

**Universidade Federal do Rio de Janeiro
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho**

CAROLINE REZENDE GUERRA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE INIBIDORES DA SÍNTESE DO
ERGOSTEROL EM ISOLADOS DE *Cryptococcus neoformans***

**Dissertação de Mestrado submetida à Universidade Federal do Rio de Janeiro
visando a obtenção do Grau de Mestre em Ciências Biológicas**

Rio de Janeiro

2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

CAROLINE REZENDE GUERRA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE INIBIDORES DA
SÍNTESE DO ERGOSTEROL EM ISOLADOS DE
*Cryptococcus neoformans***

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biofísica), Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Biofísica).

Orientadora: Sonia Rozental



**Rio de Janeiro
2009**

Ficha Catalográfica:

GUERRA, Caroline Rezende

Avaliação da atividade de inibidores da síntese do ergosterol em isolados de *Cryptococcus neoformans*. / Caroline Rezende Guerra. Rio de Janeiro, 2009.

VIII, 72f.

Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas - Biofísica) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, 2009.

Orientadora: Sonia Rozental

1. *Cryptococcus neoformans*. 2. Ergosterol. 3. Antifúngicos. 4. Microscopia
- I. Universidade Federal do Rio de Janeiro II. Título

“Avaliação da atividade de inibidores da síntese do ergosterol em isolados de *Cryptococcus neoformans*.”

CAROLINE REZENDE GUERRA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA À UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO VISANDO A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOFÍSICA)

APROVADA POR:

RIO DE JANEIRO, 11 DE SETEMBRO DE 2009.

PROF^a. NARCISA LEAL DA CUNHA E SILVA (DOUTOR – UFRJ)
(COORDENADORA DO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS BIOFÍSICA)

PROF^a SONIA ROZENTAL (DOUTOR – UFRJ) – ORIENTADORA

PROF^a. CELUTA SALES ALVIANO (DOUTOR – UFRJ) - REVISORA

PROF. ANDRÉ LUIS SOUZA DOS SANTOS (DOUTOR – UFRJ)

PROF^a. DANIELA SALES ALVIANO (DOUTOR – UFRJ)

PROF^a. ELEONORA KURTENBACH (DOUTOR – UFRJ)

Agradecimentos

Primeiramente, agradeço a minha família, pelo apoio, incentivo, carinho e por me proporcionar uma base familiar sólida. E ao meu namorado, Eduardo, pela compreensão, amizade e conselhos.

Agradeço a minha orientadora, Dra. Sonia Rozental, pela oportunidade, por investir e acreditar em mim (desde os tempos de iniciação científica). Pela amizade e ótimo convívio, dentro e fora do laboratório.

Agradeço a todos do laboratório: Amanda, Kelly, Luana, Marcel, Priscila, Taissa e Talita por toda ajuda, apoio e amizade.

A todos os professores do Laboratório de Ultra-estrutura Celular Hertha Meyer, muito obrigada pela colaboração, em especial para Juliany Rodrigues, por ter me ensinado e orientado em diversas etapas do meu desenvolvimento científico.

A todos os alunos do Laboratório Hertha Meyer, obrigada pelo convívio e amizade, especialmente Lissa, Thiago Luiz e Thiago Manchester, pelos momentos de descontração e companhia na hora do almoço e do “cafezinho”.

A todos os meus amigos de colégio e faculdade, pelos anos de amizade e companheirismo.

LISTA DE ABREVIATURAS

AMB – Anfotericina B

ATCC – American Type Culture Collection

AZA – 22,26-Azasterol

CFM – Concentração Fungicida Mínima

CIM – Concentração Inibitória Mínima

CIM₉₀ – Concentração Inibitória Mínima de 90% das amostras

DAPI – 4',6-diamidino-2-fenilindol dihidroclorato

DIC – Microscopia óptica de contraste interferencial

EIL - Epiminolanosterol

FIC *index* – Índice da Concentração Inibitória Fracional

FLU – Fluconazol

HU – Hospital Universitário Clementino Fraga Filho

IC – Concentração Inibitória

IC₅₀ – Concentração Inibitória de 50% do crescimento

IC₉₀ – Concentração Inibitória de 90% do crescimento

ITRA – Itraconazol

MET – Microscopia Eletrônica de Transmissão

PBS – Tampão fosfato-salina

SFB – Soro Fetal Bovino

TERB – Terbinafina

UFC – Unidade Formadora de Colônia

WSP – WSP1267

RESUMO

Cryptococcus neoformans é um patógeno oportunista que pode causar meningoencefalite, principalmente, em pacientes imunocomprometidos. Relatos de reincidência de infecções fúngicas, após longos períodos de terapia, têm se tornado muito freqüentes nos últimos anos, sugerindo um aumento de cepas resistentes aos quimioterápicos disponíveis atualmente. Assim, é de extrema importância pesquisas que visem à busca de novos antifúngicos. Um potencial alvo quimioterápico é a via de biossíntese do ergosterol, um dos principais esteróis componentes da membrana plasmática de fungos e protozoários, devido à ausência de tal via em mamíferos.

Nosso estudo teve como principais objetivos avaliar a susceptibilidade de 23 isolados de *C. neoformans* frente ao tratamento com diferentes drogas, que atuam na via de síntese do ergosterol; observar as modificações morfológicas causadas pelos compostos: WSP 1267 (WSP), inibidor da enzima esqualeno sintase; 22,26-azasterol e epiminolanosterol (EIL), inibidores da enzima $\Delta 24^{(25)}$ -esterol metiltransferase; comparar estes com antifúngicos utilizados na terapia atual: anfotericina B, fluconazol e itraconazol (ITRA); além de testarmos a atividade *in vitro* da terbinafina (TERB), isolada ou em combinação com antifúngicos, como um possível tratamento para a criptococose.

Através de ensaios de microdiluição, verificamos que os compostos WSP e EIL tiveram ótimo efeito contra *C. neoformans*, apresentando IC₅₀ (50% de inibição do crescimento) menores que 2 µg/ml. De maneira similar, os isolados foram bastante sensíveis a TERB e ITRA. A partir de testes de *checkerboard*, verificamos que as combinações entre os antifúngicos usados neste trabalho foram sinérgicas. Além disso, por meio da microscopia eletrônica de transmissão, observamos alterações estruturais, principalmente, na parede celular e membrana plasmática, nas cepas tratadas com as diferentes drogas. Da mesma forma, foi possível observar marcação com Nile Red nas cepas tratadas, indicando um provável acúmulo de esteróis e/ou seus precursores na célula.

Portanto, a TERB e suas combinações com antifúngicos podem ser uma alternativa no tratamento da criptococose. Os novos compostos testados, também, demonstraram uma boa atividade, principalmente WSP e EIL, sendo antifúngicos em potencial. Porém, testes *in vivo* são necessários.

ABSTRACT

Cryptococcus neoformans is an opportunistic pathogen that causes severe infections, mainly in immunocompromised patients, such as meningo-cerebral cryptococcosis. Over the last few years there has been an increase of resistant strains, indicating the need for new antifungal agents. Thus, studies aiming for the search of new chemotherapy agents are extremely important. Ergosterol is one of the major membrane sterol present in fungal and protozoan cells, and its biosynthesis pathway is a good antifungal target, due to its absence in mammalian cells.

The aim of our study was to evaluate the susceptibility of 23 *C. neoformans* isolates treated with various drugs that act in the ergosterol biosynthesis pathway; analyze morphological alterations caused by the compounds: WSP 1267 (WSP), inhibitor of the enzyme squalene synthase; 22,26-azasterol and epiminolanosterol (EIL), inhibitors of the enzyme $\Delta 24^{(25)}$ -sterol methyl transferase; compare with currently used antifungals: amphotericin B, fluconazole and itraconazole; as well as evaluate the *in vitro* activity of terbinafine, alone or in combination with antifungals, as a potential alternative in the treatment of cryptococcosis.

Through microdilution assays we were able to see that WSP and EIL had a good effect on *C. neoformans*, as the IC₅₀ (50% of growth inhibition) values were lower than 2 μ g/ml. In addition, the isolates were susceptible to TERB and ITRA. Interestingly, by combining the antifungals with the checkerboard method we saw a synergistic effect with all combinations. Furthermore, using transmission electron microscopy we were able to see ultrastructural alterations, mainly in the cell wall and membrane, in the strains treated with the different compounds. Also, Nile Red staining was observed, by fluorescence microscopy, in treated cells, indicating a probable sterol and/or sterol intermediate accumulation in the cell.

Therefore, TERB, used alone or in combination, can be an alternative treatment to cryptococcosis. The new agents tested also demonstrated good antifungal activity, especially WSP and EIL, being potential compounds for clinical use. However, *in vivo* tests are needed.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 <i>Cryptococcus</i> sp	1
1.1.2 Dimorfismo	3
1.2 Criptococose	4
1.2.1 Tratamento da Criptococose	7
1.3 Drogas: Mecanismos de Ação	8
2 OBJETIVOS	12
3 MATERIAIS E MÉTODOS	13
3.1 <i>Cryptococcus neoformans</i>	13
3.2 Compostos Antimicrobianos	14
3.3 Microdiluição	14
3.4 Concentração Fungicida Mínima (CFM)	15
3.5 Porcentagem Cumulativa das Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM)	16
3.6 Correlação entre as concentrações inibitórias das drogas	16
3.7 <i>Checkerboard</i>	16
3.8 Medição de cápsula e volume celular	18
3.9 Contagem de brotamento e alteração morfológica	20
3.10 Marcação para lipídios neutros com vermelho do nilo (Nile Red)	20
3.11 Marcação de DNA com DAPI	21
3.12 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	21
4 RESULTADOS	22
4.1 Microdiluição e Concentração Fungicida Mínima	22
4.2 Correlação entre as concentrações inibitórias	26
4.3 <i>Checkerboard</i>	28

4.4 Alterações no diâmetro celular	29
4.5 Alterações do tamanho de cápsula	35
4.6 Contagem de células com brotamento	39
4.7 Formação de pseudohifa <i>like</i>	41
4.8 Marcação de lipídeos com vermelho do nilo (Nile Red)	43
4.9 Marcação do DNA com DAPI	43
4.10 Microscopia Eletrônica de Transmissão	48
5 DISCUSSÃO	52
5.1 Susceptibilidade <i>in vitro</i>	52
5.1.1 Antifúngicos comerciais	52
5.1.2 Novos compostos antimicrobianos	54
5.1.3 Correlação entre as concentrações inibitórias das drogas	55
5.1.4 Combinação entre os antifúngicos	56
5.2 Alterações morfológicas	57
5.2.1 Medição do diâmetro celular	57
5.2.2 Medição do tamanho de cápsula	57
5.2.3 Porcentagem de brotamento	59
5.2.4 Formação de pseudohifa <i>like</i>	59
5.3 Acúmulo de lipídeos	60
5.4 Alterações no material genético	60
5.5 Alterações ultraestruturais	61
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	62
7 CONCLUSÕES	63
8 REFERÊNCIAS	64

1. INTRODUÇÃO

1.1 *Cryptococcus* sp

O fungo *Cryptococcus neoformans* foi, primeiramente, identificado em 1894 por Busse e Buschke (apud Casadevall & Perfect, 1998), a partir de um isolado de lesão na tíbia e por Sanfelice, a partir da polpa de pêssigo (Casadevall & Perfect, 1998). Este fungo faz parte do Filo Basidiomycota, gênero *Filobasidiella* (em seu estado sexuado) ou *Cryptococcus* (em seu estado assexuado). Em 1982, Kwon-Chung *et al* reconheceram duas variedades da espécie *C. neoformans*: *C. neoformans* var. *neoformans* e *C. neoformans* var. *gattii*. Posteriormente, a variedade *gattii* foi elevada ao nível de espécie, originando a espécie *C. gattii* (Kwon-Chung *et al*, 2002). As duas espécies de *Cryptococcus* se encontram sob a forma de levedura, envoltas por uma cápsula de polissacarídeos, e possuem um tamanho variando de 3 a 10µm de diâmetro, podendo ser esférica ou oval (figura 1). Sua reprodução se dá por brotamento simples ou múltiplo e, macroscopicamente, apresentam colônias creme, brilhantes e viscosas.

De acordo com características imunológicas dos polissacarídeos da cápsula, este fungo pode apresentar quatro sorotipos diferentes, sendo: A e D, *C. neoformans*; B e C, *C. gattii*. Em 1999, Franzot *et al*, propuseram que o sorotipo A fosse classificado como *C. neoformans* var. *grubii*, ficando o sorotipo D como *C. neoformans* var. *neoformans*. No entanto, já tem sido demonstrado que apenas o sorotipo não é suficiente para determinar as variedades e subgrupos dentro de um mesmo sorotipo, sendo necessário a genotipagem para melhor classificação de cada cepa (Diaz *et al*,

2005; Kwon-Chung *et al*, 2006). Dessa forma, na presente dissertação, utilizaremos apenas as denominações *C. neoformans* e *C. gattii*.

C. gattii pode ser encontrado na natureza associado a árvores e madeira em decomposição, sua distribuição geográfica ocorre, majoritariamente, em regiões tropicais e subtropicais. Porém, um importante surto de criptococose causado por *C. gattii*, no ano de 1999, em Vancouver, Canadá, sugere que esta espécie também ocorra em regiões de clima mais temperado (Kidd *et al*, 2004). Este fungo causa infecções pulmonares, principalmente, em indivíduos imunocompetentes, podendo evoluir ou não para uma meningoencefalite.

Por outro lado, *C. neoformans* possui uma distribuição global e pode habitar solos contaminados com excretas de aves, principalmente de pombos, ocos de árvores e poeira doméstica (Passoni *et al*, 1998; Nishikawa *et al*, 2003). Acomete, na maior parte dos casos, pacientes imunocomprometidos, ocasionando meningite criptococócica (Bicanic *et al*, 2005).

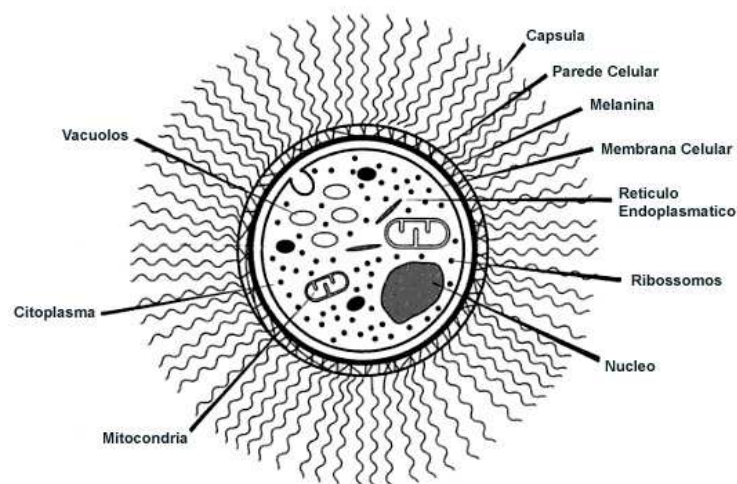


Figura 1. Esquema da célula de *Cryptococcus* sp e seus componentes. Adaptado de Casadevall & Perfect, 1998.

1.1.2 Dimorfismo

Os fungos dimórficos são aqueles que possuem a capacidade de crescer sob forma de levedura ou hifa. Muitos fungos patogênicos como, *Candida albicans*, *Histoplasma capsulatum*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Blastomyces dermatitidis* e *Sporothrix schenckii* apresentam um dimorfismo durante a infecção. O *Cryptococcus* não é reconhecidamente um fungo dimórfico, pois produz hifa apenas durante a reprodução sexuada, na natureza (Wickes *et al*, 2006).

Além das formas de levedura e hifa, alguns fungos podem formar pseudohifa, onde as células provenientes de brotamento permanecem ligadas à célula-mãe, formando uma cadeia de brotamentos alongados (figura 2) (Berman 2006).

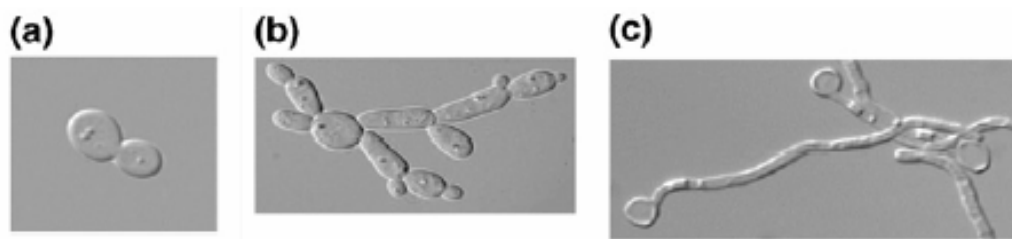


Figura 2. Células de *Candida albicans* representando as diferentes formas de crescimento dos fungos: levedura (a), pseudohifa (b) e hifa (c). Adaptado de Berman 2006.

Alguns fungos que, normalmente, não produzem hifa ou pseudohifa, como *Saccharomyces cerevisiae*, podem apresentar tais morfologias em condições de estresse, como falta de nutrientes (Gimeno *et al*, 1992). Similarmente, alguns estudos já demonstraram a capacidade do *C. neoformans* em apresentar hifas e pseudohifas *in vitro* e *in vivo* (Wickes *et al*, 1996; Williamson *et al*, 1995; Bemis *et al*, 2000).

1.2 Criptococose

Por definição, a criptococose é uma infecção sistêmica causada pela inalação de esporos do fungo *C. neoformans* ou *C. gattii*, sendo a primeira caracterizada como uma doença oportunista, associada à imunossupressão do hospedeiro, e a segunda, como uma infecção primária de hospedeiro aparentemente imunocompetente (Consenso em criptococose, 2008).

Como pode ser visto na figura 3, a via de infecção do *Cryptococcus* sp. se inicia através da inalação de seus esporos ou leveduras desidratadas encontradas no ambiente. Dessa forma, se estabelece uma infecção pulmonar que pode ser assintomática, ocorrendo resolução pelo próprio sistema imune do hospedeiro, ou os esporos podem ficar latentes no pulmão. Em pacientes que apresentam um sistema imune debilitado ou no caso de infecção por *C. gattii*, o fungo poderá se disseminar para outros órgãos e atravessar a barreira hemato-encefálica, infectando o sistema nervoso central e causando meningoencefalite (Idnurm *et al.*, 2005).

Nos últimos anos, infecções por *C. neoformans* têm se tornado cada vez mais freqüentes, devido ao aumento do uso de terapias imunossupressoras e à pandemia de HIV. Em muitos pacientes, o diagnóstico da criptococose é a primeira indicação de AIDS e é a terceira complicação neurológica mais frequente nesses indivíduos (Del Valle *et al.*, 2006). Recentemente, um estudo de revisão da literatura estimou uma taxa de mortalidade, associada à criptococose, de 70% na África sub-Sahariana e de 55% na América Latina (Park *et al.*, 2009). No Brasil, um estudo com 443 isolados ambientais

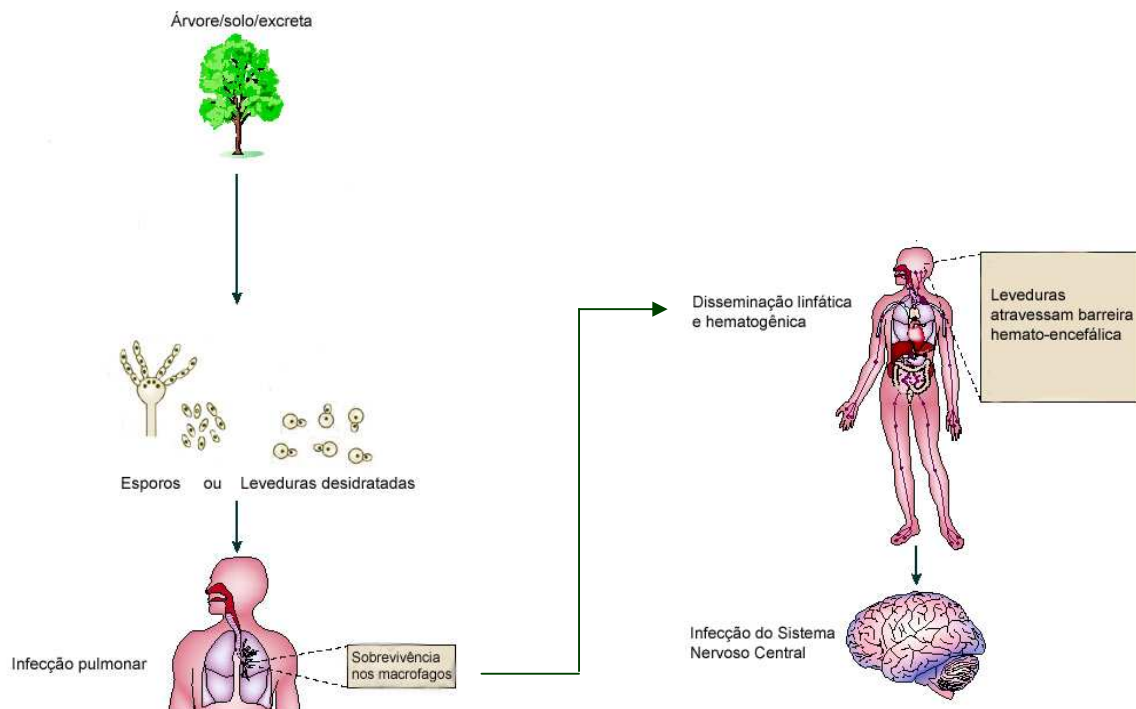


Figura 3. Via de infecção do *Cryptococcus* sp. Os esporos do fungo, presentes na natureza, são inalados pelo hospedeiro, causando uma infecção pulmonar inicial. O fungo é capaz de sobreviver a ação dos macrófagos alveolares e se disseminar pelo organismo. Ao atingir o sistema nervoso central causa a meningite criptocócica. Adaptado de Idnurm *et al*, 2005.

e clínicos de *Cryptococcus* sp provenientes de 11 estados, demonstrou uma predominância de *C. gattii* (67,3%) na macroregião norte do país de acordo com Trilles *et al*, 2008, e prevalência de *C. neoformans* (85%) na macroregião sul (figura 4). Entre o ano de 2005 e 2006, a média anual de mortes por criptococose no Brasil foi de 26,8%, sendo esta, a segunda causa mais freqüente relacionada a mortes por micoses sistêmicas (Prado *et al*, 2009).

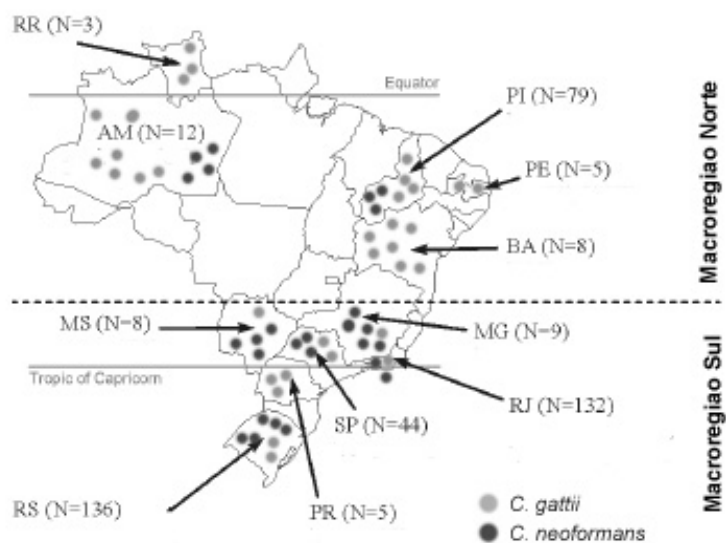


Figura 4. Distribuição geográfica de isolados de *Cryptococcus* sp de 11 estados brasileiros divididos em duas macroregiões, Norte e Sul. Prevalência de *C. gattii* na macroregião norte e de *C. neoformans* na macroregião sul. Adaptado de Trilles *et al*, 2008.

Diversos fatores estão associados à virulência deste fungo, como: capacidade de sobrevivência a 37°C, presença da cápsula polissacarídica (caráter antifagocítico), produção de melanina junto à parede celular (proteção contra radicais livres), produtos extracelulares (enzimas secretadas), entre outros (Buchanan & Murphy, 1998). Recentemente, a cápsula e os seus polissacarídeos liberados no organismo, foram considerados os principais fatores de virulência, pois, raramente, cepas com pouco material capsular são isoladas de pacientes (McFadden *et al*, 2006). Além disso, sabe-se que o tamanho da cápsula pode ser regulado em resposta a condições ambientais, sendo maior durante o processo infeccioso (Zaragoza & Casadevall, 2004).

1.2.1 Tratamento da Criptococose

Hoje em dia, os antifúngicos disponíveis para o tratamento da meningite criptocócica são: anfotericina B, flucitosina (não comercializada no Brasil), fluconazol e itraconazol. Recentemente, o consenso brasileiro de criptococose (2008) estabeleceu um roteiro de tratamento dos diferentes pacientes acometidos por *Cryptococcus* sp. Sugere-se que o tratamento para as formas pulmonares da criptococose seja feito com fluconazol ou itraconazol por 6 a 12 meses ou só anfotericina B, no caso de pacientes HIV negativos. Já, o tratamento para a meningite criptocócica deve ser realizado com anfotericina B, somente nas duas primeiras semanas do tratamento, em conjunto com a flucitosina, quando disponível. Nas 8 a 10 semanas seguintes, utiliza-se fluconazol. Posteriormente, mantem-se o tratamento com fluconazol, utilizando doses mais baixas, até que haja uma reconstituição do sistema imune. Em casos mais graves pode-se utilizar o fluconazol associado à flucitosina. Após melhora clínica, uma terapia de manutenção pode ser feita, por 12 a 24 meses, com fluconazol ou itraconazol.

Infelizmente, essa terapia antifúngica muitas vezes não é eficaz, ocorrendo reincidência da infecção, em até 30% dos pacientes imunocomprometidos, após a suspensão do tratamento. Nesses casos, novos azóis podem ser utilizados (voriconazol ou posaconazol), um estudo recente demonstrou melhora clínica após uso do posaconazol em 48% de pacientes que apresentaram falha à terapêutica convencional (Pitisuttithum *et al*, 2005), porém, ainda não existem muitos estudos com voriconazol na clínica da criptococose. A persistência da infecção pode estar relacionada à incapacidade do próprio sistema imune do hospedeiro combater o microrganismo, apesar da ajuda dos antifúngicos; à capacidade do *Cryptococcus* sp sofrer alterações fenotípicas, devido a pressões seletivas causadas pelos medicamentos, aumentando a

sua virulência; e à resistência adquirida pelo fungo após longos períodos de tratamento (Fries *et al*, 2005).

1.3 Drogas: Mecanismos de Ação

A anfotericina B é um antifúngico da classe dos poliênicos, isolado de *Streptomyces nodosus*, e foi primeiramente utilizado contra leishmaniose no início da década de 60 (Croft & Yardley, 2002). Atua se ligando ao ergosterol, principal esterol da membrana de fungos e protozoários, de modo a ocasionar poros na membrana plasmática, o que gera alteração em sua permeabilidade e uma conseqüente morte da célula. Dessa forma, diz-se que os poliênicos são fungicidas (matam a célula fúngica). Entretanto, apesar de haver uma maior afinidade ao ergosterol, este pode se ligar, também, ao colesterol presente nas células de mamíferos ocasionando muitos efeitos adversos ao paciente e, comumente, nefrotoxicidade (Brajtburg & Bolard, 1996).

Nas últimas décadas, novas formulações lipídicas foram desenvolvidas de modo a diminuir a toxicidade da anfotericina B, mantendo a sua atividade. Três formulações estão disponíveis comercialmente: AmBisome[®], Amphotec[™] e Abelcet[®]. Estes compostos apresentam baixa toxicidade mesmo quando usados em altas concentrações. No entanto, seu uso é limitado, pois possuem valores muito elevados, sendo inviável o uso dessas formulações em hospitais públicos.

O fluconazol e o itraconazol fazem parte da classe dos triazólicos e atuam na via de síntese do ergosterol, inibindo a enzima 14 α -demetilase e, conseqüentemente, impedindo a conversão do lanosterol em zimosterol (figura 5). Estes antifúngicos são conhecidamente fungistáticos, pois apenas impedem o crescimento do patógeno.

Ambos apresentam um certo grau de hepatotoxicidade para o hospedeiro, pois podem inibir, em menor grau, enzimas do citocromo P450 (Chen & Sorrell, 2007).

A terbinafina é um antifúngico da classe das alilaminas, esta também tem sua ação na via de síntese do ergosterol, porém, diferentemente dos azólicos, inibe uma enzima presente no início da via, a esqualeno epoxidase (figura 5). Apesar de ser clinicamente utilizada apenas contra dermatófitos, possui atividade *in vitro* contra diversos gêneros. Já foram observados efeitos fungicida, contra fungos filamentosos, e fungistático, contra isolados de *Candida* sp (Ryder *et al*, 1998).

Além dos antifúngicos comerciais citados acima. Durante esta tese, tivemos o objetivo de testar novas substâncias antimicrobianas com potencial atividade antifúngica: 22,26-Azasterol, Epiminolanosterol e WSP1267.

As novas substâncias utilizadas também inibem enzimas da via de síntese do ergosterol (figura 5), sendo o WSP 1267 inibidor da enzima esqualeno sintase, no início da via, e o 22,26-azasterol e epiminolanosterol, inibidores da enzima $\Delta^{24(25)}$ -esterol metiltransferase (Urbina *et al*, 1995). Esta enzima é responsável pela metilação do zimosterol, uma etapa que está ausente na biossíntese do colesterol em mamíferos, sendo a enzima, portanto, exclusiva de fungos e tripanossomatídeos (De Souza *et al*, 2002). Na figura 6, podemos observar a estrutura química de todos os agentes testados.

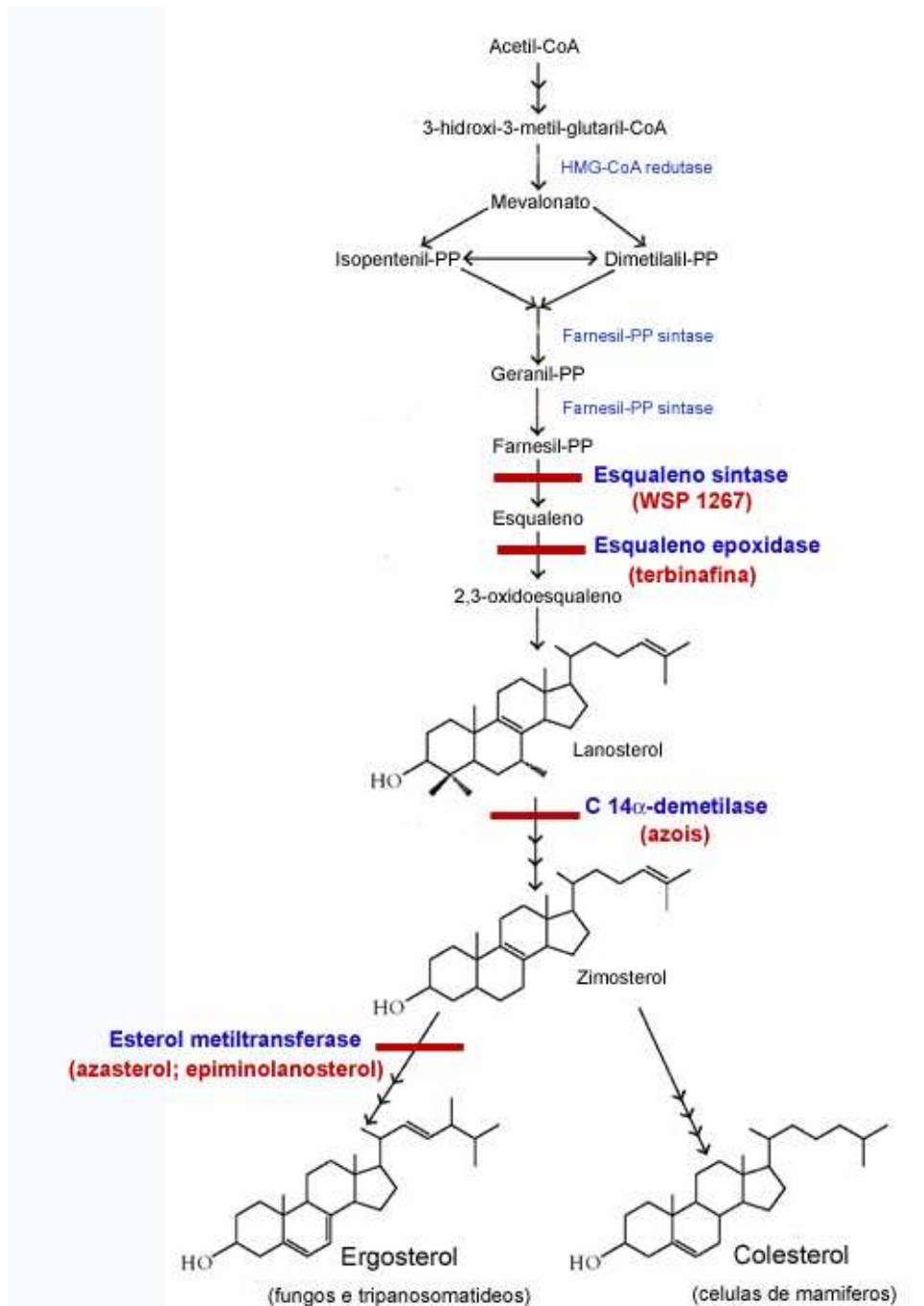
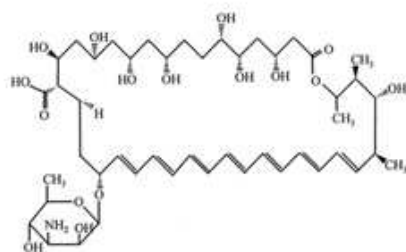
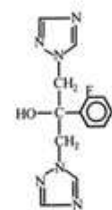


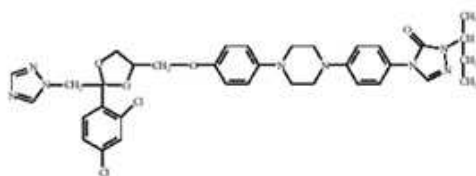
Figura 5. Principais etapas da via de biossíntese do ergosterol e colesterol. Esquema representa locais de atuação das drogas (em vermelho) e a respectiva enzima inibida (em azul). Adaptado de De Souza & Rodrigues, 2009.



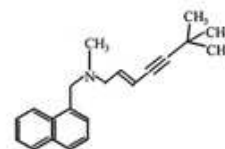
Anfotericina B



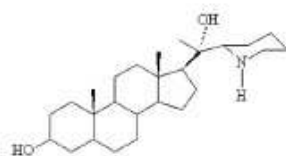
Fluconazol



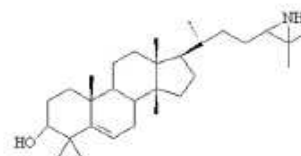
Itraconazol



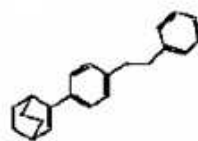
Terbinafina



22,26- Azasterol



Epiminolanosterol



WSP 1267

Figura 6. Estrutura química das drogas utilizadas. Adaptado de Ghannoum & Rice, 1999 e Ishida *et al*, 2009.

2 OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivos:

2. Avaliar a susceptibilidade de diversos isolados de *Cryptococcus neoformans* frente ao tratamento com antifúngicos comerciais e novos compostos, inibidores da biossíntese do ergosterol.
3. Determinar as concentrações inibitórias (IC₅₀ e IC₉₀) e fungicida mínima (CFM) dos compostos testados.
4. Observar alterações morfológicas causadas pelos compostos usados, através de microscopia óptica e eletrônica.
5. Analisar os efeitos das combinações entre os antifúngicos comerciais.
6. Quantificar as alterações observadas após os tratamentos com as diferentes drogas, como: tamanho da cápsula, diâmetro celular, porcentagem de brotamento e formação de pseudohifa.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 *Cryptococcus neoformans*

As cepas e isolados de *C. neoformans* utilizados neste trabalho foram obtidos e cultivados como descrito a seguir. A cepa T₁-444 foi obtida da Universidade Federal de São Paulo. A cepa HEC 3393 foi obtida do Laboratório de Micologia Médica, Hospital Evandro Chagas, FIOCRUZ, Rio de Janeiro. Ambas as cepas foram isoladas de pacientes com meningoencefalite e AIDS. As cepas ATCC 28957 e CAP 67 foram obtidas da American Type Culture Collection (ATCC), sendo a primeira isolada de lesão óssea e a segunda um mutante acapsular, obtido através de uma mutação pontual da cepa NIH B-3501, que por sua vez, foi originada do cruzamento das cepas ATCC 28957 e ATCC 28958.

As amostras CNBel 1 e CNBel 2 são isolados clínicos do líquido céfalo-raquidiano de pacientes HIV positivos e CNBel 4, isolado de felino, e foram gentilmente cedidas pelo Dr. Claudio Salgado, da Universidade Federal do Pará.

As amostras HU 1, HU 2, HU 3, HU 4A, HU 4B, HU 4C, HU 6, HU 7, HU 8, HU 9, HU 10, HU 11, HU 12, HU 13, HU 14 e HU 15 são isolados clínicos de pacientes do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, e foram cedidos pelo Dr. Márcio Nucci.

Todas as amostras foram estocadas em ágar Sabouraud, a 4°C. Quando retiradas do estoque, estas foram repicadas pelo menos duas vezes. Previamente a todos os experimentos, as amostras foram cultivadas por 48 horas, a 35°C, em um meio

quimicamente definido (meio mínimo) contendo: 15mM glucose, 10mM MgSO₄, 29,4 mM KH₂PO₄, 13mM glicina e 3μM de tiamina (vitamina B1), pH 5,5 (Rosas *et al*, 2001).

3.2 Compostos Antimicrobianos

As drogas utilizadas neste trabalho foram: anfotericina B (AMB), itraconazol (ITRA) e terbinafina (TERB) (Sigma Chemical Co., Missouri, EUA); fluconazol (FLU) (Pfizer, São Paulo); 22,26-azasterol (AZA) e epiminolanosterol (EIL) (cedidos por Julio Urbina - Caracas, Venezuela); e WSP 1267 (WSP) (cedido por Dr. Ian Gilbert - Cardiff, Grã Bretanha). Todos os compostos foram diluídos a concentrações 100 vezes maiores que as utilizadas, em água (FLU) ou DMSO (AMB, ITRA, TERB, AZA, EIL e WSP) e armazenados a -20°C.

3.3 Microdiluição

Para determinação da concentração inibitória de 50 e 90% (IC₅₀ e IC₉₀) foram realizados ensaios de microdiluição em placa, de acordo com o protocolo M27-A3 (CLSI, 2008). O inóculo final, aplicado em placas de 96 poços de fundo chato, foi ajustado para 0,5 x 10³ a 2,5 x 10³ UFC/ml em meio RPMI 1640 (Sigma Chemical Co.), suplementado com tampão MOPS 0,16 M, pH 7,0. As concentrações finais das drogas variaram de 0,125 a 64 μg/ml para FLU e 0,03 a 16μg/ml para os demais compostos. As concentrações inibitórias foram determinadas após incubação, a 35°C, por 72h, através de leitura espectrofotométrica a 492nm. Os valores de IC₅₀ e IC₉₀ foram determinados como sendo a menor concentração da droga que correspondeu à redução de 50 e 90% da absorbância, respectivamente, em comparação com a absorbância obtida no poço

controle. Os ensaios foram realizados com duplicatas de cada poço, três testes independentes foram feitos para cada quimioterápico.

3.4 Concentração Fungicida Mínima (CFM)

Anteriormente à leitura espectrofotométrica das placas de microdiluição, cada poço foi homogeneizado e uma alíquota de 5µl foi plaqueada em meio ágar sabouraud (peptona, dextrose e ágar) livre de droga. Após incubação a 35 °C, por 72h, a CFM foi determinada como sendo a menor concentração onde não ocorreu crescimento visual de colônias (figura 7).

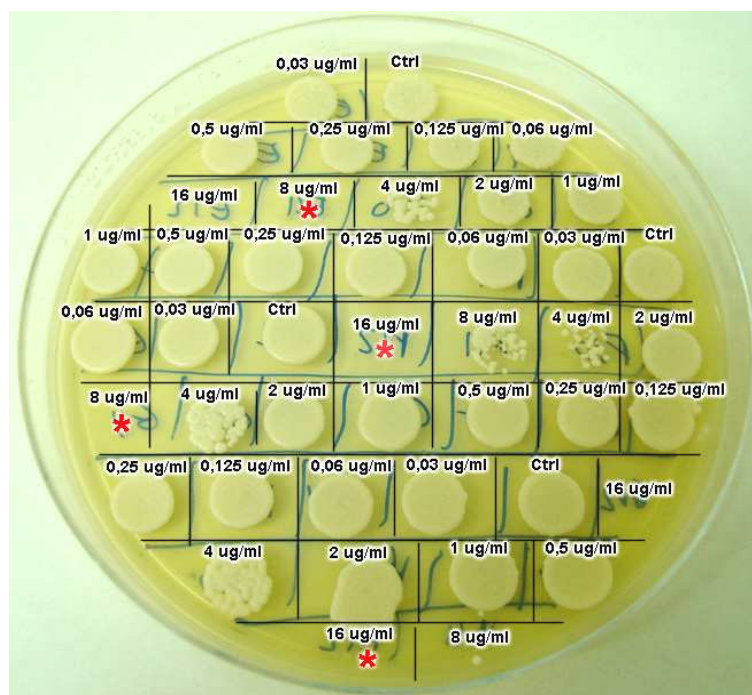


Figura 7. Placa de petri com meio ágar Sabouraud para determinação da CFM. Alíquotas dos poços da placa de microdiluição foram plaqueadas para visualização do crescimento de colônias, a menor concentração onde não houve crescimento corresponde a CFM (*). Em cada placa determinou-se CFM de quatro compostos diferentes. Arquivo pessoal.

3.5 Porcentagem Cumulativa das Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM)

Para melhor analisar os dados obtidos, após os testes de microdiluição, foi feita uma tabela com o valor cumulativo, em porcentagem, de cepas que apresentaram as respectivas CIM para cada composto. Dessa forma, é possível determinar a CIM₉₀, que corresponde à concentração inibitória mínima de 90% de uma determinada população, onde $n \geq 10$. Baseando-se no protocolo M27-A3, entende-se por CIM o valor que corresponde à inibição de 50% do crescimento fúngico para os azólicos e 100% de inibição para anfotericina B.

Para a terbinafina e as novas drogas testadas, utilizou-se a mesma classificação estabelecida para os azólicos.

3.6 Correlação entre as Concentrações Inibitórias

Foi realizado um teste de regressão linear com o programa GraphPad Prism 4.03, para determinação da correlação das IC₅₀ obtidas entre cada droga testada. Foi considerada uma correlação significativa quando o valor de $P < 0,05$.

3.7 Checkerboard

Para a combinação das drogas *in vitro* foram realizados ensaios de *checkerboard*, avaliando os efeitos sinérgico, antagônico ou indiferente entre os antifúngicos já utilizados na clínica. Estes testes foram realizados com as cepas de *C. neoformans* ATCC 28957 e HU 2.

Resumidamente, 100µl de uma droga A (4x concentrada) é dispensado na coluna 11 da placa de 96 poços, que já contém 100µl de RPMI 1640, e, posteriormente, faz-se a diluição seriada até a coluna 2. Depois, coloca-se 100µl da droga B (4x

concentrada) na linha A e faz-se a diluição seriada até a linha G, de modo que é feita a combinação das duas drogas. A linha H fica apenas com a droga A, sem combinação, e a coluna 1, somente com a droga B, sem combinação (figura 8).

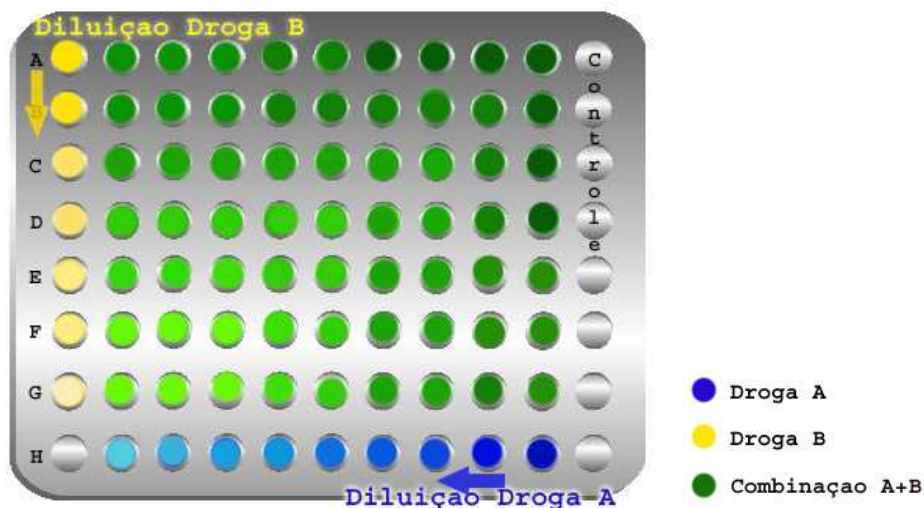


Figura 8. Esquema representando as diluições e combinações feitas no ensaio de *checkerboard*.

Após a inoculação do fungo, as placas são incubadas a 35°C, por 72h, e lidas por espectrofotômetro a 492nm. As interações são então interpretadas a partir do índice da concentração inibitória fracional (*FIC index*) que é calculado pela seguinte fórmula:

$$FIC_{Index} = FIC_A + FIC_B \quad \text{sendo,}$$

$$FIC_x = \frac{[X]}{IC_{50X}} \quad \text{onde,}$$

[X] = concentração da droga X que inibe 50% do crescimento após combinação;

IC_{50X} = IC₅₀ da droga X sem combinação.

De acordo com dados na literatura, o valor do FIC *Index* é considerado: sinérgico, quando $FIC_{Index} \leq 0,5$; indiferente de $0,5 < FIC_{Index} \leq 4$; e antagônico se $FIC_{Index} > 4$ (Johnson *et al*, 2004). Para cada combinação foram realizados dois testes independentes.

A partir dos resultados obtidos com os ensaios de *checkerboard* foram construídos isobogramas, onde as concentrações das combinações que inibiram 50% do crescimento fúngico foram plotados em um gráfico e uma linha de “aditividade” foi traçada a partir dos valores de IC_{50} dos compostos utilizados sozinhos (figura 9). Dessa forma, avaliam-se as combinações dos quimioterápicos *in vitro* conforme o seguinte: os valores encontrados abaixo da linha de “aditividade” são considerados sinérgicos; acima da linha, antagônicos; e em cima ou próximo da linha de “aditividade”, indiferentes (Tallarida 2006).



Figura 9. Isoblograma representativo demonstrando valores sinérgicos e antagônicos. Adaptado de Tallarida 2006.

3.8 Medição de cápsula e volume celular

A cepa *C. neoformans* ATCC 28957 foi incubada, a 35°C, em meio RPMI 1640 suplementado ou não com 10% de soro fetal bovino (SFB), sem ou com IC_{50} das drogas previamente descritas, e das combinações realizadas por *checkerboard*

entre TERB e AMB, FLU ou ITRA. Após 48h, uma alíquota foi retirada e fixada em líquido de contagem (10% formaldeído em PBS) para a medição do tamanho da cápsula e das células, após os diferentes tratamentos. Posteriormente, as células foram centrifugadas a 2000 rpm, por 3 minutos, o meio RPMI foi trocado e os compostos foram novamente adicionados nas mesmas concentrações. As células foram cultivadas por mais 72h e novas alíquotas foram retiradas. Para as medições foram preparadas lâminas com uma gota de tinta nanquim e uma gota das células fixadas, permitindo a visualização da cápsula por microscopia óptica. As imagens foram obtidas a partir do microscópio Zeiss Axioplan com o programa AnalySIS 3.2. As medições foram realizadas com o programa Semafore 5.0 JEOL, para a medição de cápsula considerou-se a distância entre a parede celular e o limite externo da cápsula e em cada célula mediu-se cerca de quatro regiões diferentes para obtenção do tamanho capsular médio (figura 10). Para a determinação do tamanho da levedura mediu-se o diâmetro em duas direções. Foram analisadas 20 células para cada condição e foi realizado o teste estatístico One-Way ANOVA, com pós-teste de Dunnett, para avaliar se a diferença dos tamanhos da cápsula e célula era significativa após os tratamentos. Os testes estatísticos foram realizados com o programa GraphPad Prism 4.03.

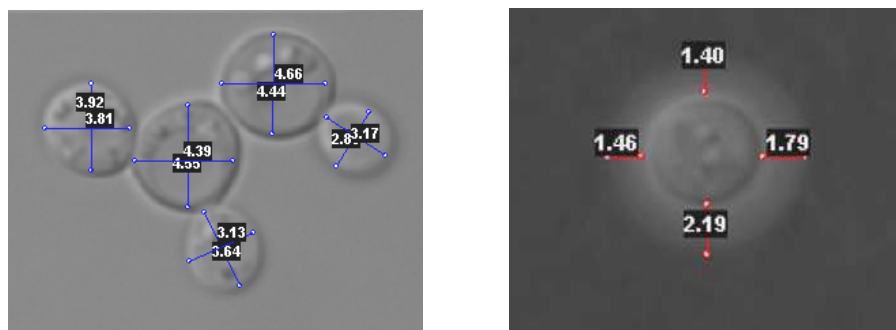


Figura 10. Medição do diâmetro das células e do tamanho da cápsula, em μm . *C. neoformans* ATCC 28957. Arquivo pessoal.

3.9 Contagem de brotamento e alteração morfológica

A partir das células fixadas e utilizadas para as medições descritas acima, fez-se a contagem do número de células que apresentavam brotamento ou aspecto pseudohifa *like* (figura 11B), em um total de 200 células por cada condição (Nakamura *et al*, 2004). A avaliação de alteração morfológica e contagem de brotamento foram realizadas sem adição de SFB ao meio RPMI 1640. Três testes independentes foram feitos.

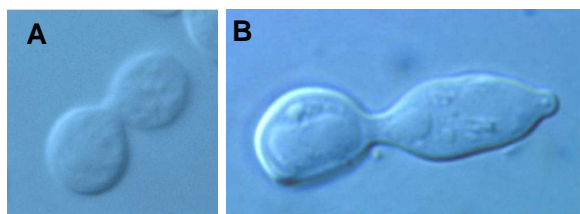


Figura 11. Leveduras com brotamento (A) e formato pseudohifa *like* (B). Arquivo pessoal.

3.10 Marcação para lipídios neutros com vermelho do nilo (Nile Red)

Após a incubação das células com os compostos antimicrobianos, as amostras foram lavadas duas vezes com tampão PBS, fixadas por 30 minutos com paraformaldeído 4%, incubadas com 100 μ l de vermelho do nilo, em uma concentração final de 5 μ g/ml, por 30 minutos (no escuro) e lavadas novamente com PBS. As células foram aderidas em lamínulas com poli-L-lisina, por 2 horas, depois lavadas três vezes com PBS para retirar as células não aderidas. As lamínulas, por sua vez, foram montadas em lâminas para fluorescência com N-propil galacto, seladas com esmalte incolor e guardadas a – 4°C, até a visualização por microscópio óptico de fluorescência Zeiss Axioplan.

3.11 Marcação de DNA com DAPI

As células foram processadas, também, para fluorescência, utilizando-se um marcador de núcleo (DAPI). Para tal, as células foram lavadas três vezes com PBS, após os tratamentos com as drogas, previamente descritas, permeabilizadas com Triton-X 0,5% em PBS por 15min, fixadas com paraformaldeído 4% por 30min e lavadas por três vezes com água destilada. Após adesão em lamínulas com poli-L-lisina, por 2h, as células foram incubadas com DAPI em uma concentração de 1µg/ml, por 10min. Depois de lavagens com água destilada, as lâminas foram montadas com N-propil galato, vedadas com esmalte e guardadas a -4°C até visualização em microscópio óptico de fluorescência Zeiss Axioplan.

3.12 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

A cepa ATCC 28957 foi incubada por 48 horas, a 35°C, com ou sem os compostos, lavada em tampão PBS com 3% de sacarose pH 7,2, fixada por uma hora em temperatura ambiente com 2,5% de glutaraldeído, 4% de paraformaldeído em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7.2. As células foram lavadas três vezes em tampão cacodilato de sódio e pós-fixadas, por 2 horas, em tetróxido de ósmio 1% e ferrocianeto de potássio 0,8%, no escuro. Seguido de três lavagens com água destilada, foram desidratadas em concentrações crescentes de etanol (30%, 50%, 70%, 90%, duas vezes 100% e 100% super seca), infiltradas e emblocadas em resina Spurr. Os blocos foram cortados em ultramicrótomo, os cortes recolhidos em grades de cobre, contrastados com acetato de uranila 5% e citrato de chumbo e analisados ao microscópio eletrônico de transmissão Zeiss 900.

4 RESULTADOS

4.1 Microdiluição e Concentração Fungicida Mínima

Os ensaios de microdiluição em caldo foram realizados para determinar o perfil de susceptibilidade das cepas de *C. neoformans* frente às diferentes drogas estudadas (tabelas 1 e 2). A análise dos antifúngicos comerciais revelou que, para a AMB, os isolados de pacientes do Hospital Universitário (HU) tiveram IC₅₀ e IC₉₀ um pouco mais elevados, provavelmente, devido ao tratamento prévio dos pacientes com AMB. Ainda, os isolados testados apresentaram uma menor susceptibilidade ao FLU, onde os valores de IC₅₀ e IC₉₀ variaram de 0,5 a 8µg/ml e de 4 a 16µg/ml, respectivamente. Entretanto, as amostras testadas obtiveram um perfil bastante sensível para o ITRA e a TERB, apresentando IC₅₀ até 0,5µg/ml para a maioria dos isolados. Interessantemente, os isolados do HU que apresentaram uma menor susceptibilidade para FLU e AMB foram mais sensíveis ao ITRA e TERB (tabela 1).

Entre as novas drogas utilizadas (tabela 2), o AZA foi o que apresentou menor atividade contra as cepas de *C. neoformans* testadas (IC₅₀ entre 2 a 16µg/ml). Entretanto, o WSP e EIL mostraram-se promissores devido a sua maior eficácia *in vitro*. Para WSP, os valores de IC₅₀ ficaram em torno de 0,5 e 1µg/ml e, interessadamente, todas as cepas apresentaram o mesmo perfil de sensibilidade, inclusive os isolados do HU que foram menos sensíveis ao FLU e AMB. Os isolados testados também apresentaram sensibilidade ao EIL, no entanto o perfil de inibição foi mais variável (IC₅₀ entre 0,03 e 4µg/ml).

Tabela 1. IC₅₀, IC₉₀ e CFM dos isolados de *C. neoformans* frente aos antifúngicos comerciais.

Cepas	Concentração (µg/ml)											
	Anfotericina B			Fluconazol			Itraconazol			Terbinafina		
	IC ₅₀	IC ₉₀	CFM	IC ₅₀	IC ₉₀	CFM	IC ₅₀	IC ₉₀	CFM	IC ₅₀	IC ₉₀	CFM
<i>C. neoformans</i> T,444	0,06	0,125	0,25	4	8	16	1	4	8	0,125	0,25	0,5
<i>C. neoformans</i> ATCC 28957	0,06	0,125	0,25	2	4	8	0,5	4	8	0,125	0,5	1
<i>C. neoformans</i> HEC 3393	0,06	0,125	1	2	4	8	0,5	2	8	0,25	0,5	1
<i>C. neoformans</i> CAP 67	0,03	0,06	0,125	2	4	8	0,5	2	8	0,125	0,5	1
<i>C. neoformans</i> CN Bel 1	0,125	0,25	1	2	4	8	2	8	16	0,25	0,5	2
<i>C. neoformans</i> CN Bel 2	0,125	0,25	1	2	4	8	2	8	16	0,25	0,5	1
<i>C. neoformans</i> CN Bel 4	0,06	0,125	0,25	0,5	2	16	0,06	0,5	2	0,06	0,5	4
<i>C. neoformans</i> HU 1	1	2	4	4	4	16	0,06	0,25	1	0,5	1	4
<i>C. neoformans</i> HU 2	1	2	4	8	16	32	0,06	0,25	8	0,5	1	16
<i>C. neoformans</i> HU 3	0,5	2	8	4	8	16	0,03	0,125	1	0,25	1	8
<i>C. neoformans</i> HU 4A	1	2	4	2	4	16	0,06	0,125	4	0,5	1	8
<i>C. neoformans</i> HU 4B	1	2	4	2	4	8	0,03	0,125	4	0,5	1	4
<i>C. neoformans</i> HU 4C	1	2	4	4	8	16	0,03	0,125	2	0,5	1	4
<i>C. neoformans</i> HU 6	0,5	1	8	1	4	8	0,06	0,25	2	0,25	0,5	4
<i>C. neoformans</i> HU 7	1	2	8	2	4	8	0,03	0,125	4	0,5	1	8
<i>C. neoformans</i> HU 8	1	2	8	1	4	32	0,03	0,06	1	0,25	0,5	4
<i>C. neoformans</i> HU 9	0,5	1	4	2	8	32	0,06	0,125	1	0,5	1	8
<i>C. neoformans</i> HU 10	0,5	1	4	4	16	32	0,06	0,125	1	0,5	1	16
<i>C. neoformans</i> HU 11	0,25	0,5	1	4	8	16	0,06	0,125	0,25	0,5	1	16
<i>C. neoformans</i> HU 12	2	4	8	4	8	16	0,25	0,5	1	0,25	0,5	2
<i>C. neoformans</i> HU 13	2	4	8	4	8	64	0,25	1	2	0,25	0,5	4
<i>C. neoformans</i> HU 14	1	4	8	4	16	32	0,25	0,5	1	0,5	1	8
<i>C. neoformans</i> HU 15	2	4	16	2	4	32	0,25	0,5	1	0,25	1	2

Tabela 2. IC₅₀, IC₉₀ e CFM dos isolados de *C. neoformans* frente às novas drogas.

Cepas	Concentração (µg/ml)								
	WSP 1267			Epiminolanosterol (EIL)			22,26-azasterol		
	IC ₅₀	IC ₉₀	CFM	IC ₅₀	IC ₉₀	CFM	IC ₅₀	IC ₉₀	CFM
<i>C. neoformans</i> T ₁₄₄₄	1	2	4	1	4	8	4	8	16
<i>C. neoformans</i> ATCC 28957	1	2	4	1	2	4	2	8	16
<i>C. neoformans</i> HEC 3393	1	2	4	1	2	4	2	8	8
<i>C. neoformans</i> CAP 67	1	2	4	0,5	2	4	2	8	16
<i>C. neoformans</i> CN Bel 1	1	2	8	4	8	16	8	16	>16
<i>C. neoformans</i> CN Bel 2	1	2	16	4	8	16	4	16	>16
<i>C. neoformans</i> CN Bel 4	0,5	1	2	0,125	4	8	2	16	16
<i>C. neoformans</i> HU 1	1	2	4	1	8	16	16	>16	>16
<i>C. neoformans</i> HU 2	1	2	8	2	8	16	8	16	>16
<i>C. neoformans</i> HU 3	0,5	1	4	1	4	8	8	>16	>16
<i>C. neoformans</i> HU 4A	0,5	1	4	1	4	8	4	16	>16
<i>C. neoformans</i> HU 4B	0,5	1	8	1	4	8	8	>16	>16
<i>C. neoformans</i> HU 4C	0,5	1	8	2	8	16	8	>16	>16
<i>C. neoformans</i> HU 6	1	2	8	1	2	4	16	>16	>16
<i>C. neoformans</i> HU 7	0,5	1	4	0,25	4	8	8	16	>16
<i>C. neoformans</i> HU 8	0,5	1	8	0,03	0,06	1	2	4	8
<i>C. neoformans</i> HU 9	0,5	1	4	1	4	8	16	>16	>16
<i>C. neoformans</i> HU 10	0,5	1	4	1	4	8	16	>16	>16
<i>C. neoformans</i> HU 11	0,5	1	8	2	4	8	8	16	>16
<i>C. neoformans</i> HU 12	1	2	4	1	4	8	8	16	>16
<i>C. neoformans</i> HU 13	0,5	1	8	2	4	16	8	16	>16
<i>C. neoformans</i> HU 14	0,5	1	4	0,5	2	8	4	8	>16
<i>C. neoformans</i> HU 15	1	2	4	2	4	8	8	16	>16

Como demonstrado na tabela 3, a CIM₉₀ (CIM de 90% de todas as amostras) para AMB foi entre 2 e 4µg/ml, novamente, este valor elevado reflete a menor sensibilidade apresentada pelos isolados de pacientes do Hospital Universitário. Porém, a maioria das cepas (94%) apresentou CFM até 8µg/ml. Um resultado de CFM com concentrações até 4 vezes o valor da CIM₉₀, como o observado para AMB, reflete a atividade fungicida desta droga (tabela 4).

Para o FLU, a população testada, também, apresentou CIM₉₀ de 4µg/ml. Todavia, as CFM apresentaram valores muito elevados, onde a maior parte da população obteve CFM de até 32µg/ml, 8 vezes o valor de CIM₉₀, corroborando a característica fungistática dos azólicos.

Já o ITRA apresentou CIM₉₀ de 1µg/ml e a TERB de 0,5µg/ml. Aparentemente, ambos antifúngicos tiveram um efeito fungistático, onde a maior parte da população apresentou CFM de até 8µg/ml.

Analisando a atividade *in vitro* das novas drogas, todos os isolados obtiveram IC₅₀ até 1µg/ml e IC₉₀ até 2 µg/ml para o WSP; IC₅₀ até 4 µg/ml e IC₉₀ até 8 µg/ml para o EIL. Já, para AZA, os valores de IC₅₀ variaram de 2 a 16µg/ml, não sendo possível determinar o IC₉₀ para boa parte das amostras. Os valores elevados de CFM obtidos demonstram que estes compostos apresentaram um efeito fungistático para a maioria das amostras testadas.

Tabela 3. Porcentagem cumulativa das CIM de 23 cepas de *C. neoformans*.

Concentração (µg/ml)	% Cumulativa de CIM									
	0,03	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16
Anfotericina B*	0	0	17	30	30	48	83	100		
Fluconazol	0	0	0	0	4	12	55	94	100	
Itraconazol	22	57	57	74	87	91	100			
Terbinafina	0	4	17	56	100					
WSP 1267	0	0	0	0	52	100				
EIL	4	4	8	12	20	68	90	100		
22,26-Azasterol	0	0	0	0	0	0	22	39	82	100

* CIM para AMB corresponde a 100% de inibição.

Tabela 4. Porcentagem cumulativa das CFM de 23 cepas de *C. neoformans*.

Concentração (µg/ml)	% Cumulativa de CFM											
	0,03	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64
Anfotericina B	0	0	4	17	17	34	34	64	94	100		
Fluconazol	0	0	0	0	0	0	0	0	35	70	96	100
Itraconazol	0	0	0	4	4	39	56	69	91	100		
Terbinafina	0	0	0	0	4	21	34	64	86	100		
WSP1267	0	0	0	0	0	0	4	61	96	100		
EIL	0	0	0	0	0	4	4	21	73	100		
22,26-Azasterol	0	0	0	0	0	0	0	0	9	26	100*	

* corresponde a CFM >16 µg/ml.

4.2 Correlação entre as concentrações inibitórias das drogas

Através da análise dos valores de IC₅₀ obtidos para cada composto, por teste de regressão linear, foi possível observar uma correlação positiva entre: ITRA e WSP ($r = 0,56$); ITRA e EIL ($r = 0,71$); TERB e AZA ($r = 0,51$); e negativa entre TERB e WSP ($r = -0,45$) (gráfico 1). O valor de r corresponde à inclinação da reta de tendência e quanto mais próximo de 1 é este valor, maior a correlação entre os dois grupos analisados.

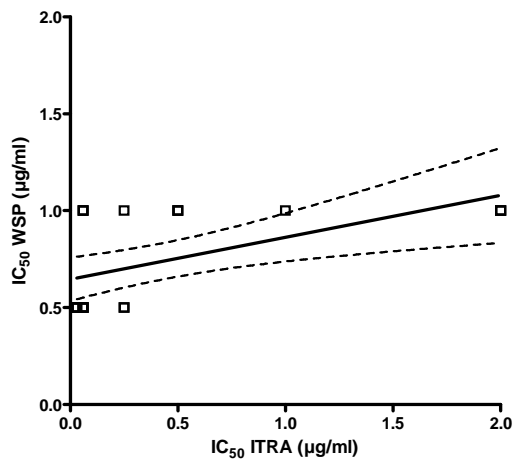
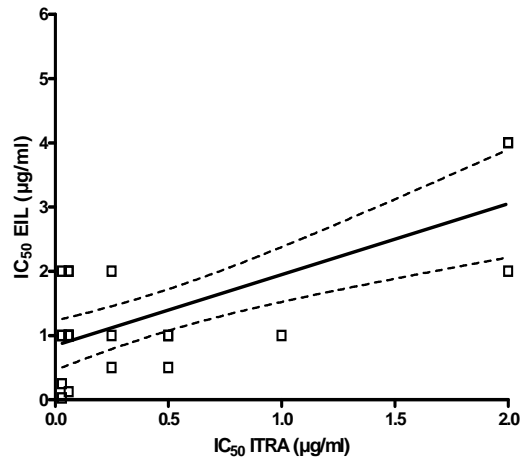
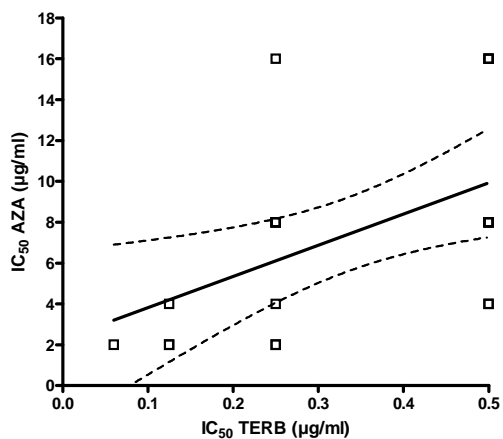
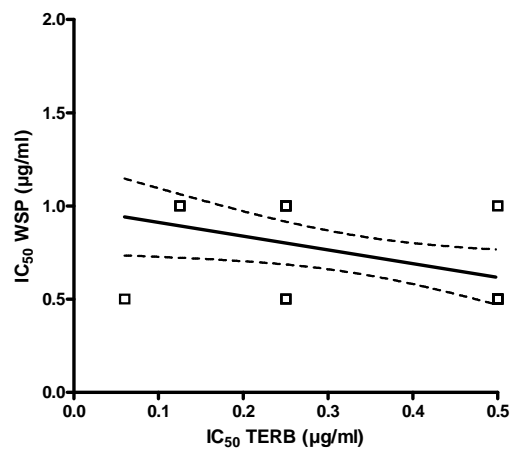
A**B****C****D**

Gráfico 1. Correlação entre os valores de IC_{50} obtidos para 23 cepas de *C. neoformans*. Teste de regressão linear significativo ($P < 0,05$) entre WSP x ITRA (A), EIL x ITRA (B), AZA x TERB (C) e WSP x TERB (D). — reta de tendência - - - - intervalo de confiança 95% □ valor de IC_{50} dos isolados testados

4.3 Checkerboard

Os ensaios de *checkerboard* foram realizados para avaliar o efeito das combinações entre os antifúngicos já comercializados. Para estes ensaios foram escolhidos uma cepa ATCC, padrão, e um isolado de paciente que apresentou valores mais elevados de IC₅₀ para os compostos testados (ATCC 28957 e HU2, respectivamente). Na tabela 5, encontram-se os valores das concentrações de diferentes combinações que inibiram 50% do crescimento das cepas. Essas concentrações representam a combinação mais eficaz para cada par de drogas, ou seja, a combinação que apresentou o menor valor de *FIC index*.

Todas as combinações foram sinérgicas para as duas cepas testadas e foram capazes de diminuir, consideravelmente, a concentração da droga. Principalmente, quando foram combinadas TERB com FLU ou ITRA, onde ocorreu redução de mais de 30 vezes o valor da IC₅₀. O mesmo, também, foi observado nas combinações com AMB para o isolado HU2, onde esta apresentou uma maior sensibilidade à AMB quando utilizada em conjunto com outro antifúngico, ocorrendo redução de até 16 vezes o valor da IC₅₀.

Tabela 5. Combinações entre os antifúngicos para as cepas ATCC 28957 e HU2.

	Concentrações em µg/ml (<i>FIC index</i>)	
	ATCC 28957	HU 2
Anfotericina B / Fluconazol	0,06 / 0,25 (0,31)	0,06 / 2 (0,28)
Anfotericina B / Itraconazol	0,06 / 0,015 (0,31)	0,06 / 0,03 (0,27)
Anfotericina B / Terbinafina	0,06 / 0,125 (0,37)	0,12 / 0,5 (0,5)
Terbinafina / Fluconazol	0,015 / 0,06 (0,25)	0,25 / 0,12 (0,26)
Terbinafina / Itraconazol	0,015 / 0,005 (0,17)	0,06 / 0,03 (0,3)

Corroborando com os dados obtidos através da análise do FIC *index*, é possível inferir, a partir dos isobogramas, que as combinações entre os antifúngicos mostraram-se sinérgicas para ambas as cepas testadas (gráficos 2 e 3). De modo que a maioria das concentrações, quando combinadas, apresentam-se abaixo da linha de “aditividade”, ou seja, abaixo dos valores de IC₅₀ dos antifúngicos utilizados sozinhos.

4.4 Alterações no diâmetro celular

Foram realizadas medições do diâmetro celular da cepa ATCC 28957, após 48 e 120h de tratamento, com adição ou não de 10% de SFB ao meio de cultura, para avaliar possíveis alterações no tamanho celular, ocasionadas pelos quimioterápicos. Comparado com o controle, o tratamento com os antifúngicos AMB, FLU e TERB causou um aumento significativo no tamanho celular após 120h, sem SFB, sendo esse aumento significativo, também, em 120h de tratamento com TERB, com SFB (gráfico 4).

Ao incubar as células com a combinação de TERB e AMB, notou-se um aumento no diâmetro celular no tempo de tratamento de 120h, com SFB (gráfico 5). Entretanto, curiosamente, no tratamento com as demais combinações não foram observadas diferenças em comparação com o controle, apesar de ter havido diferença quando os antifúngicos foram utilizados sozinhos.

O efeito dos novos compostos testados foi percebido, apenas, no tratamento com AZA, após 120h de incubação, sem SFB, ocorrendo um aumento celular significativo comparado ao controle (gráfico 6).

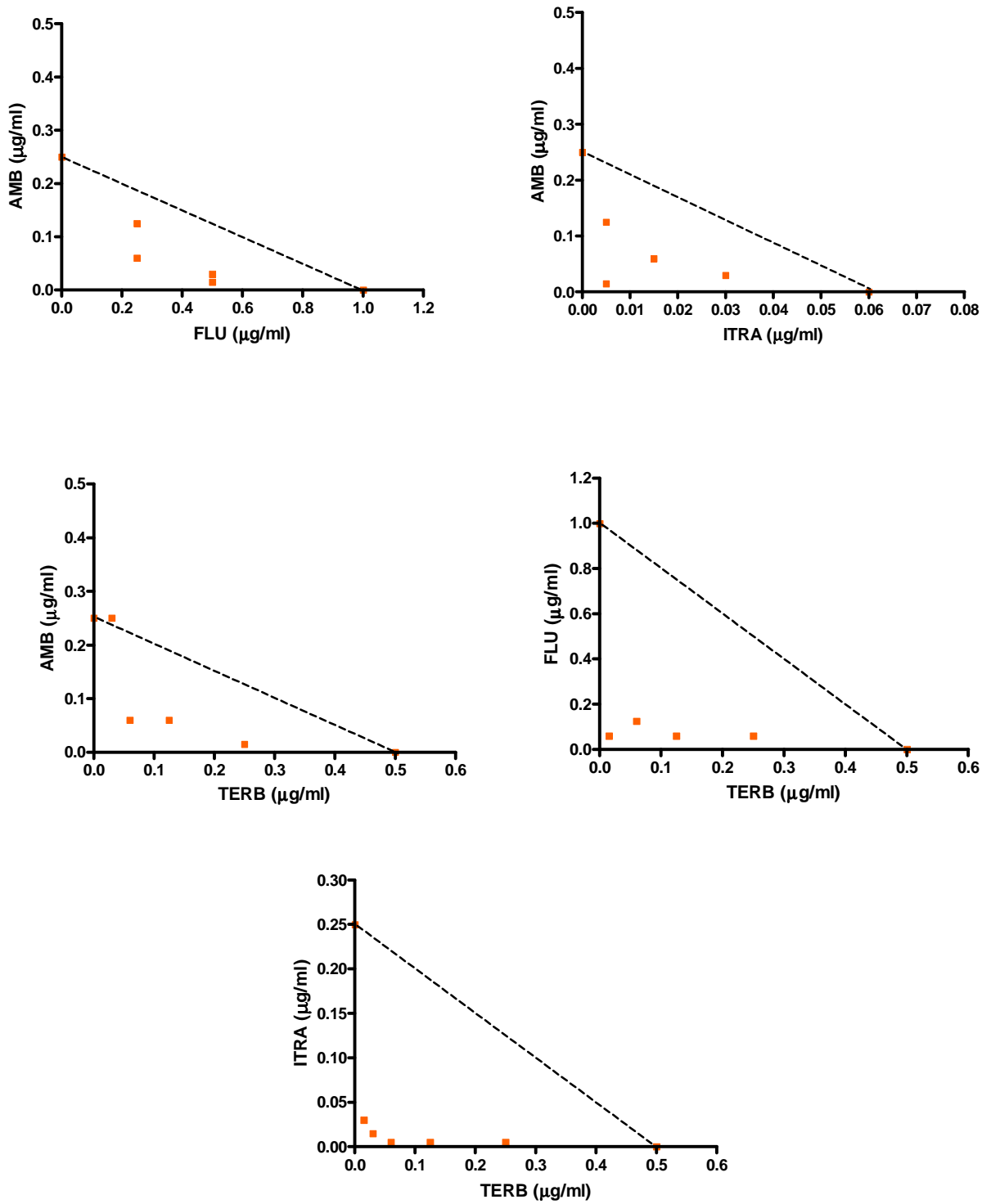


Gráfico 2. Isobogramas de diferentes combinações de antifúngicos realizados por *checkerboard* para *C. neoformans* cepa ATCC 28957. Os pontos no gráfico correspondem às concentrações dos quimioterápicos combinados que inibiram 50% do crescimento fúngico.

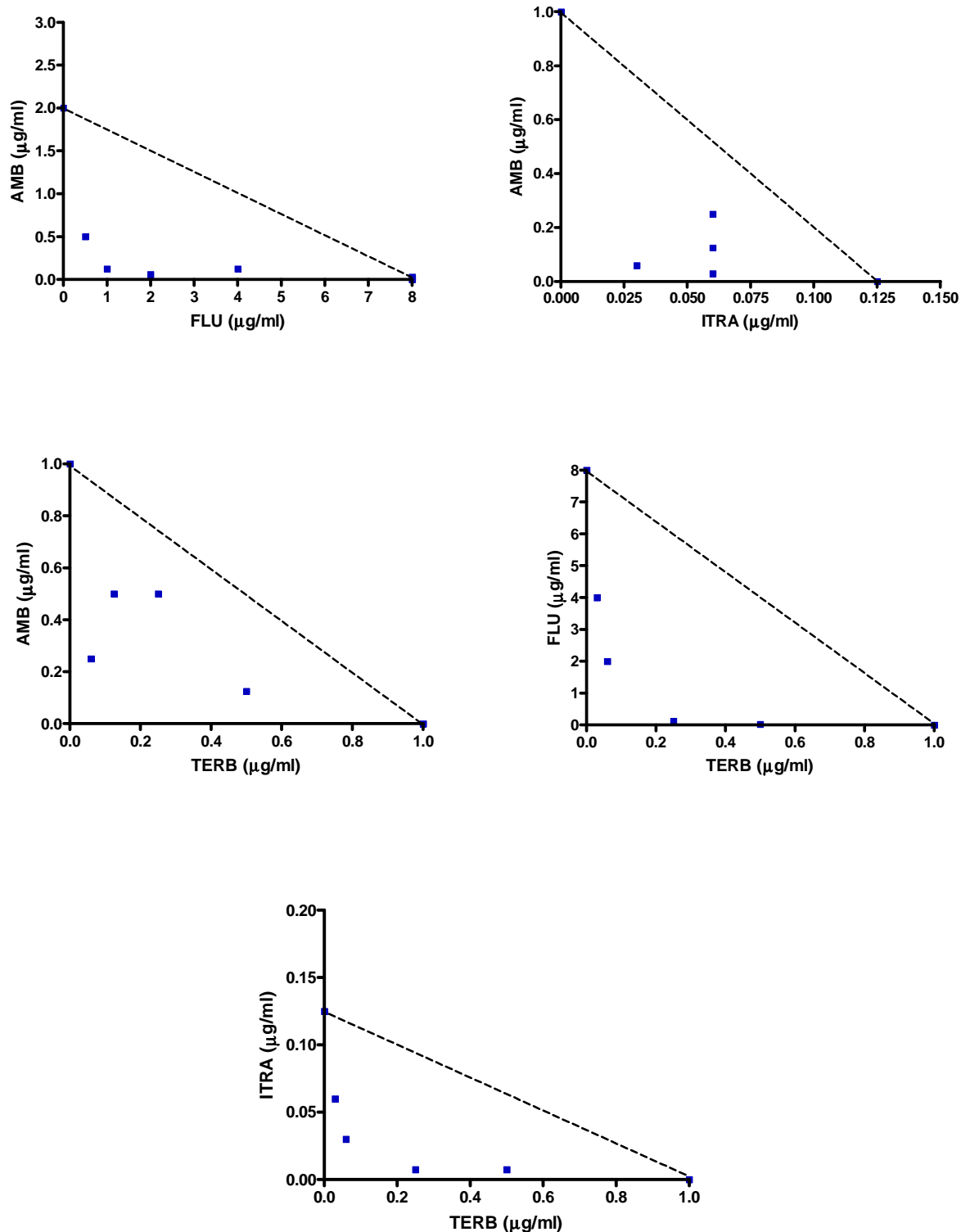


Gráfico 3. Isobogramas de diferentes combinações de antifúngicos realizados por *checkerboard* para *C. neoformans* isolado HU 2. Os pontos no gráfico correspondem às concentrações dos quimioterápicos combinados que inibiram 50% do crescimento fúngico.

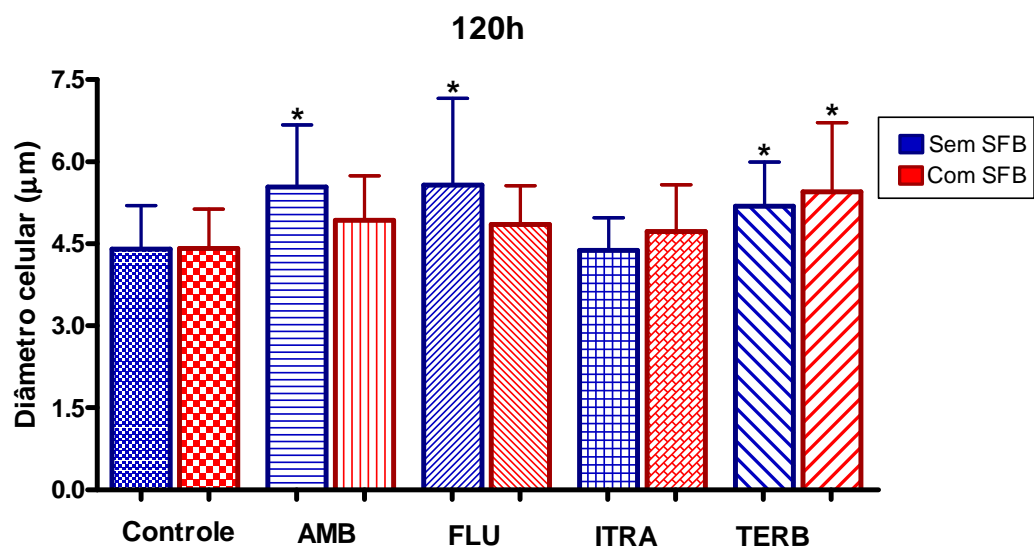
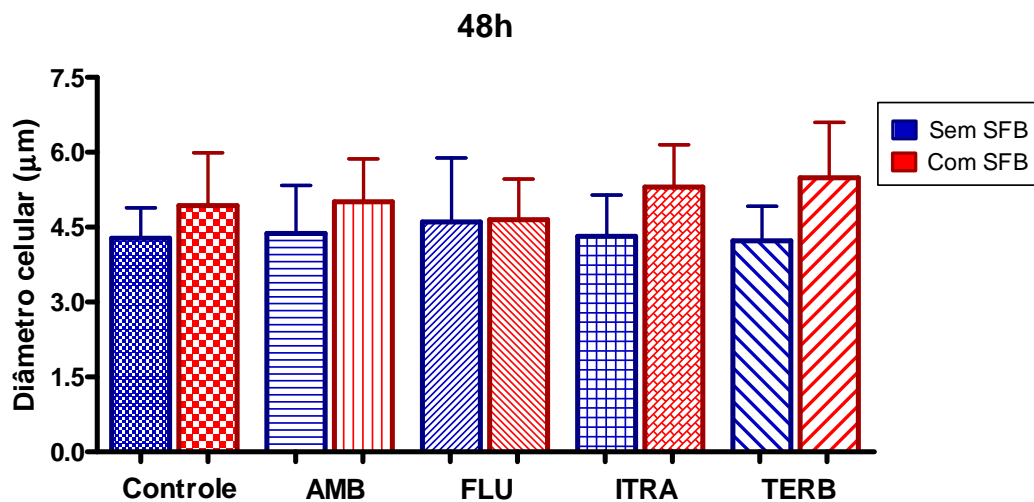


Gráfico 4. Diâmetro celular de *C. neoformans* cepa ATCC 28957, controle e após tratamento com AMB, FLU, ITRA e TERB por 48h e 120h, com ou sem SFB. Resultados estão mostrados como a média e o desvio padrão (n=20). * Diferença significativa em comparação com o respectivo controle (P < 0,05).

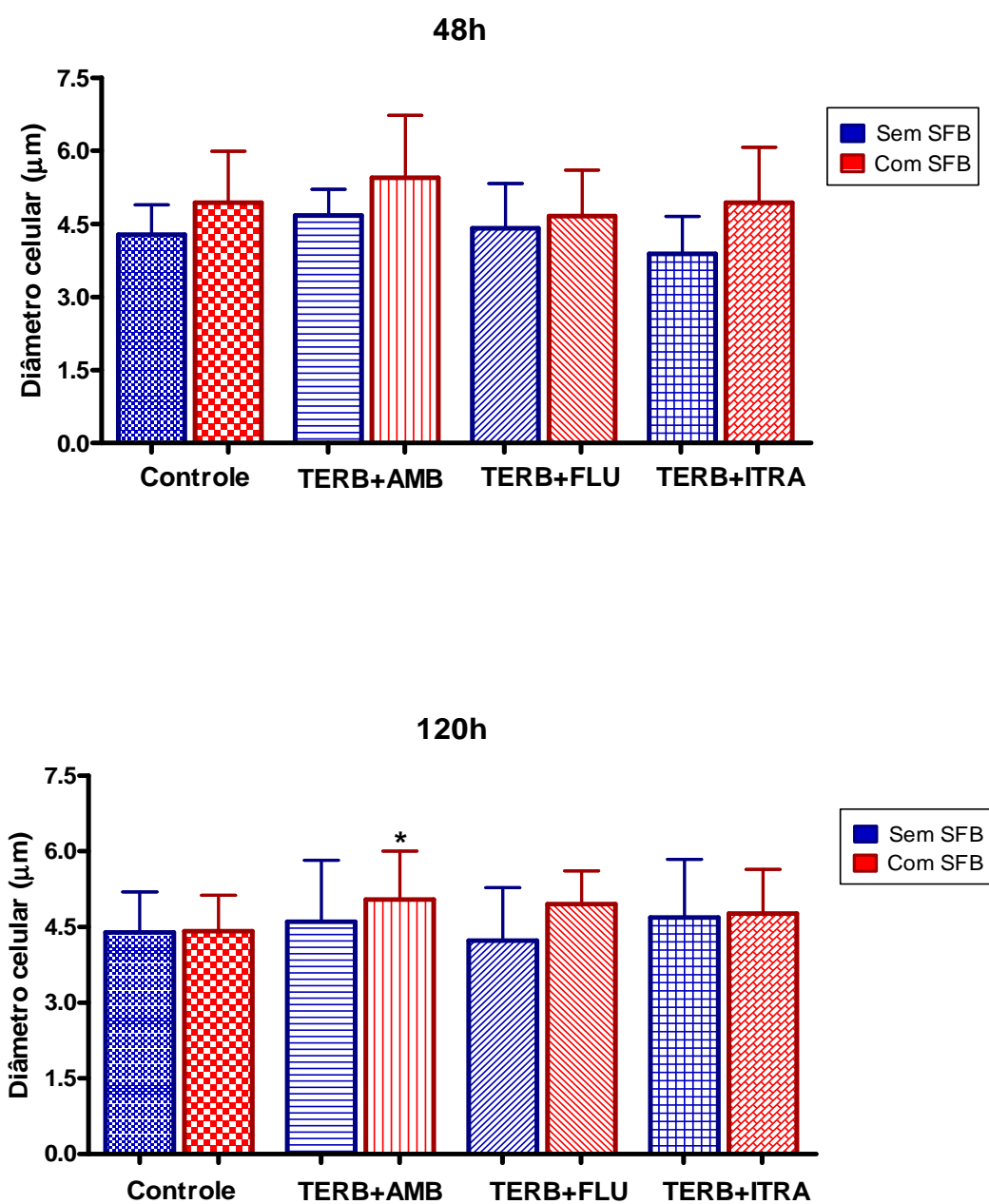


Gráfico 5. Diâmetro celular de *C. neoformans* cepa ATCC 28957, após tratamento com as combinações de TERB com AMB, FLU ou ITRA por 48h e 120h, com ou sem SFB. Resultados estão mostrados como a média e o desvio padrão (n=20). * Diferença significativa em comparação com o respectivo controle ($P < 0,05$).

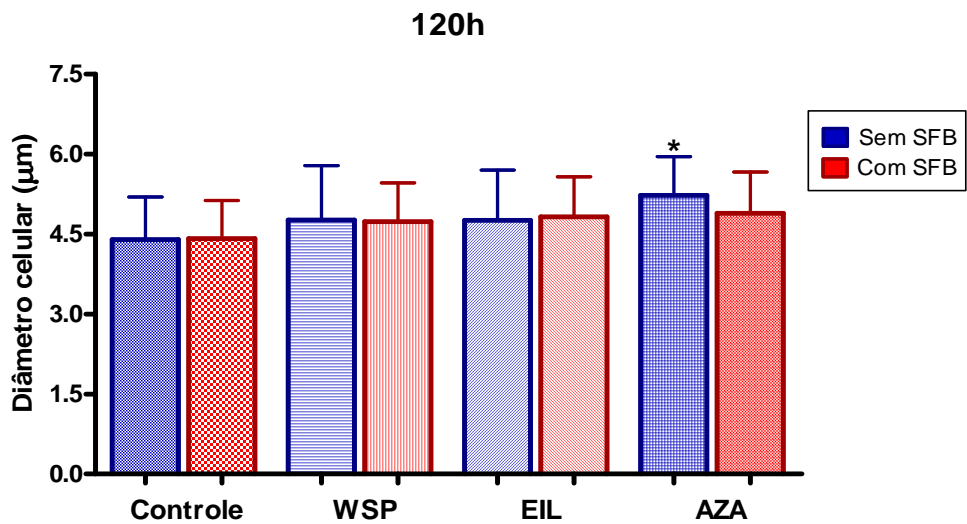
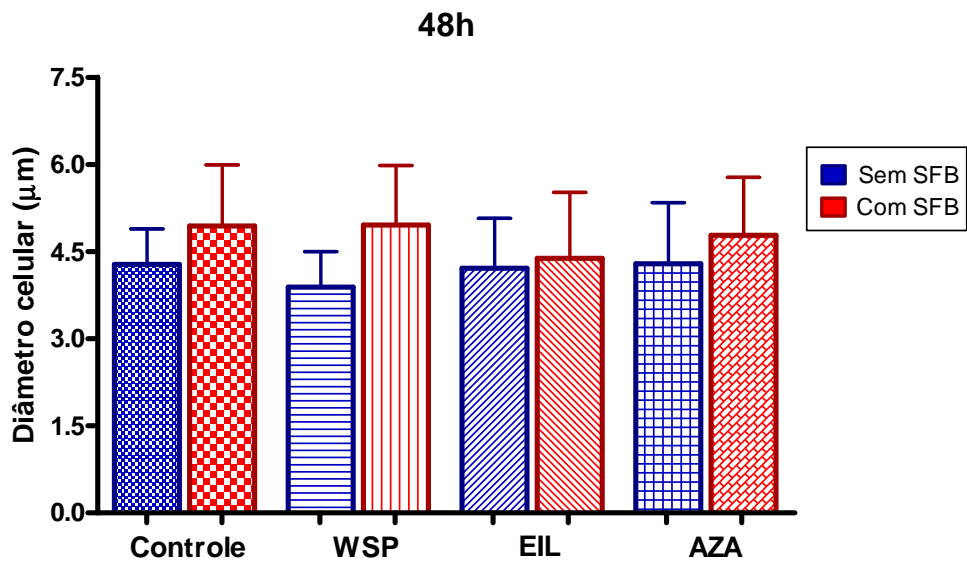


Gráfico 6. Diâmetro celular de *C. neoformans* cepa ATCC 28957, após tratamento com WSP, AZA e EIL por 48h e 120h, com ou sem SFB. Resultados estão mostrados como a média e o desvio padrão (n=20). * Diferença significativa em comparação com o respectivo controle (P < 0,05).

4.5 Alterações do tamanho de cápsula

Após os mesmos tratamentos utilizados para medição do diâmetro celular, também, foram realizadas medições do tamanho da cápsula, de modo a avaliar modificações em decorrência do tratamento com as drogas, em situações de estímulo a uma maior produção de polissacarídeo capsular (com ou sem SFB, respectivamente).

Como pode ser visto no gráfico 7, ao incubar as células com AMB, ocorreu um aumento significativo do tamanho de cápsula depois de 48h, sem SFB, e no tempo de 120h, sem e com SFB. Nos tratamentos com FLU e ITRA, houve um aumento da expressão de cápsula em ambos os tempos e condições. Interessantemente, o tratamento com TERB apresentou um aumento significativo do tamanho de cápsula apenas no tempo de 48h, sem SFB. É importante destacar que, nos tratamentos onde ocorreu um aumento da expressão de cápsula, este aumento foi consideravelmente maior quando na presença de SFB.

No tratamento com a combinação de TERB e AMB, houve um aumento no tamanho capsular em 48h, sem SFB, e em 120h, com SFB. Porém, ocorreu diminuição da cápsula em 48h, com SFB (gráfico 8). Interessantemente, o aumento de cápsula que ocorreu com SFB não foi tão expressivo quando as células foram tratadas apenas com AMB. Já, quando se combinou TERB e FLU, ocorreu aumento nos tempos de 48h, sem SFB, e 120h, com SFB. Diferentemente, ao combinar TERB e ITRA, ocorreu aumento do tamanho da cápsula em 48h, sem SFB, e em 48h e 120h, com SFB. Entretanto, curiosamente, observou-se uma diminuição no tempo de 120h, sem SFB.

Analisando as novas drogas, foi possível perceber um maior efeito no aumento de cápsula tardiamente, após 120h com SFB, nos três tratamentos (gráfico 9). Ademais,

houve aumento da cápsula em 48h, sem SFB, com AZA e EIL. Porém, ocorreu redução do tamanho em 48h, com SFB, após tratamento com AZA.

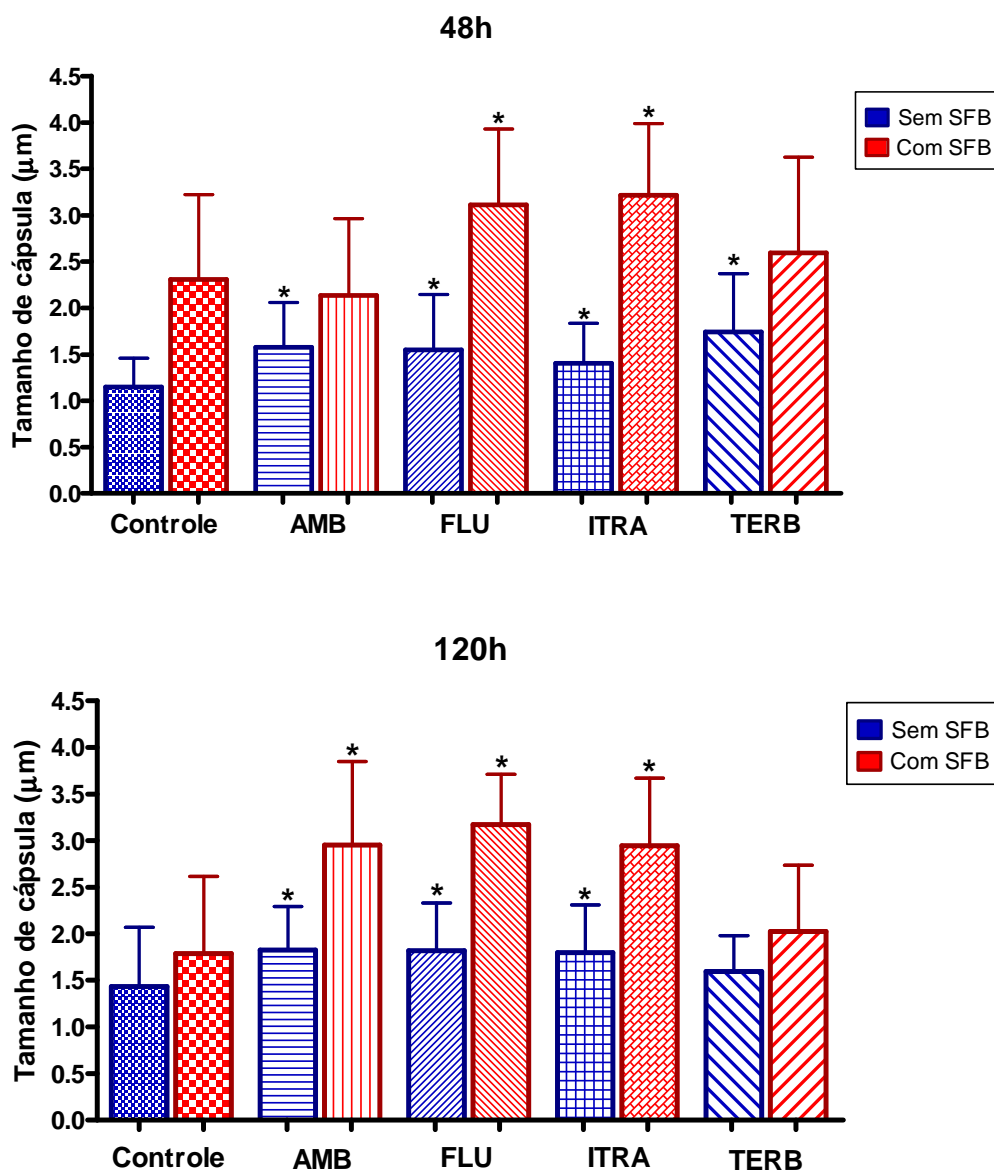


Gráfico 7. Tamanho de cápsula de *C. neoformans* cepa ATCC 28957, controle e após tratamento com AMB, FLU, ITRA e TERB por 48h e 120h, com ou sem SFB. Resultados estão mostrados como a média e o desvio padrão (n=20). * Diferença significativa em comparação com o respectivo controle ($P < 0,05$).

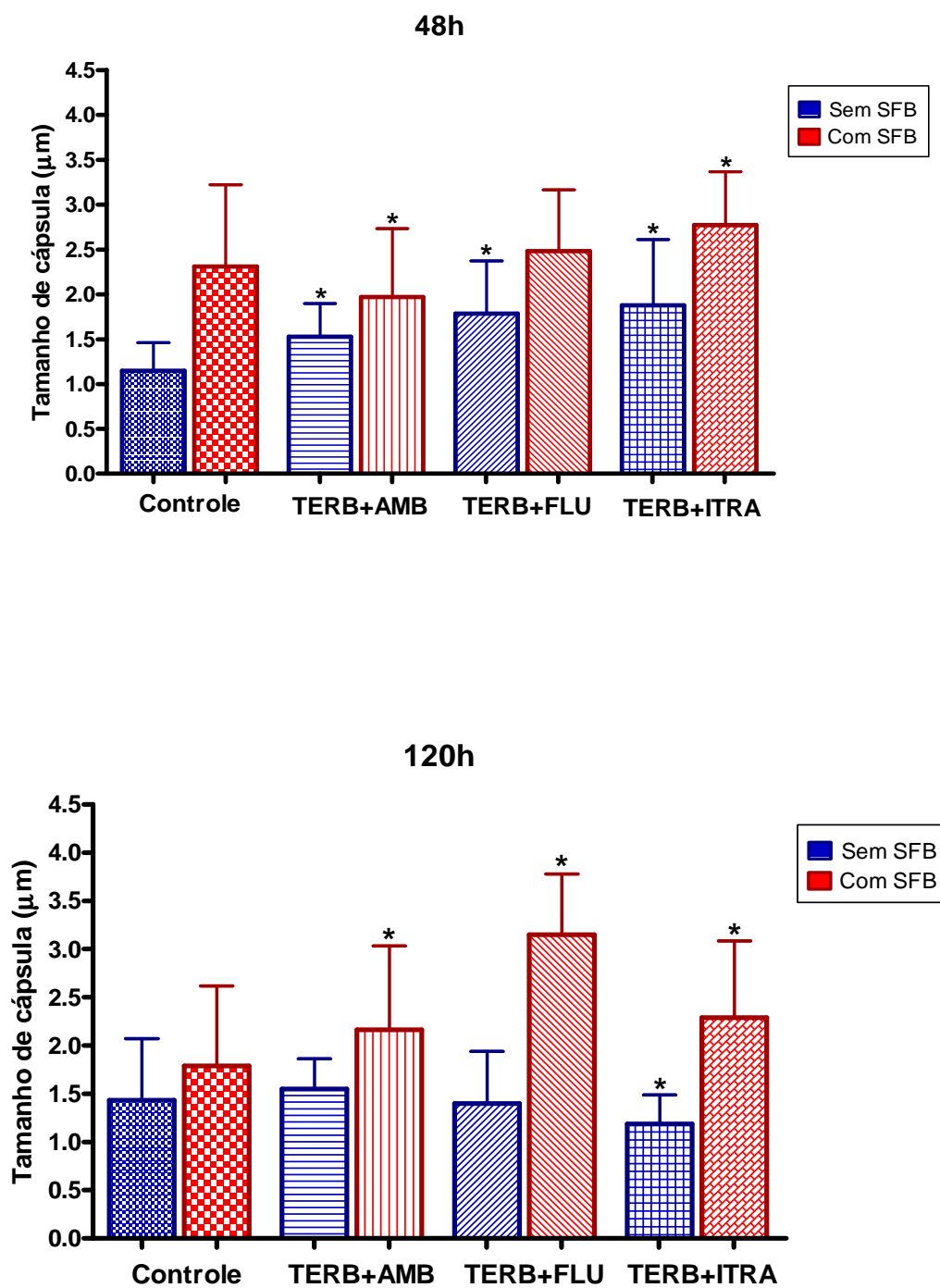


Gráfico 8. Tamanho de cápsula de *C. neoformans* cepa ATCC 28957, após tratamento com as combinações de TERB com AMB, FLU ou ITRA por 48h e 120h, com ou sem SFB. Resultados estão mostrados como a média e o desvio padrão (n=20). * Diferença significativa em comparação com o respectivo controle ($P < 0,05$).

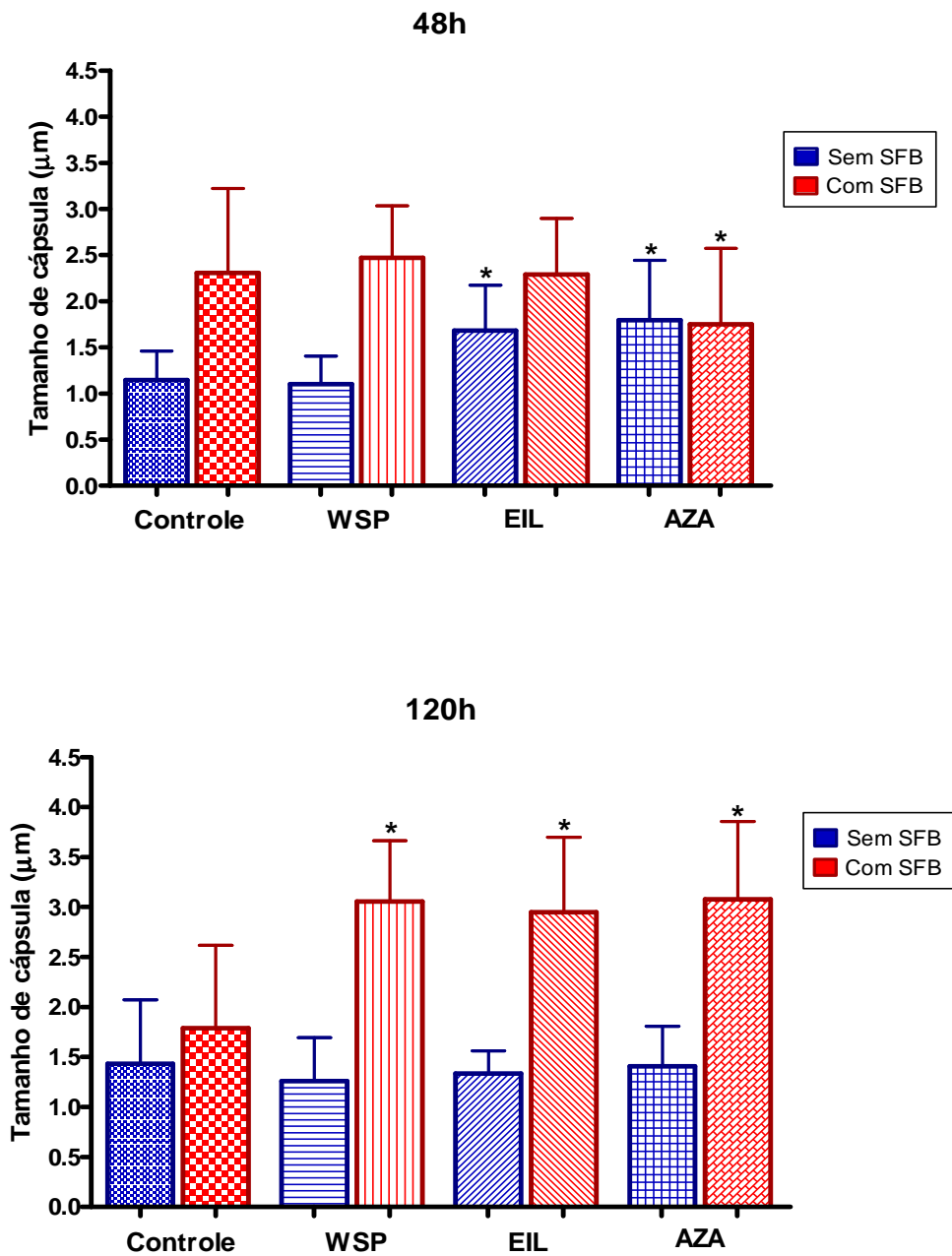


Gráfico 9. Tamanho de cápsula d *C. neoformans* cepa ATCC 28957, após tratamento com WSP, AZA e EIL por 48h e 120h, com ou sem SFB. Resultados estão mostrados como a média e o desvio padrão (n=20). * Diferença significativa em comparação com o respectivo controle (P < 0,05).

4.6 Contagem de células com brotamento

Prosseguindo com a análise de possíveis alterações morfológicas provocadas pelos diversos compostos, foi realizada uma contagem de células que apresentavam brotamento, nos mesmos tempos descritos acima (48 e 120h) (gráfico 10). Em comparação com o controle, a incubação com AMB, por 120h, acarretou em um aumento do número de células com brotamento. Já, ao serem tratadas com FLU ou ITRA, o número de células com brotamento apresentou um aumento significativo, em ambos os tempos. As células tratadas com TERB apresentaram aumento na porcentagem de células com brotamento em 48h, porém uma diminuição da mesma em 120h.

Curiosamente, ao incubar as células com TERB e AMB combinadas, houve um aumento na porcentagem de brotamento, após 120h, apesar de ter ocorrido uma diminuição no mesmo tempo de tratamento quando estes antifúngicos foram utilizados sozinhos. Para as combinações com TERB e FLU ou ITRA, este aumento foi observado apenas no tempo de 120h. Da mesma forma, os novos compostos testados provocaram aumento no número de brotamentos apenas após 120h.

Este aumento observado no número de brotamentos, provavelmente, está correlacionado com a atividade fungistática das drogas que impede que a replicação se complete.

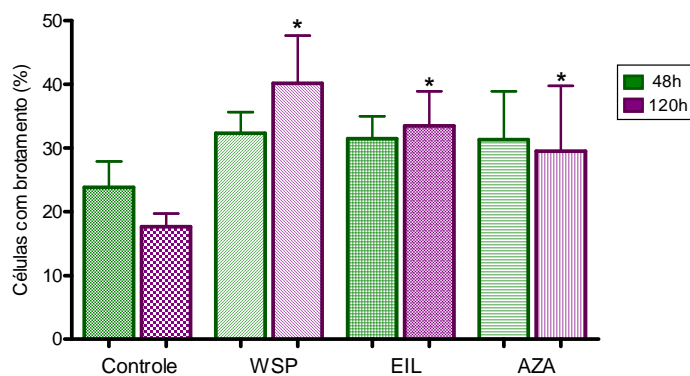
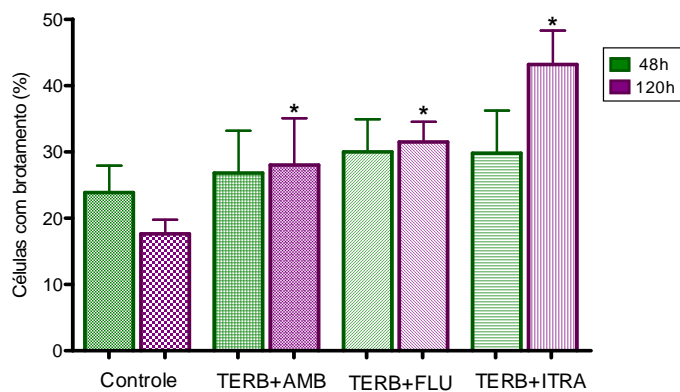
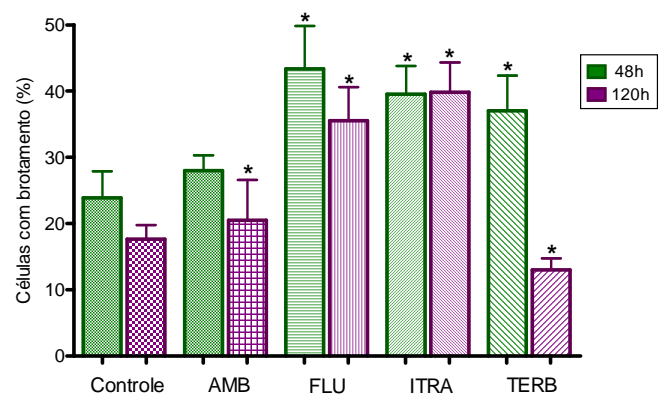


Gráfico 10. Porcentagem de células com brotamento após tratamentos com diferentes drogas e controle, por 48h e 120h. *C. neoformans* cepa ATCC 28957. Gráficos mostram média e desvio padrão (n=200). * Diferença significativa em comparação com o respectivo controle (P < 0,05).

4.7 Formação de pseudohifa *like*

A partir da observação de pseudohifas em microscopia óptica, foram realizadas contagens de tais formas, de modo a quantificar a indução de dimorfismo pelos quimioterápicos. Observou-se que os tratamentos com os azólicos aumentaram a formação de células pseudohifa *like* após 120h (gráfico 11). Já, as células tratadas com AMB ou TERB não apresentaram diferenças significativas, em comparação com o controle, em ambos os tempos. No entanto, a combinação da TERB com os demais antifúngicos aumentou expressivamente a porcentagem das formas pseudohifa *like*, principalmente na combinação de TERB com ITRA. Este maior efeito, possivelmente, ocorreu devido a uma potencialização dos efeitos de ambas as drogas quando usadas juntas, lembrando que estas combinações foram as que apresentaram os menores FIC *index*.

Analisando os tratamentos da cepa ATCC 28957 com as novas drogas, notou-se uma indução da forma pseudohifa *like* com WSP e EIL, após o tempo de 120h. Não havendo diferença significativa no tratamento com AZA.

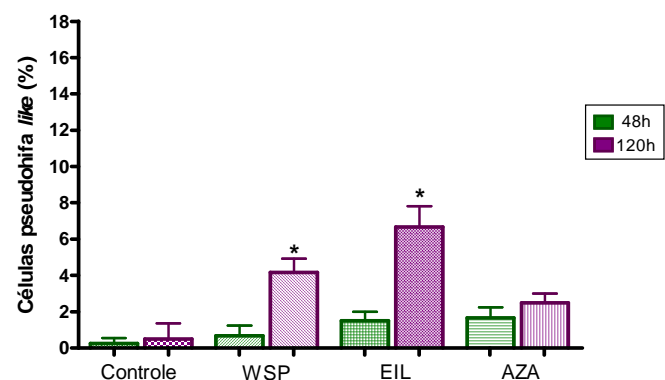
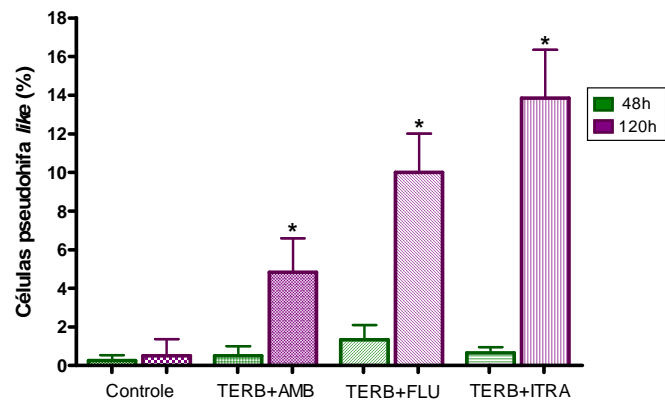
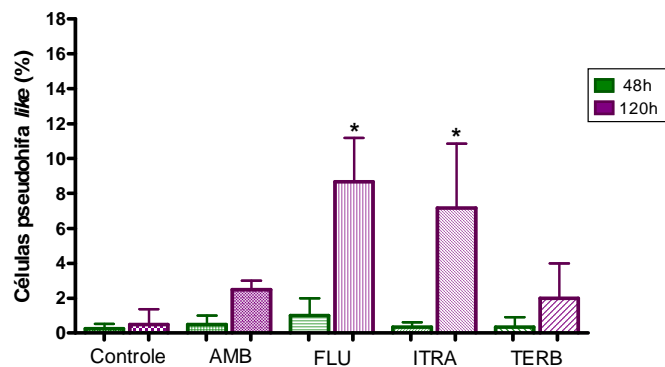


Gráfico 11. Porcentagem de células com formato pseudohifa *like* após tratamentos com diferentes drogas e controle, por 48h e 120h. *C. neoformans* cepa ATCC 28957. Gráficos mostram média e desvio padrão (n=200). * Diferença significativa em comparação com o respectivo controle (P<0,05).

4.8 Marcação de lipídeos com vermelho do nilo (Nile Red)

O vermelho do nilo é um marcador fluorescente utilizado para a detecção de lipídeos neutros em microscopia óptica (Greenspan *et al*, 1985). Esta metodologia foi utilizada para averiguar se as células apresentavam acúmulo lipídico devido à ação das drogas. Foram observadas marcações pontuais na cepa ATCC 28957, indicando a presença de vesículas de lipídeos, após 48h de tratamento com os diferentes compostos (figuras 12 e 13). Os vacúolos podem ocorrer como reservatórios energéticos ou como um acúmulo anormal de lipídios devido a condições patológicas (Zinser *et al*, 1993). A marcação observada somente em células tratadas indica um provável excesso de esteróis, e/ou seus precursores, na célula e uma desorganização do metabolismo desta.

4.9 Marcação do DNA com DAPI

Com o intuito de analisar possíveis alterações na duplicação, após os diversos tratamentos, foi utilizado o DAPI, uma molécula fluorescente intercalante de DNA. Dessa forma, o DNA das células foi marcado e analisado, após 48h de tratamento. Como pode ser visto na figura 14, após incubação com os antifúngicos, notaram-se, principalmente, células sem marcação para DNA (*), células com brotamento e material genético não duplicado (cabeça de seta), ou células com DNA duplicado, porém este não migrou para a célula-filha (seta fina), além de marcações difusas (seta grande). Da mesma forma, após incubação com as novas drogas, observamos células com uma marcação mais alongada (cabeça de seta), sugerindo provável alteração da estrutura do DNA, células sem marcação para DNA (*) e sem duplicação e migração do material genético para o brotamento (seta) (figura 15).

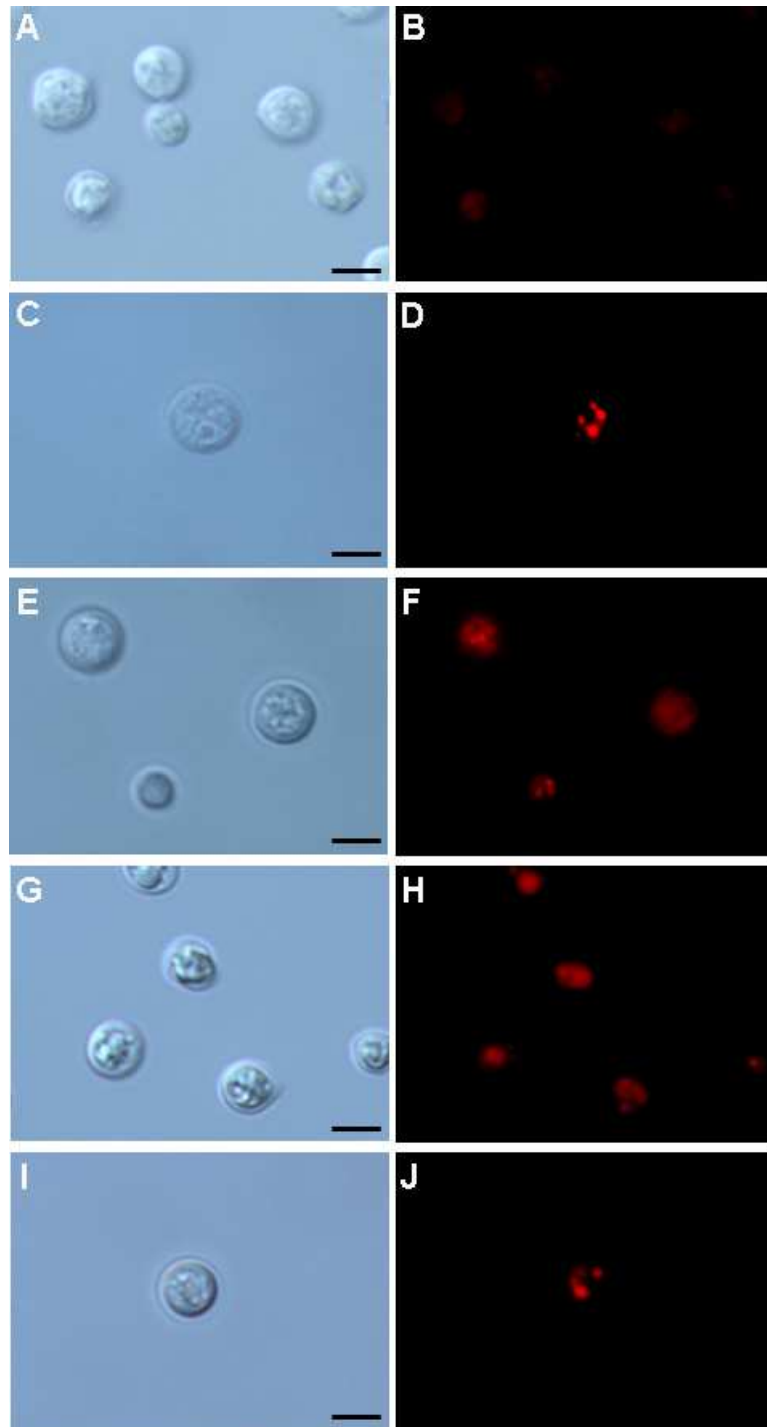


Figura 12. Microscopia óptica de *C. neoformans*, cepa ATCC 28957. Marcação com Nile Red (B, D, F, H, J) e DIC (A, C, E, G, I). Controle (A-B), tratado com AMB (C-D), FLU (E, F), ITRA (G, H) e TERB (I, J), 48 horas de incubação. Marcação pontual presente apenas em células tratadas. Barras representam 4 μ m.

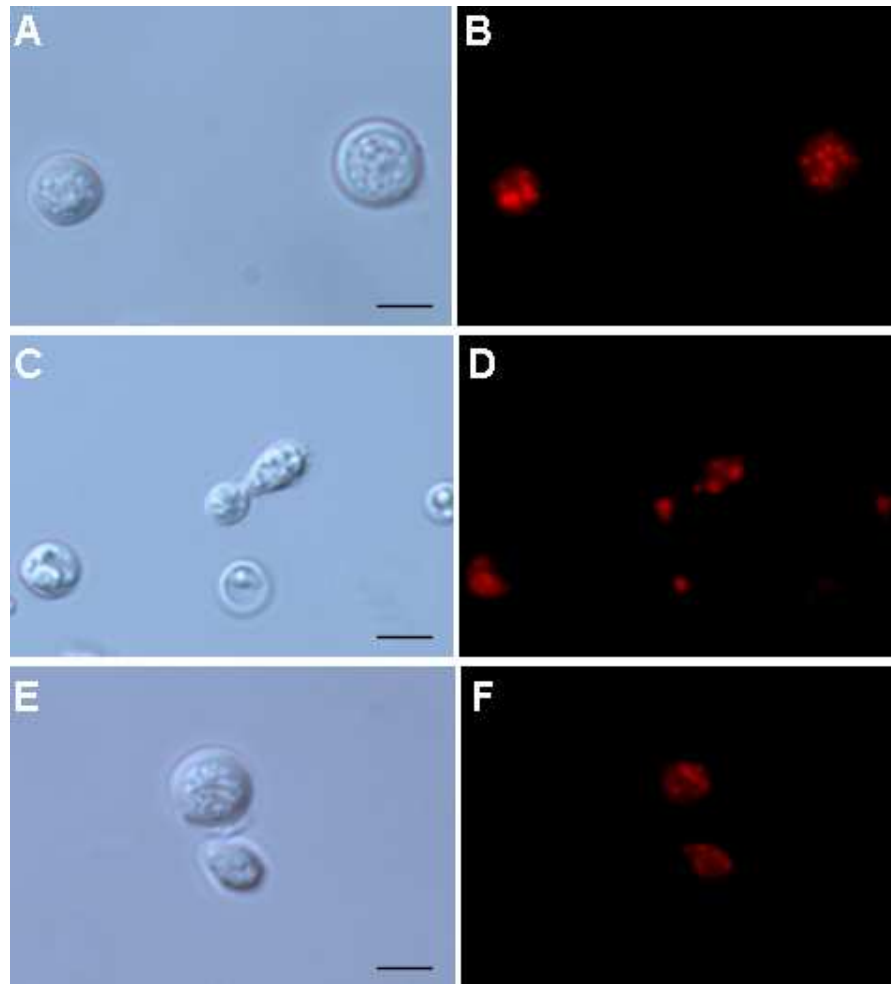


Figura 13. Microscopia óptica de *C. neoformans*, cepa ATCC 28957. Marcação com Nile Red (B, D, F) e DIC (A, C, E). Tratado com WSP (A-B), AZA (C-D) e EIL (E, F), 48 horas de incubação. Marcação pontual presente apenas em células tratadas. Barras representam 4 μ m.

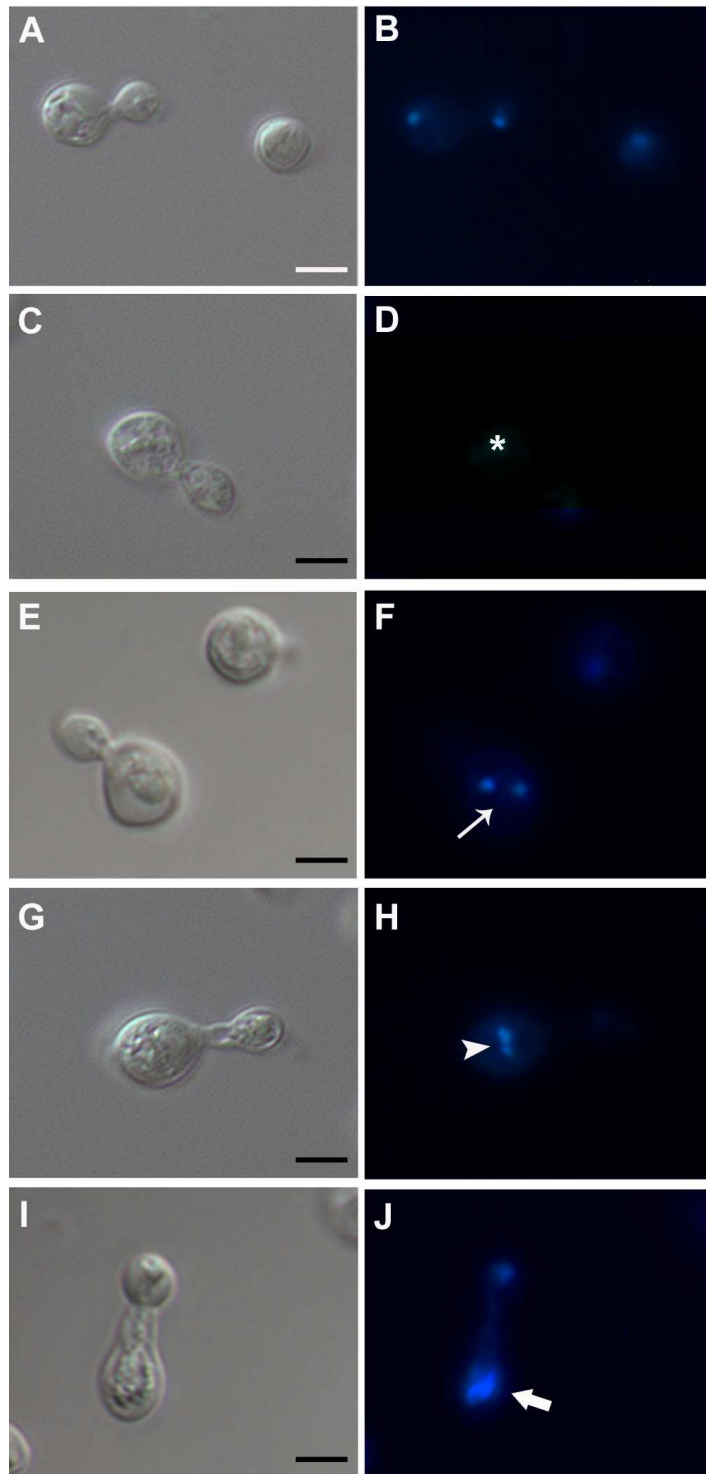


Figura 14. Microscopia óptica de *C. neoformans*, cepa ATCC 28957. DIC (A, C, E, G, I) e marcação com DAPI (B, D, F, H, J). Controle (A-B), tratado com IC₅₀ de AMB (C-D), FLU (E, F), ITRA (G, H) e TERB (I, J), 48 horas de incubação. Células sem marcação para DNA (*), com DNA duplicado (seta fina), sem migração do DNA para o brotamento (cabeça de seta) e com marcação difusa (seta grande). Barras representam 4 μ m.

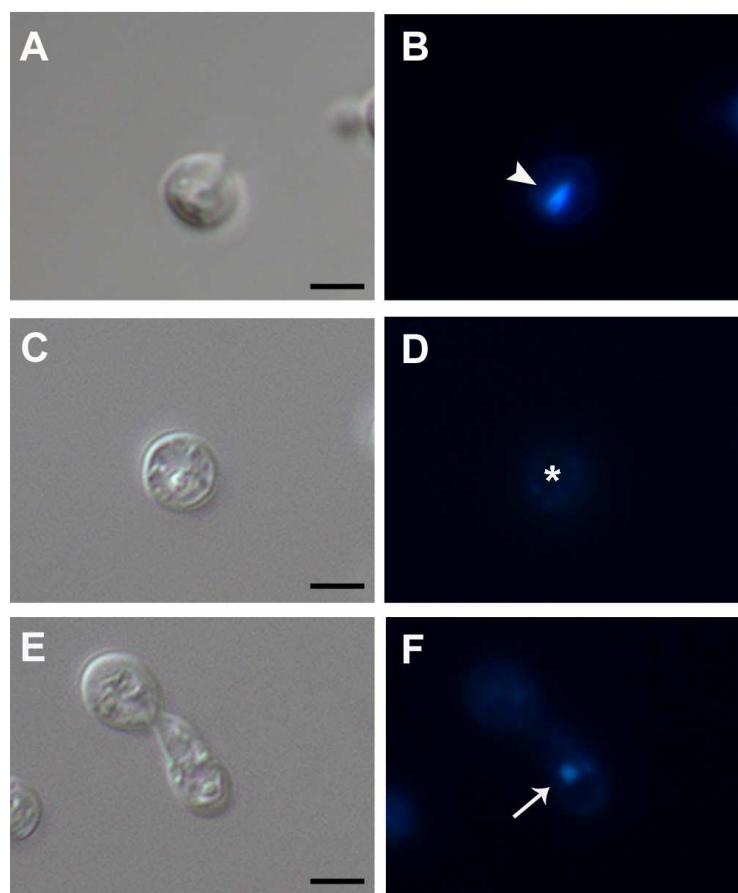


Figura 15. Microscopia óptica de *C. neoformans*, cepa ATCC 28957. DIC (A, C, E) e marcação com DAPI (B, D, F). Tratado com IC₅₀ de WSP (A, B), AZA (C, D) e EIL (E, F), 48 horas de incubação. Células com marcação alongada (cabeça de seta), sem marcação para DNA (*) e ausência do material genético no brotamento (seta). Barras representam 4µm.

4.10 Microscopia Eletrônica de Transmissão

Para observar possíveis alterações ultraestruturais causadas nas células pela ação das drogas, após 48h de tratamento. Foram realizados ensaios para microscopia eletrônica de transmissão, com a cepa ATCC 28957 tratada com IC_{50} dos compostos, previamente descritos, em comparação com o controle, sem tratamento. As alterações estruturais mais freqüentemente observadas foram: aumento no número de vacúolos no citoplasma, presença de parede celular menos compacta e o descolamento da membrana plasmática da parede celular.

Como pode ser visto nas figuras 16 e 17, os tratamentos com AMB, FLU, ITRA e TERB causaram modificações na estrutura da cápsula e da parede celular, sendo também observado invaginações da mesma, após tratamento. Os antifúngicos causaram, também, o aparecimento de vacúolos no citoplasma das células, além de alterações na morfologia da membrana plasmática.

Na figura 18, é possível observar tratamentos por 48h com o valor de IC_{50} das drogas WSP, AZA e EIL. Todos os tratamentos causaram alterações na estrutura da cápsula e parede celular, após os quais, estas se apresentaram menos compactadas e mais desorganizadas. Outra alteração, frequentemente observada, foi o descolamento da membrana plasmática da parede celular e o surgimento de estruturas de membrana dispersas no citoplasma provenientes, provavelmente, da própria membrana plasmática e de organelas danificadas (observado nos tratamentos com WSP e AZA). Após tratamento com WSP, também foi possível observar mitocôndrias (dificilmente vistas em MET convencional) com estrutura alterada e inchadas. Ademais, os tratamentos com os inibidores da síntese de esterol ocasionaram o surgimento de vacúolos no citoplasma.

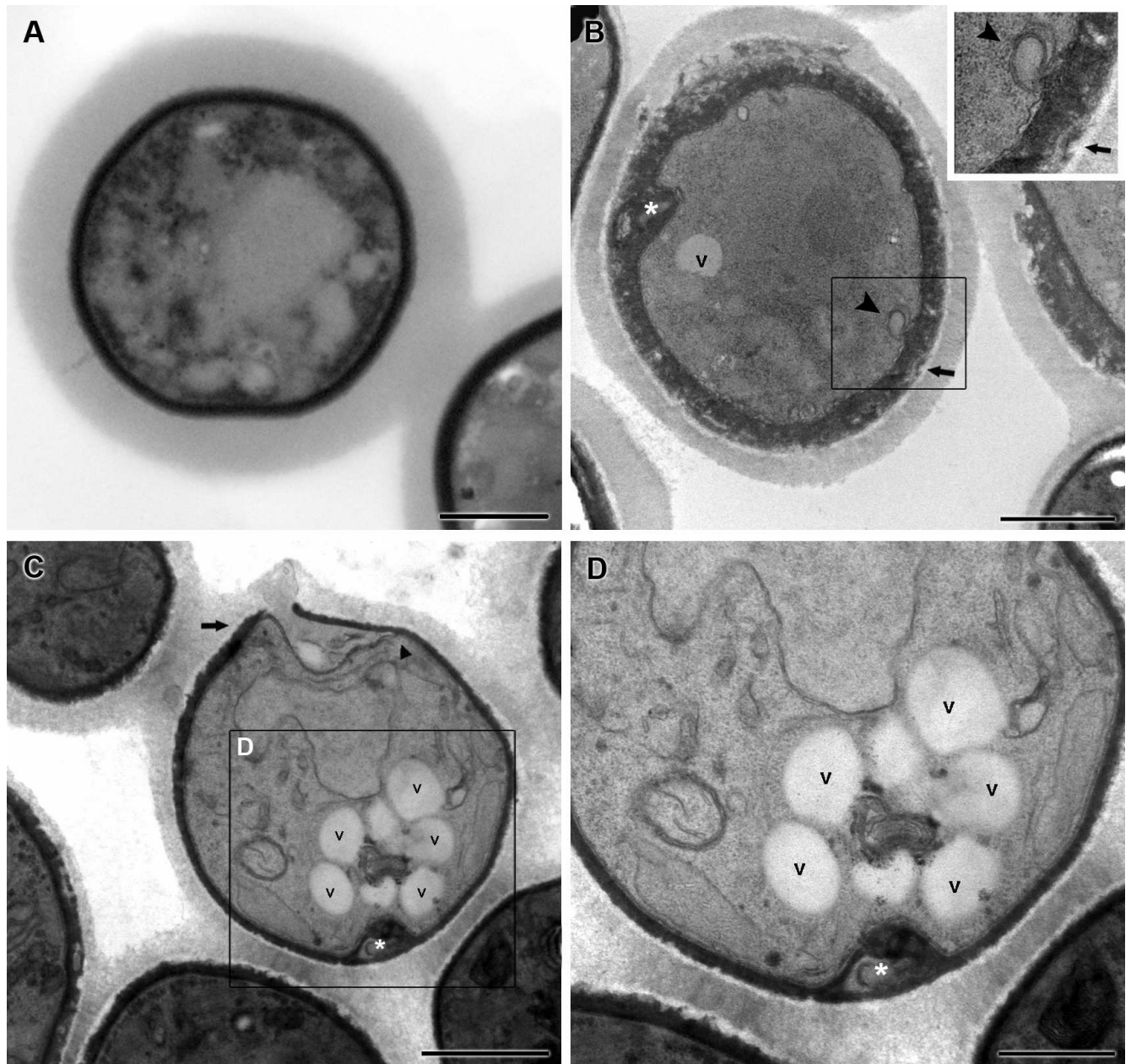


Figura 16. Microscopia eletrônica de transmissão de *C. neoformans*, cepa ATCC 28957. Controle (A), tratado com 0,06µg/ml de AMB (B) e 2µg/ml de FLU (C e D). 48 horas de incubação a 35°C. Foram observadas alterações na parede celular (seta), descolamento da membrana (cabeça de seta), presença de vacúolo (v) e invaginações da parede celular (*). Detalhes no *inset* (B). Barras representam 1µm (A - C) e 0,5µm (D).

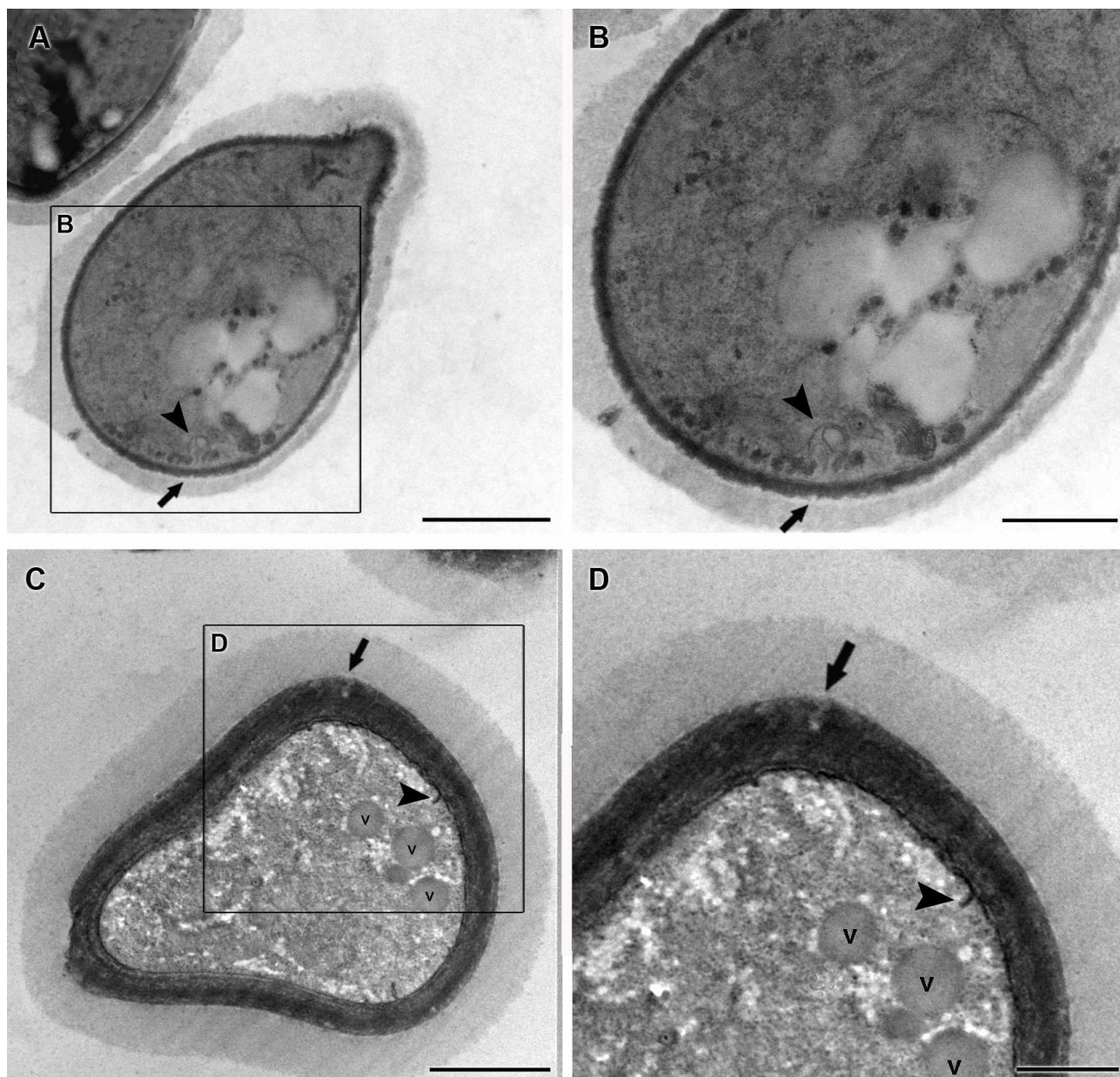


Figura 17. Microscopia eletrônica de transmissão de *C. neoformans*, cepa ATCC 28957. Tratado com 0,5µg/ml de ITRA (A-B) e 0,125µg/ml de TERB (C-D). 48 horas de incubação a 35°C. Foram observadas alterações na parede celular (seta), descolamento da membrana (cabeça de seta) e presença de vacúolo (v). Barras representam 1µm.

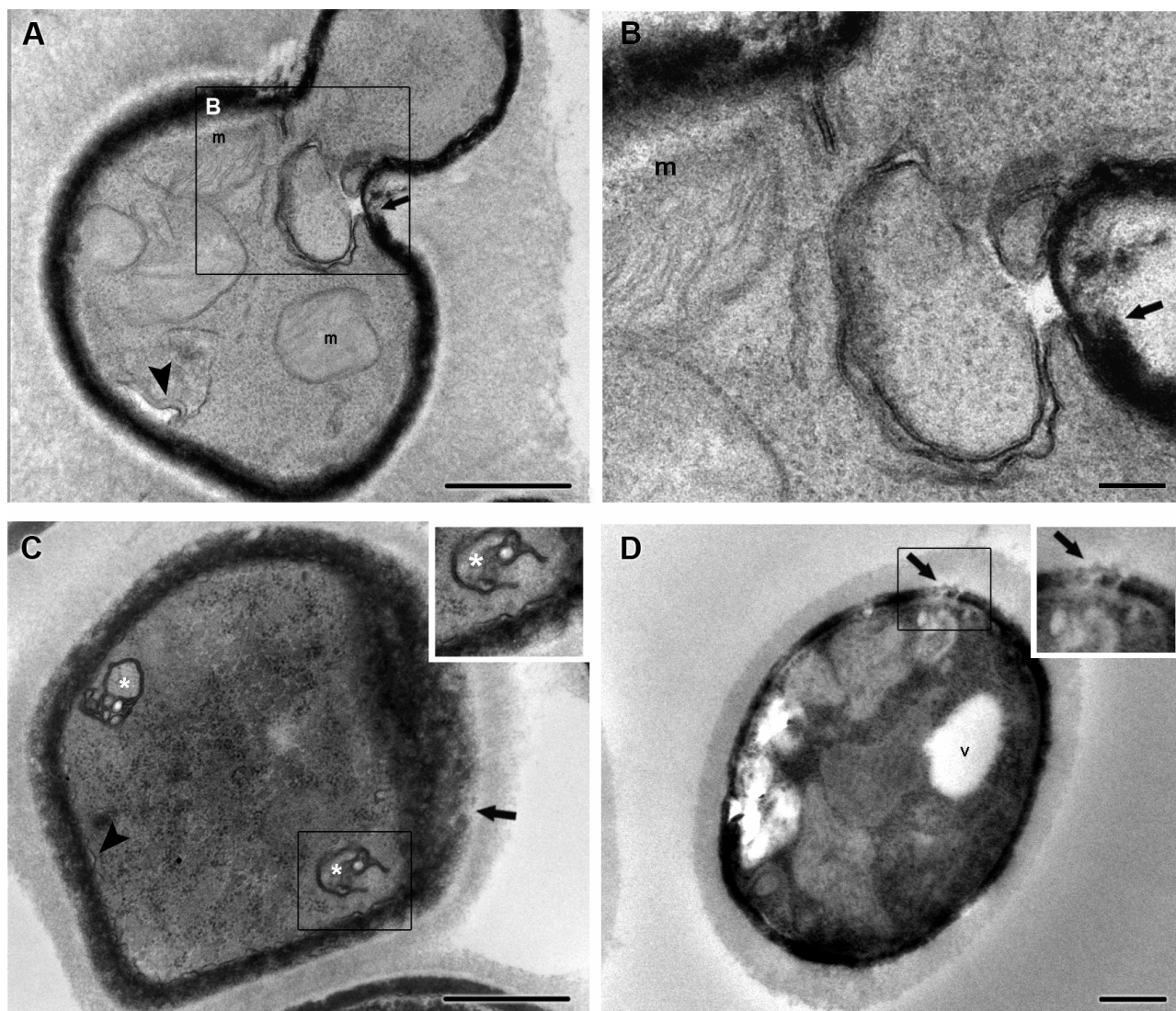


Figura 18. Microscopia eletrônica de transmissão de *C. neoformans*, cepa ATCC 28957. Tratado com 1 μ g/ml de WSP (A e B), 2 μ g/ml de AZA (C) e 1 μ g/ml de EIL (D). 48 horas de incubação a 35°C. Foram observadas alterações na parede celular (seta), descolamento da membrana (cabeça de seta), presença de vacúolo (v), estruturas de membrana (*) e mitocôndrias (m). Detalhes nos *insets* (C-D). Barras representam 0,5 μ m (A, C e D) e 0,2 μ m (B).

5 DISCUSSÃO

5.1 Susceptibilidade *in vitro*

5.1.1 Antifúngicos comerciais

Atualmente, para *C. neoformans*, não há uma padronização na determinação do ponto de corte das CIM dos antifúngicos comerciais. Dessa forma, a interpretação dos dados obtidos em laboratório teve como base, os pontos de corte de fluconazol e itraconazol já estabelecidos para *Candida* (CLSI, 2008) e estudos relacionados a cepas de *C. neoformans* resistentes a anfotericina B (Lozano-Chiu *et al*, 1998), onde são consideradas resistentes as cepas que apresentam CIM $\geq 2 \mu\text{g/ml}$, $64 \mu\text{g/ml}$ e $1 \mu\text{g/ml}$ para AMB, FLU e ITRA, respectivamente. Ainda não está estabelecido ponto de corte para TERB, apesar de alguns autores considerarem o ponto de CIM $\geq 8 \mu\text{g/ml}$ como resistência para *Candida* (Ryder *et al*, 1998)

Analisando o perfil de susceptibilidade dos 23 isolados testados, observou-se que 17% da população teve IC₅₀ para AMB entre 2-4 $\mu\text{g/ml}$ (tabela 3), o que seria considerado resistência para *Candida*, sendo a maioria destas cepas provenientes de pacientes tratados com AMB, após diagnóstico de criptococose. Entretanto, através da análise das CFM (tabela 4) AMB manteve seu efeito fungicida para 94% das amostras, não havendo crescimento de colônias até quatro vezes o valor da CIM (Hazen, 1998). Interessantemente, as cepas HU 6, 9, 10 e 11 apresentaram os menores valores de IC₉₀, entre as amostras do Hospital Universitário, (tabela 1) e as duas últimas são provenientes de pacientes que receberam FLU como tratamento. Apesar de não ser muito comum o relato de casos de resistência a AMB no tratamento da criptococose

(Lozano-Chiu *et al*, 1998), é fundamental que haja um monitoramento das CIM de isolados clínicos devido ao aumento de pacientes imunocomprometidos e por se tratar de um importante agente oportunista.

As cepas de *C. neoformans* apresentaram valores inibitórios mais elevados para o FLU, em comparação com os demais antifúngicos comerciais (CIM₉₀=4µg/ml). Entretanto, nenhuma cepa mostrou-se resistente, inclusive aquelas oriundas de pacientes tratados com FLU. Ademais, os valores obtidos são similares aos descritos para isolados clínicos na literatura, que demonstram valores de CIM₉₀ entre 4 e 8µg/ml (Souza *et al*, 2005; Pfaller *et al*, 2005). Curiosamente, a cepa que apresentou maior sensibilidade ao FLU foi um isolado de gato (CN BEL4).

Como pode ser visto na literatura, o ITRA, em geral, apresenta valores menores de CIM para *C. neoformans* (Alves *et al*, 2001; Espinel-Ingroff, 2003). Da mesma forma, este apresentou grande atividade para as cepas testadas, principalmente, para os isolados do HU, que se mostraram mais sensíveis. Apenas 3 amostras foram resistentes (T₁-444, CN BEL1 e 2), porém, como não tivemos acesso às fichas dos pacientes do Hospital de Belém, não é possível afirmar se tal resistência é devido a um tratamento prévio com ITRA. Vale ressaltar, que a maioria destes pacientes é HIV positivo, tendo alta probabilidade de já ter tido infecções fúngicas e tratamentos anteriores. Como era esperado, os azóis apresentaram uma atividade fungistática, sendo as CFMs maiores que quatro vezes os valores de IC₅₀

Apesar de ser utilizada, principalmente, contra fungos filamentosos na clínica de dermatofitoses, alguns estudos já mostraram a eficácia *in vitro* da TERB contra *C. neoformans* e leveduras do gênero *Candida* (Ryder *et al*, 1998; Li *et al*, 2008; Jessup *et*

al, 2000). Similarmente, no presente estudo foi possível observar uma alta sensibilidade das cepas de *C. neoformans* à TERB, onde 100% dos isolados apresentaram valores de CIM até 0,5µg/ml (tabela 3). Ao contrário do efeito fungicida observado em fungos filamentosos, a TERB teve, aparentemente, um perfil fungistático para *C. neoformans*. Na literatura existem relatos de eficácia clínica da TERB em pacientes com candidíase cutânea (Jones, 1990; Jung *et al*, 1994). Dessa forma, devido à existência de possíveis manifestações cutâneas da criptococose e recentes relatos de criptococose cutânea primária (Calista *et al*, 1997; Revenga *et al*, 2002; Xiujiao & Ai'e, 2005) acreditamos que, a partir dos dados obtidos, a TERB pode ser uma alternativa nesses tratamentos. Porém, são necessários mais estudos e testes *in vivo* com *C. neoformans* para melhor correlacionar os resultados *in vitro* com a clínica.

5.1.2 Novos compostos antimicrobianos

O composto WSP pertence à classe das quinuclidinas, agentes hipocolesterolêmicos, tal classe tem demonstrado grande atividade contra *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania mexicana*, *L. amazonensis* e *Toxoplasma gondii* (Urbina *et al*, 2004; Rodrigues *et al*, 2005; Martins-Duarte *et al*, 2006). Na presente dissertação, WSP apresentou ótima atividade antifúngica contra *C. neoformans*, obtendo valores de IC₅₀ entre 0,5 e 1µg/ml, inclusive para os isolados resistentes à AMB.

A classe dos azasteróis já possui atividade antifúngica conhecida há muitos anos (Burbiel & Bracher, 2003). Neste trabalho testamos um novo azasterol, 22,26-azasterol. Ao contrário do que foi visto por nosso grupo em espécies de *Candida*, onde muitas foram sensíveis ao AZA, inclusive cepas resistentes a FLU, como *C. krusei* (Ishida *et al*,

2009), observamos valores de IC₅₀ e IC₉₀ elevados pra *C. neoformans* (tabela 2), obtendo um CIM₉₀= 16µg/ml (tabela 3). Entretanto, o EIL, que inibe a mesma enzima na via de biossíntese do ergosterol, apresentou uma melhor atividade antifúngica, onde apenas dois isolados (CN BEL 1 e 2) apresentaram IC₅₀ maior de 4µg/ml. Tanto AZA quanto EIL já tiveram suas atividades demonstradas contra espécies de *Candida*, *in vitro*, e tripanosomatídeos, *in vitro* e *in vivo* (Ishida *et al*, 2009; Rodrigues *et al*, 2007; Urbina *et al*, 1996; respectivamente). É importante destacar que, pela análise das concentrações fungicidas mínimas, os três novos compostos testados obtiveram um efeito fungistático.

5.1.3 Correlação entre as concentrações inibitórias das drogas

Comparando os IC₅₀ de todas as drogas testadas, foi possível perceber uma correlação positiva entre TERB e AZA; ITRA e WSP; ITRA e EIL, sendo maior a correlação entre os dois últimos, devido ao coeficiente de correlação ter sido mais próximo de 1, $r = 0,71$ (gráfico 1). Ou seja, teoricamente, um paciente que responder bem ao tratamento com ITRA, também responderá a um tratamento com EIL. Porém, também, há uma chance maior de haver resistência cruzada, onde uma cepa resistente ao ITRA terá maior probabilidade de, também, ser resistente para EIL. O mesmo vale para as demais drogas que obtiveram uma correlação positiva. Apenas TERB e WSP apresentaram correlação negativa, o que significa que pacientes que não responderem a um dos quimioterápicos, poderão, em teoria, responder bem ao outro (Cleophas *et al*, 2006).

5.1.4 Combinação entre os antifúngicos

A combinação de duas drogas pode aumentar a eficácia individual, de modo que se atinja um quadro clínico satisfatório usando baixas concentrações de cada droga. Além disso, a combinação de drogas, devido a diminuição das doses utilizadas, pode prevenir o surgimento de cepas resistentes *in vivo* (Lupetti *et al*, 2003). Entretanto, atualmente, existem poucos estudos clínicos mostrando a eficiência das combinações de drogas e de seus efeitos adversos. Nos estudos *in vitro*, os métodos mais utilizados são os de *checkerboard* e curva de tempo de morte. A técnica de *checkerboard* pode ser, usualmente, realizada em laboratórios clínicos, entretanto, hoje em dia, não existem protocolos de padronização disponíveis (Cuenca-Estrella, 2004). Neste estudo, nos baseamos nos modelos de Eliopoulos & Moellering (1991).

Entende-se por sinergismo, uma interação positiva entre dois agentes cujo efeito inibitório é maior que a soma dos efeitos individuais (Odds, 2003). Os dados obtidos na presente dissertação, através de ensaios de *checkerboard* e análise dos isobogramas (tabela 5; gráficos 2 e 3), mostraram existir sinergismo entre todas as combinações realizadas para as cepas ATCC 28957 e HU2: azólicos com AMB, e TERB com AMB ou azólicos.

Estudos *in vitro* de combinação em isolados de *C. neoformans*, descritos na literatura, mostram resultados variados, dependendo da técnica e cepa utilizada. AMB com azólicos mostram sinergismo, antagonismo ou nenhuma interação. Já, combinações com TERB não foram realizadas para *C. neoformans*. No entanto, estudos *in vivo* com animais mostram que combinações entre AMB e azólicos tem um

efeito similar à monoterapia de AMB, mas é superior à monoterapia de azólicos. Testes com a TERB não foram realizados (Barchiesi *et al*, 2000).

Ensaio farmacocinéticos com TERB demonstram que há uma baixa penetração do antifúngico no pulmão e tecidos profundos, sendo sua maior concentração em tecido adiposo e cutâneo (Hosseini-Yeganeh & McLachlan, 2002). Todavia, alguns relatos de caso descrevem sucesso clínico da monoterapia com TERB para aspergilose pulmonar refratária em paciente imunocomprometido (Schiraldi *et al*, 1996 e 1996a). Dessa forma, combinações antifúngicas podem ser utilizadas em pacientes que não respondem ao tratamento convencional. Porém, mais estudos clínicos são necessários para melhor avaliar a eficácia e vantagens das combinações.

5.2 Alterações morfológicas

5.2.1 Medição do diâmetro celular

Continuando a investigação dos efeitos das drogas sobre o *C. neoformans*, percebemos que o aumento celular ocorreu mais tardiamente, apenas após 120h de tratamento (gráficos 4-6). Ademais, nem todos os compostos causaram esse efeito, somente os tratamentos com AMB, FLU, TERB, combinação de TERB com AMB e AZA. A adição de SFB ao meio de cultura não ocasionou uma alteração do diâmetro celular, havendo aumento celular após incubação das leveduras com TERB e TERB com AMB, apenas.

5.2.2 Medição do tamanho de cápsula

O tamanho da cápsula do *C. neoformans* varia de acordo com condições ambientais, e já estão descritos diversos fatores que estimulam o crescimento capsular,

um deles é a adição de soro de mamífero ao meio de cultura (Zaragoza *et al*, 2003). Dessa forma, analisamos os efeitos sobre o tamanho capsular, causados pelo tratamento com as drogas, com e sem adição de SFB ao meio.

Em geral, os antifúngicos causaram um aumento do tamanho capsular nos tempos testados, sendo que o tratamento com TERB ocasionou este aumento apenas no tempo de 48h, sem SFB (gráficos 7-9). Interessantemente, ao combinar os antifúngicos com TERB o efeito deste se sobrepôs, de modo que o aumento da cápsula foi menor do que o observado com os antifúngicos sozinhos e nem todos os tempos apresentaram aumento capsular significativo, ocorrendo até diminuição da cápsula nos tratamentos de TERB com AMB e TERB com ITRA, após 48h e 120h, respectivamente.

O tratamento com as novas drogas, também, ocasionou um aumento do tamanho capsular, principalmente após 120h com SFB. Em todos os tratamentos, o aumento foi mais expressivo na presença de SFB. Esse aumento, percebido após os tratamentos, pode ser explicado como uma provável resposta do fungo ao estresse sofrido, ou ainda, como uma desestabilização da estrutura fibrilar da cápsula, tornando-a mais frouxa e, portanto, aparentemente maior.

Apesar de alguns trabalhos demonstrarem diminuição de tamanho capsular após tratamentos com antifúngicos (Zaragoza *et al*, 2005), o mesmo grupo já observou a ausência de alteração do tamanho capsular frente ao voriconazol (Duin *et al*, 2004). Indicando que a alteração da cápsula pode variar de acordo com o teste realizado.

5.2.3 Porcentagem de brotamento

O efeito observado dos compostos sobre o brotamento celular foi, em geral, um aumento da porcentagem de células com brotamento em comparação com o controle (gráfico 10). Os azólicos, principalmente, apresentaram um aumento expressivo da porcentagem de brotamento. Novamente, as novas drogas tiveram um efeito mais tardio, apresentando um aumento de células com brotamento somente após 120h de tratamento. Provavelmente, o aumento de brotamento observado está relacionado com a ação fungistática dos compostos, de modo que, ao impedir o crescimento fúngico, muitas células podem iniciar o brotamento e não concluí-lo.

5.2.4 Formação de pseudohifa *like*

Apesar do *Cryptococcus* não ser reconhecidamente um fungo dimórfico (não sofre transição entre levedura e hifa no hospedeiro), alguns estudos e relatos de casos mostram a possibilidade de formação de hifas *in vitro* e o aparecimento de pseudohifas durante infecção *in vivo* (Wickes *et al*, 1996; Williamson *et al*, 1995; Bemis *et al*, 2000). No presente estudo, observamos a indução na formação de tubos germinais, etapa inicial de formação de pseudohifas, após 120h de tratamento com os agentes inibitórios, havendo uma maior indução a partir da incubação das leveduras com FLU, ITRA, e com as combinações com TERB e EIL (gráfico 11). Geralmente, a indução de pseudohifas em fungos que, normalmente, não as produzem, como *Saccharomyces cerevisiae*, ocorre através de fatores de estresse ambiental (Wickes *et al*, 1996). Dessa forma, é provável que os quimioterápicos estejam agindo como fatores de estresse capazes de induzir a filamentação em leveduras de *C. neoformans*. Alguns estudos *in*

vivo relatam que as formas de pseudohifas seriam avirulentas, uma vez que não são capazes de estabelecer infecção em camundongos (Neilson *et al*, 1978 e 1981).

No entanto, é importante destacar que a aparente filamentação pode ser resultado de um brotamento mal formado. Sendo os compostos capazes de afetar a estrutura da parede celular e, conseqüentemente, a morfoloogia do brotamento.

5.3 Acúmulo de lipídeos

A marcação pontual por vermelho do nilo, observada após os tratamentos com as drogas testadas, nos permite inferir que estes causam acúmulo de lipídeos no citoplasma da célula (figuras 12 e 13). Dessa forma, demonstrou-se a possível atuação desses compostos, principalmente os novos agentes, no metabolismo de síntese lipídica, como, também, já foi demonstrado no tratamento de *Leishmania amazonensis* com AZA (Rodrigues *et al*, 2002).

5.4 Alterações no material genético

Como pode ser observado na figura 19, durante a divisão celular de leveduras, ocorre uma formação inicial do brotamento com o seguinte deslocamento, alongamento e divisão do núcleo entre as duas células (Kopecká *et al*, 2000).

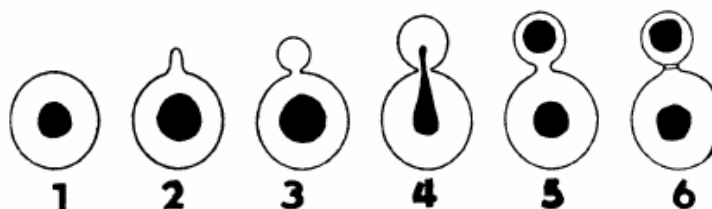


Figura 19. Esquema representativo da divisão celular de *C. neoformans*. Adaptado de Kopecká *et al*, 2000.

Assim, a partir da marcação do DNA com DAPI após os tratamentos com os compostos testados, foi possível observar possíveis alterações na migração do material genético (figuras 14 e 15). Foram vistos brotamentos sem migração e divisão do DNA, células sem marcação para DNA ou com DNA duplicado, além de marcações alongadas indicando provável divisão sem haver formação de brotamento. Dessa forma, é possível que os agentes testados na presente dissertação atuem em outras vias, alterando também, de alguma forma, o ciclo celular.

5.5 Alterações ultraestruturais

Através da microscopia eletrônica de transmissão pudemos avaliar as alterações causadas pelos diferentes tratamentos (figuras 16-18). As drogas utilizadas atuam na síntese do ergosterol ou se ligando diretamente a ele, portanto, alterações na membrana plasmática foram observadas, como era esperado. Além disso, os tratamentos causaram má formação da parede celular, provavelmente devido a uma alteração da atividade da enzima β 1-3 glucana sintase, que se encontra inserida na membrana, e é responsável pela síntese do principal componente da parede celular. Houve, também, um aumento de vacúolos no citoplasma provenientes, possivelmente, da alteração do metabolismo celular, podendo ser relacionados com as marcações lipídicas observados através de microscopia de fluorescência (Nile Red). Além disso, observou-se um inchaço mitocondrial provocado, principalmente, por tratamento com WSP. Alterações similares a essas também foram percebidas nos tratamentos de AZA e EIL com *C. albicans* (Ishida *et al*, 2009).

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em resumo, os dados demonstrados nesta tese indicam que os compostos WSP1267, epiminolanosterol e 22,26-azasterol têm grande potencial em se tornarem novos antifúngicos. Sendo necessários estudos *in vivo* para melhor compreender suas atuações durante a infecção. Ademais, a terbinafina mostrou-se eficaz contra os isolados de *C. neoformans*, sendo uma possível alternativa no tratamento da criptococose.

7 CONCLUSÕES

- ❑ Os isolados de *C. neoformans* foram sensíveis aos tratamentos com TERB, WSP e EIL. Tendo estas drogas apresentado um efeito fungistático.
- ❑ Combinações *in vitro* entre TERB e azóis, TERB e AMB e AMB com azóis foram sinérgicas para as duas cepas testadas, podendo ser terapias alternativas em caso de falha clínica.
- ❑ Após 120h de tratamento com AMB, FLU ou AZA ocorreu um aumento do diâmetro celular em comparação com o controle.
- ❑ A cepa ATCC 28957 aumentou a expressão de cápsula após tratamento com os quimioterápicos, sendo esse aumento mais evidente na presença de SFB.
- ❑ Os compostos testados causaram um aumento na porcentagem de células com brotamento, possivelmente devido à ação fungistática, não ocorrendo finalização do processo replicativo.
- ❑ Tratamentos de 120h com FLU, ITRA, EIL e combinações com TERB, induziram o surgimento de formas pseudohifa *like*.
- ❑ Estudos por MET revelaram alterações na membrana plasmática, na estrutura da parede celular, aumento de vacúolos citoplasmáticos e inchaços mitocondriais, após 48h de incubação com as drogas.
- ❑ O tratamento com estes compostos alterou o metabolismo do fungo, causando acúmulo de vesículas de lipídeos observadas através de marcação com Nile Red.
- ❑ Todos os agentes testados causaram alterações no ciclo celular do fungo, mostradas através da marcação do núcleo por DAPI.

8 REFERÊNCIAS

- ALVES S. H., OLIVEIRA L. T., COSTA J. M., LUBECK I., CASALI A. K., VAINSTEIN M. H. ***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: 267-270.
- BARCHIESI F., SCHIMIZZI A. M., CASELLI F., NOVELLI A., FALLANI S., GIANNINI D., ARZENI D., DI CESARE S., DI FRANCESCO L. F., FORTUNA M., GIACOMETTI A., CARLE F., MAZZEI T., SCALISE G. **Interactions between triazoles and amphotericin B against *Cryptococcus neoformans*.** Antimicrob. Ag. Chemother. 2000; 44: 2435–2441.
- BEMIS D. A., KRAHWINKEL D. J., BOWMAN L. A., MONDON P., KWON-CHUNG K. J. **Temperature-sensitive strain of *Cryptococcus neoformans* producing hyphal elements in a feline nasal granuloma.** J. Clin. Microbiol. 2000; 38: 926-928.
- BICANIC T., HARRISON T. S. **Cryptococcal meningitis.** British Medical Bulletin 2005; 72: 99-118.
- BRAJTBURG J., BOLARD J. **Carrier effects on biological activity of amphotericin B.** Clin. Microb. Rev. 1996; 9: 512–531.
- BUCHANAN K. L., MURPHY J. W. **What makes *Cryptococcus neoformans* a pathogen?** Emerg. Inf. Dis. 1998; 4: 71-83.
- BURBIEL J., BRACHER F. **Azasteroids as antifungals.** Steroids 2003; 68: 587-594.
- CALISTA D., STAGNO A., LANDI C. **Cutaneous lesions of disseminated cryptococcosis as the initial presentation of advanced HIV infection.** J. Europ. Acad. Dermatol. Venereol. 1997; 8: 140-144.
- CASADEVALL A., PERFECT J. R. ***Cryptococcus neoformans*.** Washington, DC: American Society for Microbiology 1998.

CLEOPHAS T. J., ZWINDERMAN A. H., CLEOPHAS T. F. **Statistics Applied to Clinical Trials**. Springer Netherlands 2006.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts**. Approved Standard, M27-A3 2008.

CHEN S. C. A., SORRELL T. C. **Antifungal agents**. Med. J. Australia 2007; 187: 404–409.

Consenso em criptococose - 2008. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 2008; 41: 524-544.

CORREA M. P. S. C., OLIVEIRA E. C., DUARTE R. R. B. S., PARDAL P. P. O., OLIVEIRA F. M., SEVERO L. C. **Criptococose em crianças no estado do Pará, Brasil**. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 1999; 32: 505-508.

CROFT S. L. & YARDLEY V. **Chemotherapy of leishmaniasis**. Cur. Pharmac. Des. 2002; 8: 319-342.

CUENCA-ESTRELLA M. **Combinations of antifungal agents in therapy – what value are they?** J. Antimicrob. Chemother. 2004; 54: 854–869.

DE SOUZA W., RODRIGUES J. C. F. **Sterol biosynthesis pathway as target for anti-trypanosomatid drugs**. Interdisciplin. Perspect. Infect. Dis. 2009; Article ID 642502: 19 pages.

DE SOUZA W., RODRIGUES J. C. F., URBINA J. A. **Effects of inhibitors of the ergosterol biosynthesis on the structural organization of trypanosomatids**. Recent. Res. Devel. Antimicrob. Agents & Chemother. 2002; 5: 79-97.

DEL VALLE L., PINA-OVIEDO S. **HIV disorders of the brain: pathology and pathogenesis**. Front. Biosci. 2006; 11: 718–732.

DIAZ M. R., BOEKHOUT T., KIESLING T., FELL J. W. **Comparative analysis of the intergenic spacer regions and population structure of the species complex of the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans***. FEMS Yeast Res. 2005; 5: 1129–1140.

DUIN D. V., CLEARE W., ZARAGOZA O., CASADEVALL A., NOSANCHUK J. D. Effects of Voriconazole on *Cryptococcus neoformans*. Antim. Ag. Chemother. 2004; 48: 2014-2020.

ELIOPOULOS G. M., MOELLERING R. C. **Antibiotics in laboratory medicine.** Baltimore, MD: The Williams & Wilkins Co. 1991.

ESPINEL-INGROFF A. **In vitro antifungal activities of anidulafungin and micafungin, licensed agents and the investigational triazole posaconazole as determined by NCCLS methods for 12,052 fungal isolates: review of the literature.** Rev. Iberoam. Micol. 2003; 20: 121-136.

FELDMESSER M., KRESS Y., CASADEVALL A. **Dynamic changes in the morphology of *Cryptococcus neoformans* during murine pulmonary infection.** Microbiol. 2001; 147: 2355 - 2365.

FRANZOT S. P., SALKIN I. F., CASADEVALL A. ***Cryptococcus neoformans* var. *grubii*: separate varietal status for *Cryptococcus neoformans* serotype A isolates.** Journal Clin. Microb. 1999; 37: 838-840.

FRIES B. C., COOK E., WANG X., CASADEVALL A. **Effects of antifungal interventions on the outcome of experimental infections with phenotypic switch variants of *Cryptococcus neoformans*.** Antimicrob. Agents and Chemother. 2005; 49: 350-357.

GIMENO C. J., LJUNGDAHL P. O., STYLES C. A., FINK G. R. **Unipolar cell divisions in the yeast *S. cerevisiae* lead to filamentous growth: Regulation by starvation and RAS.** Cell 1992; 68: 1077-1090.

GHANNOUM M. A., RICE L. B. **Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance and correlation of these mechanisms with bacterial resistance.** Clin. Microbiol. Rev. 1999; 12: 501-517.

GREENSPAN P., MAYER E. P., FOWLER S. D. **Nile red: a selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets.** The Journal of Cell Biology 1985; 100: 965-973.

HAZEN K. C. **Fungicidal versus fungistatic activity of terbinafine and itraconazole: An in vitro comparison.** J. American Acad. of Dermat. 1998; 38: S37-S41.

HOSSEINI-YEGANEH M. & MCLACHLAN A. J. **Physiologically based pharmacokinetic model for terbinafine in rats and humans.** Antimicrob. Ag. Chemother. 2002; 46: 2219–2228.

IDNURM A., BAHN Y. S., NIELSEN K., LIN X., FRASER J. A., HEITMAN J. **Deciphering the model pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*.** Nature Reviews Microb. 2005; 3: 753-764.

ISHIDA K., RODRIGUES J. C. F., RIBEIRO M. D., VILA T. V. M., DE SOUZA W., URBINA J. A., NAKAMURA C. V., ROZENTAL S. **Growth inhibition and ultrastructural alterations induced by $\Delta 24(25)$ -sterol methyltransferase inhibitors in *Candida* spp. isolates, including non-*albicans* organisms.** BMC Microb. 2009; 9: 74-85.

JESSUP C. J., GHANNOUM M. A., RYDER N. S. **An evaluation of the in vitro activity of terbinafine.** Med. Mycol. 2000; 38: 155 – 159.

JOHNSON M. D., MACDOUGALL C., OSTROSKY-ZEICHNER L., PERFECT J. R., REX J. H. **Combination antifungal therapy.** Antimicrob. Agents Chemother. 2004; 48: 693-715.

JONES T. C. **Treatment of dermatomycoses with topically applied allylamines: naftifine and terbinafine.** J. Dermatol. Treat. 1990; 1: 29–32.

JUNG E. G., HAAS P. J., BRAUTIGAM M. WEIDINGER G. **Systemic treatment of skin candidosis: a randomized comparison of terbinafine and ketoconazole.** Mycoses 1994; 37: 361–365.

KIDD S. E., HAGEN F., TSCHARKE R. L., HUYNH M., BARTLETT K. H., FYFE M., MACDOUGALL L., BOEKHOUT T., KWON-CHUNG K. J., MEYER W. **A rare genotype of *Cryptococcus gattii* caused the cryptococcosis outbreak on Vancouver Island (British Columbia, Canada).** PNAS 2004; 101: 17258-17263.

KOPECKÁ M., YAMAGUCHI M., GABRIEL M., TAKEO K., SVOBODA A. **Morphological transitions during the cell division cycle of *Cryptococcus neoformans* as revealed by transmission electron microscopy of ultrathin sections and freeze substitution.** Scripta Medica 2000; 73: 369–380.

KWON-CHUNG K. J., BENNETT J. E., RHODES J. C. **Taxonomic studies on *Filobasidiella* species and their anamorphs.** *Antonie van Leeuwenhoek* 1982; 1: 25-38.

KWON-CHUNG K. J., BOEKHOUT T., FELL J. W., DIAZ M. **Proposal to conserve the name *Cryptococcus gattii* against *C. hondurianus* and *C. bacillisporus* (Basidiomycota, Hymenomyces, Tremellomycetidae).** *Taxon* 2002; 51: 804-806.

KWON-CHUNG K. J., VARMA A. **Do major species concepts support one, two or more species within *Cryptococcus neoformans*?** *FEMS Yeast Res.* 2006; 6: 574–587.

LI X., JACOB M. R., KHAN S. I., ASHFAQ M. K., BABU K. S., AGARWAL A. K., ELSOHLY H. N., MANLY S. P., CLARK A. M. **Potent in vitro antifungal activities of naturally occurring acetylenic acids.** *Antimicrob. Agents Chemother.* 2008; 52: 2442–2448.

LIN X., HEITMAN J. **The biology of the *Cryptococcus neoformans* species complex.** *Annu. Rev. Microbiol.* 2006; 60: 69-105.

LOZANO-CHIU M., PAETZNICK V.L., GHANNOUM M.A., REX J.H. **Detection of resistance to amphotericin B among *Cryptococcus neoformans* clinical isolates: performances of three different media assessed by using E-test and National Committee for Clinical Laboratory Standards M27-A methodologies.** *J. Clin. Microbiol.* 1998; 36: 2817-2822.

LUPETTI A., NIBBERING P. H., CAMPA M. **Molecular targeted treatments for fungal infections: the role of drug combinations.** *Trends Molec. Medic.* 2003; 9: 269–76.

MARTINS-DUARTE E. S., URBINA J. A., DE SOUZA W., VOMMARO R. C. **Antiproliferative activities of two novel quinuclidine inhibitors against *Toxoplasma gondii* tachyzoites in vitro.** *J. Antimicrob. Chemother.* 2006; 58: 59-65.

MCFADDEN D., ZARAGOZA O., CASADEVALL A. **The capsular dynamics of *Cryptococcus neoformans*.** *Trends Microbiol.* 2006; 14: 497-505.

NAKAMURA C. V., ISHIDA K., FACCIN L. C., DIAS FILHO B. P., CORTEZ D. A. G., ROZENTAL S., DE SOUZA W., UEDA-NAKAMURA T. **In vitro activity of essential oil from *Ocimum gratissimum* L. against four *Candida* species.** Research Microb. 2004; 155: 579-586.

NEILSON J. B., FROMTLING R. A., BULMER G. S. **Pseudohyphal forms of *Cryptococcus neoformans*: Decreased survival *in vivo*.** Mycopathol. 1981; 73: 57-59.

NEILSON J. B., IVEY M. H., BULMER G.S. ***Cryptococcus neoformans*: Pseudohyphal forms surviving culture with *Acanthamoeba polyphaga*.** Infect. Immun. 1978; 20: 262-266.

NISHIKAWA M. M., LAZERA M. S., BARBOSA G. G., TRILLES L., BALASSIANO B. R., MACEDO R. C. L., BEZERRA C. F., PEREZ M. A., CARDARELLI P., WANKE B. **Serotyping of 467 *Cryptococcus neoformans* isolates from clinical and environmental sources in Brazil: Analysis of host and regional patterns.** J. Clin. Microbiol. 2003; 41: 73-77

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

PARK B. J., WANNEMUEHLER K. A., MARSTON B. J., GOVENDER N., PAPPAS P. G., CHILLER T. M. **Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS.** AIDS 2009; 23: 525-530.

PASSONI L. F. C., WANKE B., NISHIKAWA M. M., LAZERA M. S. ***Cryptococcus neoformans* isolated from human dwellings in Rio de Janeiro, Brazil: an analysis of the domestic environment of AIDS patients with and without cryptococcosis.** Med. Mycol. 1998; 36: 305-311.

PFALLER M. A., MESSER S. A., BOYKEN L., RICE C., TENDOLKAR S., HOLLIS R. J., DOERN G. V., DIEKEMA D. J. **Global Trends in the Antifungal Susceptibility of *Cryptococcus neoformans* (1990 to 2004).** J. Clin. Microbiol. 2005; 43: 2163–2167.

PITISUTTITHURM P., NEGRONI R., GRAYBILL J. R., BUSTAMANTE B., PAPPAS P., CHAPMAN S., HARE R. S., HARDALO C. J. **Activity of posaconazole in the treatment of central nervous system fungal infections.** J. Antimicrob. Chemother. 2005; 56: 745-755.

PRADO M., DA SILVA M. B., LAURENTI R., TRAVASSOS L. R., TABORDA C. P. **Mortality due to systemic mycoses as a primary cause of death or in association with AIDS in Brazil: a review from 1996 to 2006.** Mem. Inst. Oswaldo Cruz 2009; 104: 513-521.

REVENGA F., PARICIO J. F., MERINO F. J., NEBREDA T., RAMÍREZ T., MARTÍNEZ A. M. **Primary cutaneous cryptococcosis in an immunocompetent host: Case report and review of the literature.** Dermatology 2002; 204: 145-149.

RODRIGUES J. C. F., ATTÍAS M., RODRIGUEZ C., URBINA J. A., DE SOUZA W. **Ultrastructural and biochemical alterations induced by 22,26-azasterol, a $\Delta^{24(25)}$ -sterol methyltransferase inhibitor, on promastigote and amastigote forms of *Leishmania amazonensis*.** Antimicrob. Agents Chemother. 2002; 46: 487-499.

RODRIGUES J. C. F., BERNARDES C. F., VISBAL G., URBINA J. A., VERCESI A. E., DE SOUZA W. **Sterol methenyl transferase inhibitors alter the ultrastructure and function of the *Leishmania amazonensis* mitochondrion leading to potent growth inhibition.** Protist 2007; 158: 447-456.

RODRIGUES J. C. F., URBINA J. A., DE SOUZA W. **Antiproliferative and ultrastructural effects of BPQ-OH, a specific inhibitor of squalene synthase, on *Leishmania amazonensis*.** Exp. Parasitol. 2005; 111: 230-238.

ROSAS A. L., NOSANCHUK J. D., CASADEVALL A. **Passive immunization with melanin-binding monoclonal antibodies prolongs survival of mice with lethal *Cryptococcus neoformans* infection.** Infection and Immunity 2001; 69: 3410–3412.

RYDER N. S., WAGNER S., LEITNER I. **In vitro activities of terbinafine against cutaneous isolates of *Candida albicans* and other pathogenic yeasts.** Antimicrob. Ag. Chemother. 1998; 42: 1057–1061.

SCHIRALDI G. F., CICERO S. L., COLOMBO M. D. *et al.* **Refractory pulmonary aspergillosis: compassionate trial with terbinafine.** British J. Dermatol. 1996; 134: 25–39.

SCHIRALDI G. F., COLOMBO M. D., HARARI S. *et al.* **Terbinafine in the treatment of non-immunocompromised compassionate cases of bronchopulmonary aspergillosis.** Mycoses 1996a; 39: 5–12.

SOUZA L. K. H., FERNANDES O. F. L., KOBAYASHI C. C. B. A., PASSOS X. S., COSTA C. R., LEMOS J. A., SOUZA-JÚNIOR A. H., SILVA M. R. R. **Antifungal susceptibilities of clinical and environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* in Goiânia city, Goiás, Brazil.** Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo 2005; 47: 253-256.

TALLARIDA R. J. **An Overview of Drug Combination Analysis with Isobolograms.** J. Pharmacol. Exp. Ther. 2006; 319: 1-7.

TRILLES L., LAZÉRA M. L., WANKE B., OLIVEIRA R. V., BARBOSA G. G., NISHIKAWA M. M., MORALES B. P., MEYER W. **Regional pattern of the molecular types of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in Brazil.** Mem. Inst. Oswaldo Cruz 2008;103: 455-462.

URBINA J. A., CONCEPCION J. L., RANGEL S., VISBAL G., LIRA R. **Squalene synthase as a chemotherapeutic target in *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania mexicana*.** Molec. Biochem. Parasitol. 2002; 125: 35-45.

URBINA J. A., VIVAS J., LAZARDI K., MOLINA J., PAYARES G., PIRAS M. M., PIRAS R. **Antiproliferative effects of $\Delta 24(25)$ sterol methyl transferase inhibitors on *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*: In vitro and in vivo studies.** Chemother. 1996; 42: 294-307.

URBINA J. A., VIVAS J., VISBAL G., CONTRERAS L. M. **Modification of the composition of *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* epimastigotes by $\Delta 24(25)$ sterol methyltransferase inhibitors and their combinations with ketoconazole.** Mol. Biochem. Parasitol. 1995; 73: 199-210.

WICKES B. L., MAYORGA M. E., EDMAN U., EDMAN J. C. **Dimorphism and haploid fruiting in *Cryptococcus neoformans*: association with the alpha-mating type.** PNAS 1996; 93: 7327-7331.

WILLIAMSON J. D., SILVERMAN J. F., MALLAK L. C. T., CHRISTIE J. D. **Atypical cytomorphologic appearance of *Cryptococcus neoformans*: A report of five cases.** A. Cytolog. 1996; 40: 363-370.

XIUJIAO X., AI'E X. **Two cases of cutaneous cryptococcosis.** Mycoses 2005; 48: 238 – 241.

ZARAGOZA O., CASADEVALL A. **Experimental modulation of capsule size in *Cryptococcus neoformans***. Biol. Proced. Online 2004; 6: 10-15.

ZARAGOZA O., FRIES B. C., CASADEVALL A. **Induction of capsule growth in *Cryptococcus neoformans* by mammalian serum and CO₂**. Infect. Immun. 2003; 71: 6155–6164.

ZARAGOZA O., MIHU C., CASADEVALL A., NOSANCHUK J. D. **Effect of Amphotericin B on capsule and cell size in *Cryptococcus neoformans* during murine infection**. Antimicrob. Agents Chemother. 2005; 49: 4358-4361.

ZINSER E., PALTAUF F., DAUM G. **Sterol composition of yeast organelle membranes and subcellular distribution of enzymes involved in sterol metabolism**. J. Bacteriol. 1993; 175: 2853-2858.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)