

Mariana da Silva Ruiz

Avaliação do fenômeno de heteroresistência em isolados clínicos de *Cryptococcus neoformans*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências, da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública

Orientadora: Prof. Dra. Marcia de Souza Carvalho Melhem

São Paulo
2009

**FICHA
CATALOGRÁFICA**

Preparada pelo Centro de Documentação – Coordenadoria de
Controle de Doenças/SES-SP

©reprodução autorizada pelo autor, desde que citada a fonte

Ruiz, Mariana da Silva

Avaliação do fenômeno de heteroresistência em isolados clínicos de
Cryptococcus neoformans / Mariana da Silva Ruiz - São Paulo, 2009.

Dissertação (mestrado) - Programa de Pós-Graduação
em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da
Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo.

Área de concentração: Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública

Orientador: Márcia de Souza Carvalho Melhem

1. Micoses 2. *Cryptococcus neoformans*
3. Criptococose 4. Fluconazol 5. Testes de
sensibilidade microbiana 6. Resistência microbiana a
medicamentos

SES/CCD/CD-222/09

Dedicatória

Aos meus pais, Moacyr e Janete, que sempre estiveram presentes em todas as etapas de minha vida, sempre me apoiando em minhas decisões. Obrigada pelo incentivo, carinho, amor e confiança depositados em mim. Vocês sempre serão meus maiores exemplos

Às minhas irmãs Luciana e Adriana, pelo carinho, amizade e união em todos estes anos. Muito obrigada pelos conselhos e pela confiança

Ao meu namorado, amigo e companheiro Gustavo Rosa Monteiro, pelo amor, carinho e paciência em todos os momentos. Obrigada pelo auxílio na configuração do trabalho, pelos bons conselhos e apoio

Agradecimentos

Agradeço, primeiramente, à minha orientadora Profa. Dra. Marcia de Souza Carvalho Melhem, por todo apoio, carinho e dedicação em todos estes anos de pesquisa. Tê-la como orientadora foi um privilégio. Agradeço por tudo o que aprendi com ela nestes anos. Sua atuação em minha vida não foi só como professora e orientadora, mas também como uma amiga. Obrigada por tudo.

Aos funcionários e amigos da Seção de Micologia do Instituto Adolfo Lutz: Walderez, Antônio Strob, Dulcilena, Marilena, Sandra, Fumiko, Leonor, Andres, Hilda e Maria, pela colaboração direta ou indireta para realização deste trabalho. Obrigada pelo carinho e apoio.

Aos companheiros de pós-graduação e bolsistas Fundap: Jeane, Tânia, Lucas, Mara, Daiane, Aline, Juliana e Sônia, que compartilharam momentos de alegria, tristeza, preocupação e estresse. Obrigada pela amizade.

Aos membros da banca examinadora de qualificação do mestrado, Profa. Dra. Gisele M.D. de Almeida, Profa. Dra. Adriana Pardini Vicentini, Profa. Dra. Júlia Maria Martins de Souza Felipe, Profa. Dra. Angélica Schreiber e Profa. Dra. Marina Baquerizzo, pelas sugestões que contribuíram para este trabalho.

Aos membros da banca examinadora de defesa do mestrado, Profa. Dra. Claudete Paula Rodrigues e Profa. Dra. Angélica Schreiber, pela disponibilidade, sugestões e sábios conselhos. Muito obrigada.

Aos professores da Pós Graduação, pela dedicação e contribuição na formação profissional. Obrigada pelo carinho e paciência.

Agradeço à Dra. Maria de Fátima Costa Pires, pela dedicação e paciência durante essa fase. Obrigada pelos conselhos e atenção.

Às secretárias da Pós Graduação, Tirces e Emiliana, que sempre me atenderam com paciência e atenção. Obrigada.

À Ms. Adriana Lopes Motta, do Laboratório de Microbiologia, do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo, pelo auxílio na realização do trabalho.

À todos os meus amigos que estiveram sempre ao meu lado em todos os momentos e participaram desta fase de minha vida.

**Este trabalho teve o apoio financeiro da Fundação de
Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP
(Processo 2006/58648-2)**

RESUMO

A criptococose do sistema nervoso central é uma doença grave e fatal, principalmente, em pacientes com comprometimento do sistema imune. A resistência a antifúngicos do agente etiológico, *Cryptococcus* spp. pode contribuir para a falha terapêutica. Os objetivos deste estudo foram: avaliar a suscetibilidade de isolados clínicos de *C. neoformans*, determinar a frequência de amostras heterogêneas e heteroresistentes a fluconazol (FCZ) e investigar a ocorrência de resistência cruzada para voriconazol (VCZ). Foram avaliados 400 isolados de *C. neoformans*, provenientes de líquido de pacientes atendidos entre 1995 e 2007, em hospitais públicos da cidade de São Paulo, Brasil. Os isolados estão mantidos na coleção de cultura da Seção de Micologia do Instituto Adolfo Lutz. Foram utilizadas duas metodologias: i) técnica em ágar contendo 8µg de fluconazol por mL, ii) método de referência por microdiluição, AFST-EUCAST (Antifungal Susceptibility Testing Subcommittee of the European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing) para confirmação de heteroresistência e determinação da sensibilidade aos azóis. Observou-se 4% de isolados resistentes a fluconazol ($CIM_{\geq 16\mu g/mL}$) e nenhum a voriconazol ($CIM_{\geq 4\mu g/mL}$). Os resultados obtidos com a técnica de ágar contendo fluconazol sugeriram a presença de colônias com perfis distintos em relação à suscetibilidade à esta droga, em todos os isolados. Entretanto, este dado não foi confirmado pelo método de referência AFST-EUCAST, no qual isolados heterogêneos (26,5%) e heteroresistentes (6,25%) foram encontrados em menores taxas. O método em ágar, portanto, não apresentou resultados satisfatórios para indicar heteroresistência e esforços devem ser direcionados para definir um método otimizado que indique e quantifique heteroresistência em isolados de *C. neoformans*. Neste estudo foi demonstrada, pela primeira vez a ocorrência de heteroresistência em isolados brasileiros de *C. neoformans*. Os fenótipos resistentes a FCZ não apresentaram resistência cruzada a VCZ, indicando a melhor eficácia, *in vitro*, deste novo azol. Além disso, foi observado que a sensibilidade dos isolados a fluconazol foi alta, em concordância com dados da literatura nacional.

Palavras-chave: *Cryptococcus neoformans*, sensibilidade a antifúngicos, fluconazol, heteroresistência, ASFT-EUCAST.

ABSTRACT

The central system nervous cryptococcosis a serious lethal disease, particularly, among immune compromised patients. The antifungal resistance of the etiologic agent, *Cryptococcus* spp. could contribute to clinical failure. The aim of this study was to: evaluate the susceptibility to fluconazole (FCZ) of *C. neoformans* clinical isolates, determine the frequency of heterogeneous and heteroresistant samples and investigate the occurrence of cross-resistance between FCZ and voriconazole (VCZ). We have studied 400 isolates of *Cryptococcus neoformans* isolated from cerebrospinal fluid and blood of patients hospitalized between 1995 and 2007, at public hospitals in São Paulo city, Brazil. The isolates are maintained in the culture collection of the Mycology Section of the Institute Adolfo Lutz. Two methodologies were employed: i) an agar methodology containing 8µg of FCZ per mL, ii) microdilution reference method AFST-EUCAST (Antifungal Susceptibility Testing Subcommittee of the European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing) in order to confirm the heteroresistance occurrence, and to determine the azole antifungal susceptibility profile. We observed 4% of resistant isolates to fluconazole (CIM>16µg/mL), and any voriconazole-resistant isolate (CIM≥4µg/mL). The agar medium test suggested occurrence of colonies with distinct susceptibility patterns in all isolates. Otherwise, these findings were not confirmed through AFST-EUCAST reference methodology, in with heterogeneous isolates (26.3%) and heteroresistant isolates (6.25%) were found in lower rates. So, the agar medium test did not show a good performance to assessed heteroresistance, and efforts should be addressed to define a optimized method for detect and measure heteroresistance in *C. neoformans* isolates. In this study we showed, by first time the occurrence of heteroresistance in Brazilian *C. neoformans* isolates. The fluconazole-resistant phenotypes did not show cross-resistance to voriconazole stressing the higher efficacy of this new azole agent. Furthermore, we observed the high fluconazole-susceptibility of *C. neoformans* isolates in agreement with national data.

Key-words: *Cryptococcus neoformans*, antifungal susceptibility, fluconazole, heteroresistance, ASFT-EUCAST

Lista de abreviaturas

C. neoformans - *Cryptococcus neoformans*

C. gattii - *Cryptococcus gattii*

FCZ - Fluconazol

VCZ - Voriconazol

AMB - Anfotericina B

5-FC - 5-fluorocitosina

GXM - Glicuronoxilomanose

GalXM - Galactoxilomanose

kDa - kiloDalton

SNC - Sistema Nervoso Central

HAART - Terapia Antiretroviral de Alta Potência; “Highly Active Antiretroviral Therapy”

LCR - Líquido Cefalorraquideo; Líquor

NCCLS - “National Committee for Clinical Laboratory Standards”

CLSI - “Clinical Laboratory Standards Institute”

EUCAST - “European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing”

CIM - Concentração Inibitória Mínima

UFC - Unidade Formadora de Colônia

D.O - Densidade Ótica

ATCC - “American Type Culture Collection”

Lista de Tabelas

Tabela 1. Concentrações de fluconazol (FCZ) e voriconazol (VCZ) para testes de suscetibilidade *in vitro* por método de microdiluição..... **18**

Tabela 2. Resultados de concentração inibitória mínima (CIM) de fluconazol frente aos 400 isolados originais de *C. neoformans* e respectivas colônias pequenas e grandes, segundo intervalo, CIM₅₀, CIM₉₀, média e moda dos valores..... **26**

Tabela 3. Resultados de concentração inibitória mínima (CIM) de voriconazol frente aos 400 isolados originais de *C. neoformans* e respectivas colônias pequenas e grandes, segundo intervalo, CIM₅₀, CIM₉₀, média e moda dos valores. **26**

Lista de Figuras

Figura 1. Placa de microtitulação para teste de sensibilidade a antifúngicos.....	19
Figura 2. Placa representando o crescimento de colônias de distintos tamanhos	24
Figura 3. Sensibilidade a fluconazol e voriconazol de 400 isolados originais de <i>Cryptococcus neoformans</i> , utilizando teste de microdiluição	27
Figura 4. Distribuição do número de colônias P por CIM de fluconazol ..	27
Figura 5. Distribuição do número de colônias G por CIM de fluconazol..	28
Figura 6. Distribuição do número de colônias G por CIM de voriconazol	28
Figura 7. Distribuição do número de colônias G por CIM de voriconazol	29
Figura 8. Correlação entre os CIMs de fluconazol para colônia pequena e colônia original.....	29
Figura 9. Correlação entre os CIMs de fluconazol para colônia grande e colônia original	30
Figura 10. Correlação entre os CIMs de fluconazol para colônia pequena e colônia grande	30

Índice

1. Introdução.....	1
1.1 <i>Cryptococcus neoformans</i>	1
1.2 Criptococose.....	2
1.3 Drogas antifúngicas e tratamento da criptococose.....	4
1.4 Resistência e heteroresistência de <i>C.neoformans</i> a drogas antifúngicas	7
1.5 Mecanismos de resistência a antifúngicos.....	11
1.6 Determinação de resistência a antifúngicos em isolados de <i>C. neoformans</i>	11
2. Objetivos.....	14
2.1. Objetivo Geral.....	14
2.2. Objetivos Específicos	14
3. Materiais e Métodos	15
3.1 Isolados de <i>C. neoformans</i>	15
3.2 Crescimento em meio contendo fluconazol.....	15
3.3 Teste de sensibilidade a antifúngicos	16
3.3.1 Pesagem das substâncias antifúngicas e preparo das soluções-mãe	17
3.3.2 Preparo das placas de microdiluição	
3.3.3 Preparo do inóculo.....	19
3.3.4 Incubação	20
3.3.5 Controle de Qualidade.....	20
3.3.6 Leitura dos resultados	20
3.4 Interpretação dos resultados.....	21
3.5 Análise dos resultados.....	21
3.6 Análise estatística.....	21
4. Resultados.....	23

4.1 Testes de sensibilidade a antifúngicos por microdiluição para isolados originais	23
4.2 Crescimento dos isolados originais em meio contendo fluconazol.....	24
4.3 Testes de sensibilidade a antifúngicos por microdiluição para colônias derivadas (P e G)	24
5. Discussão	31
6. Conclusões.....	39
7. Referências Bibliográficas	40

1. Introdução

1.1 *Cryptococcus neoformans*

Cryptococcus neoformans, levedura encapsulada, pertence ao grupo dos basidiomicetos e tem essa denominação na sua fase anamorfa, ou assexuada, e *Filobasidiella neoformans* na fase teleomorfa, ou sexuada (Lacaz *et al.*, 2002). As principais fontes do fungo são excrementos de pombos e solo contendo acúmulo de fezes de aves (Casadevall & Perfect, 1998).

C. neoformans apresenta cápsula formada por um polissacarídeo viscoso, do qual glicuronoxilomanose (GXM) é o principal componente, seguido por galactoxilomanose (GalXM) e manoproteínas. GXM consiste de uma cadeia principal linear de polímeros de manose, substituídos com monossacarídeos de ácido glicurônico e xilose, com peso molecular aparente de 1000 kDa. GalXM é menor, aproximadamente 100 kDa, e consiste em um polímero constituído, principalmente, por galactose na cadeia principal, com cadeias laterais contendo galactose, manose e xilose (Mitchell e Perfect, 1995; Casadevall e Perfect, 1998; Buchanan e Murphy, 1998; Ma & Mody, 2002).

Até recentemente, consideravam-se duas variedades do agente etiológico da criptococose: *C. neoformans* var. *neoformans* (sorotipos A e D) e *C. neoformans* var. *gattii* (sorotipos B e C) (Kwon-Chung *et al.*, 1982). Atualmente, são aceitas duas espécies distintas, *C. neoformans* e *C. gattii*, diferenciadas por técnicas de análise genotípica (Kwon-Chung *et al.*, 2006). A primeira espécie compreende os sorotipos A (var. *grubii*), D (var. *neoformans*) e AD, e a segunda, os sorotipos B e C (Kwon-Chung *et al.*, 1982). As infecções causadas por *C. neoformans* ocorrem com maior frequência em indivíduos que apresentam deficiência no sistema imunológico, enquanto, as produzidas por *C. gattii* são observadas, principalmente, em indivíduos imunocompetentes (Kwon-Chung *et al.*, 1992; Mitchell & Perfect, 1995).

No estudo de patógenos, é importante a descrição de patogenicidade e virulência que, em definição simples, podem ser entendidas como a habilidade do microrganismo em superar as defesas naturais do hospedeiro e desenvolver uma doença de maior ou menor gravidade (Casadevall & Perfect, 1998). Uma

característica básica de patogenicidade para a sobrevivência dentro do organismo humano é a capacidade de crescer a 37°C. Este fator está relacionado com a produção de calcineurina (fosfatase) que modula o estresse causado pelo aumento da temperatura. Isolados de *C. neoformans* mutantes de calcineurina, são capazes de crescer a 24 °C, mas não a 37 °C. A virulência, por sua vez, é resultante de uma somatória de fatores característicos de *Cryptococcus* spp que contribui para a gravidade da apresentação clínica da criptococose. Um dos fatores comprovados de virulência é a produção de cápsula. Esta estrutura é formada por um polissacarídeo, a glucuroxilomanana (GXM), que define os distintos sorotipos da levedura. Esta substância impede o reconhecimento de antígenos de parede por células efetoras da resposta imune, como monócitos e macrófagos. Outros produtos formados por células de *C. neoformans* são galactoxilomanana e manoproteínas que estão relacionadas à gravidade da doença. A formação de melanina, por ação da fenoloxidase sobre compostos fenólicos, é uma característica comprovada em culturas de *C. neoformans* e *C. gattii*. Esta habilidade é reconhecida como um fator de virulência por sua ação antioxidante. A melanina, ainda, tem a propriedade de dificultar a fagocitose pelos macrófagos e aumentar a resistência das células contra a ação do antifúngico anfotericina B. O manitol, substância produzida por células de *C. neoformans*, tem também, poder antioxidante e capacidade de induzir edema *in vivo*, o que implica em mais um fator de virulência. Outra substância produzida, com ação oxidante, é a enzima superóxido dismutase, com potencial para um fator de virulência (Dias *et al.*, 2006). A produção de enzimas capazes de lisar proteínas (proteínases), fosfolípidos (fosfolipases) e colágeno (colagenases) são produzidas *in vitro* por isolados de *C. neoformans* e podem ser importantes na fase de instalação da infecção (Buchanan e Murphy, 1998; Kurokawa *et al.*, 1998; Ma & Mody, 2002).

1.2 Criptococose

Cryptococcus neoformans é o principal agente etiológico da criptococose, caracterizada por infecção sub-aguda ou crônica, acometendo

sobretudo pulmões, tecido cutâneo e meninges. Dependendo das condições do sistema imune do hospedeiro, do tamanho do inóculo e da virulência do isolado, a criptococose pode ser assintomática, sendo contida logo no estágio pulmonar, ou pode ocorrer disseminação para outros órgãos e acometimento do Sistema Nervoso Central (SNC) com risco de morte do hospedeiro (Bicanic *et al.*, 2006). O comprometimento do SNC, causando meningoencefalite, é conhecido como a manifestação mais grave da doença (Perfect e Casadevall, 2002). O diagnóstico da criptococose no SNC pode ser realizado através do exame micológico direto com preparação da tinta da china, através da cultura para fungos e através do antígeno criptocócico liquórico. O padrão ouro para o diagnóstico é a cultura, sendo positiva em 89 % dos pacientes não infectados pelo HIV e em 95% a 100% dos pacientes com Aids (Consenso em criptococose – 2008).

O neurotropismo pode ser explicado, parcialmente, pela presença de catecolaminas no SNC, como dopamina e norepinefrina. Tais substâncias atuam como substrato para síntese de melanina pela levedura, importante na proteção contra o sistema oxidativo de defesa do hospedeiro (Buchanan & Murphy, 1998). Recentemente, a assimilação de inositol foi citada como um possível fator adicional para o tropismo de células fúngicas de *C. neoformans* pelo SNC (Reynolds *et al.*, 2009).

Os primeiros relatos do comportamento oportunista de *C. neoformans* ocorreram na década de 50, notadamente em portadores de doenças como leucemias, linfomas, mielomas, sarcomas, doenças do colágeno e sarcoidose (Mendes *et al.*, 1989). A criptococose era considerada como micose de ocorrência esporádica, afetando tanto humanos quanto animais, em todo o mundo. Porém, sua importância médica aumentou drasticamente após a década de 80, em virtude do surgimento da Aids (Kwon-Chung & Bennett, 1992).

Criptococose, assim como outras micoses, não é doença de notificação compulsória em nosso país; assim sendo, o cálculo de frequência é impossível de ser realizado. No entanto, dados da doença quando associada à Aids, estão disponibilizadas em Boletins Epidemiológicos do Ministério da Saúde que, até 2002, traziam distribuição de casos segundo doença oportunista concomitante. Assim, os novos casos de Aids quando notificados apresentavam criptococose em cerca de 6%. Portanto, se de 1980 a 2002, 215.810 casos de Aids foram

registrados no Brasil, cerca de 13.000 deles tinham criptococose, sendo São Paulo o Estado com maior incidência da doença (Ministério da Saúde do Brasil, 2002).

Embora a introdução da terapia antiretroviral, para tratamento dos casos de Aids, diminuiu a incidência da criptococose, a doença ainda tem grande impacto na mortalidade dessa população, especialmente em países em desenvolvimento (Delgado *et al.*, 2005; Branchini & Papaiordanou, 2000; Pappalardo & Melhem, 2003; Pappalardo *et al.*, 2007; Horta *et al.*, 2002; Igreja *et al.*, 2004). Estudo realizado com 1.255 pacientes atendidos em clínicas especializadas nos Estados Unidos demonstrou redução na taxa anual de mortalidade, de aproximadamente 29,4% para 8,8%, no período de 1994 a 1997 (Palella *et al.*, 1998). O restabelecimento imunológico dos pacientes foi acompanhado pela diminuição da incidência da criptococose em muitos países. Houve também redução na prevalência de algumas doenças associadas à Aids, tais como: citomegalovirose, micobacterioses, criptosporidioses, além da criptococose (Manfredi & Chiodo, 2000). No Brasil, a taxa de mortalidade em pacientes com criptococose, com ou sem doença de base, varia em torno de 45 a 65 %, segundo revisão efetuada por Pappalardo & Melhem (2003).

A meningite criptocócica, que constitui um desafio na prática médica, é de difícil controle em pacientes imunocomprometidos, mesmo com a aplicação de terapia com antifúngicos (Xu *et al.*, 2001, Aller *et al.*, 2000, Jessup *et al.*, 1998; Pappalardo *et al.*, 2007).

1.3 Drogas antifúngicas e tratamento da criptococose

Nos últimos anos, novos antifúngicos da classe dos azóis foram sintetizados para tratamento das micoses sistêmicas em geral, como: voriconazol, posaconazol e ravuconazol, além dos que pertencem à classe das equinocandinas, como caspofungina e micafungina (Perfect & Casadevall, 2002). Contudo, os antifúngicos mais importantes são os polienos, azólicos e análogos de pirimidinas, sendo seus representantes principais, respectivamente, anfotericina B, fluconazol e 5-fluorocitosina (Powderly 1996; Graybill, 1996; Sanglard, 2002).

A 5-fluorocitosina (5-FC) é indicada como terapia combinada à anfotericina B (AMB), na fase inicial da criptococose de sistema nervoso central (SNC). Porém ela não deve ser usada como terapia única, desde que, a resistência à droga é alta em cepas *Cryptococcus* spp (Saag *et al.*, 2000). Apesar da 5-FC não ser comercializada há anos no Brasil, ela continua a ser empregada nos continentes norte-americano e europeu, pois há evidências clínicas em número suficiente, que mostram o grande benefício da sua associação com AMB, pelo menos nas duas primeiras semanas de tratamento. As diretrizes norte-americanas para o manejo de criptococose, o consenso brasileiro de criptococose (Kon *et al.*, 2008) e outros autores também endossam esse parecer, visando à rápida esterilização do LCR (Saag *et al.*, 2000; Bicanic *et al.*, 2004; Dromer *et al.*, 2007)

A anfotericina B é medicação de grande valor no tratamento da criptococose (Lacaz *et al.*, 2002; Barchiesi *et al.*, 2001). O emprego da AMB é recomendado na fase inicial do processo infeccioso, também conhecida como fase de indução ou fase de ataque da criptococose. A fase de indução tem por objetivo a negatização ou redução efetiva da carga fúngica, tendo como período mínimo de tratamento de duas semanas. Apesar da alta capacidade fungicida da AMB, sua toxicidade leva à insuficiência renal e, por isso, em pacientes imunocomprometidos que necessitam longos períodos de tratamento, segue-se a fase de consolidação e manutenção com drogas menos tóxicas, como os azóis (Saag *et al.*, 1992; Sanguinetti *et al.*, 2006). A fase de consolidação compreende manutenção de negatividade micológica e normalização de parâmetros clínicos e laboratoriais, por pelo menos oito semanas. Segue-se a fase de manutenção também chamada de supressão, por mínimo de 1 ano com tempo adicional variando de acordo com a condição do estado imune do hospedeiro (Consenso em criptococose – 2008).

Os azóis são substâncias sintéticas descobertas no final da década de 60, podendo ser divididos em imidazóis (cetoconazol, miconazol, clotrimazol) e triazóis: fluconazol, itraconazol e voriconazol (Sanglard, 2002; Greer, 2003). Azóis de nova geração, como voriconazol, posaconazol e ravuconazol, apresentam excelente atividade *in vitro* contra *C. neoformans* (Perkins *et al.*, 2005; Illnait-Zaragozi *et al.*, 2008) e possuem o mesmo modo de ação do FCZ.

O mecanismo de ação dessas drogas consiste no bloqueio da enzima citocromo P450, denominada lanosterol 14 α -demetilase e codificada pelo gene *ERG11*, que está envolvida na biossíntese de ergosterol da membrana celular fúngica. Sem a formação e incorporação do ergosterol, a fluidez e a estabilidade da membrana ficam comprometidas, assim como, o crescimento e a divisão celular (Andriole, 1998; Richardson *et al.*, 1998). As drogas dessa classe, como fluconazol e itraconazol, possuem efeito predominantemente, fungistático nas concentrações terapêuticas (Joseph-Horne & Hollom, 1997; Sanglard, 2002).

Voriconazol, o mais novo triazol disponível no mercado nacional, é derivado da estrutura do fluconazol, sendo obtido pela substituição de um grupo triazólico por uma fluopirimidina e pela adição de um grupamento metil à cadeia central de propanol. Estas mudanças estruturais promoveram tanto o aumento da atividade no alvo celular (citocromo P450) bem como o aumento do espectro de ação, atuando também contra fungos filamentosos (Greer, 2003). Além de ter a vantagem sobre fluconazol pela sua formulação por via parenteral, é eficiente contra diversas espécies de leveduras patogênicas, como *C. neoformans*, e *Aspergillus spp.*, para o qual é considerado fungicida (Chiou *et al.*, 2001; Greer, 2003). Alguns estudos demonstram a eficácia de voriconazol quando comparado à outros azóis. Em 1999, Pfaller *et al* investigaram a atividade *in vitro* de voriconazol comparado a fluconazol e itraconazol, em 566 isolados biológicos de *C. neoformans*, e mostraram que o voriconazol apresentou-se mais potente do que fluconazol e itraconazol sugerindo ser eficaz no tratamento da criptococose, dentre outras infecções fúngicas invasivas. Em outro estudo, Johnson *et al.* 2008, avaliaram a sensibilidade de 1763 espécies de leveduras, dentre elas *C. neoformans*, à voriconazol, itraconazol, fluconazol e anfotericina B. O grupo concluiu que o voriconazol apresentou atividade semelhante ao itraconazol, porém, mais ativo do que fluconazol, em termos de potência e espectro de ação, para a maioria dos isolados, incluindo *C. neoformans*.

O fluconazol é o agente mais empregado na prevenção de recidivas e tratamento de infecções por *C. neoformans*. A eficácia e a segurança, aliadas à sua excelente farmacocinética fazem deste antifúngico importante opção terapêutica para criptococose, na fase de consolidação e manutenção (ou

profilática), em pacientes imunodeprimidos (Saag *et al.*, 1992; Sanguinetti *et al.*, 2006). A duração da terapia de manutenção é indefinida em pacientes com Aids, podendo ser interrompida a critério clínico, quando houver recuperação da contagem de células CD4. Porém, as recidivas são freqüentes e, por isso, justificam-se os longos períodos de terapia com azol (Dismukes, 1988, Powderly, 1993; Sanati *et al.*, 1996).

1.4 Resistência e heteroresistência de *C.neoformans* a drogas antifúngicas

O impacto da ocorrência de resistência aos antifúngicos, verificada *in vitro*, nas frequentes recidivas observadas em pacientes com neurocriptococose, é ainda indeterminado (Bicanic *et al.* 2006). Ghannoum *et al.* (1992) foram os pioneiros em demonstrar a alta sensibilidade ao FCZ de isolados de *C.neoformans* obtidos de LCR, relacionando esse achado ao sucesso do tratamento dos pacientes com criptococose associada à Aids. Porém, a ocorrência de resistência ao FCZ, pode contribuir para o fracasso terapêutico (Birley *et al.*, 1995 e Sanati *et al.*, 1996).

Alguns estudos descrevem taxas de resistência a fluconazol em isolados iniciais de pacientes não-tratados, o que sugere a possibilidade de resistência natural do agente etiológico (Franzot & Hamdan, 1996; Orni-Wasselauf *et al.*, 1999). Por outro lado, a hipótese de falha terapêutica devido a cepas com resistência adquirida, após exposição à droga, é descrita na literatura nacional e internacional (Dupouy-Camet *et al.*, 1991; Alves *et al.*, 2001).

Pacientes com Aids e neurocriptococose, submetidos à terapêutica com FCZ por longos períodos, são a população-alvo para avaliação da ocorrência de resistência adquirida, sendo comprovada em alguns deles (Paugam *et al.*, 1994; Birley *et al.*, 1995; Armengou *et al.*, 1996; Berg *et al.*, 1998). Outros estudos não evidenciaram o mesmo fato em isolados seriados, não comprovando o surgimento de resistência ao azol (Casadevall *et al.*, 1993; Brandt *et al.*, 1996; Witt *et al.*, 1996). No Brasil, Pappalardo *et al.* 2009, demonstrou a presença de isolados com perfis distintos de sensibilidade ao

fluconazol, confirmada em isolados seriados de quatro (19,05%) de 21 pacientes tratados, porém, a autora não confirmou a ocorrência de resistência adquirida, desde que, apenas um caso (25%) recebeu dose terapêutica de fluconazol. O primeiro isolado obtido do paciente que recebeu fluconazol, apresentou valor de CIM de 0,5 µg/mL e após 30 dias de exposição à droga, o segundo isolado apresentou CIM de 8 µg/mL. Nos outros três casos com cepas heteroresistentes, os pacientes fizeram uso de fluconazol durante a coleta dos isolados. Um estudo molecular permitiria analisar a correlação genética entre tais cepas, porém não foi realizado.

Coutinho *et al.* em 2006, estudando isolados brasileiros de *C.neoformans*, verificou que a exposição *in vitro* a doses de 8 µg de FCZ, induz o aparecimento de colônias com CIM superior ao da colônia inicial. Essa resistência, no entanto, foi transitória, desde que, após remoção da droga, a grande maioria dos isolados (89%) voltou a apresentar o perfil de sensibilidade da amostra original. Isolados analisados por Mondon *et al.* (1999) e Yamazumi *et al.* (2003) também reverteram ao fenótipo sensível inicial, após passagem em meio de cultura sem fluconazol.

A detecção de valores de CIM quatro vezes maior nos isolados subsequentes quando comparado ao inicial, sugere que a falha terapêutica pode ter sido pelo componente de resistência ao antifúngico, recomendando-se a troca da terapêutica. Valores de CIM \geq 16 µg/mL de fluconazol, em isolados de *Cryptococcus*, podem estar relacionados à falha terapêutica e a base da resistência permanece em estudo (Consenso em criptococose – 2008).

Os isolados de *C.neoformans*, obtidos de LCR, constituem o alvo principal das pesquisas com cepas resistentes aos antifúngicos. Devido ao tropismo de *C. neoformans* pelo SNC, o LCR é o material biológico mais utilizado para o diagnóstico laboratorial e acompanhamento da doença, desde que, vários isolados do agente etiológico podem ser obtidos sequencialmente desse material durante muitos meses. Existe a recomendação de que o primeiro isolado de *Cryptococcus* seja armazenado até um ano após o diagnóstico para que, em casos de recaída, o valor da CIM possa ser comparado (Consenso em criptococose – 2008). Dessa maneira, é possível a realização de monitoramento do perfil de sensibilidade da cepa ao longo da infecção (Mendes-Giannini & Melhem, 2001). O perfil do isolado inicial pode se

manter inalterado ou haver seleção de cepas menos sensíveis à medicação. Em pacientes com criptococose recorrente, os valores de CIM dos isolados iniciais são, em geral, idênticos aos valores de CIM dos isolados obtidos nos episódios de recorrência, sendo que, valores de CIM de ≥ 16 $\mu\text{g/mL}$ são esporadicamente encontrados frente a tais isolados, tanto na literatura nacional, quanto internacional (Pappalardo & Melhem, 2002; Strob *et al.*, 2006; Yamazumi *et al.*, 2003).

Alguns estudos realizados com métodos moleculares de análise do DNA do agente etiológico evidenciaram que as recidivas ocorrem pela cepa do episódio inicial e não por novas cepas infectantes (Brandt *et al.*, 2001; Casadevall & Perfect, 1998).

A possibilidade de alteração molecular por mutação genética também foi aventada, recentemente, em estudos com cepas brasileiras (Martins *et al.*, 2007). Com o propósito de identificar genes envolvidos na resistência a azóis de *Cryptococcus neoformans*, Posteraro *et al.* 2003 obtiveram a cepa mutante BPY22-17 resistente a FCZ, a partir do isolado clínico sensível BPY22, por exposição *in vitro* à droga. Em seguida, um procedimento de hibridização foi utilizado para comparar a expressão gênica entre as cepas obtidas.

Questiona-se, portanto, se a cepa inicial desenvolveu resistência após a exposição prolongada à droga, ou seja, resistência adquirida ou, se houve seleção de células resistentes que estavam presentes na amostra inicial isolada de líquido cefalorraquidiano, ou mesmo se houve mescla de cepas com distintos perfis de sensibilidade.

A questão do perfil distinto de sensibilidade de *C. neoformans* a FCZ, classificada como heteroresistência, foi investigada por diversos autores. Em 1999, Mondon *et al.*, relataram que o fenômeno de heteroresistência estava associado à recorrência da criptococose. Neste estudo, o grupo observou que as 7 amostras de *C. neoformans* avaliadas, apresentaram composição heterogênea, sendo que, a maioria das células era sensível, porém, algumas delas foram resistentes a FCZ (CIM ≥ 64 $\mu\text{g/mL}$). Em 2000, Xu *et al.*, estudaram colônias mutantes obtidas de 21 amostras de *C. neoformans*, e verificaram que estas colônias apresentaram valores de CIM diferentes de suas amostras iniciais. Em outro estudo, feito por Yamazumi *et al.* (2003), foi observado que culturas de *C. neoformans* apresentaram células com distintos perfis de

sensibilidade ao FCZ, caracterizando a heteroresistência a essa droga. Nesse estudo, o grupo utilizou o método de plaqueamento em meio PDA (Potato Dextrose Agar) contendo várias concentrações de FCZ e classificaram como heteroresistentes, as amostras que apresentaram crescimento em meio contendo concentrações de 4 a 8 vezes maior do que o valor de CIM da amostra.

Recentemente, Sionov *et al.* (2009), consideraram heteroresistência como sendo a ocorrência simultânea de clones com sensibilidade distinta a fluconazol em um único isolado de *C. neoformans*. A definição de heteroresistência não contempla apenas clones resistentes (CIM $\geq 16 \mu\text{g/mL}$) e não-resistentes, mas inclui também, clones que apresentam sensibilidade distinta frente a uma determinada concentração de antifúngico. Para isso, Sionov *et al.* (2009) utilizaram placas de Petri contendo ágar adicionado de diversas concentrações de fluconazol nas quais foram semeados os 130 isolados de *C. neoformans*. Quando os autores observavam diminuição parcial de crescimento, por técnica de unidades formadoras de colônias, esta concentração era a determinante de heteroresistência. Além disso, classificaram os 130 isolados em duas categorias de heteroresistência: alta ($\geq 32 \mu\text{g/mL}$) e baixa ($\leq 8 \mu\text{g/mL}$), englobando 4 sub-classes (4 $\mu\text{g/mL}$, 8 $\mu\text{g/mL}$, 16 $\mu\text{g/mL}$ e $\geq 32 \mu\text{g/mL}$). Talvez, a ocorrência de heteroresistência, contribua para a falha clínica de casos tratados com fluconazol (Yamazumi *et al.*, 2003).

Os altos valores de CIM para fluconazol são acompanhados de altos valores de CIM para outros azóis, incluindo voriconazol, em estudos com *Candida albicans*. Este fato é descrito entre azóis, por apresentarem o mesmo mecanismo e sítio de ação. Em um dos primeiros trabalhos que descreveram essa ocorrência, os autores observaram falha clínica em caso submetido à terapia com cetoconazol, droga imidazólica usada para micoses cutâneas, sendo que o isolado mostrou-se pouco sensível *in vitro*, não somente ao cetoconazol, mas também ao FCZ (Birley *et al.*, 1995). Outros estudos descreveram cepas de *C. neoformans* com resistência cruzada para azóis. Cepas resistentes a fluconazol, itraconazol e/ou voriconazol foram encontradas em isolados clínicos de casos tratados (Sanati *et al.*, 1996; Perkins *et al.*, 2005). Para *C. neoformans* são poucos os estudos sobre essa ocorrência, mas pode haver desenvolvimento de resistência a uma droga, após exposição à

outra de mesma categoria, o que se denomina resistência cruzada, que pode acarretar sérias implicações no tratamento da criptococose. Yildiran *et al.* (2002) alertaram para a tendência de resistência cruzada entre azóis, frente a cepas de *C. neoformans*.

1.5 Mecanismos de resistência a antifúngicos

Os mecanismos de resistência descritos em isolados de *C. neoformans* têm como base, três enfoques. O primeiro consiste na alteração na composição de esteróis da membrana celular fúngica, sendo que a resistência adquirida a anfotericina B está associada a esse mecanismo. A redução no conteúdo de ergosterol na membrana e, conseqüentemente, o aumento de seus precursores (ergostadienol e ergostenol) faz com que a levedura perca o sítio de ação da anfotericina, tornando-se resistente à droga (Sanglard, 2002). Um segundo mecanismo de resistência consiste no aumento de expressão gênica e produção de bombas de expulsão de drogas. Em 1997, Thornewell *et al.* identificaram, clonaram e caracterizaram o gene *MDR1* do isolado M1-106 de *C. neoformans*. Este gene codifica a proteína transportadora-ABC, relacionada à multiresistência a antifúngicos, que promove a retirada de drogas do interior da célula fúngica. Outro mecanismo envolve a alteração da enzima 14- α -demetilase do citocromo P450, por mutação do gene *ERG11* (Sanguinetti *et al.*, 2006; Almeida *et al.*, 2007). Rodero *et al.* (2003) verificaram que a substituição de um aminoácido alterou a configuração dessa enzima, em um isolado de *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*, sendo responsável pelo desenvolvimento de resistência secundária ao fluconazol.

1.6 Determinação de resistência a antifúngicos em isolados de *C. neoformans*

Os relatos de cepas de *C. neoformans* resistentes às drogas antifúngicas, intensificaram a necessidade de avaliação *in vitro* do seu perfil de sensibilidade, com uso de testes de sensibilidade (Kobayashi *et al.*, 2005).

A sensibilidade aos antifúngicos é mensurada *in vitro* pela determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) da droga frente ao agente etiológico. O método de referência para determinação de CIM fundamenta-se na diluição da droga em meio líquido, que pode ser na forma de macrodiluição, realizada em tubos de ensaio, ou de microdiluição, executada em placas de microtitulação. O método foi desenvolvido, após muitos estudos pelo Comitê Norte-Americano *National Committee for Clinical Standards Laboratory-NCCLS*, hoje CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute) que culminaram na publicação de documentos denominados M27, inicialmente, desenvolvidos somente para o gênero *Candida*. Em 2002 o documento M27-A2 (NCCLS, 2002) abrangeu também o gênero *Cryptococcus* em sua metodologia e foi atualizado no final de 2008 nas publicações M27-A3 e S3 (CLSI, 2008) que incluem proposta de *breakpoint* para voriconazol e equinocandinas e procedimentos para novos azóis (posaconazol e ravuconazol).

No continente europeu, o comitê respectivo ao CLSI e que determina parâmetros em microbiologia clínica (European Society Committee on Microbial Diseases-ESCMID) designou uma subcomissão técnica para avaliar metodologias para testes com antifúngicos (*European Committee for Antifungal Susceptibility Testing, EUCAST*). Em 2002, esse grupo publicou o documento Dis. E. 7.1 que recomenda algumas modificações no protocolo de referência M27-A, nos testes realizados com leveduras do gênero *Candida*. Dentre os itens propostos destacam-se: aumento do inóculo e da concentração de glicose no meio de cultura, no intuito de melhorar o crescimento microbiano e antecipar a leitura; e a leitura espectrofotométrica que proporciona aumento da objetividade e rastreabilidade dos resultados. Em anos seguintes, essas modificações foram avaliadas em trabalhos multicêntricos, para verificar a correlação de resultados, com os obtidos no método CLSI, além de atestar sua alta reprodutibilidade e os resultados indicaram que o método europeu, permite resultados mais rápidos e leitura mais objetiva do que o norte-americano (Cuenca-Estrella et al, 2002; Espinel-Ingroff *et al.*, 1998).

O consenso brasileiro em criptococose indica que *C.neoformans* com $CIM_{\geq 16\mu g/mL}$ para FCZ pode estar associado com falha terapêutica (Consenso de Criptococose – 2008). Este valor é considerado, por alguns autores, como significativo para distinguir cepas associadas à falha clínica e foi

adotado para determinar o ponto de corte (*breakpoint*) para classificar cepas resistentes (Aller *et al.*, 2000).

Desde que, não há consenso no valor de *breakpoint* de fluconazol para isolados de *C. neoformans* e que a grande maioria dos estudos mostra que cepas clínicas são inibidas frente a baixas concentrações (4 µg/mL) da droga, foi proposto o valor de CIM de 16 µg/mL para classificar isolados resistentes (Aller *et al.*, 2000). Raros são os estudos que demonstram elevadas taxas de CIM acima de 16 µg/mL, destacando-se os trabalhos de Bicanic *et al.* (2006), Sar *et al.* (2004) e Perkins *et al.* (2005). No Brasil, estudos com cepas expostas ao FCZ, como o realizado por Coutinho *et al.* (2006) e Pappalardo (2009) indicam índices de até 16 % de cepas para os quais o CIM de FCZ foi 16 µg/mL.

O monitoramento da resistência do agente da criptococose, aos antifúngicos utilizados na prática médica, enfocando diversos aspectos, tais como a heteroresistência e a resistência cruzada pode fornecer bases para avaliação da ocorrência de falha terapêutica e quadros recidivantes dessa micose.

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

- Analisar o perfil de sensibilidade de *Cryptococcus neoformans* a fluconazol e voriconazol.

2.2. Objetivos Específicos

- Determinar a sensibilidade de 400 isolados de *C. neoformans* aos antifúngicos fluconazol e voriconazol;
- Investigar a ocorrência dos fenômenos de heteroresistência e heterogeneidade de *C. neoformans* a fluconazol;
- Avaliar a ocorrência de resistência cruzada de *C. neoformans* frente a fluconazol e voriconazol.

3. Material e Métodos

3.1 Isolados de *C. neoformans*

Quatrocentos isolados de *C. neoformans* foram selecionados, aleatoriamente, da micoteca da Seção de Micologia do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo. As amostras foram obtidas de líquido cefalorraquidiano (LCR) de 400 pacientes com criptococose, atendidos em unidades hospitalares do estado de São Paulo, no período de 12 anos (1995 a 2007).

A identificação da espécie, realizada anteriormente a este estudo, foi feita por análise das características bioquímicas, em provas de assimilação de fontes de carbono e nitrogênio. Os caracteres morfológicos foram estudados segundo a metodologia descrita por Fell & Statzell-Tallman, 1998. Cepas caracterizadas como *Cryptococcus* spp foram submetidas ao cultivo em meio CGB (canavanina, glicina e bromotimol), assim como a prova de assimilação de D-prolina (Kwon-Chung & Benett, 1992), para a diferenciação das duas espécies.

Os isolados, conservados à temperatura de -20°C em meio infusão-cérebro-coração (Difco Laboratories, Detroit, Mi, USA) com glicerol 30%, foram descongelados e repicados em ágar Sabouraud (Difco Laboratories, Detroit, Mi, USA) com cloranfenicol, para verificar sua viabilidade e pureza.

3.2 Crescimento em meio contendo fluconazol

As 400 amostras de *C. neoformans* foram submetidas ao teste de triagem, ou seja, ao plaqueamento em ágar batata dextrose (Difco Laboratories, Detroit, Mi, USA) acrescido de 8 µg/mL de FCZ (Xu *et al.*, 1998; Xu *et al.*, 2000; Yamazumi *et al.*, 2003), com a finalidade de se obter colônias de tamanhos distintos.

De cada um dos 400 isolados, foi obtida uma suspensão em salina estéril 0,145 mol/L (8,5 g/L NaCl; salina a 0,85%), e a turbidez ajustada de acordo com a escala 0,5 de McFarland. Em seguida, foi realizado o

plaqueamento em ágar batata dextrose (Difco Laboratories, Detroit, Mi, USA) acrescido de 8 µg/mL de FCZ. Após 72 h a 35°C, os isolados foram avaliados quanto ao crescimento de colônias de distintos tamanhos. As colônias que apresentaram diâmetro menor do que 4 mm foram classificadas como pequenas (P) e àquelas cujo diâmetro foi maior ou igual a 4 mm, foram classificadas como grandes (G). Após o crescimento de colônias P e G, estas foram semeadas separadamente em ágar Sabouraud (Difco Laboratories, Detroit, Mi, USA) sem cloranfenicol e incubadas a 35°C por 72h, para realização dos testes de sensibilidade a antifúngicos, segundo o recomendado por AFST-EUCAST (Antifungal Susceptibility Testing Subcommittee of the European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing, 2002).

A classificação das colônias em P e G e seus respectivos diâmetros, ou seja, < 4 mm e ≥ 4 mm, foi sugerida de acordo com experiência prévia na Seção de Micologia do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo. Observou-se que em ágar contendo 8 µg/mL de fluconazol, isolados de *Cryptococcus neoformans* apresentavam colônias com distintos diâmetros e que, por isso, poderiam ser separadas em dois grupos: grandes e pequenas. Análise preliminar mostrou que as colônias com 4 mm ou mais, apresentaram-se menos sensíveis, segundo os testes de sensibilidade por microdiluição EUCAST (Strob, comunicação pessoal)

3.3 Teste de sensibilidade a antifúngicos

Os 400 isolados originais e suas respectivas colônias derivadas P e G (800), totalizaram 1200 isolados, os quais foram submetidos ao teste de sensibilidade por método de microdiluição, segundo o descrito no documento E. Dis. 2.1 do grupo europeu EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing). Os testes foram realizados com FCZ (Janssen-Cilag) e VCZ (Pfizer) de modo simultâneo.

Os valores de CIM de FCZ para cada amostra original foram comparados aos obtidos em suas colônias P e G. Além disso, valores de CIM obtidos para as colônias P foram comparados aos das colônias G. As CIMs

foram analisadas segundo moda, média, intervalo, CIM₅₀ e CIM₉₀, os quais representam, respectivamente, o valor de CIM que inibiu 50% e 90% dos isolados.

3.3.1 Pesagem das substâncias antifúngicas e preparo das soluções-mãe

Os antifúngicos, fluconazol e voriconazol, foram doados em forma pura p.a. pelas empresas Laboratórios Pfizer (EEUU) e Janssen-Cilag (EEUU), respectivamente. Os antifúngicos foram pesados em balança analítica calibrada para preparação de soluções-mãe. A quantidade de pó, ou diluente, necessária para o preparo da solução-mãe foi determinada de acordo com a seguinte equação:

$$\text{Peso (mg)} = \frac{\text{Volume (mL)} \times \text{Concentração } (\mu\text{g/mL})}{\text{Potência da substância } (\mu\text{g/mg)}}$$

O volume escolhido para o preparo da solução-mãe de cada antifúngico foi de 30 mL. A potência, de acordo com o fabricante, é de 100% e a concentração é de 5120 µg/mL para FCZ e 1600µg/mL para VCZ. Após a pesagem, FCZ e VCZ foram diluídos em 30 mL de água destilada e dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, Missouri,USA), respectivamente. Foram dispensados aproximadamente 2mL da solução em frascos de polietileno ou polipropileno previamente esterilizados e posteriormente estocados a -70°C até o momento do uso.

3.3.2 Preparo das placas de microdiluição

Para o preparo das placas de microdiluição (96 orifícios, poliestireno, fundo chato, modelo 92096, Techno Plastic Products AG, Switzerland) (**Figura 1**), foram feitas 10 diluições diferentes a partir da solução-mãe de cada antifúngico. Foram enumerados 10 tubos de ensaio contendo volumes

diferentes de meio RPMI (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, Missouri, USA) para diluição do FCZ e DMSO para diluição do VCZ. A concentração final de cada tubo variou de 64 a 0,125 µg/mL para FCZ e de 8 a 0,015 µg/mL para VCZ (**Tabela 1**). Cada placa correspondeu a um antifúngico e as diluições das drogas foram distribuídas em alíquotas de 100µL da coluna 2 a 11 das placas de microdiluição, de modo que cada coluna corresponde a uma concentração do antifúngico. A maior concentração encontra-se na coluna 2 e a menor na coluna 11. A coluna 1 foi destinada ao controle de esterilidade, contendo apenas 200 µL de meio RPMI e a coluna 12 destinada ao controle de crescimento, contendo 100µL de RPMI e 100 µL de inóculo de cada amostra. As colunas 1 e 12 são preenchidas apenas no momento da realização do teste. As placas foram vedadas e conservadas à temperatura de -70°C, até o momento do uso, por período máximo de seis meses (Rodriguez-Tudela *et al.*, 2002).

Tabela 1. Concentrações de fluconazol (FCZ) e voriconazol (VCZ) para testes de sensibilidade *in vitro* por método de microdiluição, segundo EUCAST

Antifúngico	Concentração em µg/mL									
	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
FCZ	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125
VCZ	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,06	0,03	0,015

Coluna 2, maior concentração; coluna 11, menor concentração; colunas 3 a 10, concentrações intermediárias de cada antifúngico

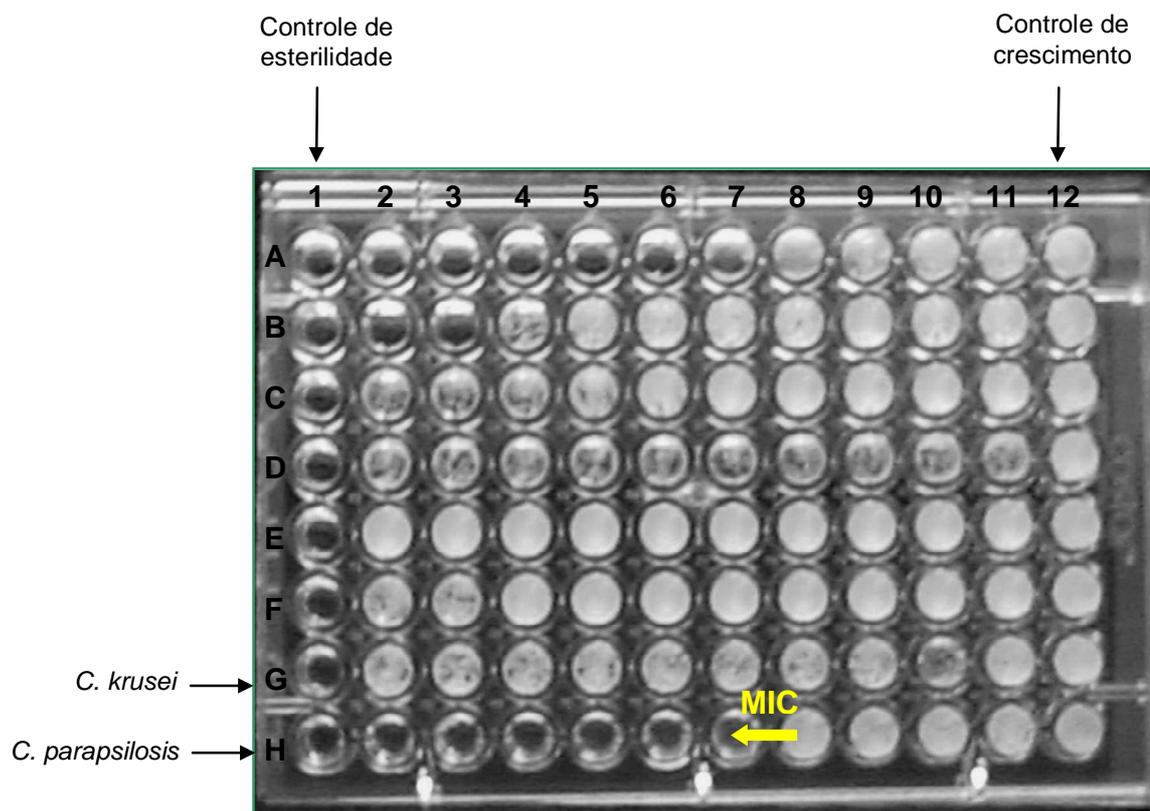


Figura 1. Placa de microtitulação para teste de sensibilidade a antifúngicos contendo FCZ ou VCZ; coluna 1, controle de esterilidade; colunas 2 a 11, FCZ ou VCZ em concentrações conforme abaixo; coluna 12, controle de crescimento; fileiras A-F: inóculos de 6 leveduras; fileira G, inóculo de cepa-padrão *C. krusei* (ATCC 6258); fileira H, inóculo de cepa-padrão *C. parapsilosis* (ATCC 22019). A seta indica a concentração inibitória mínima.

3.3.3 Preparo do inóculo

O inóculo de cada amostra de *C. neoformans* foi preparado retirando-se colônias isoladas, com auxílio de alça descartável, do ágar Sabouraud sem cloranfenicol, após 48 h de incubação a 35°C e suspensas em 5 mL de solução salina estéril 0,145 mol/L (8,5 g/L NaCl; salina a 0,85%). A turbidez da suspensão foi ajustada de acordo com a escala 0,5 de McFarland ($1-5 \times 10^6$ ufc/mL), preparada pelo setor de Meio de Cultura do Instituto Adolfo Lutz. Dessa suspensão realizou-se uma diluição 1:10 em RPMI 1640 sem bicarbonato e com L-glutamina (Cultilab, Campinas, São Paulo, Brasil), tampão

MOPS (morpholinepropanesulfonic) (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, Missouri, USA) e 2% de glicose para obtenção do inóculo a ser usado na placa. Em seguida, foram dispensados 100 µL de cada inóculo nos orifícios das colunas de 2 a 12. A coluna 12, usada como controle de crescimento, é isenta de droga, sendo acrescido, além do inóculo, 100 µl de meio RPMI. A coluna 1, usada como controle de esterilidade, isenta de antifúngico e inóculo, foi acrescida com 200 µl de meio RPMI 1640. As fileiras de A a H correspondem a uma levedura cada, sendo as fileiras G e H representadas pelas cepas padrões *Candida krusei* (ATCC 6258) e *Candida parapsilosis* (ATCC 22019), respectivamente.

3.3.4 Incubação

As placas foram incubadas à temperatura de $35 \pm 2^\circ\text{C}$. A primeira leitura sob espectrofotômetro (Titertek Multiskan, Flow, Suécia) foi realizada após 48 horas de incubação e, se a densidade ótica da suspensão do controle-positivo ficou abaixo de 0,3 a placa foi re-incubada por mais 24 h, totalizando 72 horas de incubação. Nesse período foi efetuada leitura final da reação.

3.3.5 Controle de Qualidade

Utilizou-se em todos os testes e em todas as placas, as cepas-padrão *Candida parapsilosis*, ATCC 22019 e *Candida krusei*, ATCC 6258, cujo perfil de sensibilidade é conhecido, com valores de CIM menores que 8 µg/mL e acima de 16 µg/mL para fluconazol, respectivamente.

3.3.6 Leitura dos resultados

A turbidez de cada orifício foi avaliada em espectrofotômetro (Titertek Multiskan, Flow, Suécia) sob filtro de 492 nm.

A CIM (concentração inibitória mínima) é a concentração mais baixa do antifúngico que inibe o crescimento do microrganismo. Compara-se o

crescimento em cada concentração de antifúngico com o orifício controle de crescimento (Rodriguez-Tudela *et al.*, 1997). Para os azóis, como FCZ e VCZ, drogas de efeito fungistático, a inibição em 50% (IC₅₀) no crescimento, em relação ao controle positivo indica a CIM.

3.4 Interpretação dos resultados

Para FCZ, o valor de *breakpoint* foi de 16 µg/mL, foi adotado com base em Aller *et al.*, 2000. Portanto, um resultado de CIM $\geq 16\mu\text{g/mL}$ classificou o isolado como resistente.

Para voriconazol as categorias consideradas foram: resistente (CIM ≥ 4 µg/mL) e sensível (CIM < 4 µg/mL), de acordo com *breakpoint* definido para *Candida spp* (CLSI, 2006).

3.5 Análise dos resultados

Foi realizada comparação dos valores de CIM, obtidos por AFST-EUCAST (Cuenca-Estrella *et al.*, 2002) para as colônias P e G derivadas de um mesmo isolado. Quando esses valores diferiram em duas, ou mais, diluições o isolado foi considerado como heterogêneo.

Heteroresistência foi definida para aqueles isolados que apresentaram colônias P e G com resultados distintos (resistente e sensível) de CIM.

Os maiores valores de CIM para fluconazol, encontrados nas colônias dos isolados heteroresistentes, foram compilados para análise da taxa de resistência.

3.6 Análise estatística

Foram avaliados os valores de CIMs obtidos para os isolados originais e suas colônias derivadas, pequenas e grandes.

A análise de regressão linear (r) através do coeficiente de Pearson (IC 95%) foi utilizada para avaliar a correlação entre os resultados obtidos entre:

- valores de CIM para fluconazol das colônias pequenas e grandes
- valores de CIM para fluconazol das colônias pequenas e originais
- valores de CIM para fluconazol das colônias grandes e originais

A concordância essencial foi definida como:

Concordância essencial (CE) foi considerada quando o resultado da CIM para a colônia pequena (P) e a CIM para a colônia grande (G) de um mesmo isolado foi idêntico. A concordância essencial foi também definida para os valores da CIM do isolado original, em relação aos obtidos para colônias derivadas P ou G.

4. Resultados

4.1 Crescimento dos isolados originais em meio contendo fluconazol

Todos os isolados de *C. neoformans*, cultivados em meio ágar batata contendo 8 µg/mL de FCZ, apresentaram crescimento de colônias com diferentes diâmetros e foram classificadas, segundo este critério, como P (<4 mm) e G (≥4 mm) (**Figura 2**). Desse modo, de cada isolado original, foram obtidas duas colônias derivadas (P e G), totalizando 800 colônias para avaliação da concentração inibitória mínima (CIM).

Inicialmente, dez isolados de *C. neoformans* foram submetidos ao plaqueamento em ágar YMA (Yeast morphology agar), incubados a 35°C por 72h, contendo concentrações de 8 e 16 µg/mL de FCZ (Xu *et al.*, 2001). No entanto, os isolados não apresentaram crescimento e foram, então, submetidos ao plaqueamento em ágar batata dextrose e incubadas a 35°C por 72h (Yamazumi *et al.*, 2003).

Nesse meio de cultura, verificou-se crescimento de colônias apenas nas placas contendo 8 µg/mL de FCZ. Nessa concentração foi possível observar colônias de diâmetros distintos. Nas placas contendo 16 µg/mL de FCZ não foi verificado crescimento.

4.2 Testes de sensibilidade a antifúngicos por microdiluição para isolados originais

O teste de sensibilidade por AFST-EUCAST (Cuenca-Estrella *et al.*, 2002), para os 400 isolados originais indicou 16 (4%) fenótipos resistentes (**Figura 3**) para fluconazol. Para nove (9) isolados o resultado de CIM foi de 16 µg/mL, para quatro (4) o CIM foi de 32 µg/mL e para três (3) foi 64 µg/mL (**Anexo**). As concentrações de fluconazol necessárias para inibir 50% (MIC₅₀) e 90% (MIC₉₀) dos isolados foram 2 µg/mL e 8 µg/mL, respectivamente. O intervalo de CIM foi de 0,12 µg/mL a 64 µg/mL, média de 1,4 µg/mL e moda de 0,25 µg/mL (**Tabela 2**).

Para voriconazol, todas as amostras foram sensíveis (CIM<4), com intervalo entre 0,015 µg/mL a 2 µg/mL, CIM 50 e CIM 90, respectivamente, média de 0,06 µg/mL e moda de 0,25 µg/mL. O valor mais alto de CIM para voriconazol (2µg/mL) foi encontrado frente a um isolado cujo CIM de fluconazol foi de 64µg/mL. (**Tabela 3**).

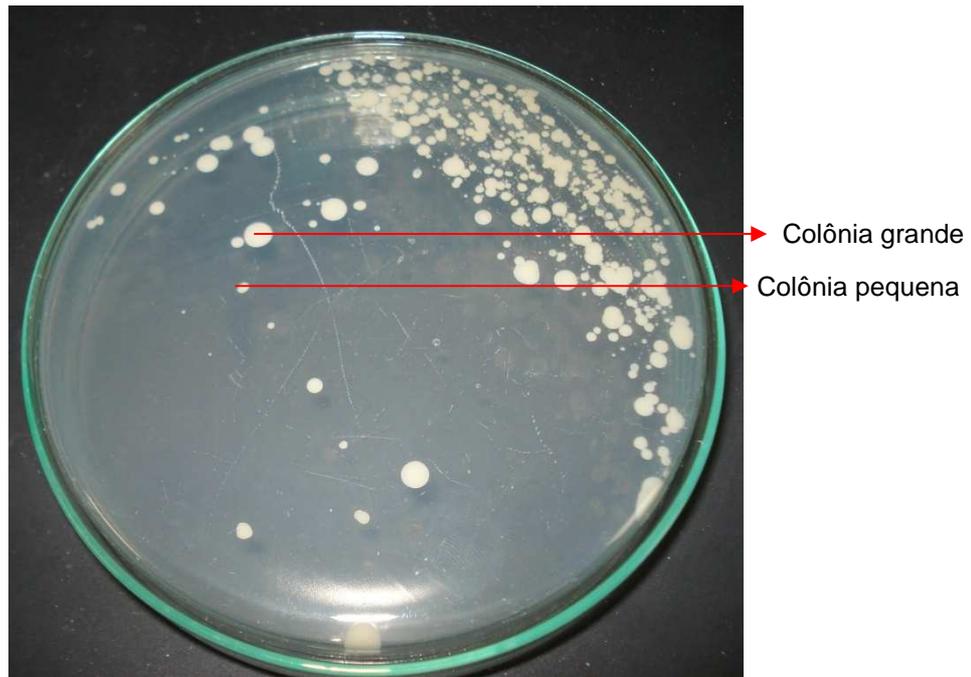


Figura 2. Colônias de diâmetros distintos obtidas em ágar batata dextrose acrescido de 8 µg/mL de FCZ

4.3 Testes de sensibilidade a antifúngicos por microdiluição para colônias derivadas (P e G)

Foram realizados 800 testes de microdiluição, para determinação dos valores de CIM dos isolados de *C. neoformans*, para colônias P e G (**Anexo**). As placas foram incubadas a 35°C, e após 48 h, foram submetidas à leitura espectrofotométrica.

A leitura, realizada nesse momento, indicou que a turbidez dos poços da coluna 12, contendo controle de crescimento não atingiu densidade ótica $\geq 0,3$. O crescimento, portanto, não foi suficiente para leitura da reação e as

placas foram re-incubadas, por mais 24 h, totalizando período de 72 h de reação. Após esse período, as placas foram submetidas à nova leitura em espectrofotômetro e a turbidez, denotando crescimento, foi adequada para todos, com exceção de 30 (7,5%) isolados. Estes isolados foram submetidos novamente aos testes de microdiluição, porém, as placas foram incubadas a 30°C e a leitura foi realizada com 72 h de incubação. A alteração da temperatura de 35° para 30° C permitiu o crescimento adequado das 60 amostras.

A distribuição do número de colônias P e G por CIM de FCZ e VCZ está ilustrada nas **Figuras 4, 5, 6 e 7**.

Os resultados de CIM para as colônias derivadas foram comparados com aqueles dos isolados originais. A comparação dos resultados obtidos nos testes com fluconazol com isolados originais e com as colônias derivadas (P e G) demonstrou: i) forte correlação essencial ($r = 0,82$) entre valores de CIM de isolados originais e colônias P; ii) media correlação essencial ($r = 0,74$) entre isolados originais e colônias G; iii) media correlação ($r = 0,57$) entre colônias P e G derivadas de mesmo isolado.

A melhor correlação entre os resultados de CIM foi entre os isolados originais e colônias P. A pior correlação foi entre as colônias P e G.

As **Figuras 8, 9 e 10**, mostram, respectivamente, os gráficos de regressão linear destas análises.

Os valores de CIM para as colônias P foram distintos de modo significativo (diferença de ± 2 diluições) daqueles das colônias G em 26,3% (105/400) isolados. Esse grupo de isolados foi considerado como o de perfil heterogêneo. Os resultados de CIM deste grupo mostraram que para 12,25% (49/400) das colônias P, o valor de CIM foi inferior ao observado para a colônia G. De modo inverso, para 14% (56/400) das colônias P o valor de CIM foi superior ao valor de CIM encontrado para as colônias G.

A classificação (sensível e resistente) dos valores de CIM obtidos para as colônias P e G, permitiu observar que 6,25% (25/400) isolados apresentaram o fenômeno de heteroresistência; ou seja, apenas uma de suas colônias derivadas (P ou G) foi resistente, sendo a outra sensível. Nesta análise, dos 25 isolados verificou-se que 14 (3,25%) tiveram colônia P sensível e G resistente e que 11 (2,75%) isolados tiveram colônia P resistente e G

sensível. Dentre estas 25 amostras heteroresistentes, 17 foram consideradas heterogêneas também, pois além de apresentarem perfis de sensibilidade diferentes, os valores de CIM de FCZ entre elas, diferiu em 4 vezes.

A capacidade do teste em ágar em indicar colônias resistentes ($CIM \geq 16 \mu\text{g/mL}$) de acordo com seu tamanho (G) foi de apenas 3,25%, em que as colônias G foram resistentes e P sensíveis.

Tabela 2. Concentração Inibitória Mínima (CIM) de fluconazol frente aos 400 isolados originais de *C. neoformans* e respectivas colônias pequenas e grandes, segundo intervalo, CIM_{50} , CIM_{90} , média e moda dos valores.

Parâmetro	Classificação		
	Colônias grandes	Colônias Pequenas	Colônias originais
Intervalo	0,12 - 64 $\mu\text{g/mL}$	0,12 - 64 $\mu\text{g/mL}$	0,12 - 64 $\mu\text{g/mL}$
CIM_{50}	1 $\mu\text{g/mL}$	1 $\mu\text{g/mL}$	2 $\mu\text{g/mL}$
CIM_{90}	8 $\mu\text{g/mL}$	8 $\mu\text{g/mL}$	8 $\mu\text{g/mL}$
Média	0,9 $\mu\text{g/mL}$	0,9 $\mu\text{g/mL}$	1,4 $\mu\text{g/mL}$
Moda	0,25 $\mu\text{g/mL}$	0,25 $\mu\text{g/mL}$	0,25 $\mu\text{g/mL}$

CIM_{50} e CIM_{90} : respectivamente, valor de CIM de Fcz que inibe 50% e 90% dos isolados

Tabela 3. Resultados de concentração inibitória mínima (CIM) de voriconazol frente aos 400 isolados originais de *C. neoformans* e respectivas colônias pequenas e grandes, segundo intervalo, CIM_{50} , CIM_{90} , média e moda dos valores.

Parâmetro	Classificação		
	Colônias grandes	Colônias Pequenas	Colônias originais
Intervalo	0,015 - 2 $\mu\text{g/mL}$	0,015 - 1 $\mu\text{g/mL}$	0,015 - 2
CIM_{50}	0,03 $\mu\text{g/mL}$	0,03 $\mu\text{g/mL}$	0,06 $\mu\text{g/mL}$
CIM_{90}	0,12 $\mu\text{g/mL}$	0,12 $\mu\text{g/mL}$	0,25 $\mu\text{g/mL}$
Média	0,046 $\mu\text{g/mL}$	0,073 $\mu\text{g/mL}$	0,101 $\mu\text{g/mL}$
Moda	0,015 $\mu\text{g/mL}$	0,015 $\mu\text{g/mL}$	0,06 $\mu\text{g/mL}$

CIM_{50} e CIM_{90} : respectivamente, valor de CIM de Vcz que inibe 50% e 90% dos

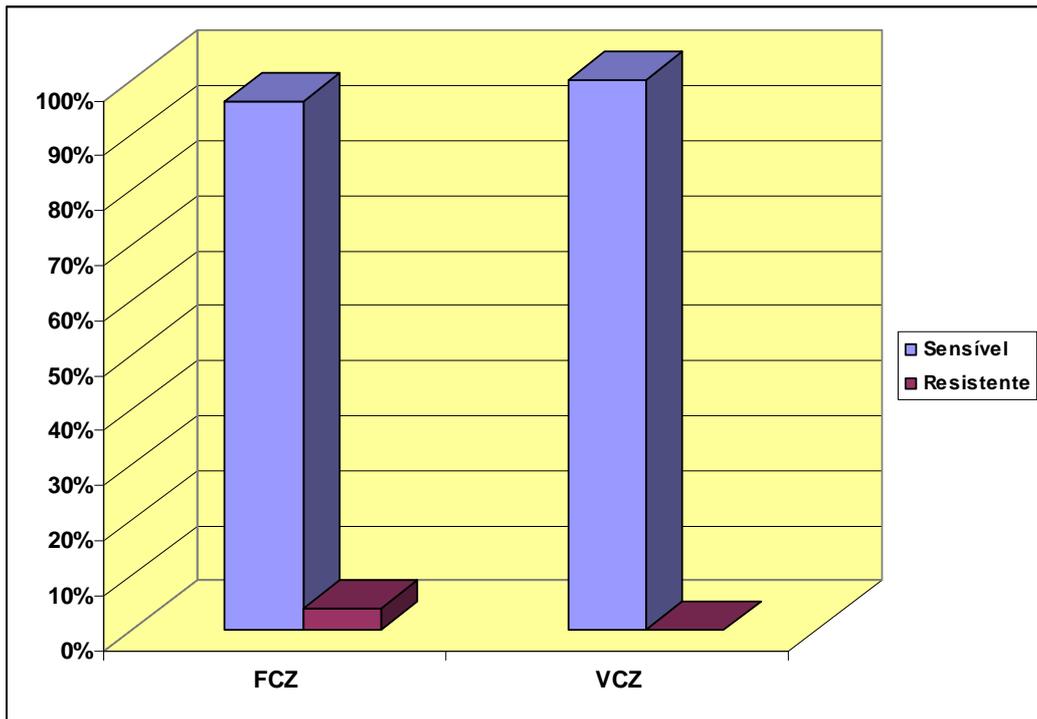


Figura 3. Sensibilidade a fluconazol e voriconazol de 400 isolados originais de *C. neoformans*, utilizando teste de microdiluição. Sensível: CIM < 16 µg/mL de fluconazol ou CIM < 4 µg/mL de voriconazol. Resistente: CIM ≥ 16 µg/mL de fluconazol ou CIM ≥ 4 µg/mL de voriconazol

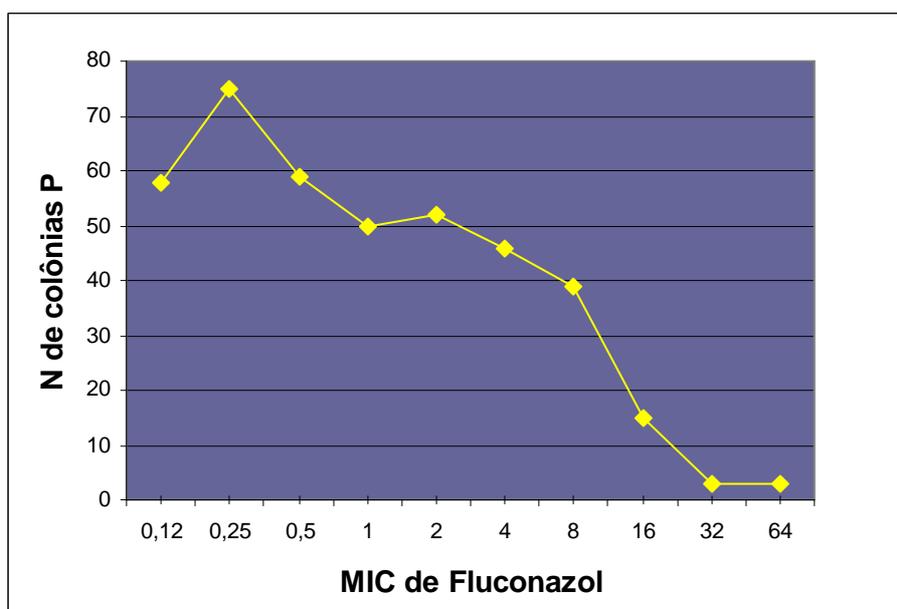


Figura 4. Distribuição do número de colônias P por CIM de fluconazol

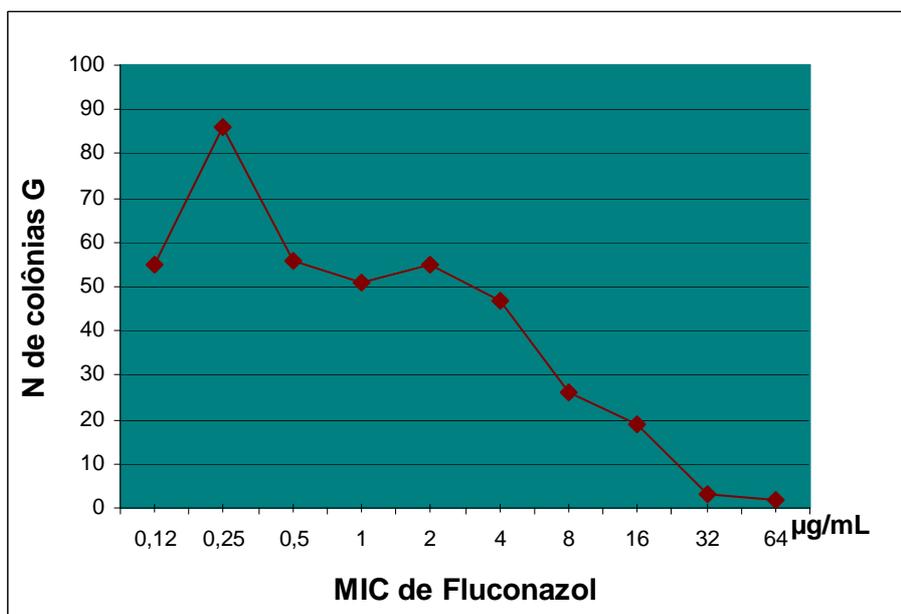


Figura 5. Distribuição do número de colônias G por CIM de fluconazol

Os testes com voriconazol foram realizados com todas as colônias P e G e os valores constam das **Tabelas 1 e 2** e estão representados nas **Figuras 7 e 8**. Não foi encontrada resistência cruzada entre fluconazol e voriconazol..

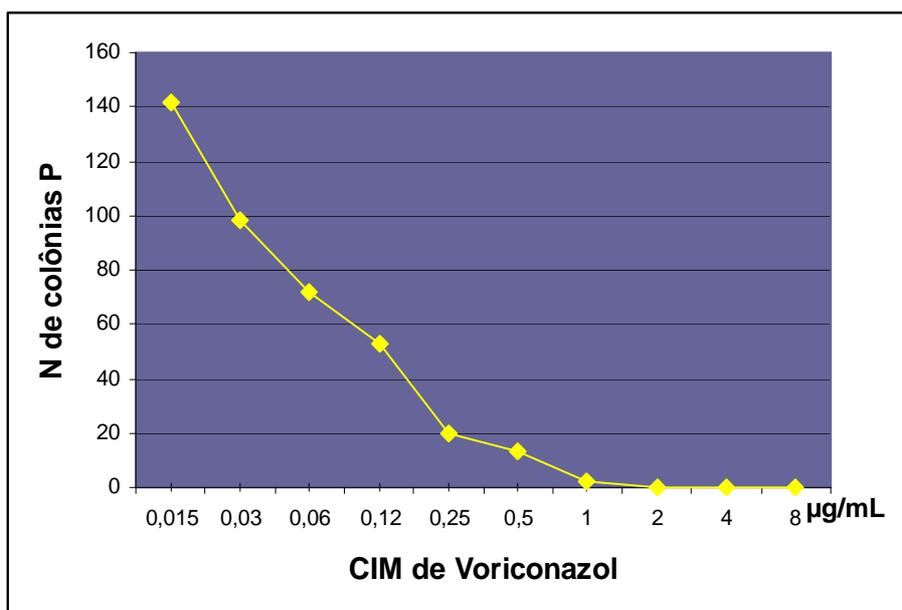


Figura 6. Distribuição do número de colônias G por CIM de voriconazol

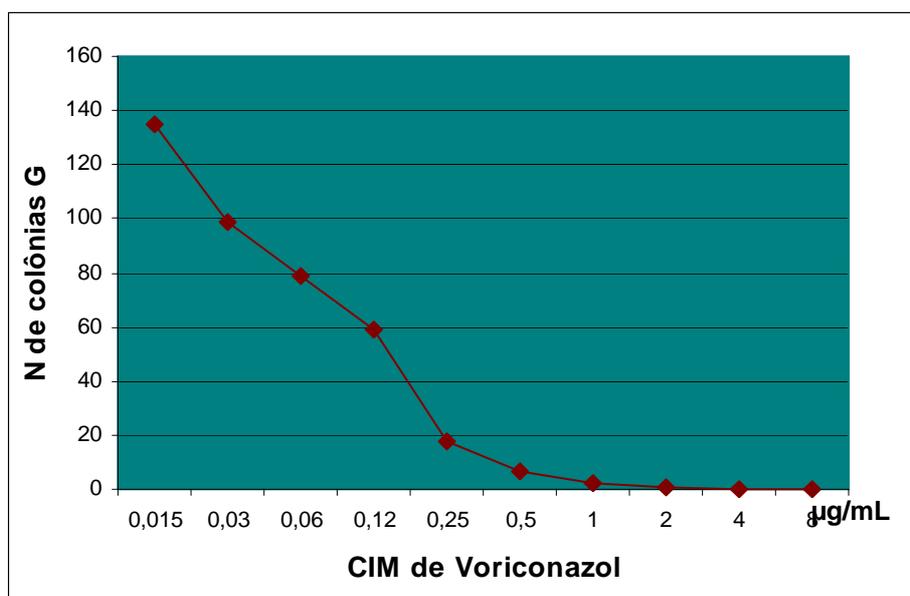


Figura 7. Distribuição do número de colônias G por CIM de voriconazol

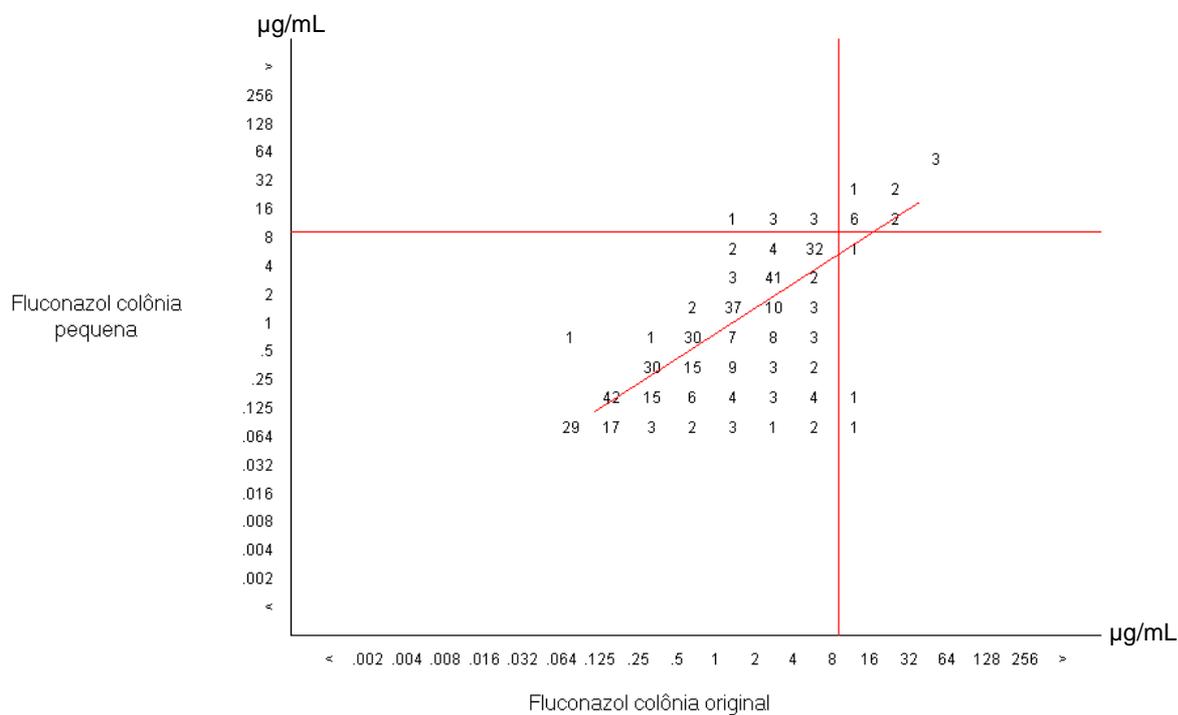


Figura 8. Correlação entre os CIMs de fluconazol para colônia pequena e colônia original. Equação: $\log_2(\text{CIM colônia pequena}) = -0,49 + 0,88 \log_2(\text{CIM colônia original})$ $r = 0,82$.

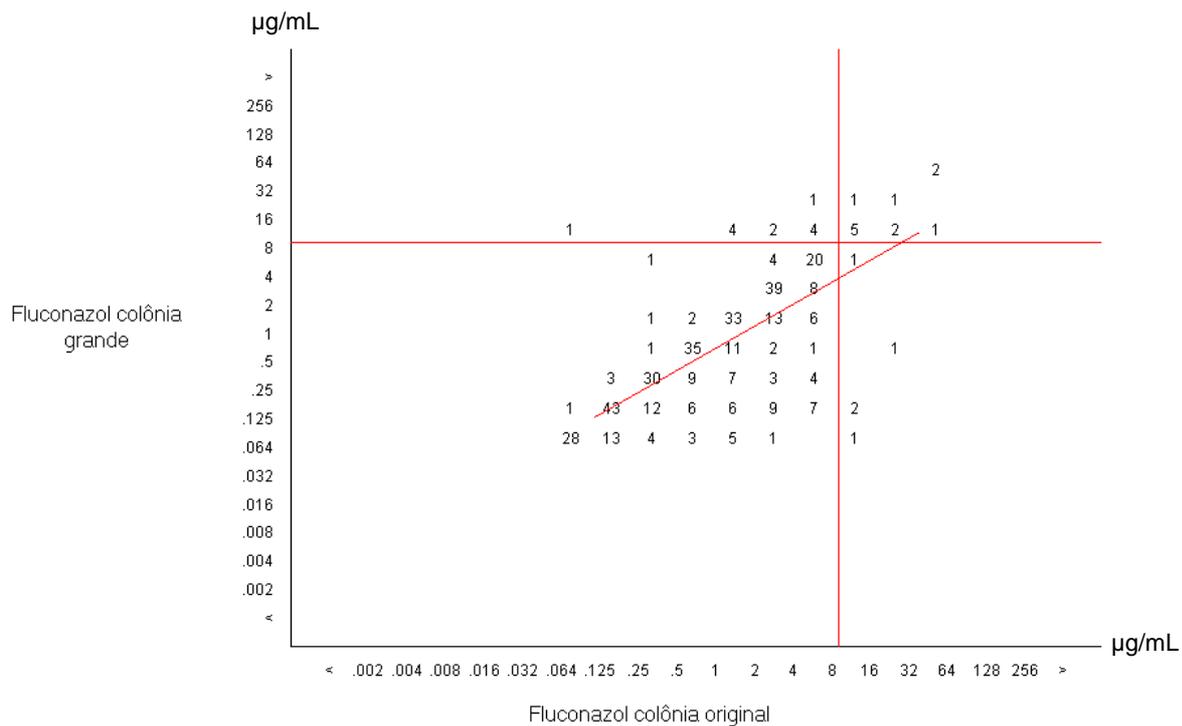


Figura 9. Correlação entre os CIMs de fluconazol para colônia grande e colônia original. Equação: $\log_2(\text{CIM col\~{o}nia grande}) = -0,52 + 0,78 \log_2(\text{CIM col\~{o}nia original})$ $r = 0,74$.

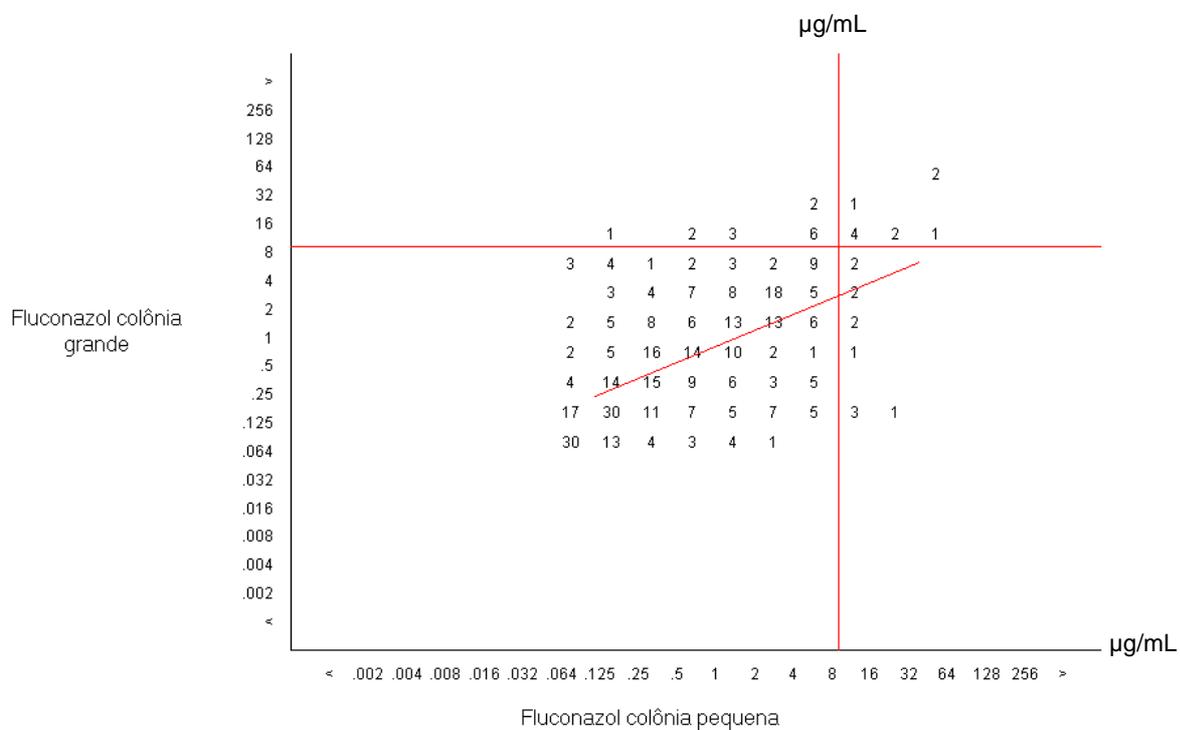


Figura 30. Correlação entre os CIMs de fluconazol para colônia pequena e colônia grande. Equação: $\log_2(\text{CIM col\~{o}nia grande}) = 0,12 + 0,56 \log_2(\text{CIM col\~{o}nia pequena})$ $r = 0,57$.

5. Discussão

Esta dissertação é o primeiro estudo brasileiro, segundo literatura consultada, a avaliar o fenômeno de heteroresistência em *Cryptococcus neoformans*. Neste trabalho, foi possível a avaliação da frequência desse fenômeno, por determinação de CIM e teste de triagem em ágar, que pode contribuir para detecção de cepas com diferentes perfis de sensibilidade a fluconazol. Há que se considerar, ainda, que a taxa de ocorrência aplica-se tão somente à população de isolados analisados, dentro da metodologia escolhida para esta dissertação. Isto significa que, fatores como: período do estudo localização geográfica, manutenção dos isolados, critérios empregados para detecção da heteroresistência, podem interferir nos resultados.

Os antifúngicos da classe dos azóis, em particular os triazóis, representam o maior arsenal terapêutico de uso clínico para infecções fúngicas. O amplo uso de fluconazol e o tratamento profilático da neurocriptococose associada a Aids podem levar ao aparecimento de cepas resistentes a esta medicação (Posteraro et al., 2003). No entanto, durante a terapia de longa-duração com fluconazol, o isolamento de cepas de *Cryptococcus* spp. resistentes *in vitro* foi, raramente, descrito na literatura se comparado aos dados existentes para leveduras do gênero *Candida* (Powderly et al., 1992; Pagan et al., 1994; Birley et al., 1995; Currie et al., 1996; Armendou et al., 1996; Brandt et al., 1996; Davey et al., 1998; Brandt et al., 2001). Desse modo, a ocorrência e os possíveis mecanismos de resistência a azóis, no gênero *Cryptococcus*, ainda são pouco estudados e há muitos aspectos a serem elucidados.

A problemática da avaliação de resistência em isolados de *Cryptococcus* spp., inclui a adequação dos métodos de referência para estudos de sensibilidade deste gênero de levedura (Rex et al., 2001). Avaliando-se as condições experimentais deste estudo, notou-se crescimento insuficiente (d.o. controle-crescimento < 0,3) de 60 isolados submetidos aos testes de sensibilidade, sob temperatura padrão de 35°C. Estes isolados, de outro modo, quando incubados a 30°C desenvolveram-se adequadamente (d.o. controle-crescimento \geq 0,3).

Outro aspecto interessante a ser discutido nesta dissertação é o tempo de incubação das culturas de *C. neoformans* após a realização dos testes de sensibilidade por microdiluição. Pfaller *et al.* (1999) analisaram o tempo de incubação e concluíram que não há diferença significativa entre 48h e 72h nos valores de CIM de fluconazol em testes com *C. neoformans*. Porém, neste estudo, verificou-se que o tempo de incubação é um fator de forte influência no crescimento fúngico que pode resultar em alteração no valor de CIM. Observou-se que quando incubadas por 48 h, as culturas apresentaram baixo crescimento, revelado por densidade ótica abaixo de 0,3, mesmo com inóculo ASFT-EUCAST, que é 100 vezes maior do que usado por Pfaller *et al.* (1999) no método CLSI.

Desse modo, todas as leituras foram feitas após 72h de incubação, período que permitiu valores de d.o. $\geq 0,3$. Uma das possíveis explicações para o baixo desenvolvimento das culturas de *C. neoformans* seria o meio de cultura utilizado no teste. Um dos principais estudos e o pioneiro sobre a influência do meio de cultura para *C. neoformans*, foi realizado por Ghannoum *et al.* (1992) que avaliaram o crescimento de 21 isolados humanos e concluíram que o meio *yeast nitrogen base* (YNB) era o mais adequado. Espinel-Ingroff *et al.* (1998) afirmaram que, mesmo após 72h de incubação, o meio de RPMI não oferecia boas condições de crescimento para *C. neoformans*. Em 1995, o grupo europeu EUCAST já havia publicado estudo demonstrando que glicose a 2% favorecia o desenvolvimento de *C. neoformans*. O sucesso desse experimento europeu motivou a inclusão no doc. norte-americano M27-A2 (NCCLS, 2002), de RPMI contendo essa concentração do açúcar para melhoria do crescimento das cepas.

Quanto à análise da taxa de resistência dos 400 isolados de *C. neoformans* foi verificada baixa porcentagem de isolados resistentes a fluconazol (4%). Esta é condizente com as relatadas na literatura nacional. Coutinho *et al.* (2006) estudaram 133 isolados de *C. neoformans* e demonstraram que 7,5% dos isolados de episódios iniciais de criptococose eram resistentes ao FCZ. Os autores verificaram que os isolados não-iniciais apresentaram maior taxa de resistência (16,7%) ao FCZ. Strob (2005) avaliou 242 isolados de *C. neoformans* e encontrou valor médio de 3,3% de isolados resistentes ao fluconazol, no período de 1996 a 1999. Recentemente,

Pappalardo (2008) avaliando isolados 41 isolados de *C. neoformans* de casos de criptococose associada à Aids, verificou 12,2% de resistência para fluconazol.

Hsueh et al. (2005) descreveram 3 (4%) de isolados de *C. neoformans* com CIMs de FCZ > 16 µg/mL. Nos Estados Unidos, Brandt et al. (2001) verificaram frequência mais elevada de resistência (19,5%) em 522 isolados de *C. neoformans*. Pfaller et al., (1999) analisaram 566 isolados norte-americanos e africanos de *C. neoformans*, encontrando 16% de resistência (MIC > 16µg/mL). Yildiran et al. (2002) não verificaram alta taxa de resistência a fluconazol em 213 amostras de *C. neoformans* isolados no período de dez anos (1990 a 1999).

Contrastando com os dados publicados na Europa e América, um estudo realizado na Espanha foi descrita a mais alta taxa de resistência ao fluconazol (CIM ≥ 16µg/mL). O grupo avaliou 317 amostras de *C. neoformans*, isoladas durante o período de 10 anos, e encontraram 46,6% (148) de resistência a fluconazol. As amostras resistentes apresentaram valores de CIM de 16 µg/mL ou 32 µg/mL, sendo que nenhuma apresentou valor de CIM igual ou maior a 64 µg/mL (Perkins et al. 2005).

No continente africano, Bii et al. (2006) detectaram 11,2% de resistência a FCZ em cepas de paciente do Kenia. Em 2004, Sar et al. Estudaram 402 isolados de *C. neoformans* de pacientes do Cambódia. Do total de amostras, 134 foram isolados no período de 2001 a 2002. A taxa de resistência encontrada neste estudo foi de 24,2% sendo que houve um aumento nos valores de CIM neste período de 2 anos.

A análise comparativa com outros trabalhos da literatura fica prejudicada, na medida em que outros critérios distintos dos usados nesta dissertação foram escolhidos para definir resistência a fluconazol; alguns autores usaram CIM ≥ 64 µg/mL para definir um isolado de resistência a fluconazol. Nesses casos, pode-se utilizar outros parâmetros, como MIC₅₀ e MIC₉₀, freqüentemente, empregados para comparar o perfil de sensibilidade a antifúngicos. Nesta dissertação foi verificado MIC₉₀ de 8µg/mL, semelhante ao encontrado por Pfaller et al. (1999), descrito em 16 mg/mL. Yildiran et al. (2002)

encontraram os mesmos valores, sendo CIM₅₀ e CIM₉₀ de 2 µg/mL a 8 µg/mL para fluconazol.

Assim como os mecanismos de resistência, o fenômeno da heteroresistência ainda é pouco explorado para leveduras do gênero *Cryptococcus*, sendo muito comum o seu estudo em bactérias (Appelbaum, 2007; Leonard *et al.*, 2009; Tenover *et al.*, 2009). Postula-se que o fenômeno de heteroresistência possa estar associado à ocorrência de recidivas da criptococose, por isso a importância de se estudar tal fenômeno (Xu *et al.*, 2001; Yamazumi *et al.*, 2003; Sionov *et al.*, 2009).

Em 1999, Mondon *et al.* descreveram pela primeira vez, a ocorrência de heteroresistência em *C. neoformans* e relataram que o fenômeno estava associado à recorrência da criptococose. O grupo estudou sete isolados de *C. neoformans*, sendo um isolado de Israel e seis isolados seriados de um único paciente da Itália, contendo sub-populações heteroresistentes a FCZ. Os autores verificaram que as colônias derivadas de cada um dos sete isolados originais heteroresistentes continham populações celulares mistas, com diferentes perfis de sensibilidade ao FCZ, sendo a maioria delas sensíveis, porém, algumas se mostraram altamente resistentes ao FCZ (CIM \geq 64 µg/mL).

Em 2000, Xu *et al.*, avaliaram colônias mutantes obtidas de 21 amostras de *C. neoformans*. Estas colônias foram plaqueadas em ágar YMA (*Yeast morphology agar*) contendo 8 µg/mL de FCZ e, posteriormente, submetidas ao teste de microdiluição (NCCLS-CLSI, 2002), verificando que estas colônias apresentaram valores de CIM distintos daqueles de suas amostras originais, provando a ocorrência de heteroresistência em todas as 21 amostras avaliadas. No estudo feito por Yamazumi *et al.* (2003), foi observado que 5 de 107 (4,7%) culturas de *C. neoformans* apresentaram células com distintos perfis de sensibilidade ao FCZ, caracterizando a heteroresistência a essa droga. Nesse estudo, o grupo utilizou o método de plaqueamento em meio de ágar batata, contendo várias concentrações de FCZ e classificaram como heteroresistentes, os isolados que apresentaram crescimento em meio contendo concentrações de quatro a oito vezes superiores do que o valor de CIM da amostra.

Fenótipos heteroresistentes também foram observados em *Candida albicans*. No estudo conduzido por Marr *et al.* (2001) foram identificados, em

isolados de dois pacientes transplantados de medula óssea, isolados seriados com sensibilidade ao FCZ distinta dos respectivos isolados seqüenciais.

No mais novo estudo sobre o tema, Sionov *et al.* (2009) descreveram o fenômeno de heteroresistência em 130 amostras de *C. neoformans*, por exposições sucessivas à concentrações crescentes de fluconazol. O estudo teve como objetivo verificar a taxa de ocorrência de heteroresistência e, também, determinar mecanismos moleculares e estabilidade do fenômeno. Das 130 amostras, 114 eram clínicas, ou ambientais, isolados há pelo menos uma década antes da disponibilidade das drogas azólicas; portanto, as cepas nunca haviam sido expostas a antifúngicos. Os outros 16 isolados foram provenientes de pacientes com Aids submetidos à terapia antifúngica com fluconazol em períodos distintos. Todas as amostras, incluindo as não-expostas à droga, foram heteroresistentes frente a todas as concentrações avaliadas (4µg/mL a 32 µg/mL), denotando heteroresistência intrínseca ao fluconazol. Por sua vez, todas as cepas clínicas de pacientes sob tratamento, foram heteroresistentes a concentrações maiores, todas acima ou igual a 16 µg/mL. Esses dados indicam que o aparecimento do fenômeno não está, necessariamente, relacionado à exposição prévia à droga, mas que é estimulado pela presença da droga. Além disso, os autores verificaram, de modo inédito, que o fenômeno é reversível, após um número variado de passagens em meio de cultura sem fluconazol. Isso foi observado mesmo em cepas com altíssimos valores de heteroresistência (256-400 µg/mL), mas vale ressaltar que uma cepa clínica, mesmo após quarenta e cinco repiques sem a droga, manteve alto nível de heteroresistência (128 µg/mL). Esses achados sugerem como concluíram os autores, que a heteroresistência é um fenômeno adaptativo de sobrevivência celular ao estresse causado por exposição ao azol.

A correlação entre heteroresistência e virulência nunca havia sido estudada, até que Sionov *et al.* (2009), observaram que o fenômeno está relacionado com a virulência das cepas. Assim, as amostras mais virulentas apresentaram maiores níveis de heteroresistência (≥ 32 µg/mL).

O único estudo que se destinou a desvendar a origem do fenômeno, foi o de Sionov *et al.* (2009). Os autores realizaram estudos moleculares e concluíram que os mecanismos de resistência que controlam o nível de heteroresistência a fluconazol parecem não ser específicos. Esses

mecanismos também contribuem para que as células de *C. neoformans* heteroresistentes resistam a determinadas toxinas produzidas por microrganismos de solo. Em seu *habitat* o agente da criptococose, portanto, poderia estar sujeito a essas substâncias que atuariam como possível fator de estresse ambiental e responderiam com ativação de determinados mecanismos de resistência. Os autores associaram o nível de heteroresistência a fluconazol com a habilidade de sobreviver em meios contendo toxinas e antibióticos produzidos por esses microrganismos.

A metodologia utilizada pelos autores foi diferente da adotada nesta dissertação. A maioria dos estudos de resistência trata o agente etiológico como único, não empregando técnicas que permitiriam detectar possível complexidade do isolado. Neste estudo, a realização do teste de triagem permitiu observar dois padrões distintos de crescimento para as 40 amostras de *C. neoformans* avaliadas. Colônias pequenas, com diâmetro inferior a 4 mm e grandes, com diâmetro superior ou igual a 4 mm. O propósito de avaliar o comportamento dos isolados em ágar batata contendo fluconazol foi de relacionar colônias pequenas com maior sensibilidade à droga e da mesma forma, correlacionar colônias grandes com resistência ao antifúngico. No entanto, os resultados de CIM, obtidos com as colônias P e G, indicaram baixa relação do tamanho com o perfil de sensibilidade ao fluconazol (15,75%). De modo mais grave, o valor de CIM em 16,75% das colônias P foi superior (≥ 2 diluições) ao encontrado para a correspondente colônia G. Quando analisados os isolados heterogêneos, observou-se que em 14% (n=56) o CIM das colônias P foi maior do que os das colônias G, o que reforça o baixo desempenho do teste em ágar batata.

As hipóteses para explicar esse achado são muitas, mas pode-se inferir que as outras condições para o teste em ágar poderiam melhorar a acurácia do método. Entre elas, a que parece mais plausível, é o fator temperatura, desde que é importante para *C. neoformans*, conforme estudos anteriores. Nesses estudos, sobre heteroresistência, foram realizados ensaios sob temperatura de 35°C e 30°C para verificar a expressão da resistência. Yamazumi *et al.* (2003) verificaram a ocorrência de heteroresistência apenas quando as culturas de *C. neoformans* foram incubadas em ágar contendo 64 µg/mL de FCZ a 30°C e não a 35°C.

O fenômeno de heteroresistência, observado pelo método de microdiluição, segundo recomendações do grupo EUCAST (2002), foi detectado em 6,25% dos 400 isolados originais. Ou seja, nesse grupo foi verificado colônias P sensíveis e G resistentes (3,5%) ou P resistentes e G sensíveis (2,75%). Isso mostra que, o método em ágar apresentou boa correlação com o método de referência em apenas 3,25%.

Para explicar a natureza da heteroresistência, pode-se inferir de outros estudos que confirmaram a presença concomitante de cepas distintas, com características próprias, incluindo aspectos relacionados à sensibilidade a antifúngicos, além de outros, tais como virulência, toxicidade, morfologia e perfil bioquímico. Um dos estudos nacionais que demonstrou a complexidade do agente da criptococose e comprovou a ocorrência simultânea de duas espécies de *Cryptococcus* em amostra clínica foi o de Igreja *et al.* (2004).

Uma explicação possível para o achado de perfis múltiplos do agente em um único isolado, seria a ativação de mecanismos de resistência após exposição a determinado antifúngico, caracterizando resistência secundária, e consequente aparecimento de células menos sensíveis junto a outras que não desenvolveram esse processo. Coutinho *et al.* (2006), avaliando isolados humanos e ambientais de *C. neoformans*, verificou após crescimento em meio contendo fluconazol, que ambos apresentaram sub-populações com sensibilidade antifúngica diferente do isolado original. Os autores verificaram também, que uma única passagem no meio adicionado de FCZ, foi suficiente para que o valor de CIM do antifúngico frente aos isolados humanos alcançasse 64 µg/mL. Este dado sugere que a exposição prévia à droga é um fator importante na seleção de sub-populações resistentes.

A ocorrência de resistência cruzada entre os azóis, fluconazol e voriconazol, foi avaliada neste estudo. Todos os isolados apresentaram valores de CIM < 4 µg/mL para voriconazol, ou seja, sensíveis. Mesmo as amostras que apresentaram resistência (CIM ≥ 16 µg/mL) a FCZ, não foram resistentes a VCZ. Este fato nos mostra que não houve, portanto, resistência cruzada e VCZ apresentou melhor atividade do que FCZ. Este achado confirma dados encontrados por outros autores, que também verificaram maior atividade deste triazol, quando comparado ao fluconazol (Pfaller *et al.*, 2004; Greer, 2003, Chryssanthou & Cuenca-Estrella, 2002). Em 2005, Perkins *et al* avaliaram a

resistência cruzada entre azóis e verificaram que 33,8% das amostras de *C. neoformans* resistentes a FCZ foram também resistentes a outra droga azólica (itraconazol), entretanto a maioria destas amostras foi sensível a voriconazol. Apesar de não ter sido verificado resistência cruzada na grande maioria das amostras, chama a atenção o achado de um isolado menos sensível a voriconazol (CIM 2µg/mL) e resistente a fluconazol (CIM 64µg/mL). Pfaller *et al.* (1999) também encontrou o mesmo dado, o que alerta para possível tendência de futura resistência cruzada. Vale a pena ressaltar que para voriconazol o ponto de corte de 4µg/mL (CLSI, 2008) é o valor indicado para classificar cepas de *Candida*, mas, a falta de melhor alternativa para *Cryptococcus* permite essa extrapolação para investigações científicas.

Comparando-se o parâmetro de MIC₉₀ de voriconazol, verifica-se que, neste estudo, foi encontrado valor idêntico (0,25µg/mL) ao de Pfaller *et al.* (1999). Yildiran *et al.* (2002), de outro modo, observaram CIM₅₀ menor (\leq 0,125µg/mL), mostrando a diferença do perfil de sensibilidade a este novo azol, em cepas de regiões geográficas distintas.

O fato de, neste estudo, ter sido, de modo inédito descrita a presença de heteroresistência para fluconazol em isolados clínicos de *C. neoformans* demonstra a necessidade de mais estudos sobre a ocorrência desse fenômeno. Nota-se que poucos trabalhos foram realizados com objetivo de avaliar a frequência desse fenômeno, apesar da importância deste tema, comprovada recentemente, com uma publicação de um dos grupos mais reconhecidos dentro da micologia médica. Esse trabalho reafirmou a relevância e atualidade do estudo de heteroresistência em *Cryptococcus neoformans* (Sionov *et al.*, 2009). Estudos futuros poderiam estabelecer correlação entre a presença do fenômeno e a evolução clínica, tendo em vista a melhor terapia para os pacientes com criptococose.

6. Conclusões

- Valores de CIM ≥ 16 $\mu\text{g/mL}$, indicando isolados resistentes ao fluconazol, foram obtidos frente à minoria (4%) dos isolados, indicando elevada sensibilidade *in vitro* do agente da criptococose.
- O fenômeno de heteroresistência a fluconazol foi descrito, pela primeira vez, em isolados de *Cryptococcus neoformans* no Brasil, em frequência baixa (6,25%) se comparada a outros dados de literatura.
- Isolados heterogêneos foram encontrados em 26,25% das amostras analisadas.
- A capacidade do método em ágar batata para distinguir colônias grandes menos sensíveis e colônias pequenas sensíveis foi baixa (3,25%), não sendo considerado um método com bom desempenho.
- Não foi observada resistência cruzada entre fluconazol e voriconazol, confirmando dados de literatura.

7. Referências Bibliográficas

Aller AI, Martin-Mazuelos E, Lozano F, Gomes-Mateos J, Steele-Moore L, Holloway WJ, Gutiérrez MJ, Recio FJ, Espinel-Ingroff A. Correlation of fluconazol CIMs with clinical outcome in Cryptococcal infection. *AntiCIMrob Agents Chemother* 2000; 44:1544-1548.

Almeida AMF, Matsumoto MT, Baeza LC, Silva R, Klainer AAP, Melhem MSC, Mendes-Giannini MJS & The Laboratory Group on cryptococcosis. Molecular typing and antifungal susceptibility of clinical sequential isolates of *Cryptococcus neoformans* from Sao Paulo State, Brazil. *Fems Yeast Research* 2007; 7: 152-164.

Alves SH, Oliveira LT, Costa JM, Lubeck I, Casali AK, Vainstein MH. *In vitro* susceptibility to antifungal agents of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* isolated in southern of Brazil. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 2001; 43:267-70.

Andriole VT. History of antifungal therapy. *Infect Dis Clin Pract* 1998; 7: S 2-7.

Armengou A, Porcar C, Mascaró J, García-Bragado F. Possible development of resistance to fluconazole during suppressive therapy for AIDS-associated cryptococcal meningitis. *Clin Infect Dis* 1996; 23: 1337-1338.

Barchiesi F, Schimizzi AM., Caselli F. *et al.* Activity of the new antifungal triazole, posaconazole, against *Cryptococcus neoformans*. *J Antimicrob Chemother* 2001; 48:769-773.

Berg J, Clancy C, Hong Nguyen M. The hidden danger of primary fluconazole prophylaxis for patients with AIDS. *Clin Infect Dis* 1998; 26: 186-187.

Bicanic T, Harrison TS, Niepieklo A, Dyakopu N, Mentjes G. Symptomatic Relapse of HIV-Associated Cryptococcal Meningitis after Initial Fluconazole

Monotherapy: The Role of Fluconazole Resistance and Immune Reconstitution. *Clinical Infection Diseases* 2006; 43: 1069-73.

Birley HD, Johnson EM, Mc Donald P. *et al.* Azole drug resistance as a cause of clinical relapse in AIDS patients with cryptococcal meningitis. *Int J STD AIDS* 1995; 6:353-355.

Bii CC, Makimura K, Abe S, Taguchi H, Mugasia OM, Revathi G *et al.* Antifungal drug susceptibility of *Cryptococcus neoformans* from clinical sources in Nairobi, Kenya. *Mycoses* 2006; 50: 25-30

Branchini MLM & Papaiordanou PMO. Destaque para as infecções fúngicas em pacientes com Aids e no hospedeiro imunocomprometido no Brasil. *J Bras AIDS* 2000; 1: 31–34.

Brandt ME, Pfaller MA, Hajjeh RA, Hamill J, Pappas PG, Reigold AL, Rimland D, Warnock DW. Trends in Antifungal Drug Susceptibility of *Cryptococcus neoformans* Isolates in the United States: 1992 to 1994 and 1996 to 1998. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 3065-3069.

Buchanan KL, Murphy JW. What Makes *Cryptococcus neoformans* a Pathogen *Emerg Infect Dis* 1998; 4:71-83.

Casadevall A, Perfect JR. *Cryptococcus neoformans*, New York, American Society Microbiology Press 1998; p.541.

Casali AK, Goulart L, Rosa e Silva LK, Ribeiro AM, Amaral AA, Alves SH *et al.* Molecular typing of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* isolates in the Brazilian state Rio Grande do Sul. *FEMS Yeast Res* 2003; 3: 405-415.

Chaisson RE, Gallant JE, Keruly JC, Moore RD. Impact of opportunistic disease on survival in patients with HIV infection. *AIDS* 1998; 12:29-33.

Chiou CC, Groll AH, Walsh TJ. New drugs and novel targets for treatment of invasive fungal infections in patients with cancer. *Oncologist* 2000; 5:120-35.

Chryssanthou E, Cuenca-Estrella M. Comparison of the antifungal susceptibility testing subcommittee of the European committee on antibiotic susceptibility testing proposed standard and the E-test with the NCCLS broth microdilution method for voriconazole and caspofungin susceptibility testing of yeast species. *J Clin Microbiol.* 2002; 40:3841-3844.

Clinical Laboratory Standards Intitute (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts : approved standard – Second edition. Document S2 2006.

Clinical Laboratory Standards Intitute (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts : approved standard. Document S3 2008.

Coutinho, G. Virulência e resistência a antifúngicos de isolados clínicos e ambientais de *Cryptococcus neoformans*. São Paulo, 2006 (Dissertação de Mestrado- Coordenação de Controle de Doenças da Secretaria de Estado de Saúde de São Paulo, Brasil).

Cuenca-Estrella M, Lee-Yang W, Ciblak MA *et al.* Comparative evaluation of NCCLS M27-A and EUCAST broth microdilution procedures for antifungal susceptibility testing of *Candida* species. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46:3644-3647.

Currie BP, Ghannoum M, Bessen and A. Casadevall. Decreased fluconazole susceptibility of a relapse *Cryptococcus neoformans* isolate after fluconazole treatment. *Infect. Dis Clin Pract* 1995; 4:318–319.

Davey KG, Johnson EM, Holmes AD, Szekely A and Warnock DW.

In-vitro susceptibility of *Cryptococcus neoformans* isolates to fluconazole and itraconazole. *J Antimicrob Chemother* 1998; 42:217–220.

Delgado AC, Taguchi H, Mikami Y, Myiajy M, Villares MC, Moretti ML. Human cryptococcosis: relationship of environmental and clinical strains of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* from urban and rural areas. *Mycopathologia* 2005; 159: 7-11.

Dupouy-Camet J, Paugam A, Di Donato C, Viguia C, Vicens I, Volle PJ et al. Resistance to fluconazole in hospitalized patients. Concordance between *Candida albicans* resistance in vitro and therapeutic failure. *Presse Med* 1991; p.1341.

Espinel-Ingroff A, Barchiesi F, Hazen KC et al. Standardization of antifungal susceptibility testing and clinical relevance. *Med Mycol* 1998; 38: 68- 78.

Subcommittee of Antifungal Susceptibility of the European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Method for Determination of Minimal Inhibitory Concentration (MIC) by broth dilution of fermentative yeasts. EUCAST Discussion Document 7.1. Germany: European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases; 2002.

Franzot SP, Hamdan S. In vitro susceptibilities of clinical and environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* to five antifungal drugs. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40:822-824.

Franzot SP, Mukherjee J, Cherniak R, Chen LC, Hamdan JS, Casadevall A. Microevolution of standard strain of *Cryptococcus neoformans* resulting in differences in virulence and other phenotypes. *Infect Immun* 1998; 66: 89-97.

Ghannoum MA, Ibraim AS, Fu Y, Shafiq MC, Edwards JE Jr, Griddle RS. Susceptibility testing of *Cryptococcus neoformans*: a Microdilution technique. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 2881-2886.

Graybill JR. The future of antifungal therapy. *Clin Infect Dis* 1996; 22 Suppl 2:S166-78.

Graybill JR, Sobel J, Saag M et al. Diagnosis and management of increased intracranial pressure in patients with AIDS and cryptococcal meningitis. The NIAID Mycoses Study Group and AIDS Cooperative Treatment Groups. Clin Infect Dis 2000; 30:47-54.

Greer ND. Voriconazole: the newest triazole antifungal agent. Baylor University Medical Center (BUMC) Proceedings 2002; 16:241-8.

Guimarães MDC. Estudo Temporal das doenças associadas à Aids no Brasil, 1980-1999. Cad Saúde Pública 2000; 1-19.

Horta JA, Staats CC, Casali AR, Ribeiro AM, Schrank IS, Schrank A et al. Epidemiological aspects of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* isolates in the Brazilian state Rio Grande do Sul. Med Mycol 2002; 40: 565–571.

Igreja RP, Lazéra MS, Wanke B, Galhardo MC, Kidd SE, Meyer W. Molecular epidemiology of *Cryptococcus neoformans* isolates from AIDS patients of the Brazilian city, Rio de Janeiro. Medical Mycology 2004; 42:229-238.

Ikeda R, Nishikawa A, Shinoda T, Fukazawa Y. Chemical characterization of capsular polysaccharide from *Cryptococcus neoformans* serotype A-D. CIMrobiol Immunol 1985; 29:981-991.

Jessup CJ, Pfaller MA, Messer SA et al. Fluconazole Susceptibility Testing of *Cryptococcus neoformans*: Comparison of Two Broth Microdilution Methods and Clinical Correlates among Isolates from Ugandan AIDS Patients. J Clin Microbiol 1998; 36:2874-76.

Joseph-Horne T, Hollom DW. Molecular mechanisms of azole resistance in fungi. FEMS Microbiol Lett 1997; 149:141-9.

Kobayashi CCBA, Souza LKH, Fernandes OFL. *et al.* Characterization of *Cryptococcus neoformans* isolated from urban environmental sources in Goiânia, Goiás State, Brazil. *Rev Inst Med Trop S. Paulo* 2005; 47:203-07.

Kon AS; Grumach AS; Colombo AL; Penalva ACO; Wanke B; Telles FQ *et al.* Consenso em criptococose *Rev Soc Bras Med Trop* 2008; 41:524-44.

Kurokawa CS, Sugizaki MF, Peraçoli MTS Virulence factors in fungi of systemic mycoses *Revista do Instituto de Medicina Tropical São Paulo* 40:125-135, 1998.

Kwon-Chung KJ, Rhodes JC. Encapsulation and melanin formation as indicators of virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun* 1986; 51:518-23

Kwon-Chung KJ, Benett JE. Cryptococcosis. In: *Medical Mycology*. Philadelphia: Lea & Febiger, 1992. p.397-446.

Kwon-Chung KJ, Varma SA. Do major species concepts support one, two or more species within *Cryptococcus neoformans*? *FEMS Yeast Res* 2006; 6:574-87.

Lacaz CS, Porto E, Martins JEC, Heins-Vaccari EM, Melo NT. *Tratado de Micologia Médica*. 9 ed. São Paulo; Sarvier; 2002.

Levitz SM. The ecology of *Cryptococcus neoformans* and the epidemiology of cryptococcosis. *Rev Infect Dis* 1991;13:1163-9.

Ma LL, Mody CH. When there is a fungus among us, what makes it virulent? *Am J Respir Cell Mol Biol* 2002; 26: 273-276.

Manfredi R, Chiodo F. Features of AIDS and defining diseases during the highly active antiretroviral therapy (HAART) era, compared with the pre- HAART period: a case-control study. *Sex Transm Infect* 2000; 76:145–6.

Marr KA, Lyons CN, Ha K, Rustad R, White TC. Inducible azole resistance associated with a heterogeneous phenotype in *Candida albicans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2001; 45:52–59.

Martins MA, Pappalardo MCSM, Melhem MSC, Chioccola VLP. Molecular diversity of serial *Cryptococcus neoformans* isolates from AIDS patients in the city of São Paulo, Brazil 2007; 102: 777-784.

Mendes CMF, Francisco W, Siqueira LFG, Silveira MJ. Sorogrupagem de *Cryptococcus neoformans*. *Nota Epidemiológica. Rev Microbiol* 1989; 20: 333-336.

Mendes-Giannini MJS, Melhem MSC. Infecções Fúngicas. In *Diagnóstico Laboratorial das Principais Doenças Infecciosas e Auto-Imunes*. Rio de Janeiro; Guanabara Koogan 2001; p. 334 – 403.

Ministério da Saúde/ Programa Nacional de DST/AIDS. *Boletim Epidemiológico*. Brasília, Brasil, Ano XVII, 2004, número 01.

Mitchell TG, Perfect JR. Cryptococcosis in the era of AIDS – 100 years after the discovery of *Cryptococcus neoformans*. *Clin Microbiol Rev* 1995; 8:515-48.

Mondon P, Petter R, Amalfitano, G. *et al.* Heteroresistance to Fluconazole and Voriconazole in *Cryptococcus neoformans*. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43:1856-1861.

NCCLS (2002). M27-A2. In *National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: proposed standard.*

Orni-Wasserlauf R, Zkhakov E, Siegma-Ingra Y *et al.* Fluconazole resistant *Cryptococcus neoformans* isolated from an immunocompetent patient without prior exposure to fluconazol. *Clin infect Dis* 1999; 29:1592- 1593.

Palella FJ, Delaney KM, Moorman AC, Loveless MO, Fuhrer J, Satten GA, *et al.* Declining Morbidity and Mortality Among Patients with Advanced Human Immunodeficiency Virus Infection. *N Engl J Med* 1998; 338:853-60.

Pappalardo MCSM. Criptococose em Aids: estudo clínico e Microbiológico em 35 pacientes acompanhados no Instituto de Infectologia Emílio Ribas, São Paulo, entre 1995 e 1997. São Paulo [dissertação]. São Paulo: Coordenação dos Institutos de Pesquisa da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo; 2002.

Pappalardo MCSM, Melhem MSC. Cryptococcosis: A review of the brazilian experience for the disease. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 2003; 45:299-305.

Pappalardo MCSM, Paschoal RC, Melhem MSC. Cryptococcosis in Brazil. *AIDS* 2007; 21:1971-1972.

Pappalardo Mscm, Szeszs Mw, Martins Ma, Baceti Lb, Bonfietti Lx, Purisco Su, Baez Aa, Melhem Msc. Susceptibility of clinical isolates of *Cryptococcus neoformans* to amphotericin B using time–kill methodology. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 2009; 64: 146-151.

Pappalardo MCSM. Parâmetros farmacocinéticos e farmacodinâmicos da anfotericina B e fluconazol e sua contribuição no estudo da correlação clínico-laboratorial de criptococose de sistema nervoso central associada à Aids. [dissertação]. São Paulo: Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, Brasil, 2009.

Paugam A, Dupouy-Camet J, Blanche P, Gangneux JP *et al.* Increased fluconazole resistance of *Cryptococcus neoformans* isolated from a patient with AIDS and recurrent meningitis. *Clin Infect Dis* 1994; 19: 975-976.

Perfect JR, Casadevall A. Cryptococcosis. *Infect Dis Clin North Am.* 2002; 16: 837-74.

Perkins A, Gomez-Lopez A, Mellado E, Rodriguez-Tudela J, Cuenca-Estrella M. Rates of antifungal resistance among Spanish clinical isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans*. J Antimicrob Chemother 2005; 56: 1144-1147.

Pfaller MA, Zhang J, Messer AS, Brandt ME, Hajjeh RA, Jessup CJ et al. In vitro activities of voriconazole, fluconazole and itraconazole against 566 clinical isolates of *Cryptococcus neoformans* from the States and Africa. Antimicrob Agents Chemother 1999; 43(1): 169-71.

Pfaller MA, Messer SA, Boyken L, Rice C, Tendolkar S, Hollis RJ et al. Evaluation of the NCCLS M44-P Disk Diffusion Method for Determining Susceptibilities of 276 Clinical Isolates of *Cryptococcus neoformans* to Fluconazole. J Clin Microbiol 2004; 42:380-383.

Posteraro B, Sanguinetti M, Sanglard D, Sorda M *et al.* Identification and characterization of a *Cryptococcus neoformans* ATP binding cassette (ABC) transporter encoding gene, CnAFR1, involved in the resistance to fluconazole. Mol Microbiol 2003; 47: 357-71.

Powderly WG. Recent advances in the management of cryptococcal meningitis in patients with AIDS. Clin Infect Dis 1996; 22 Suppl 2:S119-23.

Rezende C. Aspectos fenotípicos e moleculares de isolados de *Cryptococcus neoformans* da região de Araraquara e Ribeirão Preto, relacionados aos perfis de suscetibilidade, Tese de Mestrado, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, SP, Brasil. 2002.

Reynolds SJ, Kytio C, Mbamanya F, Dewar R *et al.* Evolution of drug resistance after virological failure of a first-line highly active antiretroviral therapy regimen in Uganda. Antivir Ther 2009; 14: 293-297.

Richardson MD, Warnock DW. Cryptococcosis. In Fungal Infection. Diagnosis and Management. Blackwell Science 1998; p.149- 159.

Rodero L, Mellado E, Rodriguez AC *et al.* G484S Amino acid substitution Alfa Lanosterol Demethylase (ERG11) is related to fluconazole resistance in a recurrent *Cryptococcus neoformans* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 7: 3653-3656.

Rodriguez-Tudela JL, Martinez-Suarez JV. Fluconazole and amphotericin B antifungal susceptibility testing by National Committee for Clinical Laboratory Standards broth macrodilution method compared with E-test and semiautomated broth microdilution test. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 336-337.

Saag MS, Powderly WG, Cloud GA. Comparison of amphotericin B with fluconazole in the treatment of acute AIDS-associated cryptococcal meningitis. The NIAID Mycoses Study Group and the AIDS Clinical Trials Group. *N Eng J Med* 1992; 83-89.

Sanati H, Messer SA, Pfaller MA *et al.* Multicenter evaluation of broth microdilution method for susceptibility testing of *Cryptococcus neoformans* against fluconazole. *J Clin Microbiol* 1996; 34:1280-1282.

Sanglard D. Clinical relevance of mechanisms of antifungal drug resistance in yeasts. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2002; 20:462-70.

Sanguinetti M, Posteraro B, La Sorda M *et al.* Role of AFR1, an ABC Transporter-Encoding Gene, in the In Vivo Response to Fluconazole and Virulence of *Cryptococcus neoformans*. *Infection and Immunity* 2006; 74:1352-1359.

Sar B, Monchy D, Vann M, Keo C, Sarthou JL, Buisson Y. Increasing in vitro resistance to fluconazole in *Cryptococcus neoformans* Cambodian isolates: April 2000 to March 2002. *British Soc Antimicrobiol Chemother* 2004; 54:563-565.

Sionov E, Chang YC, Garraffo HM, Kwon-Chung KJ. Heteroresistance to Fluconazole in *Cryptococcus neoformans* is Intrinsic and Associated with Virulence. *Antimicrob Agents Chemother* 2009 [Epub ahead of print].

Strob AJ. Monitoramento do perfil de sensibilidade a antifúngicos de 242 isolados clínicos de *Cryptococcus neoformans* do Estado de São Paulo, Brasil, no período de 1995 a 1999. [dissertação]. São Paulo:- Coordenação de Controle de Doenças da Secretaria de Estado de Saúde de São Paulo, Brasil, 2007.

Sukroongreung S, Lim S, Tantimavanich S, Eampokalap B, Carter D, Nilakui C et al. Phenotypic switching and genetic diversity of *Cryptococcus neoformans*. *J Clin Microbiol* 2001; 39:2060–2064.

Witt MD, Lewis RJ, Larsen RA, Milefchik EM et al. Identification of patients with acute AIDS-associated cryptococcal meningitis Who can be effectively treated with fluconazole: the role of antifungal susceptibility testing. *Clin Infect Dis* 1996; 22: 322-328.

Xu J, Onyewu C, Yoell HJ, Ali RY, Vilgalys RJ, Mitchell TG. DynaCIM and Heterogeneous Mutations to Fluconazole Resistance in *Cryptococcus neoformans*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45:420-427.

Yamazumi T, Pfaller MA, Messer SA et al. Characterization of Heteroresistance to Fluconazole among Clinical Isolates of *Cryptococcus neoformans*. *J Clin Microbiol* 2003; 41:267-272.

Yildiran ST, Fothergill AW, Sutton DA, Rinaldi MG. *In vitro* susceptibilities of cerebrospinal fluid isolates of *Cryptococcus neoformans* collected during a ten-year period against fluconazole, voriconazole and posaconazole (SCH56592). *Mycoses* 2002; 45: 378-83.

ANEXO							
Amostras	Concentração Inibitória Mínima (CIM) - (µg/mL)						Classificação (Heterogênea, Heteroresistente ou Heterogênea e Heteroresistente)
	Original		P		G		
	FCZ	VCZ	FCZ	VCZ	FCZ	VCZ	
L312/95	8	0,03	8	0,03	0,5	0,015	
L318/95	0,12	0,03	0,12	0,03	0,12	0,03	
L329/95	1	0,015	1	0,015	0,25	0,015	HETEROGÊNEA
L330/95	1	0,015	1	0,015	0,12	0,015	HETEROGÊNEA
L199/95	4	0,015	0,5	0,015	4	0,015	HETEROGÊNEA
L404/95	0,25	0,06	0,25	0,015	0,12	0,06	
L407/95	0,25	0,25	0,25	0,25	0,12	0,03	
L188/95	2	0,06	2	0,015	0,12	0,06	HETEROGÊNEA
L192/95	4	0,12	4	0,015	0,25	0,12	HETEROGÊNEA
L196/95	4	0,06	4	0,06	2	0,03	
L412/95	1	0,06	0,5	0,015	1	0,06	
L424/95	0,25	0,12	0,25	0,06	0,25	0,12	
L434/95	1	0,12	1	0,015	0,25	0,12	HETEROGÊNEA
L439/95	1	0,06	0,5	0,015	1	0,06	
L441/95	0,5	0,06	0,5	0,06	0,25	0,06	
L449/95	1	0,015	1	0,015	0,5	0,015	
L459/95	0,25	0,03	0,25	0,03	0,25	0,03	
L478/95	0,25	0,03	0,25	0,03	0,25	0,03	
L486/95	8	0,015	8	0,015	0,25	0,015	HETEROGÊNEA
L513/95	2	0,015	2	0,015	1	0,015	
L520/95	0,25	0,5	0,25	0,5	0,25	0,25	
L417/95	16	0,12	16	0,06	0,25	0,12	HETEROGÊNEA E HETERORESISTENTE
L557/95	0,25	0,06	0,25	0,015	0,25	0,06	
L588/95	0,25	0,25	0,25	0,12	0,25	0,25	
L592/95	2	0,06	2	0,06	0,25	0,12	HETEROGÊNEA
L581/95	0,25	0,06	0,25	0,03	0,25	0,06	
L542/95	0,25	0,5	0,25	0,5	0,25	0,12	
L521/95	4	0,5	4	0,5	0,25	0,25	HETEROGÊNEA
L415/95	1	0,5	0,25	0,5	1	0,12	HETEROGÊNEA
L13/96	4	0,03	4	0,03	4	0,015	
L21/96	0,12	0,015	0,12	0,015	0,12	0,015	
L22/96	2	0,12	0,5	0,12	2	0,12	HETEROGÊNEA
L31/96	0,5	0,03	0,25	0,03	0,5	0,015	
L37/96	64	0,06	64	0,03	16	0,06	HETEROGÊNEA
L44/96	8	0,015	1	0,12	0,25	0,12	HETEROGÊNEA
L46/96	4	0,06	4	0,06	4	0,03	
L47/96	4	0,12	4	0,12	2	0,03	
L48/96	4	0,03	16	0,015	2	0,03	HETEROGÊNEA E HETERORESISTENTE
L49/96	4	0,015	8	0,12	16	0,06	HETERORESISTENTE
L52/96	2	0,06	8	0,06	16	0,06	HETERORESISTENTE
L53/96	4	0,015	8	0,06	8	0,06	
L54/96	1	0,06	0,5	0,03	1	0,06	
L60/96	1	0,12	1	0,015	1	0,12	
L66/96	2	0,03	2	0,015	1	0,03	
L67/96	8	0,03	2	0,015	8	0,03	HETEROGÊNEA
L76/96	4	0,25	4	0,25	2	0,06	
L85/96	0,25	0,06	0,25	0,06	0,25	0,015	
L87/96	4	0,12	4	0,03	2	0,12	
L12/97	0,5	0,25	0,5	0,25	0,25	0,03	
L13/97	0,25	0,12	0,25	0,12	0,25	0,06	

L15/97	8	0,03	8	0,03	0,5	0,03	HETEROGÊNEA
L16/97	0,25	0,06	0,25	0,015	0,25	0,06	
L17/97	4	0,03	4	0,015	4	0,03	
L26/97	4	0,25	2	0,25	4	0,015	
L34/97	2	0,06	2	0,06	1	0,015	
L36/97	0,5	0,06	0,5	0,06	0,5	0,06	
L60/97	1	0,12	0,5	0,12	1	0,06	
L19/98	4	0,25	1	0,25	4	0,015	HETEROGÊNEA
L39/98	8	0,03	8	0,015	8	0,03	
L11/98	16	1	16	1	16	0,06	
L40/98	8	0,03	8	0,03	4	0,015	
L42/98	4	0,12	4	0,12	4	0,06	
L16/98	4	0,03	4	0,03	1	0,03	HETEROGÊNEA
L22/98	16	0,06	16	0,06	8	0,015	HETERORESISTENTE
L15/98	8	0,12	8	0,03	16	0,12	HETERORESISTENTE
L26/98	4	0,015	4	0,015	2	0,015	
L04/98	2	0,03	2	0,015	0,5	0,03	HETEROGÊNEA
L08/98	0,5	0,03	0,12	0,015	0,25	0,03	
L09/98	8	0,03	0,25	0,03	8	0,015	HETEROGÊNEA
L31/00	2	0,06	2	0,03	16	0,06	HETEROGÊNEA E HETERORESISTENTE
L23/00	2	0,03	2	0,03	2	0,03	
L33/00	0,25	0,03	0,25	0,03	0,25	0,015	
L106/96	8	0,06	1	0,03	8	0,06	HETEROGÊNEA
L03/01	4	0,06	1	0,06	1	0,015	
L114/97	8	0,06	8	0,06	2	0,03	HETEROGÊNEA
L27/00	4	0,06	4	0,015	4	0,06	
L21/02	4	0,06	4	0,03	2	0,06	
L109/96	4	0,015	4	0,015	2	0,015	
L26/00	8	0,06	8	0,06	8	0,06	
L50/01	8	0,12	8	0,12	16	0,12	HETERORESISTENTE
L07/01	4	0,015	4	0,015	2	0,015	
L08/01	1	0,06	1	0,015	0,5	0,06	
L05/00	0,5	0,25	0,25	0,25	0,5	0,015	
L18/01	2	0,03	0,5	0,03	0,25	0,03	
L24/01	0,5	0,015	0,12	0,015	0,5	0,015	HETEROGÊNEA
L29/01	0,25	0,06	0,25	0,06	0,25	0,015	
L96/96	0,5	0,015	0,5	0,015	0,12	0,015	HETEROGÊNEA
L32/00	0,5	0,03	0,5	0,03	0,5	0,03	
L22/01	0,12	0,015	0,12	0,015	0,12	0,015	
L25/01	1	0,03	1	0,03	1	0,015	
L42/01	1	0,5	1	0,5	0,5	0,03	
L01/01	0,12	0,03	0,12	0,03	0,12	0,03	
L57/98	0,25	0,015	0,12	0,015	0,25	0,015	
L32/02	0,5	0,03	0,25	0,03	0,5	0,03	
L48/98	1	0,03	1	0,015	1	0,03	
L43/98	0,25	0,015	0,25	0,015	0,5	0,015	
L23/98	0,5	0,03	0,5	0,03	0,5	0,03	
L58/98	0,5	0,015	0,25	0,015	0,5	0,015	
L73/97	0,25	0,06	0,12	0,03	0,25	0,06	
L37/98	0,25	0,015	0,12	0,015	0,25	0,015	
L20/98	8	0,03	0,25	0,015	0,25	0,015	
L125/97	1	0,03	0,25	0,03	1	0,03	HETEROGÊNEA
L130/97	2	0,25	16	0,25	2	0,12	HETEROGÊNEA E HETERORESISTENTE
L50/98	0,12	0,03	0,12	0,015	0,12	0,03	
L18/98	8	0,03	8	0,03	2	0,015	HETEROGÊNEA
L56/98	4	0,12	1	0,03	4	0,12	HETEROGÊNEA

L123/97	4	0,25	4	0,25	4	0,12	
L14/98	0,5	0,12	0,5	0,12	0,25	0,03	
L132/99	1	0,03	1	0,015	1	0,03	
L158/99	0,12	0,06	0,12	0,06	0,12	0,03	
L17/02	4	0,03	4	0,03	4	0,015	
L51/05	0,25	0,015	0,12	0,015	0,25	0,015	
L55/05	4	0,06	2	0,03	4	0,06	
L72/06	4	0,03	4	0,03	0,5	0,03	HETEROGÊNEA
L81/06	2	0,5	2	0,015	2	0,5	
L82/06	0,25	0,015	0,25	0,015	0,12	0,015	
L83/06	8	0,25	16	0,25	4	0,12	HETEROGÊNEA E HETERORESISTENTE
L84/06	16	0,25	16	0,25	16	0,25	
L144/99	8	0,03	0,5	0,12	4	0,06	HETEROGÊNEA
L141/99	4	0,03	2	0,03	4	0,03	
L146/99	0,25	0,06	0,25	0,06	0,12	0,015	
L175/99	4	0,5	16	0,5	0,25	0,03	HETEROGÊNEA E HETERORESISTENTE
L140/99	0,5	0,06	0,5	0,03	0,12	0,06	HETEROGÊNEA
L139/99	2	0,12	2	0,06	0,5	0,12	HETEROGÊNEA
L149/99	8	0,12	8	0,12	0,25	0,03	HETEROGÊNEA
L125/99 I	1	0,12	1	0,03	0,5	0,12	
L160/99	0,12	0,03	0,12	0,015	0,12	0,03	
L241/99	8	0,12	16	0,12	4	0,12	HETEROGÊNEA E HETERORESISTENTE
L177/99	1	0,03	0,5	0,015	1	0,03	
L178/99	1	0,06	1	0,06	0,5	0,06	
L145/99	2	0,03	0,12	0,03	2	0,03	HETEROGÊNEA
L174/99	2	0,03	2	0,03	0,5	0,03	HETEROGÊNEA
L143/99	0,5	0,03	0,5	0,015	0,5	0,03	
L240/99	2	0,015	2	0,015	0,12	0,015	HETEROGÊNEA
L224/99	0,12	0,03	0,12	0,03	0,12	0,015	
L239/99	0,5	0,015	0,5	0,015	0,25	0,015	
L156/96	32	1	16	0,5	32	1	
L1190/97	4	0,03	0,25	0,03	4	0,03	HETEROGÊNEA
L1441/97	2	0,06	2	0,06	1	0,06	
L1197/97	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,03	
L154/99	0,5	0,03	0,25	0,015	0,5	0,03	
L1707/97	16	0,12	0,12	0,25	0,12	0,12	
L46/98	16	0,12	8	0,12	32	0,015	HETEROGÊNEA E HETERORESISTENTE
L147/99	64	0,015	64	0,015	64	0,015	
L138/99	32	0,03	32	0,015	16	0,03	
L59/98	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	
L45/98	8	0,25	8	0,12	8	0,25	
L125/99 II	0,5	0,12	0,25	0,12	0,5	0,12	
L124/97	2	0,06	2	0,03	2	0,06	
L129/97	1	0,015	0,5	0,015	1	0,015	
L115/97	0,25	0,12	0,25	0,12	0,25	0,015	
L112/96	0,25	0,03	0,12	0,03	0,25	0,015	
L98/96	0,25	0,015	0,25	0,015	0,25	0,015	
L195/96	0,5	0,03	0,25	0,03	0,25	0,12	
L47/98	4	0,03	2	0,03	4	0,015	
L55/98	4	0,03	4	0,03	4	0,03	
L194/96	4	0,015	4	0,015	4	0,015	
L15/02	4	0,06	4	0,06	0,12	0,03	HETEROGÊNEA
L31/02	2	0,06	0,5	0,06	2	0,03	HETEROGÊNEA
L43/05	2	0,12	2	0,12	1	0,03	HETEROGÊNEA

L40/05	8	0,12	8	0,06	2	0,12	
L44/05	4	0,06	4	0,06	0,25	0,03	
L45/05	8	0,12	8	0,03	4	0,12	
L08/02	0,5	0,03	0,5	0,015	2	0,03	
L26/03 II	8	0,12	8	0,12	4	0,06	
L62/03	1	0,03	1	0,03	0,25	0,015	HETEROGÊNEA
L90/03	0,25	0,015	0,25	0,015	0,25	0,015	
L72/03	1	0,06	1	0,06	1	0,015	
L172/99	1	0,06	0,5	0,06	1	0,03	
L35/00	0,12	0,25	0,12	0,25	0,12	0,015	
L30/00	0,12	0,12	0,12	0,03	0,12	0,12	
L35/01	64	2	64	1	64	2	
L46/01	0,5	0,06	0,25	0,015	0,25	0,06	
L47/01	0,5	0,5	0,25	0,5	0,5	0,5	
L44/01	8	1	0,25	0,25	8	1	HETEROGÊNEA
L01/00	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,03	
L52/01	2	0,03	1	0,12	0,5	0,12	
L37/00	2	0,03	0,5	0,015	2	0,03	HETEROGÊNEA
L36/00	2	0,25	0,25	0,03	2	0,25	HETEROGÊNEA
L21/00	4	0,03	8	0,25	0,25	0,12	HETEROGÊNEA
L28/00	1	0,06	0,5	0,06	1	0,03	
L07/00	0,25	0,25	0,25	0,12	0,12	0,25	
L22/00	1	0,5	0,25	0,12	1	0,5	HETEROGÊNEA
L32/01	2	0,03	2	0,03	1	0,03	
L100/03	2	0,015	0,5	0,015	2	0,015	HETEROGÊNEA
L90/05	4	0,12	4	0,12	4	0,03	
L110/06	0,5	0,015	0,5	0,015	0,5	0,015	
L20/06	0,25	0,06	0,12	0,03	0,25	0,06	
L1206/97	0,25	0,12	0,12	0,12	0,25	0,12	
L1180/97	0,25	0,12	0,25	0,12	0,25	0,12	
L87/05	0,12	0,015	0,12	0,015	0,12	0,015	
L109/05	0,5	0,03	0,25	0,03	0,5	0,03	
L1161/97	0,12	0,12	0,12	0,03	0,12	0,12	
L152/96	2	0,12	2	0,015	2	0,12	
L19/06	4	0,06	1	0,06	4	0,03	HETEROGÊNEA
L03/06	0,5	0,03	0,5	0,015	0,5	0,03	
L107/06	2	0,03	2	0,03	1	0,015	
L105/06	2	0,12	0,5	0,06	2	0,12	HETEROGÊNEA
L104/06	4	0,5	16	0,5	8	0,06	HETERORESISTENTE
L88/05	32	1	16	0,03	1	0,03	HETEROGÊNEA E HETERORESISTENTE
L153/96	0,5	0,015	0,5	0,02	0,5	0,015	
L19/02	1	0,5	0,5	0,03	1	0,5	
L07/02	1	0,12	1	0,12	0,5	0,03	
L100/05	0,5	0,06	0,5	0,03	0,5	0,06	
L04/05	8	0,06	8	0,06	2	0,06	HETEROGÊNEA
L53/04	0,25	0,015	0,25	0,015	0,12	0,015	
L78/04	4	0,12	0,5	0,06	4	0,12	HETEROGÊNEA
L75/04	2	0,25	1	0,06	2	0,25	
L81/04	2	0,03	1	0,03	2	0,06	
L54/04	8	0,25	8	0,06	2	0,25	HETEROGÊNEA
L82/04	8	0,25	1	0,12	8	0,25	HETEROGÊNEA
L102/06	2	0,06	2	0,06	2	0,06	
L26/05	1	0,03	1	0,015	1	0,03	
L72/06	2	0,06	2	0,06	2	0,06	
L56/04	1	0,06	1	0,06	0,25	0,06	HETEROGÊNEA
L35/05	1	0,06	1	0,03	1	0,06	
L71/02	4	0,12	2	0,12	4	0,06	

L69/04	4	0,06	2	0,06	4	0,015	
L181/01	0,5	0,06	0,5	0,06	0,25	0,015	
L69/03	4	0,06	2	0,03	4	0,06	
L70/02	1	0,03	1	0,03	1	0,015	
L33/05	16	0,5	16	0,5	16	0,015	
L101/97	8	0,06	8	0,06	8	0,03	
L72/04	2	0,12	0,5	0,03	2	0,12	HETEROGÈNEA
L51/04	4	0,12	4	0,12	0,25	0,06	HETEROGÈNEA
L08/03	1	0,03	2	0,015	1	0,03	
587SP3/07	1	0,03	0,5	0,03	1	0,03	
L66/03	1	0,06	1	0,03	0,5	0,06	
04SP3/07	2	0,06	1	0,06	2	0,06	
L68/02	8	0,06	8	0,06	1	0,015	HETEROGÈNEA
L60/03	1	0,06	1	0,06	1	0,03	
L89/03	1	0,06	1	0,015	1	0,06	
276SP3/07	2	0,06	0,25	0,06	2	0,06	HETEROGÈNEA
481SP3/07	1	0,06	0,5	0,015	1	0,015	
L38/03	2	0,015	2	0,015	0,12	0,015	HETEROGÈNEA
L67/03	2	0,015	2	0,015	2	0,015	
L107/96	2	0,12	2	0,06	2	0,12	
L 52/04	8	0,5	8	0,5	0,5	0,03	HETEROGÈNEA
L50/04	8	0,12	8	0,12	32	0,06	HETEROGÈNEA E HETERORESISTENTE
L58/05	2	0,12	0,25	0,06	2	0,12	HETEROGÈNEA
L33/01	0,12	0,12	0,12	0,06	0,12	0,12	
L68/06	8	0,25	0,5	0,12	8	0,25	HETEROGÈNEA
L89/05	0,25	0,03	0,25	0,03	0,25	0,03	
L57/05	2	0,12	0,25	0,06	2	0,12	HETEROGÈNEA
L83/04	2	0,06	2	0,06	2	0,03	
L1208/97	8	0,06	2	0,03	8	0,06	HETEROGÈNEA
L117/97	4	0,06	4	0,06	4	0,06	
L27/02	4	0,12	4	0,12	4	0,12	
L59/05	0,25	0,12	0,25	0,12	0,25	0,12	
L108/96	1	0,06	1	0,06	0,12	0,06	HETEROGÈNEA
L03/00	0,25	0,12	0,12	0,12	0,25	0,06	
L111/02	8	0,03	8	0,03	4	0,03	
L67/02	0,25	0,03	0,25	0,03	0,12	0,03	
L78/02	0,25	0,25	0,12	0,015	0,25	0,25	
L215/01	0,5	0,25	0,5	0,25	0,25	0,06	
L100/99	8	0,03	8	0,015	0,25	0,03	HETEROGÈNEA
L105/96	0,5	0,12	0,5	0,12	0,5	0,12	
L64/03	4	0,12	4	0,12	0,25	0,06	HETEROGÈNEA
L61/03	0,12	0,06	0,12	0,03	0,12	0,06	
L86/03	0,25	0,06	0,25	0,06	0,12	0,015	
L45/01	16	0,06	0,25	0,015	16	0,12	HETEROGÈNEA E HETERORESISTENTE
L48/01	1	0,03	0,25	0,12	0,5	0,06	
L14/02	1	0,12	0,5	0,12	1	0,03	
L15/01	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,03	
L29/02	0,25	0,015	0,25	0,015	0,25	0,015	
L23/02	4	0,12	1	0,03	4	0,12	HETEROGÈNEA
L20/03	0,5	0,03	0,5	0,03	0,12	0,015	HETEROGÈNEA
L25/03	0,5	0,03	0,25	0,03	0,5	0,015	
L09/01	0,5	0,015	0,5	0,015	0,5	0,015	
L06/02	2	0,06	2	0,015	2	0,06	
L80/04	2	0,06	2	0,025	0,25	0,06	HETEROGÈNEA
L22/02	0,25	0,03	0,12	0,015	0,25	0,03	
L23/03	0,25	0,03	0,25	0,03	0,25	0,03	

L24/03	1	0,06	1	0,015	1	0,06	
L10/02	8	0,06	8	0,06	2	0,015	HETEROGÊNEA
L11/03	2	0,015	2	0,015	2	0,015	
L21/03	4	0,03	0,25	0,03	4	0,03	HETEROGÊNEA
L209/01	1	0,03	1	0,03	0,25	0,015	HETEROGÊNEA
L14/03	1	0,03	1	0,015	0,12	0,03	HETEROGÊNEA
L101/02	0,5	0,015	0,12	0,015	0,5	0,015	HETEROGÊNEA
L23/01	2	0,03	0,5	0,015	1	0,03	
L67/04	1	0,03	1	0,03	0,25	0,015	HETEROGÊNEA
L51/01	0,25	0,015	0,12	0,015	0,25	0,015	
L09/03	0,25	0,015	0,25	0,015	0,12	0,015	
L36/05	4	0,25	4	0,12	0,25	0,25	HETEROGÊNEA
L88/03	0,12	0,03	0,12	0,03	0,12	0,015	
L1619/97	0,25	0,03	0,25	0,03	0,25	0,015	
L58/03	8	0,06	8	0,06	8	0,06	
L25/00	2	0,12	2	0,03	0,25	0,12	HETEROGÊNEA
L74/04	0,25	0,06	0,25	0,06	0,12	0,03	
L63/03	0,25	0,06	0,12	0,06	0,25	0,015	
L119/02	2	0,06	0,5	0,015	2	0,06	HETEROGÊNEA
L77/00	8	0,12	8	0,12	0,25	0,12	HETEROGÊNEA
L07/05	0,12	0,06	0,12	0,06	0,12	0,03	
L106/06	0,25	0,015	0,25	0,015	0,12	0,015	
L34/00	1	0,015	1	0,015	1	0,015	
L09/05	0,5	0,25	0,5	0,06	0,25	0,25	
L68/03	1	0,06	0,5	0,03	1	0,06	
L19/96	0,5	0,12	0,5	0,12	0,5	0,015	HETEROGÊNEA E HETERORESISTENTE
L38/02	2	0,03	1	0,03	16	0,015	
L13/02	8	0,06	8	0,06	0,5	0,015	HETEROGÊNEA
L04/02	0,25	0,015	0,12	0,015	0,25	0,015	
L03/05	0,12	0,015	0,12	0,015	0,12	0,015	
L57/04	0,12	0,06	1	0,06	16	0,06	HETEROGÊNEA E HETERORESISTENTE
L248/99	2	0,12	2	0,12	0,25	0,015	HETEROGÊNEA
L136/06	0,12	0,015	0,12	0,015	0,12	0,015	
L89/04	0,12	0,015	0,12	0,015	0,12	0,015	
L122/06	4	0,12	1	0,015	4	0,12	HETEROGÊNEA
L126/06	2	0,12	8	0,12	16	0,015	HETERORESISTENTE
L121/06	1	0,015	0,12	0,015	1	0,015	HETEROGÊNEA
L90/04	0,25	0,015	0,12	0,015	0,25	0,015	
L246/99	4	0,25	4	0,015	4	0,25	
L114/03	2	0,12	2	0,12	0,25	0,015	HETEROGÊNEA
L70/98	1	0,015	0,12	0,015	1	0,015	HETEROGÊNEA
L247/99	0,5	0,03	0,5	0,015	0,25	0,015	
L116/06	16	0,25	32	0,03	0,25	0,25	HETEROGÊNEA E HETERORESISTENTE
L115/06	1	0,25	0,5	0,25	1	0,015	
L93/04	0,12	0,015	0,12	0,015	0,12	0,015	
L91/04	0,12	0,06	0,12	0,06	0,12	0,03	
L137/06	8	0,12	16	0,03	0,25	0,12	HETEROGÊNEA E HETERORESISTENTE
L129/06	4	0,12	0,25	0,12	4	0,12	HETEROGÊNEA
L159/06	0,12	0,015	0,12	0,015	0,12	0,015	
L30/05	8	0,5	0,12	0,015	8	0,5	HETEROGÊNEA
L92/04	2	0,03	0,12	0,015	0,12	0,015	
L38/00	0,25	0,03	0,25	0,015	0,25	0,03	
L37/02	0,12	0,015	0,12	0,015	0,12	0,015	
L10/04	0,12	0,015	0,12	0,015	0,12	0,015	

L09/04	1	0,06	0,5	0,06	1	0,03	
L1608/97	0,5	0,06	0,5	0,03	0,5	0,06	
L202/04	0,5	0,03	0,25	0,06	8	0,015	HETEROGÊNEA
L212/04	4	0,015	4	0,015	2	0,015	
L487/04	2	0,12	1	0,015	2	0,12	
L440/04	4	0,12	1	0,015	4	0,12	HETEROGÊNEA
L512/04	8	0,06	8	0,06	4	0,03	
L314/04	4	0,015	4	0,015	2	0,015	
L117/03	4	0,03	0,5	0,06	4	0,015	HETEROGÊNEA
L118/03	4	0,015	2	0,03	16	0,015	HETEROGÊNEA E HETERORESISTENTE
L120/03	1	0,06	2	0,03	0,5	0,06	HETEROGÊNEA
L124/03	1	0,03	1	0,015	2	0,03	
L488/04	32	0,5	32	0,5	16	0,5	
L128/03	1	0,03	0,25	0,03	2	0,015	HETEROGÊNEA
L517/04	4	0,06	4	0,03	2	0,06	
L138/03	8	0,06	2	0,12	16	0,03	HETEROGÊNEA E HETERORESISTENTE
167SP3/06	4	0,03	4	0,03	2	0,015	
L137/03	2	0,06	4	0,06	1	0,015	HETEROGÊNEA
L119/03	2	0,06	4	0,06	2	0,03	
L495/04	8	0,06	4	0,015	8	0,06	
L129/03	2	0,015	2	0,015	0,5	0,015	HETEROGÊNEA
L134/03	8	0,06	0,12	0,015	8	0,06	HETEROGÊNEA
L116/03	2	0,03	2	0,015	2	0,03	
L125/03	2	0,015	2	0,015	0,12	0,015	HETEROGÊNEA
L300/04	2	0,015	2	0,015	0,5	0,015	HETEROGÊNEA
L127/03	2	0,03	0,12	0,015	2	0,03	HETEROGÊNEA
L115/03	0,5	0,03	1	0,015	0,5	0,015	
L133/03	4	0,06	2	0,03	4	0,06	
L216/04	4	0,06	8	0,06	0,5	0,015	HETEROGÊNEA
L298/04	4	0,015	4	0,015	0,25	0,015	HETEROGÊNEA
L494/04	0,5	0,06	0,5	0,015	0,25	0,06	
L199/04	4	0,015	4	0,015	4	0,015	
L363/04	2	0,015	2	0,015	2	0,015	
L515/04	8	0,5	8	0,12	16	0,5	HETERORESITENTE
L358/03	4	0,12	4	0,03	4	0,12	
L211/04	4	0,12	4	0,03	4	0,12	
L354/04	0,5	0,03	0,5	0,03	0,5	0,03	
274SP3/07	4	0,12	0,12	0,12	8	0,12	HETEROGÊNEA
L121/03	1	0,015	1	0,015	1	0,015	
L531/04	2	0,06	2	0,06	1	0,03	
L25/02	8	0,03	8	0,03	8	0,03	
L143/03	8	0,12	8	0,12	8	0,12	
L489/04	8	0,06	4	0,03	8	0,12	
L136/03	16	0,12	16	0,12	16	0,12	
L268/04	8	0,25	8	0,25	8	0,25	
L403/04	4	0,12	4	0,12	4	0,12	
L297/04	4	0,06	2	0,06	8	0,06	HETEROGÊNEA
L313/04	4	0,06	4	0,06	4	0,06	
L132/03	0,25	0,12	0,12	0,25	0,25	0,06	
L198/04	0,12	0,015	0,12	0,015	0,12	0,015	
L143/03	0,12	0,06	0,12	0,015	0,25	0,06	
L289/04	0,25	0,03	0,12	0,015	0,5	0,03	HETEROGÊNEA
L215/04	0,25	0,03	0,25	0,03	0,25	0,03	
L296/04	1	0,015	0,25	0,015	1	0,015	HETEROGÊNEA
L197/04	0,25	0,03	0,25	0,015	0,25	0,03	
L122/03	4	0,06	1	0,015	4	0,06	HETEROGÊNEA

L518/04	0,25	0,015	0,25	0,015	0,25	0,015	
L114/04	2	0,03	2	0,03	1	0,015	
L109/03	0,5	0,015	0,5	0,015	0,12	0,015	HETEROGÈNEA
L510/04	0,5	0,015	0,25	0,015	1	0,015	HETEROGÈNEA
L511/04	0,5	0,015	0,5	0,015	0,25	0,015	
L112/04	0,25	0,015	0,25	0,015	0,12	0,015	
L214/04	0,5	0,015	0,25	0,015	0,5	0,015	
L113/04	2	0,03	1	0,015	2	0,06	
L200/04	2	0,03	4	0,06	0,5	0,015	HETEROGÈNEA
L110/04	0,25	0,015	0,25	0,015	0,12	0,015	
L127/04	0,25	0,015	0,25	0,015	0,25	0,015	
L128/04	0,25	0,015	0,12	0,015	0,5	0,015	HETEROGÈNEA
L70/04	0,5	0,015	0,5	0,015	0,5	0,015	
L148/03	0,5	0,03	0,25	0,03	0,5	0,03	
L150/03	0,12	0,015	0,12	0,015	0,12	0,03	