

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS**

Fernanda Sangalli Leite

**“PERFIL FENOTÍPICO E DE EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS DE
Cryptococcus neoformans APÓS TRATAMENTO COM SUBSTÂNCIAS
OBTIDAS DA PLANTA *Pterogyne nitens*”**

Araraquara

2010

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE ARARAQUARA
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS**

Fernanda Sangalli Leite

**“PERFIL FENOTÍPICO E DE EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS DE
Cryptococcus neoformans APÓS TRATAMENTO COM SUBSTÂNCIAS
OBTIDAS DA PLANTA *Pterogyne nitens*”**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP como pré-requisito para obtenção do título de Mestre.

ORIENTADORA: Profa. Dra. Maria José Soares Mendes Giannini

CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. Ana Marisa Fusco Almeida

Araraquara

2010

Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

L533p Leite, Fernanda Sangalli
Perfil fenotípico e de expressão de proteínas de *Cryptococcus neoformans* após tratamento com substâncias obtidas da planta *Pterogyne nitens* / Fernanda Sangalli Leite – Araraquara, 2010.
113 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia
Orientador: Maria José Soares Mendes Giannini
Co-orientador: Ana Marisa Fusco Almeida

1. *Cryptococcus neoformans*. 2. Atividade antifúngica de plantas.
3. Análise proteômica. I. Giannini, Maria José Soares Mendes, orient. II. Almeida, Ana Marisa Fusco, co-orient. III. Título.

CAPES: 40300005

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Micologia Clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara/SP – UNESP. Recebeu apoio financeiro da Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de nível Superior (CAPES) e do PADC-FCFAR.

VIVER, UM ESPETÁCULO!

Viver é um espetáculo imperdível...

Você pode ter defeitos, viver ansioso e ficar irritado algumas vezes, mas não se esqueça de que sua vida é a maior empresa do mundo. Só você pode evitar que ela vá à falência. Lembre-se sempre de que ser feliz não é ter um céu sem tempestades, caminhos sem acidentes, trabalhos sem fadigas, relacionamentos sem decepções. Ser feliz é encontrar força no perdão, esperança nas batalhas, segurança no palco do medo, amor nos desencontros. Ser feliz não é apenas valorizar o sorriso, mas refletir sobre a tristeza. Não é apenas comemorar o sucesso, mas aprender lições nos fracassos. Não é apenas ter júbilo nos aplausos, mas encontrar alegria no anonimato. Ser feliz é reconhecer que vale a pena viver a vida, apesar de todos os desafios, incompreensões e períodos de crise.

Ser feliz não é uma fatalidade do destino, mas uma conquista de quem sabe viajar para dentro do seu próprio ser. Ser feliz é deixar de ser vítima dos problemas e se tornar um autor da própria história. É atravessar desertos fora de si, mas ser capaz de encontrar um oásis no recôndito da sua alma. É agradecer a cada manhã pelo milagre da vida. Ser feliz é não ter medo dos próprios sentimentos. É saber falar de si mesmo. É ter coragem para ouvir um "não". É ter segurança para receber uma crítica, mesmo que injusta. É beijar os filhos, curtir os pais e ter momentos poéticos com os amigos, mesmo que eles nos magoem. Ser feliz é deixar viver a criança livre, alegre e simples que mora dentro de cada um de nós. É ter maturidade para falar "eu errei". É ter ousadia para dizer "me perdoe". É ter sensibilidade para expressar "eu preciso de você". É ter capacidade de dizer "eu te amo".

Faça da sua vida um canteiro de oportunidades. Que nas suas primaveras você seja amante da alegria. Que nos seus invernos você seja amigo da sabedoria. E, quando você errar o caminho, comece tudo de novo. Pois assim você será cada vez mais apaixonado pela vida e descobrirá que ser feliz não é ter uma vida perfeita, mas é usar as lágrimas para irrigar a tolerância, usar as perdas para refinar a paciência, usar as falhas para esculpir a serenidade, usar a dor para lapidar o prazer, usar os obstáculos para abrir as janelas da inteligência.

Jamais desista de si mesmo.

Jamais desista das pessoas que você ama.

Jamais desista de ser feliz, pois a vida é um espetáculo imperdível...

Augusto Cury.

“Bom mesmo é ir a luta com determinação, abraçar a vida com paixão, perder com classe e vencer com ousadia, pois o triunfo pertence a quem se atreve.” (Charles Chaplin)

DEDICATÓRIA

Primeiramente a **Deus**, que iluminou meus pensamentos nas horas mais difíceis e meu deus saúde, disposição e coragem para viver plenamente todas as fases da minha vida, sempre me protegendo e guiando pelos melhores caminhos.

Aos meus pais **Gilson** e **Sueli** e ao meu querido irmão **Renan**, pelo apoio, encorajamento, amor, pelos ensinamentos que formaram os alicerces de minha história e por não medirem esforços na realização dos meus sonhos. Vocês são meu maior orgulho, meu maior amor e exemplo. Enfim, vocês são a base da minha vida.

Ao meu noivo **Rodrigo**, por todo apoio, amor, compreensão e paciência (e que paciência!) ao longo da trajetória que me levou à concretização deste sonho. Obrigada por acreditar em mim e me incentivar em todos os momentos. Amo você.

AGRADECIMENTOS

À **Profa. Dra. Maria José Soares Mendes Giannini**, meus agradecimentos pela orientação, compreensão e contribuição para evolução do meu conhecimento científico. Obrigada pela confiança e exemplo de profissionalismo.

À **Profa. Dra. Ana Marisa Fusco Almeida**, minha adorável co-orientadora, pela grande dedicação, disponibilidade, colaboração, sugestão e ajuda imprescindíveis desde os tempos de UNAERP.

À banca de qualificação e defesa: **Profa. Dra. Eliana Varanda, Profa. Dra. Maysa Furlan e Profa. Dra. Maristela Pereira** pelo tempo despendido com a correção e sugestões.

Ao **Prof. Dr. Oscar Zaragoza** por ter me recebido em seu laboratório e pela imensa orientação e atenção proporcionando aprendizado indescritível. Obrigada a todos do **Instituto de Salud Carlos III** (Madrid-Espanha) pelo carinho e amizade.

Ao **Laboratório de Micologia**, minha segunda família: à minha grande amiga **Liliana**, muito obrigada pelo carinho, pelos conselhos, pelo companheirismo e por todos os bons momentos e ainda por compartilhar minhas preocupações, maluquices, conquistas e alegria. Você é muito especial! À **Rosangela**, pois sem ela o laboratório não tem vida; à **Julhiany** pela amizade, conhecimentos, sugestões e idéias além da imensa disposição em me ajudar na realização dos experimentos; ao **Marcelo** pela atenção incomparável, por esclarecer sempre minhas dúvidas, além do principal, ser um grande amigo; ao **Haroldo** pelas risadas, pela ótima companhia e bom humor contagiante; à **Suélen**, por sempre ter uma palavra amiga; a **Panta**, com suas músicas e sonhos incríveis, à **Carol Tattoo** por sua alegria e disposição a sempre ajudar (hi hi hi); à **Tati** pela amizade e incentivo em todos os momentos; à **Aline** pela sinceridade e orações; à **Luciana** pela dedicação em aprender; à **Roberta**, pela convivência amigável e divertida; à **Regina**, por sua praticidade e agilidade com seus

experimentos; à **Daniele** e a **Fernanda**, amigas da UNAERP; à nova geração que está chegando: **Nayla**, **Thaís** e **Rosália**; aos estagiários **Daniel** (que sempre vai ali e já volta, e que trás picanha e flaudinha!!!!), **Warley** (sempre sorridente), à eficiente **Jaqueline** e a **Patrícia** (Laranja que é de Limeira); ao pessoal da Vigilância Sanitária **Sr. Torres** e **Valter** pelas histórias engraçadas. Agradeço pela disponibilidade de cada um de vocês, amizade, conselhos, estímulo e, acima de tudo, paciência. A ajuda de vocês foi decisiva neste trabalho. Sinto-me privilegiada por ter pessoas tão especiais como vocês ao meu lado.

À **Rosemira**, **Bel da Cito**, **Marisinha da Imuno**, **Eliana** e **Tirene**: agregadas da Micologia! Obrigada pela colaboração, agradável convivência e pelas boas risadas.

Ao pessoal da Pós-Graduação: **Cláudia**, **Sônia**, **Laura**, **Ângela** e **Márcia**, pela paciência e apoio técnico para a realização deste trabalho.

Aos **meus pais**, **Gilson** e **Sueli**, meus maiores incentivadores, que lutaram tanto quanto eu por esta conquista. É a eles que devo tudo.

Ao meu irmão **Renan**, meu grande e fiel amigo, pelas nossas conversas, pela compreensão e confiança depositada em mim. Sei que posso contar com você em todos os momentos da minha vida e que estará sempre disposto a me acolher em todas as situações.

Ao meu noivo **Rodrigo**, obrigada por me apoiar, torcer pelos meus resultados, pela ajuda aos domingos, por enfrentar os obstáculos que surgiram durante a execução deste trabalho. Desculpe-me por muitas vezes estar apenas de corpo presente e obrigada pela paciência, amor e dedicação.

Aos meus amigos **Luciene** e **Victor** pelo carinho e companheirismo e a quem devo minhas horas de alegria e descontração, entre os momentos estressantes do mestrado. Desculpem-me pelas ausências.

À **Aline** e **Luciano** por cada gesto de carinho e mesmo com minha falta de tempo sempre estavam por perto de alguma maneira.

À **Carol Inocentes**, minha irmã de coração, pelo incentivo e carinho de sempre.

A toda minha **família**: tia Cleusa, Pelé, Carol, Nino, aos pequenos João Victor e José Vinicius, tio Silvinho, tia Silvana, Ane, Gigi, tia Regina, tio Nilton (*in memorian*), Andrei, Chris, Juliano, a pequenina Maria Antônia, Tia Rute, tio Idemar, Mariele, Marcel, Ana, Felipe, e em especial, aos meus avós Lázaro, Leonor, Neide e Benedito. Obrigada pelo incentivo, interesse, entusiasmo, e torcida para que tudo desse certo.

Muito Obrigada!!

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas

Lista de figuras

Lista de quadros

Resumo

Abstract

1. INTRODUÇÃO	21
2. JUSTIFICATIVA	38
3. OBJETIVOS	40
3.1. Objetivos gerais	40
3.1. Objetivos específicos	40
4. MATERIAIS E MÉTODOS	41
4.1. Seleção e Cultivo de isolados de <i>Cryptococcus neoformans</i>	41
4.2. Preparo das substâncias vegetais	41
4.3. Avaliação da atividade antifúngica	42
4.4. Avaliação da Atividade Sinérgica	42
4.5. Concentração Fungicida Mínima	45
4.6. Escolha do extrato vegetal para verificação da ação em proteínas de <i>C. neoformans</i>	45
4.7. Extração das proteínas	45
4.8. Quantificação das proteínas	46
4.9. Análise do perfil protéico por eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)	46

4.10. Eletroforese Bidimensional	46
4.10.1. Focalização Isoelétrica (1ª dimensão)	46
4.10.2. Preparo da amostra	46
4.10.3. SDS-PAGE (2ª dimensão)	47
4.11.1. Cultura de células	47
4.11.2. Infecção por <i>C. neoformans</i> à monocamada de células A549	48
5. RESULTADOS	49
5.1. Avaliação da atividade antifúngica	49
5.2. Seleção do extrato para contato com <i>C. neoformans</i> e análise proteômica	49
5.3. Avaliação da atividade sinérgica	50
5.4. Análise do perfil protéico por eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)	53
5.5. Análise protéica por eletroforese bidimensional	54
5.6. Testes de infecção de <i>C. neoformans</i> em cultura de células epiteliais	68
5. DISCUSSÃO	72
6. CONCLUSÕES	85
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	86

LISTA DE ABREVIATURAS

% Porcentagem

µg Micrograma

µL Microlitro

µm Micrômetro

°C Graus Celsius

5-FC 5- flucitosina

ACOEt Acetato de etila

AIDS Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

AMB Anfotericina B

ATCC American Type Culture Collection

ATV Solução de tripsina-EDTA-versene (Adolfo Lutz)

BuOH butanol

CFM Concentração fungicida mínima

CIF Concentração inibitória fracionada

CIM Concentração inibitória mínima

CLAE Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CLSI Clinical and Laboratory Standards Institute

DNA Ácido desoxirribonucléico

DTT Dithiothreitol

EtOH Etanol

Fase log Fase logarítmica

FCZ Fluconazol

G Gravidade

GPI Glicosilfosfatidilinositol

HA Hidroalcoólica

HIV Vírus da imunodeficiência humana

ICIF Índice de concentração inibitória fracionada

kDa Kilodalton

kg Kilograma

M Molaridade

mg Miligrama

mL Mililitro

mM Milimolar

mm³ Milímetro cúbico

MM Massa molecular

MOPS Ácido 3-(N-morfino) propanosulfônico

MPO Enzima mieloperoxidase

mRNA RNA mensageiro

nm nanômetros

OMS Organização Mundial da Saúde

PBS Tampão salina fosfato

pH Potencial hidrogeniônico

pI Ponto isoelétrico

p/v peso/volume

RNA Ácido Ribonucléico

rpm rotações por minuto

SDS-PAGE Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio

SFB Soro fetal bovino

SNC Sistema Nervoso Central

TCA Ácido tricloroacético

Tris 2-amino-2-hidroximetilpropano

UFC Unidades formadoras de colônia

V Volts

var. Variedade

YEPD Yeast Extract Peptone Dextrose

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Estrutura química da flavona pedalitina. 32
- Figura 2:** SDS-PAGE dos componentes protéicos de *C. neoformans* sem tratamento (C-) e tratado com 750µg/mL de fluconazol. 1. Cepa ATCC 90012, sem tratamento; 2. Cepa ATCC 90012 tratada com fluconazol; 3. Isolado clínico sensível a fluconazol; 4. Isolado clínico sensível tratado com fluconazol; 5. Isolado clínico resistente tratado com fluconazol; 6. Isolado clínico resistente a fluconazol; MM. Peso Molecular. 53
- Figura 3:** SDS-PAGE dos componentes protéicos de *C. neoformans* tratado com molécula pedalitina obtida de *P. nitens* na concentração de 10 vezes o valor da CIM. 1. Cepa ATCC 90012, tratada com pedalitina na concentração de 39 µg/mL; 2. Isolado clínico sensível à fluconazol tratado com pedalitina na concentração de 19,5µg/mL; 3. Isolado clínico resistente a fluconazol tratado com pedalitina na concentração de 156 µg/mL; MM. Massa Molecular. 54
- Figura 4:** Eletroforese bidimensional do extrato protéico total de *C. neoformans* na faixa de pH de 3 a 10 com tratamento com fluconazol na concentração de 750 µg/mL corados pelo azul de Coomassie. 56
- Figura 5:** Eletroforese bidimensional dos componentes protéicos totais de *C. neoformans* com tratamento com fluconazol na concentração de 750µg/mL. Em A e B tem-se uma visão ampliada das proteínas alteradas. 57

- Figura 6:** Eletroforese bidimensional do extrato protéico total de *C. neoformans* na faixa de pH de 3 a 10 com tratamento com a substância pedalitina com concentração 10 vezes maior que o CIM; géis corados pelo azul de Coomassie. 60
- Figura 7:** Eletroforese bidimensional dos componentes protéicos totais de *C. neoformans* tratado com a substância pedalitina, na concentração de 39µg/mL. Em A, B, C e D têm-se visão ampliada das proteínas alteradas. 61
- Figura 8:** Eletroforese bidimensional do extrato protéico total de *C. neoformans* cepa ATCC 90012 na faixa de pH de 3 a 10, comparada com *C. neoformans* resistente a fluconazol, em géis corados pelo azul de Coomassie. 65
- Figura 9:** Eletroforese bidimensional do extrato protéico total de *C. neoformans* cepa ATCC 90012 na faixa de pH de 3 a 10, comparada com *C. neoformans* resistente a fluconazol. Em A, B, C, D e E tem-se visão ampliada das proteínas. 66
- Figura 10:** Comparação do padrão de capacidade de adesão de *C. neoformans* cepa ATCC 90012 e dos isolados clínicos, sensível (S) e resistente (R) ao fluconazol, após 1h de incubação com células A549. 69
- Figura 11:** Porcentagem de adesão (A) e de inibição da adesão (B) da cepa ATCC 90012 de *C. neoformans* após 1 hora de tratamento com pedalitina (Ped), fluconazol (Fluco) e anfotericina B (Anfo) e 1 hora em sistema de infecção com células epiteliais A549. 70

* p<0,0001

Figura 12: Porcentagem de adesão (A) e de inibição da adesão (B) do isolado clínico de *C. neoformans* sensível ao fluconazol (S) após 1 hora de tratamento com pedalitina (Ped), fluconazol (Fluco) e anfotericina B (Anfo) e 1 hora em sistema de infecção com células epiteliais A549.

70

* $p < 0,0001$

Figura 13: Porcentagem de adesão (A) e de inibição da adesão (B) do isolado clínico de *C. neoformans* resistente ao fluconazol (R) após 1 hora de tratamento com pedalitina (Ped), fluconazol (Fluco) e anfotericina B (Anfo) e 1 hora em sistema de infecção com células epiteliais A549.

71

* $p < 0,0001$

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1:** Exemplo do esquema de combinação na placa de microdiluição com concentrações das frações do extrato de *P. nitens*, estando uma fração em negrito e outra em itálico para o teste do “tabuleiro de xadrez”. C-, controle negativo; C+, controle positivo. 44
- Quadro 2:** Valores de CIM em porcentagem dos extratos, frações e substâncias puras de diferentes plantas, testadas contra *C. neoformans* pelo micrométodo de acordo com o documento do CLSI. 49
- Quadro 3:** Valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM) de *Pterogyne nitens*, pertencente à família Fabaceae, testados contra *C. neoformans* cepa ATCC 90012, cepa sensível e cepa resistente ao fluconazol. 50
- Quadro 4:** Valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM) das frações de *P. nitens* sozinhas e combinadas contra *C. neoformans*, bem como a verificação da atividade dos extratos quando combinados. 51
- Quadro 5.** Seleção de *spots* demonstrados nas figuras 4 e 5 e as alterações observadas com o tratamento com fluconazol (FCZ). 57
- Quadro 6.** Seleção de *spots* demonstrados nas figuras 6 e 7 e as alterações observadas com o tratamento com a substância pura de *P. nitens*, pedalitina. 61
- Quadro 7.** Seleção de *spots* demonstrados nas figuras 8 e 9 e as diferenças observadas entre a cepa ATCC e o isolado clínico resistente. 67

RESUMO

A criptococose tem emergido como importante infecção oportunista em pacientes imunossuprimidos e imunocompetentes causando principalmente a neurocriptococose. *Cryptococcus neoformans*, um dos agentes, é uma levedura capsulada comumente encontrada em infecções do sistema nervoso central em pacientes HIV positivos. No mercado há fármacos para o tratamento dessas infecções, porém problemas são verificados quanto ao espectro de ação, custos e efeitos adversos. As plantas são usadas na medicina por longa data constituindo-se de uma ótima alternativa para busca de substâncias que podem ser utilizadas na formulação de novos antifúngicos. Neste estudo foram avaliados vários extratos, frações e substâncias puras do projeto BIOTA frente à cepa ATCC de *C. neoformans*, bem como em isolados clínicos com perfil de sensível e resistente frente ao fluconazol. Também foi feita a padronização e aplicação da metodologia do “tabuleiro de xadrez” para verificação de atividade sinérgica, aditiva, indiferente e antagônica entre as frações de plantas de interesse, bem como a molécula pedalitina associada com outras substâncias de origem vegetal e com as drogas sintéticas fluconazol e anfotericina B. Os que apresentaram melhores concentrações inibitórias mínimas foram selecionados para verificação do perfil de proteínas de fungos antes e após o contato com a substância de origem vegetal e perfil de adesão frente a células (pneumócitos) A549. Dentre as plantas estudadas, *Pterogyne nitens*, espécie pertencente à família Fabaceae, a qual possui a substância ativa pedalitina, possui atividade antifúngica significativa contra os isolados de *C. neoformans* incluindo o resistente. Suspensões de *C. neoformans* com e sem tratamento com fluconazol e em contato com a substância pura pedalitina, foram analisadas por SDS-PAGE e eletroforese bidimensional. Os tratamentos revelaram modificações na expressão de um número significativo de proteínas. As combinações da pedalitina com fluconazol e da mesma com anfotericina B revelaram efeito sinérgico, reduzindo a concentração das drogas em 75%. Também foram realizados ensaios de adesão do fungo às células A549 na presença da pedalitina e das drogas sintéticas fluconazol e anfotericina B verificando-se uma significativa diminuição da adesão. Desta forma acredita-se que estamos diante de um protótipo promissor para o desenvolvimento de um fármaco antifúngico com atividade específica para este agente.

ABSTRACT

Cryptococcosis is a disease that has emerged as an important opportunistic infection in immunocompromised and immunocompetent patients mainly causing cryptococcal meningitis. *Cryptococcus neoformans*, one of the agents, is encapsulated yeast most commonly found in central nervous system infections in HIV patients. There are drugs on the marketplace for the treatment of these infections, but problems are related to spectrum of action, costs and adverse effects. Plants are used in medicine for a long time and they are a great alternative to look for substances that can be used to develop new antifungal agents. In this study we evaluated several extracts, fractions and pure substances from BIOTA project against the ATCC strain of *C. neoformans*, as well as clinical isolates with sensible and resistant profile to fluconazole. The standardization and application of the methodology of the chessboard technique was developed to verify synergistic, additive, indifferent and antagonistic activities among the fractions of the selected plants, and the molecule pedalitin associated with other natural compounds and the synthetic drugs fluconazole and amphotericin B. The substances that presented the best minimum inhibitory concentrations were selected to verify the fungi protein profile before and after contact with the plant substance and adhesion profile to cells (pneumocytes) A549. Among the plants studied, *Pterogyne nitens*, specie that belongs to the family Fabaceae, which has the active substance called pedalitin, presented a significant antifungal activity against the isolates of *C. neoformans* including resistant. Suspensions of *C. neoformans* with and without treatment with fluconazole and in contact with pedalitin were analyzed by SDS-PAGE and two-dimensional electrophoresis. These treatments revealed changes in the expression of a significant number of proteins. The combinations of pedalitin with fluconazole and amphotericin B showed synergistic effect, reducing in 75% the concentration of drugs. Adhesion assays were also performed with yeast and A549 cells (pneumocytes) in the presence of pedalitin and the synthetic drugs fluconazole and amphotericin B and we observed a significant decline in adhesion. Thus, we believe that we have a promising prototype for the development of an antifungal drug with specific activity for this agent.

1. INTRODUÇÃO

O aumento da incidência das micoses tornou-se um importante problema de saúde pública, afetando grande parte da população mundial e como consequência pode ocorrer diminuição da qualidade e da expectativa de vida. O problema se agrava em pacientes imunossuprimidos, os quais são mais susceptíveis a desenvolver estas infecções, podendo levar muitas vezes ao óbito (MASCHMEYER & HAAS, 2008; SABLE et al., 2008; SEGAL et al., 2008; JARVIS et al., 2008, ESPINEL-INGROFF, 2009).

O aumento dessas infecções tem gerado problemas não apenas ao diagnóstico, mas também na terapêutica. A disponibilidade de antifúngicos ainda é relativamente pequena, algumas vezes ineficiente e a maioria com certa toxicidade. Juntamente com o crescimento dessas infecções, o problema da resistência microbiana também sofreu um aumento acentuado (GIROIS et al., 2006). A resistência microbiana deve-se a mutações que ocorrem nas células, e a droga age como agente seletivo em uma população (WHITE et al., 1998). Dentre os mecanismos de resistência utilizados pelos fungos é importante ressaltar a superprodução de enzimas, a implementação de vias metabólicas alternativas e a produção de bombas de efluxo que expulsam o medicamento da célula fúngica (FERREIRA et al., 2005; GOLDMAN et al., 2004).

A freqüência das infecções fúngicas causadas por linhagens resistentes vem aumentando e assim cresce também a urgência no desenvolvimento de terapias mais efetivas para o tratamento destas doenças. A descoberta de novos alvos exclusivos dos fungos e o entendimento dos mecanismos moleculares de resistência é etapa fundamental neste processo (PERLIN et al., 1997).

O gênero *Cryptococcus* engloba 38 espécies, entre elas, *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*, os principais agentes etiológicos da criptococose, já as outras espécies raramente são descritas (KANTARCIOGLU, et al, 2007). *Cryptococcus neoformans* é uma levedura patogênica de distribuição mundial (PERFECT & CASADEVALL, 2002), considerada patologicamente oportunista para o homem e animais (SORREL & ELLIS, 1997).

A levedura apresenta cápsula polissacarídica, que é o principal determinante da virulência (CASADEVALL & PERFECT, 1998). A cápsula polissacarídica é importante para a sobrevivência do microrganismo no ambiente e no hospedeiro e é considerada um importante fator de virulência com capacidade imunossupressora e antifagocítica. A cápsula é constituída pelos polissacarídeos glucuronoxilomanana (90%), galactoxilomanana (7%) e manoproteína (3%) (MITCHELL & PERFECT, 1995; CASADEVALL & PERFECT, 1998; CASALI et al., 2001; NISHIKAWA et al., 2003; MOYRAND et al, 2002; LEVITZ & SPECHT, 2006, ZARAGOZA et al, 2009). Acredita-se que a cápsula de *C. neoformans* o protege contra estresse ambiental, como, por exemplo, a desidratação, e também é considerada essencial para a virulência da levedura. (CASADEVALL & PERFECT, 1998; ZARAGOZA et al, 2003). Vários genes estão envolvidos na síntese de cápsulas polissacarídicas, como os genes CAP10, CAP59, CAP60 E CAP64, os quais são essenciais para a biossíntese de glucuroloxilomanana e necessários para a virulência em modelos de infecção em camundongos (JANBON, 2004). Em estudo realizado para verificar a produção de cápsula, foi observado que o fungo mantido *in vitro* em meio com manitol induz aumento significativo no tamanho da cápsula em comparação ao cultivo com glicose. Porém quando a glicose estava em alta concentração observou-se um maior aumento no tamanho da cápsula quando comparado com cultivo com manitol. Além disso, o tratamento com manitol em camundongos infectados com *C. neoformans* resultou em células fúngicas com cápsulas significativamente maiores e houve redução da disseminação do fungo para o cérebro. Assim, verifica-se que a fonte de carboidrato e a sua concentração podem modificar a expressão da cápsula de *C. neoformans*, a qual é um importante fator de virulência da levedura (GUIMARÃES et al, 2010).

Baseando-se nos antígenos polissacarídicos da cápsula (FRIES, et al, 1999; KWON-CHUNG et al, 1982), *C. neoformans* foi dividido inicialmente em três variedades e cinco sorotipos, sendo o sorotipo A pertencente à variedade *grubii* (FRANZOT et al., 1999), o sorotipo D à variedade *neoformans*, e B e C à variedade *gattii* (FRANZOT et al., 1999; SORRELL, 2001). Sob essa classificação, a designação correta para o sorotipo AD ainda não foi definida (LENGELER et al., 2001), entretanto alguns autores o consideram um híbrido (BOEKHOUT et al., 2001). Com base em dados de tipagem, seqüenciamento

de nucleotídeos e análise filogenética, foi sugerida a reclassificação de *C. neoformans* var. *gattii* como uma nova espécie, *C. gattii* (BOEKHOUT et al., 2001; KNOW-CHUNG et al., 2002). Portanto, atualmente, o complexo *Cryptococcus* inclui as leveduras basidiomicéticas *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* (sorotipo A), *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (sorotipo D) e *Cryptococcus gattii* (sototipos B e C), onde as variedades apresentam diferenças fenotípicas, genotípicas, bioquímicas, epidemiológicas e clínicas (LIN & HEITMAN, 2006; MORETTI et al, 2008; MA & MAY, 2009; CASALI et al., 2001; SORREL, 2001, MATSUMOTO et al, 2007, ALMEIDA et al, 2007).

C. neoformans var. *grubii* (sorotipo A) é o agente mais prevalente no mundo inteiro causando a criptococose, acometendo principalmente pacientes imunocomprometidos e responsável por 99% dos casos de criptococose em pacientes com Aids (BANERJEE, et al, 2004; CHEN, et al, 2008, SCHOP, 2007, BOVERS, 2008), enquanto *C. neoformans* var. *neoformans* (sorotipo D), ocorre principalmente na Europa e América do Sul. No Brasil, os dados estão de acordo com a literatura mundial, com exceção da região nordeste, que apresenta prevalência do sorotipo B (MATSUMOTO et al., 2007; TRILLES et al., 2008; DOS SANTOS et al., 2008; LEAL et al., 2008).

C. neoformans é geralmente encontrado em excretas de aves, principalmente pombos domésticos (GRANADOS & CASTAÑEDA, 2005; KOBAYASHI et al., 2005), onde há creatinina, ácido úrico, purinas e xantinas, as quais são assimiladas facilmente pela levedura, além destas aves servirem como carreadoras, transportando a levedura nas patas, penas e bico (LIN, 2009; LEVITZ, 1991), e ainda, em excretas dessecadas, a levedura conserva sua viabilidade por aproximadamente dois anos, permanecendo com cápsulas pequenas, mas compatíveis com a deposição alveolar (CASALI et al., 2001). No Brasil, foi realizado um levantamento da ocorrência de *C. neoformans* em torres de igreja na cidade de Rio de Janeiro e a levedura foi encontrada em 100% das igrejas e em 38% das amostras de excretas coletadas (BARONI et al., 2006). A prevalência de *C.gattii* é alta em áreas tropicais e subtropicais. (SORRELL; 2001). Esta espécie é freqüentemente encontrada em eucaliptos, principalmente *Eucaliptus camaldulensis* e *Eucaliptus tereticornis*, mas também tem sido isolada de outras espécies de árvores (LAZÉRA et al., 1998, 2000; GRANADOS & CASTAÑEDA, 2005, DIXIT et al, 2009).

Em amostras clínicas, *C. neoformans* quase sempre se apresenta na forma de levedura, as quais são encontradas no líquido, em secreções de tecidos e no escarro. Morfologicamente, é uma levedura arredondada, ovalada ou elipsóide, geralmente envolta por cápsula mucopolissacarídea. A levedura também pode reproduzir-se sexuadamente, correspondendo ao estado perfeito, sendo neste estágio denominado de *Filobasidiella neoformans*. Por serem heterotáticos, possuem dois *mating types* complementares. Ao contrário de outros basidiomicetos, as filobasidielas possuem um locus com dois alelos α e α (KWON-CHUNG & BENNETT, 1992; CHATURVEDI et al., 2000; LENGELER et al., 2001; OHKUSU et al., 2002; TRILLES et al., 2003). Mais de 95% dos isolados clínicos e ambientais corresponde ao *mating type* α (FRANZOT et al., 1997; FORTES, 2001; MATSUMOTO, et al., 2007; OHKUSU et al., 2002; PAPPALARDO & MELHEM, 2003; TRILLES et al., 2003; LITVINTSEVA et al., 2005; TAY et al., 2005; ABEGG et al., 2006).

A epidemiologia da criptococose é ainda pouco compreendida, principalmente, em relação às fontes de infecção e, aos casos de recorrência. Acredita-se que a maior parte destes episódios ocorre pela persistência do isolado infectante original, embora não se saiba que proporção pode ser causada por um novo isolado. Uma melhor compreensão destes casos beneficiaria as estratégias de prevenção da criptococose (ALMEIDA et al., 2007; BENADUCCI, 2009; MARTINS et al., 2007).

Este fungo pode causar infecção em indivíduos imunocompetentes, porém afeta principalmente pacientes imunocomprometidos (RICHARDSON & WARNOCK, 1993; THAKUR et al., 2008). A criptococose é uma micose cosmopolita que vem assumindo um papel relevante, por ser o principal agente de infecção fúngica que afeta as meninges. É considerada uma infecção oportunista, geralmente associada à imunossupressão, aos pacientes acometidos de leucemia, câncer, diabetes, transplantados, em tratamento com corticosteroíde ou infectados com o vírus da síndrome da imunodeficiência adquirida (HIV), sendo a espécie *neoformans* pouco freqüente em pacientes com boa resposta imunológica. Pacientes receptores de transplantes, em conseqüência ao uso de substâncias imunossupressoras, podem apresentar criptococose, uma das razões para a elevação das taxas de mortalidade neste grupo de pacientes. A incidência das infecções fúngicas invasivas em

receptores de rins é de 5%, enquanto que de fígado e pâncreas pode chegar a 20% (TOLKOFF-RUBIN & RUBIN, 1992; DELFINO et al., 1994; MITCHELL & PERFECT, 1995; LU et al., 2006).

A importância clínica de *C. neoformans* aumentou em consequência da maior incidência da Aids a partir de 1981. A associação entre a infecção com o vírus HIV (vírus da imunodeficiência humana) e o aumento na susceptibilidade à infecção criptocócica disseminada foi notada em pacientes com o sistema imune comprometido, como em pacientes em uso de terapias imunossupressoras pós-transplantes e em neoplasias (DROMER et al., 2007). No Brasil, a criptococose ocorre como primeira manifestação oportunista em aproximadamente 4% dos pacientes com Aids, sendo responsável por 50% dos casos de morte devido a micoses sistêmicas neste grupo de indivíduos (MORETTI et al, 2008; PAPPALARDO et al., 2007; PRADO et al, 2009). A doença é ocasionada por *C. neoformans* e com esta associação é predominante nas regiões sul, sudeste e centro-oeste do país (MORETTI et al, 2008). Em todo o mundo estima-se que 25% a 30% de indivíduos com Aids têm como consequência a meningite criptocócica. Sua incidência varia em diferentes partes do planeta apresentando-se entre 5 a 10% na Europa Ocidental e Estados Unidos e mais de 20% na África Central e leste da Ásia (MITCHELL & PERFECT, 1995; MENTZ, et al 2001; LIFSON et al., 2006). Em todo o mundo, o sorotipo A é mais comumente isolado, sendo observado em até 90% dos casos, seguido pelos sorotipos B e AD, nesta seqüência (KNOW-CHUNG et al., 1982; MITCHELL & PERFECT, 1995; CASADEVALL & PERFECT, 1998; FRANZOT et al., 1997, 1999; MEYER et al., 1999, 2003; BOEKHOUT et al., 2001; LITVINTSEVA et al., 2005). Os sorotipos D e C são mais raros, exceto em alguns países europeus, algumas áreas dos Estados Unidos (Califórnia e Nova Iorque) e Ásia (DROMER et al., 1994, 1996; BOEKHOUT et al., 2001; LITVINTSEVA et al., 2005) e são considerados menos patogênicos (MITCHELL & PERFECT, 1995; CASADEVALL & PERFECT, 1998). Leal et al. (2008), realizaram um estudo retrospectivo no período entre 2000 a 2005 analisando dados como raça, gênero, idade e fatores de risco como infecção por HIV. Dos 126 pacientes que desenvolveram meningite criptocócica, 77% foram homens com idade entre 30 e 39 anos, 95% infectados pelo HIV. Também, Moreira et al. (2006), relataram que, em

Uberlândia, 72,9% de 96 pacientes com criptococose, em particular os portadores do HIV, evoluíram para óbito, mesmo tratados com anfotericina B e derivados triazólicos.

A transmissão pode ocorrer através da inalação das formas infecciosas, leveduras dessecadas e carregadas pelo ar ou provenientes de basidiósporos que se depositam facilmente nos alvéolos, comprometendo inicialmente o pulmão e podendo disseminar-se para outros órgãos, mesmo se a infecção primária for leve ou assintomática (OLIVEIRA NETO et al., 1993; MITCHELL & PERFECT, 1995; BAKER & REBOLI, 1997; BARONI et al., 2006). Frequentemente pode ocorrer disseminação para o sistema nervoso central, uma vez que este órgão apresenta concentrações ótimas de tiamina, carboidratos, minerais e nutrientes assimiláveis pelo fungo, assim como a presença de percussores de melanina (POLACHECK, et al, 1990; LIFSON et al., 2006).

A porta de entrada da levedura no organismo é por meio do trato respiratório, em que as leveduras pouco capsuladas e/ou os basidiósporos são inalados e atingem os alvéolos pulmonares. Após a instalação do fungo nos pulmões, ele pode ser eliminado pelo sistema imune ou desenvolver a criptococose pulmonar (infecção primária), variando desde formas assintomáticas a quadros de pneumonia com febre, tosse, dor no peito, perda de peso (CHAYAKULKEEREE & PERFECT, 2006). No espaço alveolar, os macrófagos fazem a linha primária de defesa. Estas células são essenciais na defesa do hospedeiro contra *C. neoformans* (SHAO, et al, 2005; MANSOUR & LEVITZ, 2002). A alta prevalência de propágulos infectantes no ambiente e a baixa frequência de pessoas que se tornam infectadas ocorre devido à eficiência da imunidade celular, que contempla uma fagocitose competente nos alvéolos e promove a defesa do organismo nos indivíduos imunocompetentes (MITCHELL & PERFECT, 1995). A capacidade para patogênese intracelular é uma característica importante, porque células fagocitárias tais como macrófagos e neutrófilos constituem a primeira linha de defesa contra muitos fungos patogênicos. Neste sentido, as diferenças na atividade macrofágica foram relacionadas com a susceptibilidade diferencial de *C. neoformans* de diferentes espécies (SHAO et al., 2005). No entanto, alguns resultados recentes sugerem que a capacidade de *C. neoformans* explorar macrófagos é um mecanismo que

permite a disseminação do fungo no hospedeiro (KECHICHIAN et al., 2007; ZARAGOZA et al., 2007). O mecanismo pelo qual *C. neoformans* invade o sistema nervoso central é fundamental para a compreensão da patogênese da criptococose, que geralmente se apresenta como meningoencefalite. Há evidências de invasão direta das células endoteliais e/ou também após a ingestão de macrófagos. Mais recentemente também foi descrito mecanismo de invasão direta do cérebro via capilares e envolve deformação celular. Assim, o neurotropismo notável de *C. neoformans* pode ter mais de um mecanismo (SHI et al., 2010)..

A partir do pulmão, pode ocorrer disseminação, através da via hematogênica, para o sistema nervoso central (SNC), sítio pelo qual a levedura apresenta tropismo e onde acarreta quadros de meningite, encefalite ou meningoencefalite, podendo levar o paciente a óbito se não for realizado tratamento adequado (KWON-CHUNG & BENNETT, 1992; IDNURM et al., 2005). A meningite criptocócica é a infecção fúngica do SNC mais freqüente e a terceira complicação neurológica em pacientes acometidos pelo vírus HIV, podendo causar mortalidade em até 30% dos casos. A utilização da terapia antiretroviral reduziu os casos de criptococose em indivíduos com Aids, porém em países onde esta terapia é pouco utilizada, como na África e Sudeste da Ásia, a criptococose permanece endêmica (LIN & HEITMAN, 2006; LIN, 2009). *C. neoformans* foi responsável por 50% dos casos de morte devido a micoses sistêmicas em pacientes com Aids entre 1996-2006 (PRADO et al, 2009).

As manifestações clínicas geralmente são relacionadas ao sistema nervoso central, com quadro de meningoencefalite subaguda ou crônica. Os sintomas são febre e cefaléia e mais raramente alteração do nível de consciência (MITCHELL & PERFECT, 1995). A meningite criptocócica é a infecção fúngica do Sistema Nervoso Central (SNC) mais freqüente e a terceira complicação neurológica em pacientes com Aids, nos quais pode causar mortalidade de até 30% (FRIEDMAN et al, 2005; DEL VALLE & PINA-OVIEDO, 2006). Outros grupos de risco para a doença incluem indivíduos submetidos ao tratamento prolongado com corticosteróides e ao transplante de órgãos (CHAYAKULKEEREE & PERFECT, 2006). A infecção pulmonar pode passar despercebida, ou apresentar manifestações discretas compatíveis com quadro gripal. Em imunocomprometidos pode ocorrer disseminação sistêmica. O

acometimento geniturinário, envolvendo pielonefrite é raro, sendo que a cultura de urina específica pode ser importante nesse caso, inclusive em casos de criptococemia. A próstata também pode ser atingida, sendo uma possível fonte de recidivas em pacientes imunocomprometidos, além de outros órgãos como a pele, olhos e trato urinário (HERNÁNDEZ & PÉRES, 1999; CASADEVALL & PEPECT, 1998; STEENBERGEN & CASADEVALL, 2003; PINTO et al, 2006; MA & MAY, 2009).

O tratamento dos pacientes com Aids com a terapia antiretroviral provocou uma queda nas taxas de incidência de criptococose, no entanto, a doença pode se manifestar mesmo durante este tratamento e o prognóstico continua a ser desfavorável (DROMER et al., 2007; DROMER et al., 2004; FRIEDMAN et al., 2005). O prognóstico dessas infecções é limitado pela eficácia reduzida das drogas atualmente disponíveis, pelo desenvolvimento de resistência e também pela falta de testes diagnósticos rápidos e específicos (SANGLARD, 2002; SHAO et al., 2007; MÉAN et al, 2008).

Apesar do declínio da criptococose, a taxa de letalidade continua consideravelmente alta, em torno de 15 a 20% (JARVIS et al., 2008; DROMER et al., 2007) e a resistência de *Cryptococcus* sp aos antifúngicos é preocupante (PFALLER et al., 2008; ALLER et al., 2000; REX et al., 2001). Apesar de existirem no mercado fármacos para o tratamento dessas infecções, existem problemas quanto ao espectro de ação, os custos e os efeitos adversos como a hepatotoxicidade, nefrotoxicidade e fototoxicidade, além da resistência a alguns destes (SANGLARD, 2002; KONTOYIANNIS e LEWIS, 2002; SHAO et al., 2007; MÉAN et al, 2008, JOHNSON et al, 2008; GUERRERO, et al., 2008; SILVA et al., 2008). O aumento destas infecções, principalmente em pacientes imunossuprimidos e também os que receberam esquemas profiláticos com antifúngicos após a primeira infecção e tiveram falhas terapêuticas, desenvolvendo isolados resistentes (ALMEIDA et al, 2007; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008), tem gerado uma grande necessidade de novos agentes antifúngicos (KAUFFMAN, 2006b).

O tratamento disponível para criptococose ainda é sub-ótimo, utilizando-se anfotericina B (AMB), com doses iniciais de ataque seguido de manutenção com fluconazol (FCZ), podendo gerar isolados resistentes, emergentes nos últimos anos principalmente nos casos de falha terapêutica (SLOAN et al.,

2008; DORNEANU et al., 2008; JARVIS et al., 2008; PFALLER et al., 2008, MORSCHHAUSER, 2009). Recentemente, a anfotericina B também está sendo administrada associada com a 5- flucitosina (5-FC), o que tem demonstrado uma diminuição de 30% de casos de falha na terapêutica quando comparado com outros tratamentos (DROMER et al., 2008), porém esta possibilidade não existe no Brasil, pois a 5-FC não está mais disponível.

A anfotericina B tem atividade fungicida de amplo espectro e mesmo apresentando nefrotoxicidade associada em 50% dos pacientes, é o fármaco de escolha nos tratamentos de infecções fúngicas sistêmicas, transpassando a barreira hemato-encefálica (WHITE et al., 1998; BARQUIST et al., 1999). A droga liga-se ao ergosterol presente na membrana plasmática do fungo formando um canal pelo qual saem componentes celulares, principalmente íons potássio provocando desequilíbrio do gradiente iônico, e conseqüentemente leva a morte do fungo (WHITE et al., 1998). ZARAGOZA et al (2005) examinaram o efeito da droga na morfologia de *C. neoformans*, durante a infecção em murinos observando redução da cápsula polissacarídica e diminuição do antígeno polissacarídico no soro, o que leva a sugestão de um mecanismo de ação adicional para esta droga.

A droga 5-fluorocitosina pertence à classe de fármacos análogos da pirimidina, que interfere na síntese de DNA por inibir timidilato sintetase, e na síntese protéica por se incorporar ao RNA. Bennet et al., (1979) em estudo multicêntrico, compararam os tratamentos, utilizando-se anfotericina B em monoterapia e com esta associada a 5-fluorocitosina. Quando as duas drogas foram utilizadas em associação, 67% dos pacientes apresentaram cura ou melhora do quadro, contra 41% dos pacientes tratados apenas com anfotericina-B. Além disso, nefrotoxicidade menor foi observada, bem como número menor de recaídas no grupo que recebeu 5-fluorocitosina associada.

O surgimento de derivado azólico com biodisponibilidade alta e toxicidade baixa, como fluconazol e também itraconazol, abriu perspectivas a novos esquemas terapêuticos, sendo usados para fins profiláticos, em esquemas de manutenção da terapia e em uso combinado a anfotericina B. Os azóis são drogas fungistáticas e agem inibindo a enzima P-450 da via biossintética do ergosterol, a lanosterol 14 α -demetilase, codificada pelo gene ERG-11, interrompendo ou levando a produção insuficiente do ergosterol que é

o principal esterol da membrana da célula fúngica levando a formação de membranas defeituosas. O uso abusivo dos derivados azólicos tem levado segundo alguns pesquisadores, ao aparecimento de isolados multirresistentes (GRAYBILL et al., 1998). Pfaller et al., (2005a) avaliaram a atividade *in vitro* do itraconazol em 1615 isolados de *C. neoformans* e a droga foi ativa em apenas 80% dos isolados.

Nos casos de portadores de HIV, a profilaxia secundária ou terapia de manutenção é essencial depois da terapia inicial, pois a recaída é inevitável caso a contagem de linfócitos T-CD4+ se mantenha baixa. Os medicamentos indicados para a profilaxia incluem o fluconazol via oral em dosagem de 200 a 400mg ao dia ou a anfotericina B. A profilaxia secundária pode ser interrompida se houver aumento sustentado da contagem de linfócitos T-CD4+ (acima de 200 células/mm³) por, pelo menos, seis meses após o início da terapia antiretroviral. Nestas condições, geralmente surge emergência de isolados resistentes devido à falta de adesão à terapia por parte do paciente e em doses insuficientes pode ocorrer seleção de cepas resistentes (ALMEIDA et al, 2007; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008; BICANIC et al., 2006).

Os mecanismos mais comuns de resistência a azólicos em patógenos fúngicos têm sido estudados, mas pouco se sabe sobre os mecanismos moleculares responsáveis pela resistência aos azólicos em *Cryptococcus*, exceto para o caso de uma mutação em ERG11 relatado na cepa isolada de um paciente com AIDS que tiveram meningoencefalite criptocócica recidivante (RODERO et al., 2003). Além disso, heteroresistência foi também relatada e é preocupante, desde que esta contribui para a reincidência de criptococose, durante a terapêutica de manutenção dos azóis. (SIONOV et al., 2009)

Verifica-se, portanto, a necessidade da busca de novos agentes antifúngicos, bem como a caracterização de novos alvos, permitindo um tratamento mais apropriado e eficiente, inclusive com relação ao aparecimento de cepas resistentes (MARTINEZ-ROSSI et al., 2008; AGARWAL et al., 2008). Um antifúngico ideal deve ter atividade fungicida de amplo espectro e não causar toxicidade ao hospedeiro (CARRILLO-MUÑOZ et al, 2006).

As plantas são boas opções para obtenção de uma grande variedade de fármacos (CRUZ et al., 2007; ROJAS et al., 2006; NASCIMENTO, et al., 2000). Esta alternativa pode beneficiar grande parte da população que utiliza as

plantas como primeira opção de tratamento (SCORZONI et al., 2007). As plantas são usadas na medicina desde longa data, sendo extensivamente empregadas na medicina popular por representarem uma alternativa econômica, de fácil obtenção e aplicabilidade para diversas patologias (ROJAS et al., 2006). Estas se constituem, portanto em uma ótima alternativa para busca de substâncias que podem ser usadas na formulação de novos antifúngicos (HOLETZ et al., 2002). O Brasil é um país de ampla extensão territorial e grande biodiversidade, possuindo diferentes tipos de clima e solo, favorecendo o desenvolvimento de diferentes tipos de espécies, as quais podem curar ou minimizar efeitos de doenças como as micoses, malária, tuberculose, etc. (HARVEY, 2007; ROLLINGER et al., 2006; BASSO et al., 2005). Assim, as pesquisas com base na atividade terapêutica das plantas foram intensificadas nos últimos anos (BARRET, 2002).

Alguns extratos de plantas medicinais com atividade antifúngica foram pesquisados. O óleo essencial obtido a partir das sementes dos frutos de *Caryocar brasiliensis*, planta amplamente distribuída nas regiões central e sudeste do Brasil, teve atividade antifúngica comprovada contra *C. neoformans* (PASSOS et al., 2002). Em estudo realizado por Braga et al. (2007), com as plantas *Bixa orellanastram*, *Ocimum gratissimum* e *Syzygium cumini*, verificaram atividade contra *C. neoformans* apresentando concentração inibitória mínima com valor de 0,078 mg/mL. Outro estudo focado na verificação da atividade antifúngica de plantas foi realizado por Cruz et al. (2007), mostrando que as espécies *Ziziphus joazeiro* e *Caesalpineia pyramidalis* também apresentaram atividade significativa contra *C. neoformans*. Em estudo realizado por Lee et al. (2009), foi encontrada atividade contra *C. neoformans* com concentração mínima inibitória (CIM) de 0.545, 2.18 e 2.18 mg/mL respectivamente com as plantas *Pinus densiflora*, *Cryptomeria japonica*, e *Chamaecyparis obtusa*. Outro estudo, também realizado por Lee (2009) et al, focado na verificação da atividade antifúngica de plantas, mostrou que as espécies *Abies holophylla* e *Abies koreana* apresentaram atividade significativa contra *C. neoformans*, com de CIM >2.2 e 1.1 mg/mL.

Pterogyne nitens (Fabaceae), planta selecionada neste estudo, é popularmente conhecida como "amendoim bravo", "amendoinceiro", "bálsamo". É uma árvore que possui de 5 a 12 metros de altura, altamente ramificada

(LORENZI, 1998). A sua madeira é usada para construção de casas, móveis e para fazer arcos (BURKART, 1952). Na medicina popular, as cascas do caule foram usadas como agente antiparasitário, por exemplo, para o tratamento de ascaridíase (CRIVOS, et al, 2007). Estudos preliminares sobre atividade biológica de *P. nitens* indicaram uma forte inibição do edema de pata de camundongo, sugerindo a presença de substâncias antiinflamatórias no extrato etanólico das folhas (FERNANDES, et al, 2008). Outras análises permitiram a descrição de mais compostos presentes nas folhas deste vegetal (FERNANDES et al. 2008; FERREIRA et al., 2009; REGASINI et al., 2007, 2008a, 2008b). Dentre estes, foi isolado um alcalóide guanidínico (galegina) (REGASINI et al., 2009), além de um flavonóide diglicosilado (kaempferitrina) (REGASINI et al., 2008c). A substância pura pedalitina é obtida a partir da fração acetato de etila, a qual é proveniente do extrato etanólico das folhas de *P. nitens*. A fração ACOEt foi submetida a partição líquido-líquido seguida de cromatografia de permeação em gel (LH-20) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), culminando na obtenção do flavonol isoquercetrina e da flavona pedalitina (Figura 1) (FERNANDES, et al, 2007). A estrutura da pedalitina foi elucidada por espectrometria de ressonância magnética nuclear bem como por espectrometria de massa de alta resolução (FERNANDES, et al, 2008).

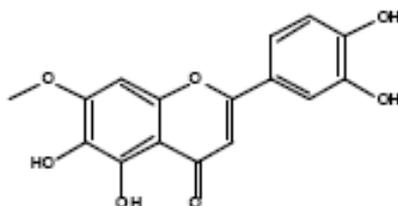


Figura 1: Estrutura química da flavona pedalitina.

Foi realizado um estudo para verificação da capacidade antioxidante da isoquercetrina e da pedalitina, através da técnica de voltametria cíclica. Foi observado que a isoquercetrina apresentou um pico de oxidação bem definido em potencial de + 0,32V, e a pedalitina apresentou um pico de oxidação de +0,40V. Assim, as duas substâncias apresentaram resultados que são indicativos de propriedade antioxidante (FERNANDES et al, 2007).

A combinação sinérgica de fármacos antifúngicos com substâncias de origem vegetal para otimizar a atividade antifúngica tem sido estudada com o intuito de viabilizar o uso de fármacos que apresentam considerável toxicidade (HAN & LEE, 2005; HAN, 2007).

O método utilizado para verificação da atividade sinérgica é conhecido como “tabuleiro de xadrez” em que se realiza um arranjo de tubos ou poços de uma microplaca, com variadas concentrações de cada um dos antifúngicos (ODDS, 2003; JOHNSON et al., 2004). Desta forma, a atividade dos extratos antifúngicos vegetais pode ser otimizada por meio da combinação entre diferentes substâncias de diversas plantas. Estudo realizado por Yamada et al (2010) verificou que a monoterapia com voriconazol ou anfotericina B lipossomal, ambos indicados para o tratamento de aspergilose invasiva, apresentava baixa resposta durante o tratamento da doença. Quando estas foram associadas à micafungina, ambas tiveram um efeito aumentado contra a infecção. O uso de drogas combinadas também foi estudado em isolados de casos de infecções disseminadas causadas por *Trichosporon asahii*, sendo avaliada a atividade antifúngica de voriconazol, caspofungina e anfotericina B isoladamente e em combinação. Melhores resultados foram obtidos com a associação de caspofungina e anfotericina B, sugerindo que o tratamento com drogas combinadas pode ser uma alternativa melhorada ao tratamento (LI et al, 2010).

Estudos a cerca da atividade sinérgica utilizando plantas medicinais ainda são incipientes. Em 1999, Jonkers et al. realizaram um estudo envolvendo cápsulas de alho e omeprazol contra *Helicobacter pylori*. Efeito sinérgico foi observado quando os dois compostos foram combinados, na concentração de 200µg/mL de omeprazol e 200-400µg/mL de extrato de alho. Lin et al (2005) verificaram que o flavonóide miricetin inibia a produção de beta lactamase espectro estendido de *Klebsiella pneumoniae* na concentração de 256µg/mL, porém, ao ser combinado com amoxicilina/clavulonato, ampilicilina/sulbactan e cefoxitina observaram significativo efeito sinérgico. Assim, com a baixa toxicidade dos flavonóides, a combinação destes com fármacos antibióticos pode ser uma nova estratégia no desenvolvimento de terapias nas infecções causadas por bactérias que produzem o conjunto de enzimas beta lactamase espectro estendido. Em alguns relatos acredita-se

que a interação sinérgica entre os constituintes das plantas é responsável pela eficácia terapêutica em fitoterápicos (WILLIAMSON, 2001). É também conhecido que muitos curandeiros tradicionais não dependem apenas de um único extrato vegetal para regimes terapêuticos, mas muitas vezes combinam várias partes das plantas e até mesmo de espécies diferentes na convicção de que a eficácia possa ser reforçada. Enquanto que a literatura cita o uso tradicional das combinações de plantas para o tratamento de infecções, verificou-se que poucas são as provas científicas para apoiar esta modalidade específica de seu uso tradicional. Alguns estudos evidenciam o uso combinado de várias partes da planta e/ou com antimicrobianos no intuito de ampliar o uso da fitoterapia (SHIN & KANG, 2003; FILOCHE et al., 2005; VAN VUUREN & VILJOEN, 2008).

Os mecanismos de ação de muitas moléculas com atividade antifúngica de fontes vegetais ainda não foram elucidados. Uma estratégia seria a utilização de sistemas proteômicos para prospecção de novos alvos moleculares. O termo proteoma foi introduzido no início dos anos 90 por Wilkins para indicar a proteína total e complementar expressa pelo genoma de uma célula, tecido ou organismo (WILKINS & PASQUALI et al., 1996; WILKINS & SANCHEZ et al., 1996). O genoma de uma célula é finito e estático por toda a sua vida, já os proteomas são dinâmicos e mudam constantemente em resposta a estímulos externos e durante o seu desenvolvimento (SPEICHER, 2004). O proteoma celular é muito complexo, formado por um grande número de proteínas que variam conforme o contexto, momento ou evento metabólico ao qual está submetido o organismo (WASINGER et al, 1995; WILKINS, et al, 1995; LOPEZ, 1999).

A análise proteômica é a “análise sistemática em larga escala das proteínas totais (ou da totalidade protéica), em uma condição específica” (BLACKSTOCK & WEIR, 1999; GYGI & RIST et al., 2000). O objetivo desta análise é obter a mais completa e integrada visão da biologia através do estudo de todas as proteínas da célula, em preferência a estudar proteínas individuais (GRAVES & HAYSTEAD, 2002). O campo de atuação desta ciência estende-se a descoberta de novas drogas, diagnósticos, terapias, microbiologia, bioquímica e biologia de sistemas.

Na pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos, as proteínas são de grande importância uma vez que se constituem de importantes alvos. Desta maneira, através do emprego de técnicas proteômicas pode-se analisar as alterações ocorridas em um sistema quando exposto a determinada substância ou estado patológico (WALGREN et al., 2004).

O genoma completo de um microrganismo, mesmo com sua importância em análises filogenéticas, seqüências gênicas e tecnologia de DNA recombinante, gera apenas uma visão estática do potencial funcional de um organismo, sendo limitado quando se necessita do conhecimento das proteínas expressas em uma condição fisiológica específica ou identificação das modificações pós-traducionais (DUTT & LEE, 2000; LOTTSPREICH, 1999). A população de RNAm, da mesma forma que o genoma, tem limitações ao proporcionar tais informações (LOTTSPREICH, 1999). Desta forma, a análise do proteoma torna-se importante em estudos de comparação da expressão gênica em diferentes estados fisiológicos de um organismo.

A eletroforese bidimensional ou 2-DE é um método de separação de proteínas com duas orientações dimensionais perpendiculares, o que permite a separação das proteínas em um plano (duas dimensões), aumentando a resolução. Esta técnica separa as proteínas pela sua carga (focalização isoelétrica) na primeira dimensão, e pela sua massa molecular (SDS PAGE) na segunda dimensão. Um gel de 2D-PAGE permite a visualização de até 3000 proteínas, dependendo da amostra e da sensibilidade da técnica de revelação, embora já se tenha descrito géis com 10000 *spots* (KLOSE & KOBALZ, 1995; RABILLOUD, 2000; WITTMANN-LIEBOLD & GRAACK et al., 2006).

Um experimento proteômico típico pode ser dividido em partes conforme seu início, meio e fim: a separação e o isolamento das proteínas, a aquisição de informação estrutural da proteína com propósito de identificar e caracterizar, e a utilização de bancos de dados (GRAVES & HAYSTEAD, 2002).

Em nosso laboratório foi utilizada a análise proteômica para um melhor entendimento da ação dos extratos de plantas com atividade na célula fúngica. Realizou-se o contato dos extratos brutos ACOEt e EtOH derivados de *Kielmeyera rubriflora*, além da droga comercial fluconazol, contra a levedura *Candida albicans* e *Candida krusei* e posterior análise proteica por eletroforese bidimensional. Nas duas leveduras foram observadas várias alterações na

expressão de proteínas. Em *C. albicans* tratada com fluconazol foram observadas nove alterações na expressão de proteínas e em *C. krusei* 11 modificações, já com ambos os extratos verificou-se aumento ou diminuição de 66 proteínas. Por outro lado, 44 proteínas não foram expressas após o tratamento. Aparentemente, ambos os extratos foram mais eficientes para inibição da expressão proteica de *C. krusei*, sugerindo a existência de alvos específicos (SCORZONI, 2008).

Outra abordagem importante é a prospecção de moléculas com atividade antifúngica em sistemas de infecção. Os modelos envolvendo técnicas de culturas de células de mamíferos podem ser utilizados no intuito de se estudar novos alvos evitando-se de forma precoce a instalação do patógeno. A adesão é um pré-requisito para a colonização e um passo essencial para o estabelecimento da infecção. Estudos realizados com *Candida* spp e *Paracoccidioides brasiliensis* têm demonstrado que estes fungos possuem grande potencial de adesão a células epiteliais (BIASOLI et al. 1999; MURPHY & KAVANAGH, 2001; MENDES- GIANNINI et al., 2008). Ambos possuem algumas características peculiares que favorecem a adesão, dentre elas a presença de adesinas em suas paredes celulares.

O fenômeno de adesão é conferido a proteínas especializadas de superfície celular chamadas de adesinas que se ligam especificamente a aminoácidos ou açúcares na superfície de outras células ou promovem a adesão a superfícies abióticas. Todas as adesinas fúngicas compartilham em comum três domínios estruturais, que são: domínio C-terminal que contém a âncora de GPI (glicosilfosfatidilinositol) responsável pela ligação da adesina a parede celular, a porção N-terminal que contém o carboidrato ou peptídeo de ligação e o domínio central caracterizado pela presença de múltiplas repetições de serina- e treonina- codificados por uma seqüência conservada do DNA (VERSTREPEN & KLIS, 2006).

A adesão de *C. neoformans* à célula hospedeira é crucial para reconhecer os fatores que têm influência sobre a sua patogenicidade porém o mecanismo responsável pela a adesão e as estruturas adesivas presentes na parede celular, permanecem desconhecidos (KARKOWSKA-KULETA et al, 2009).

Assim, no presente trabalho pretendeu-se buscar novas substâncias com atividade anti *Cryptococcus neoformans* isoladas, ou em combinação para verificação de sinergismo e após selecionar o futuro protótipo pedalitina, por outro lado, verificar a atividade da molécula sobre o fungo e em sistema de infecção. Também se utilizou abordagem proteômica a fim de realizar a detecção de novos alvos potenciais, através das proteínas diferencialmente expressas após contato com a pedalitina.

2. JUSTIFICATIVA

Cryptococcus neoformans é o patógeno mais comumente encontrado em infecções do sistema nervoso central em pacientes HIV positivos. Estima-se que 25-30% desses pacientes morrerão em consequência de meningite criptocócica. A infecção por HIV ainda é o principal fator de risco para criptococose e estima-se que 6-8% dos pacientes com AIDS desenvolvem em algum momento, infecção criptocócica.

Apesar de existirem no mercado fármacos para o tratamento dessas infecções, existem problemas quanto ao espectro de ação, os custos e os efeitos adversos como a hepatotoxicidade, nefrotoxicidade e fototoxicidade, além da resistência a algumas drogas. Atualmente o tratamento disponível ainda é subótimo, utilizando-se anfotericina B, com doses iniciais de ataque seguido de manutenção com fluconazol, podendo gerar isolados resistentes, emergentes nos últimos anos. Novos azóis foram desenvolvidos, porém não são utilizados para tratamento específico da criptococose e os novos antifúngicos como posaconazol, ravuconazol, micafungina e anidulafungina ainda não são comercializados no Brasil. Desta forma, observa-se que o arsenal para o tratamento da criptococose é restrito, verificando-se a urgência no desenvolvimento de terapias mais efetivas com novos medicamentos mais específicos. A descoberta de novos fármacos e suas interações em alvos de *C. neoformans* é de grande relevância por se tratar de doença freqüente em pacientes portadores de AIDS e em faixa etária produtiva. As plantas são ótimas alternativas, tanto na utilização de moléculas isoladas quanto em combinação com outras moléculas de origem natural ou drogas sintéticas.

Os mecanismos de ação de muitas moléculas com atividade antifúngica de fontes vegetais ainda não foram elucidados. Uma estratégia seria a utilização de sistemas proteômicos para prospecção de novos alvos moleculares exclusivos no fungo.

A interação fungo-hospedeiro também propicia a descoberta de alvos interessantes durante o processo de adesão do fungo às células. Desta forma o fármaco também poderia de forma precoce impedir a infecção.

De acordo com nosso levantamento na literatura, os estudos com extratos e substâncias derivadas de produtos naturais descrevem apenas sua atividade, não aprofundando as investigações no sentido de reconhecer a

interação molecular dos alvos deste agente com os princípios ativos antifúngicos. Os estudos que investigam novos alvos essenciais nos fungos e as suas interações moleculares ainda são incipientes, mas revelam a necessidade de se caracterizar novas moléculas ativas de fontes naturais para desenvolver drogas antifúngicas principalmente contra esta doença.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivos gerais

Realizar o estudo da atividade antifúngica de extratos e substâncias de plantas isoladamente e/ou em combinação com fluconazol bem como análise diferencial do perfil protéico total antes e após o contato com substância de origem vegetal e com o fármaco fluconazol. Também avaliar o índice de adesão às células epiteliais de pulmão antes e após contato de *C. neoformans* com a substância pura natural selecionada e ainda após contato com as drogas fluconazol e anfotericina-B. Adicionalmente verificar alterações no tamanho da cápsula polissacarídica do fungo após contato com a substância pura natural.

3.2. Objetivos específicos

-Realizar a bioprospecção de extratos brutos, compostos fracionados e substâncias puras de origem vegetal com atividade antifúngica através de técnicas adaptadas e padronizadas baseadas no Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI.

-Avaliar a atividade antifúngica sinérgica ou aditiva através da combinação entre frações da mesma planta; compostos fracionados de outra planta (*K. rubriflora*) e substância pura selecionada da planta *P. nitens*; a pedalitina com extrato bruto da planta *Garcinia* sp e a substância pura com fluconazol e posteriormente com anfotericina B.

-Realizar análise proteômica de *C. neoformans*, antes e após contato com a substância pura selecionada da planta *P. nitens*, bem como com fluconazol.

-Realizar a infecção de *C. neoformans* (ATCC e isolados clínicos sensível e resistente ao fluconazol) para verificar a adesão do fungo às células epiteliais de pulmão. Verificar o índice de adesão do fungo às células após tratamento com a substância pura pedalitina, da planta *P. nitens*, bem como com as drogas antifúngicas fluconazol e anfotericina B.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Seleção e Cultivo de isolados de *Cryptococcus neoformans*

Para a realização dos testes foram empregados os isolados clínicos de *C. neoformans* com perfil fenotípico de sensível e resistente a fluconazol. Estes foram recuperados de um paciente que apresentou vários episódios de infecção em diferentes períodos. Estes isolados foram caracterizados por tipagem molecular e posteriormente o gene ERG11 foi seqüenciado. O isolado resistente apresentou mutação na proteína 14 α lanosterol demetilase, proteína expressa pelo gene referido, caracterizado pela alteração de estrutura e afinidade química que proporcionou modificação do encaixe de fluconazol (ALMEIDA, 2005). Também foi empregada a cepa 90012 ATCC de *C. neoformans* (The American Type Culture Collection), pertencente à micoteca do Laboratório de Micologia Clínica do Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Araraquara. Os isolados com perfil sensível e ATCC foram cultivadas em ágar Sabouraud sem a adição de cloranfenicol e incubadas a temperatura ambiente durante 48 horas, enquanto que o resistente foi cultivado em ágar Sabouraud sem cloranfenicol e acrescido de fluconazol 64 μ g/mL e incubado a 30°C por 72 horas.

4.2. Preparo das substâncias vegetais

Os extratos, frações ou substâncias puras foram obtidas através do projeto Biota-FAPESP e Bioprospecta-FAPESP, coordenados pela Profa. Dra. Vanderlan da Silva Bolzani e Profa. Dra. Dulce Helena Siqueira Silva, respectivamente, do Instituto de Química da UNESP–Araraquara. As substâncias vegetais foram diluídas assepticamente em quantidades adequadas de dimetilsulfóxido e solubilizados com o auxílio do vórtex. Foram realizados cálculos para que a faixa de concentração do extrato para a avaliação da atividade antifúngica fosse de 250 a 0,4 μ g/mL. A substância pura pedalitina, obtida a partir da espécie *Pterogyne nitens*, foi posteriormente selecionada para este estudo por apresentar boa atividade biológica contra *C. neoformans*.

4.3. Avaliação da atividade antifúngica

Os testes de sensibilidade foram realizados de acordo com o documento M27-A2 (2002) do CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) com modificações (RODRIGUEZ-TUDELA et al., 1996). O meio de cultura utilizado para a realização dos testes de sensibilidade e diluição das drogas sintéticas foi o RPMI-1640 com L-glutamina sem bicarbonato de sódio e acrescido de 2% de glicose, tamponado com MOPS 0,165M, pH 7,0. A concentração da suspensão fúngica na placa foi de $5,0 \times 10^2$ – $2,5 \times 10^3$ UFC/mL. Como controles foram utilizadas as drogas sintéticas anfotericina B e fluconazol. As leituras visuais foram realizadas após 48 horas de incubação, assim como a leitura espectrofotométrica a 490nm. A Concentração Inibitória Mínima foi considerada a menor em que se observou inibição do crescimento fúngico. Os extratos que apresentarem uma CIM menor que 75µg/mL, a atividade antifúngica foi considerada forte, entre 75 a 150µg/mL possuem atividade antifúngica moderada, entre 150 a 250µg/mL, fraca e maior que 250µg/mL inativo (SCORZONI et al., 2007).

4.4. Avaliação da Atividade Sinérgica

O teste do “tabuleiro de xadrez” foi baseado no procedimento estabelecido pelo CLSI para microdiluição em caldo para teste de sensibilidade antifúngica (CLSI, 2002). O meio de cultura utilizado foi o RPMI-1640 com L-glutamina sem bicarbonato de sódio e acrescido de 2% de glicose, tamponado com MOPS 0,165M, pH 7,0. Na coluna 1, de A a D, foi adicionado 200µL de RPMI, como controle negativo, enquanto que, ainda na mesma coluna, de E a H, foi colocado 100µL de RPMI juntamente com 100µL de inóculo na concentração de 10^6 células/mL, como controle negativo. Na coluna 12, foi acrescentado um dos compostos (1) em diluição seriada, de A a H, o mesmo ocorrendo na fila H, de 2 a 11, com o outro composto (2) que foi utilizado no teste combinatório. Os compostos 1 e 2, para iniciar a combinação de ambos na placa, tinham concentração de 4 vezes o valor da concentração final. Nas filas de A a G, colunas 2 a 11, acrescentou-se 50µL do composto 1, em diluições seriadas (cada fila com uma diluição). Nas colunas de 2 a 11, de A a G, foi adicionado 50µL do composto 2, também realizando-se diluições seriadas (cada coluna com uma diluição). Desse modo, em cada placa, foi avaliado o isolado de

C.neoformans frente a dois compostos isoladamente e em associação. A disposição dos compostos e as respectivas concentrações finais na placa podem ser observadas no quadro 1. Em cada poço (exceto no controle negativo) foi adicionado 100µL de suspensão fúngica, preparada em RPMI, tendo como concentração final $5,0 \times 10^2$ – $2,5 \times 10^3$ UFC/mL. As placas foram incubadas a 35°C e lidas após 48 horas a “olho nu” e por espectrofotometria, com leitor de placas, a 490nm. O resultado do teste combinatório é a menor concentração de cada droga, que inibiu completamente o crescimento da amostra, representado por turbidez zero.

As combinações realizadas foram:

- fração butanólica (BuOH) com acetato de etila (ACOEt) de *P. nitens*;
- fração hidroalcolólica (HA) com o extrato bruto etanólico (EtOH) de *P. nitens*;
- substância pedalitina, molécula selecionada da mesma planta, com o extrato bruto da planta *Garcinia sp*;
- pedalitina com a fração ACOEt da planta *Kielmeyera rubriflora*;
- pedalitina com a fração EtOH de *Kielmeyera rubriflora*;
- pedalitina com fluconazol;
- pedalitina com anfotericina.

Quadro 1: Exemplo do esquema de combinação na placa de microdiluição com concentrações das frações do extrato de *P. nitens*, estando uma fração em negrito e outra em itálico para o teste do “tabuleiro de xadrez”. C-, controle negativo; C+, controle positivo.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	C-	<i>250</i> 250	<i>250</i> 125	<i>250</i> 62,5	<i>250</i> 31,2	<i>250</i> 15,6	<i>250</i> 7,8	<i>250</i> 3,9	<i>250</i> 1,95	<i>250</i> 0,97	<i>250</i> 0,48	500
B	C-	<i>125</i> 250	<i>125</i> 125	<i>125</i> 62,5	<i>125</i> 31,2	<i>125</i> 15,6	<i>125</i> 7,8	<i>125</i> 3,9	<i>125</i> 1,95	<i>125</i> 0,97	<i>125</i> 0,48	250
C	C-	<i>62,5</i> 250	<i>62,5</i> 125	<i>62,5</i> 62,5	<i>62,5</i> 31,2	<i>62,5</i> 15,6	<i>62,5</i> 7,8	<i>62,5</i> 3,9	<i>62,5</i> 1,95	<i>62,5</i> 0,97	<i>62,5</i> 0,48	125
D	C-	<i>31,2</i> 250	<i>31,2</i> 125	<i>31,2</i> 62,5	<i>31,2</i> 31,2	<i>31,2</i> 15,6	<i>31,2</i> 7,8	<i>31,2</i> 3,9	<i>31,2</i> 1,95	<i>31,2</i> 0,97	<i>31,2</i> 0,48	62,5
E	C+	<i>15,6</i> 250	<i>15,6</i> 125	<i>15,6</i> 62,5	<i>15,6</i> 31,2	<i>15,6</i> 15,6	<i>15,6</i> 7,8	<i>15,6</i> 3,9	<i>15,6</i> 1,95	<i>15,6</i> 0,97	<i>15,6</i> 0,48	31,2
F	C+	<i>7,8</i> 250	<i>7,8</i> 125	<i>7,8</i> 62,5	<i>7,8</i> 31,2	<i>7,8</i> 15,6	<i>7,8</i> 7,8	<i>7,8</i> 3,9	<i>7,8</i> 1,95	<i>7,8</i> 0,97	<i>7,8</i> 0,48	15,6
G	C+	<i>3,9</i> 250	<i>3,9</i> 125	<i>3,9</i> 62,5	<i>3,9</i> 31,2	<i>3,9</i> 15,6	<i>3,9</i> 7,8	<i>3,9</i> 3,9	<i>3,9</i> 1,95	<i>3,9</i> 0,97	<i>3,9</i> 0,48	7,8
H	C+	<i>500</i>	<i>20</i>	<i>125</i>	<i>62,5</i>	<i>31,2</i>	<i>15,6</i>	<i>7,8</i>	<i>3,9</i>	<i>1,95</i>	<i>0,97</i>	3,9

Para verificar o efeito combinatório dos compostos, adotou-se o índice de concentração inibitória fracionada (ICIF), o qual pode ser sinérgico, aditivo, indiferente ou antagônico. O ICIF é calculado através da soma da concentração inibitória fracionada (CIF) da fração 1 mais a CIF da fração 2. A CIF da fração 1 é obtida através da soma da CIM quando ela é usada em combinação com a fração 2 dividido pela CIM da fração 1 quando ela é usada isoladamente.

Composto 1c/CIM 1 + Composto 2c/CIM 2 = CIF Composto 1 + CIF Composto 2 = ICIF

Composto 1c = CIM do composto 1 em combinação

CIM 1 = CIM do composto 1 isoladamente

Composto 2c = CIM do composto 2 em combinação

CIM 2 = CIM do composto 2 isoladamente

A combinação é definida como sinérgica quando o ICIF é menor ou igual a 0,5; aditiva quando ICIF é maior que 0,50 e menor/igual a 1,0; indiferente quando ICIF é maior que 1 e menor/igual 4; e antagônica quando ICIF é maior 4,0 (CLANCY et al., 1997; PATTERSON et al., 2000; ODDS, 2003; RODRIGUEZ-TUDELA et al., 2003; JOHNSON et al., 2004).

4.5. Concentração Fungicida Mínima

Após o tempo de incubação, uma amostra de cada um dos 96 poços da placa de microdiluição foi retirada e colocada cuidadosamente em ágar Sabouraud contido em placas grandes. Após 48 horas de incubação a 30°C, verificou-se o crescimento ou não de colônias nos locais em que foram inoculadas e comparadas com a leitura da microplaca. Desta forma, verificou-se qual a concentração que possuía ação fungicida.

4.6. Escolha do extrato vegetal para verificação da ação em proteínas de *C. neoformans*

As substâncias vegetais que apresentaram boa atividade antifúngica frente às leveduras foram empregadas no estudo do proteoma.

4.7. Extração das proteínas

O cultivo de *C. neoformans* foi feito em meio YEPD na concentração de 1×10^4 a 5×10^4 células/mL e incubado a 30°C, durante 24 horas, ou seja, até atingir a fase *log* da curva de crescimento. Em seguida, adicionou-se fluconazol na concentração de 750 µg/mL, sendo que o mesmo foi realizado com extrato vegetal utilizando-se uma concentração 10 vezes maior que a CIM, ficando em contato por mais 24 horas. O cultivo foi centrifugado e lavado por três vezes, em água gelada, 5000 RPM, 5 minutos, 4°C, para a retirada do meio de cultura e extrato. Acrescentou-se ao *pellet* obtido, 5mL de uma solução de Tris-HCl 10mM, para realização da maceração em almofariz, com nitrogênio líquido. Em seguida, adicionaram-se ao macerado, pérolas de vidro e levou-se ao “vortex” durante 15 minutos. Centrifugou-se a 5000 rpm por 45 minutos e reservou-se o sobrenadante.

4.8. Quantificação das proteínas

A dosagem das proteínas após a extração foi realizada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976). Alíquotas de 100µL de amostra foram adicionadas a 5mL do reagente diluído (1:4) e incubadas por 5 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, foi feita a leitura em espectrofotômetro a 595nm. As concentrações das proteínas foram calculadas através da comparação com uma curva-padrão e realizados os cálculos para obtenção de 600µg de proteína por mL.

4.9. Análise do perfil protéico por eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)

Os perfis protéicos foram analisados quanto a sua alteração após a exposição à fluconazol e à substância vegetal por eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio, SDS-PAGE, sob condições redutoras, utilizando sistema de tampão descontínuo de Laemmli, (1970) e Studier, (1973).

4.10. Eletroforese Bidimensional

4.10.1. Focalização Isoelétrica (1ª dimensão)

As proteínas foram separadas de acordo com o seu ponto isoelétrico (pI), sendo submetidas à focalização isoelétrica, utilizando-se o sistema Ettan IPGphor 3 (GE Healthcare). As fitas utilizadas para a caracterização das proteínas presentes na amostra foram as de 13 cm, não lineares, com gradiente de pH de 3-10.

4.10.2. Preparo da amostra

De acordo com os cálculos realizados durante a dosagem pelo método de Bradford, pipetou-se o volume adequado de amostra e adicionou-se TCA 10% + Acetona 90%, para realização da precipitação, a qual foi feita a 4°C durante 12 horas. Em seguida, centrifugou-se a amostra por três vezes com acetona 90% e, adicionou-se De-Streak, IPG Buffer e solução de reidratação, sendo que a amostra deve estar muito bem solubilizada.

As fitas foram reidratadas com 250µL de amostra, a qual contém 600µg de proteína, durante 10-20 horas, à temperatura ambiente, no aparato

adequado para reidratação (Immobiline DryStrip Reswelling Tray – GE Healthcare). As fitas foram cobertas com Cover Fluid (GE Healthcare) evitando-se a evaporação durante a reidratação.

Em seguida, realizou-se a focalização de acordo com as seguintes condições: 500v por 1 hora, 1000v por 1 hora, 8000v por 2 horas e 30 minutos, 8000v por 30 minutos. Após a focalização, as fitas foram retiradas do aparelho e armazenadas a -80°C .

4.10.3. SDS-PAGE (2ª dimensão)

Após a focalização isoeétrica, as fitas foram mantidas por 20 minutos em solução de equilíbrio com 100mg DTT e, em seguida, por mais 20 minutos em solução de equilíbrio com 250mg de iodacetamida (solução de redução e alquilação, respectivamente). A segunda dimensão, a qual foi realizada para a separação das proteínas de acordo com a massa molecular, foi realizada em gel de poliacrilamida 12.5% de acordo com Laemmli, 1970. As fitas foram inseridas sobre o gel de acrilamida e fixadas com uma solução de agarose 0,5% (p/V). A separação eletroforética foi realizada a 10°C , sendo que no primeiro estágio foi utilizada uma corrente de 15v por 15 minutos e no segundo estágio, uma corrente de 30v por gel, por aproximadamente, 4 horas. Após a eletroforese, os géis foram corados com Coomassie Azul Brilhante G-250 segundo Neuhoff et al. (1988).

4.11.1. Cultura de células

Foi utilizada a linhagem de pneumócitos A549, células epiteliais de pulmão humano (obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro) cultivadas em meio HAM F-12 (Cultilab) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cultilab) e mantidas a temperatura de $36,5^{\circ}\text{C}$. Decorridos 3 a 4 dias, as garrafas de células foram submetidas à tripsinização. Para isso, a monocamada celular formada foi lavada com 1 mL de ATV-solução de tripsina 0,2% e Versene 0,02% (Adolfo Lutz) e, após lavagem, esta foi desprezada e acrescentado mais 1 mL de ATV. Seguidos 1-2 minutos, as células foram homogeneizadas com volumes variados do meio HAM F-12, acrescido de 10% de soro fetal bovino (SFB). Nesta etapa, a tripsina (ATV) foi neutralizada pelo soro fetal bovino presente no meio de cultura e o volume total da suspensão

celular foi transferido para outras garrafas, de modo a se obter uma concentração celular de 10^6 células/mL.

4.11.2. Infecção por *C. neoformans* à monocamada de células A549

Os ensaios de infecção foram realizados sobre lamínulas em placas de 24 orifícios. A monocamada celular foi formada por aproximadamente 24h em meio HAM-F12 (Cultilab), em seguida, cada orifício foi inoculado com 300 μ L da suspensão padronizada na concentração de 10^6 céls/mL de *C. neoformans* cepa ATCC 90012, isolados clínicos, sensível e resistente ao fluconazol, em PBS sem tratamento e tratado com a substância pedalitina e com as drogas sintéticas fluconazol e anfotericina B, acrescida de 300 μ L de meio HAM-F12 (Cultilab). O valor das concentrações utilizadas nos tratamentos foi igual ao valor da concentração inibitória mínima obtida para cada substância. As células foram incubadas com os tratamentos por 1 hora. A seguir, as células infectadas foram incubadas a 37°C, 1 hora. As lamínulas foram coradas por Giemsa e observadas em microscópio óptico e contagens do número de fungos (aderidos e invadidos) foram realizadas em 1000 células, determinando-se a porcentagem total de infecção para a avaliação da quantidade de fungos e determinação da capacidade de infecção de cada um dos isolados da monocamada de células.

5. RESULTADOS

5.1. Avaliação da atividade antifúngica

A avaliação da atividade antifúngica de extratos, frações e substâncias das plantas foi realizada pela técnica de microdiluição segundo o documento M27-A do CLSI, visando obter os valores de concentração inibitória mínima (CIM) e também determinar a concentração fungicida mínima (CFM). Os testes foram realizados com 57 extratos brutos, 52 frações e 47 substâncias puras para *C. neoformans*.

No quadro 2 estão representados os resultados da avaliação em que 10,7% dos extratos brutos e 42,85% das substâncias puras apresentaram forte atividade antifúngica.

Quadro 2: Valores de CIM em porcentagem dos extratos, frações e substâncias puras de diferentes plantas, testadas contra *C. neoformans* pelo micrométodo de acordo com o documento do CLSI.

CIM*	0,97-1,95 %	3,9-15,6 %	31,25-62,5 %	125-250 %	Sem Atividade #
Extrato Bruto (57)	-	10,71	32,14	42,85	14,30
Fração (52)	-	-	71,42	28,58	-
Substância Pura (47)	2,85	40	37,15	20	-

CIM*-µg/mL

Sem atividade na faixa de concentração selecionada para o teste.

5.2. Seleção do extrato para contato com *C. neoformans* e análise proteômica

De acordo com os resultados obtidos, encontrou-se que extratos brutos, frações e substâncias puras de *Pterogyne nitens* apresentaram melhores resultados de CIM quando foram avaliados frente a *C. neoformans*, cepa ATCC. Os testes de sensibilidade também foram realizados com os isolados clínicos de *C. neoformans* com perfil de sensível e resistente, como mostrado

no Quadro 3. Esta espécie foi selecionada para realizar o contato com as leveduras e posterior análise diferencial da expressão protéica.

Quadro 3: Valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM) de *Pterogyne nitens*, pertencente à família Fabaceae, testados contra *C. neoformans* cepa ATCC 90012, cepa sensível e cepa resistente ao fluconazol.

Extrato CIM*	<i>C. neoformans</i> ATCC	<i>C. neoformans</i> cepa sensível	<i>C. neoformans</i> cepa resistente
Hex (bruto)	250	250	250
EtOH (bruto)	15,6	7,8	31,25
ACOEt	7,8	7,8	15,6
BuOH	15,6	7,8	31,25
HA	125	125	62,5
Pedaltina	3,9	1,95	15,6

CIM*- $\mu\text{g/mL}$

Hex: extrato bruto hexânico

EtOH: extrato bruto etanólico

ACOEt: fração acetato de etila

BuOH: fração butanólica

HA: fração hidroalcoólica

A substância que apresentou melhores resultados foi a pedaltina, a qual é uma flavona obtida da fração acetato de etila, da espécie *P. nitens*. Esta substância foi selecionada para realização das análises proteômicas e posteriormente ensaios utilizando cultura de células para verificação do índice de adesão.

5.3. Avaliação da atividade sinérgica

O teste do “tabuleiro de xadrez” foi realizado com *C. neoformans* ATCC 90012, visando à padronização do método. Os resultados estão apresentados no quadro 4. De acordo com os cálculos do índice de concentração inibitória fracionada (ICIF), verificou-se em quais concentrações das combinações pode ser observada atividade aditiva ou sinérgica. A maioria das combinações teve

efeito aditivo (35 das 44 testadas) e nove efeitos sinérgicos. Nestes se incluíam combinações entre extratos de plantas e/ou pedalitina e drogas sintéticas,

Quadro 4: Valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM) das frações de *P. nitens* sozinhas e combinadas contra *C. neoformans*, bem como a verificação da atividade dos extratos quando combinados.

Combinação	Uso simples		Uso combinado		Valores ICIF	Atividade
	1s	2s	1c	2c		
ACOEt+BuOH	62,5	62,5	15,6	15,6	0,50	Sinérgica
ACOEt+BuOH	62,5	62,5	31,2	31,2	1,00	Aditiva
ACOEt+BuOH	62,5	62,5	31,2	15,6	0,750	Aditiva
ACOEt+BuOH	62,5	62,5	31,2	7,8	0,625	Aditiva
ACOEt+BuOH	62,5	62,5	15,6	31,2	0,750	Aditiva
EtOH+HA	125	125	62,5	62,5	1,00	Aditiva
EtOH+HA	125	125	62,5	31,2	0,750	Aditiva
EtOH+HA	125	125	62,5	15,6	0,625	Aditiva
EtOH+HA	125	125	62,5	7,8	0,562	Aditiva
EtOH+HA	125	125	62,5	3,9	0,531	Aditiva
EtOH+HA	125	125	62,5	1,9	0,515	Aditiva
EtOH+HA	125	125	62,5	0,9	0,507	Aditiva
EtOH+HA	125	125	31,2	62,5	0,750	Aditiva
EtOH+HA	125	125	31,2	31,2	0,500	Sinérgica
Ped + <i>Garcinia sp</i>	3,9	62,5	1,95	31,2	1,0	Aditiva
Ped + <i>Garcinia sp</i>	3,9	62,5	1,95	15,6	0,75	Aditiva
Ped + <i>Garcinia sp</i>	3,9	62,5	1,95	7,8	0,625	Aditiva
Ped + <i>Garcinia sp</i>	3,9	62,5	1,95	3,9	0,56	Aditiva
Ped + <i>Garcinia sp</i>	3,9	62,5	1,95	1,95	0,53	Aditiva
Ped + <i>Garcinia sp</i>	3,9	62,5	0,97	31,2	0,75	Aditiva
Ped + <i>Garcinia sp</i>	3,9	62,5	0,97	15,6	0,5	Sinérgica
Ped + ACOEt <i>K. rubriflora</i>	3,9	7,8	1,95	3,9	1,0	Aditiva
Ped + ACOEt <i>K. rubriflora</i>	3,9	7,8	1,95	1,95	0,75	Aditiva

Ped + ACOEt <i>K. rubriflora</i>	3,9	7,8	1,95	0,97	0,625	Aditiva
Ped + ACOEt <i>K. rubriflora</i>	3,9	7,8	0,97	3,9	0,75	Aditiva
Ped + ACOEt <i>K. rubriflora</i>	3,9	7,8	0,97	1,95	0,5	Sinérgica
Ped + EtOH <i>K. rubriflora</i>	3,9	7,8	1,95	3,9	1,0	Aditiva
Ped + EtOH <i>K. rubriflora</i>	3,9	7,8	0,97	31,2	0,75	Aditiva
Ped + EtOH <i>K. rubriflora</i>	3,9	7,8	0,97	3,9	0,75	Aditiva
Ped + EtOH <i>K. rubriflora</i>	3,9	7,8	0,97	1,95	0,5	Sinérgica
Ped + FCZ	3,9	2,0	1,95	1,0	1,0	Aditiva
Ped + FCZ	3,9	2,0	0,97	1,0	0,75	Aditiva
Ped + FCZ	3,9	2,0	0,48	1,0	0,625	Aditiva
Ped + FCZ	3,9	2,0	0,24	1,0	0,56	Aditiva
Ped + FCZ	3,9	2,0	1,95	0,5	0,75	Aditiva
Ped + FCZ	3,9	2,0	0,97	0,5	0,5	Sinérgica
Ped + FCZ	3,9	2,0	0,48	0,5	0,375	Sinérgica
Ped + FCZ	3,9	2,0	1,95	0,25	0,625	Aditiva
Ped + AMB	3,9	0,125	1,95	0,0625	1,0	Aditiva
Ped + AMB	3,9	0,125	0,97	0,0625	0,75	Aditiva
Ped + AMB	3,9	0,125	0,48	0,0625	0,625	Aditiva
Ped + AMB	3,9	0,125	1,95	0,0312	0,75	Aditiva
Ped + AMB	3,9	0,125	0,97	0,0312	0,5	Sinérgica
Ped + AMB	3,9	0,125	0,48	0,0312	0,375	Sinérgica

1s: Composto 1 sozinho; 2s: Composto 2 sozinho; 1c: Composto 1 combinado;
2c: Composto 2 combinado.

CIM- $\mu\text{g/mL}$

5.4. Análise do perfil protéico por eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)

Os componentes totais de *C. neoformans* sem tratamento e tratado com 750µg/mL de fluconazol foram analisados por SDS-PAGE. O perfil eletroforético mostrou diferenças principalmente quanto à intensidade e número de bandas (Figuras 2 e 3). Entretanto esses dados não foram suficientes para uma clara caracterização das proteínas diferencialmente expressas, sendo então, necessária realização da eletroforese bidimensional para uma melhor caracterização.

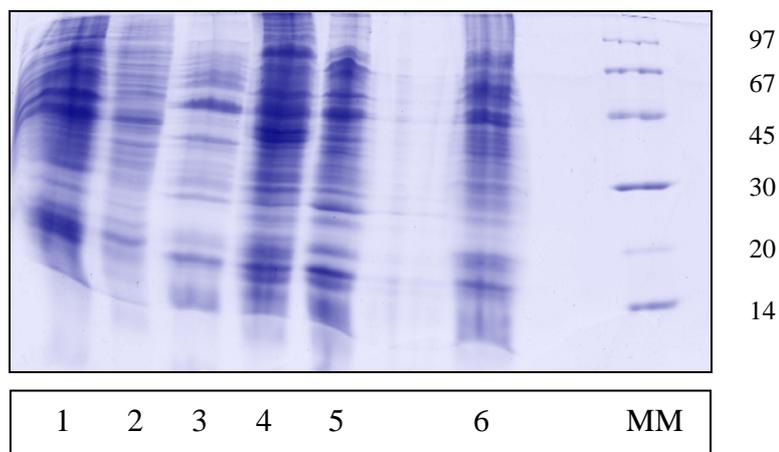


Figura 2: SDS-PAGE dos componentes protéicos de *C. neoformans* sem tratamento (C-) e tratado com 750µg/mL de fluconazol. 1. Cepa ATCC 90012, sem tratamento; 2. Cepa ATCC 90012 tratada com fluconazol; 3. Isolado clínico sensível ao fluconazol sem tratamento; 4. Isolado clínico sensível tratado com fluconazol; 5. Isolado clínico resistente tratado com fluconazol; 6. Isolado clínico resistente a fluconazol sem tratamento; MM. Massa Molecular.

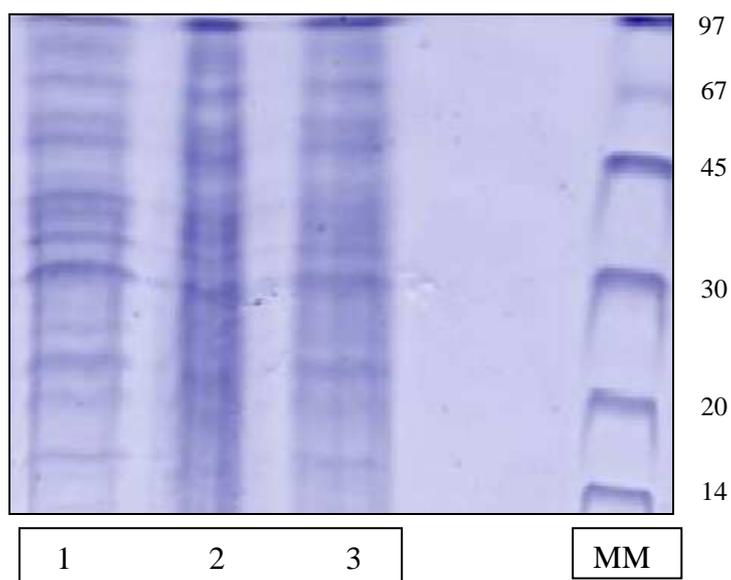


Figura 3: SDS-PAGE dos componentes protéicos de *C. neoformans* tratado com molécula pedalitina obtida de *P. nitens* na concentração de 10 vezes o valor da CIM. 1. Cepa ATCC 90012, tratada com pedalitina na concentração de 39 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 2. Isolado clínico sensível à fluconazol tratado com pedalitina na concentração de 19,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 3. Isolado clínico resistente a fluconazol tratado com pedalitina na concentração de 156 $\mu\text{g}/\text{mL}$; MM. Massa Molecular.

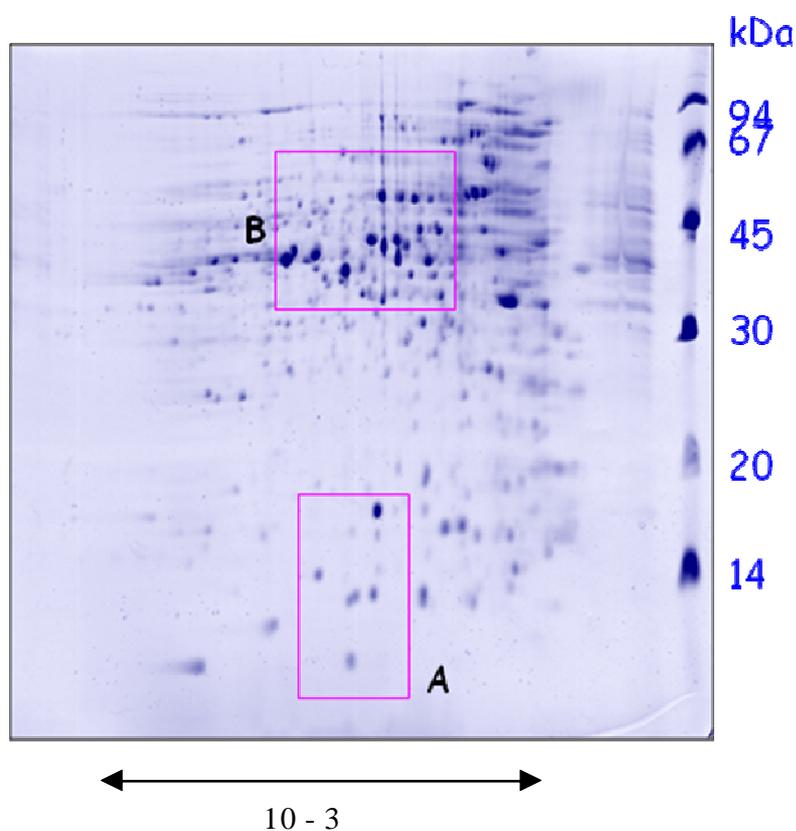
5.5. Análise protéica por eletroforese bidimensional

A eletroforese bidimensional foi realizada com os extratos totais obtidos de células de *C. neoformans* cepa ATCC sem tratamento, tratado com fluconazol (figura 4), e com a substância pura pedalitina (figura 5), obtida a partir de *P. nitens* para verificar a diferença de expressão de proteínas.

A concentração inibitória mínima (CIM) de fluconazol para *C. neoformans* foi observada variando de 0,5 a 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Neste estudo, as leveduras foram cultivadas em YEPD na concentração de 10^4 UFC/mL até atingirem a fase *log* de crescimento; então se adicionou a substância pura pedalitina na concentração de 39 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ficando em contato por 24 horas, sendo o mesmo realizado com fluconazol na concentração de 750 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Concentrações mais baixas de pedalitina também foram testadas, entretanto não foram observadas modificações relevantes nos perfis protéicos, portanto

elegeram-se uma concentração 10 vezes maior que a concentração inibitória mínima para a substância vegetal e 750 µg/mL de fluconazol. A concentração de 750 µg/mL de fluconazol foi usada, pois a partir desta concentração, segundo Bruneau et al., 2003, pode-se verificar os efeitos de alterações proteicas e identificações do possível mecanismo de ação. A análise diferencial da expressão proteica de *C. neoformans* com e sem contato com fluconazol e os extratos vegetais revelou aumento e diminuição na expressão das proteínas quando em contato. Esses dados estão descritos nos quadros 5 e 6.

C. neoformans sem tratamento



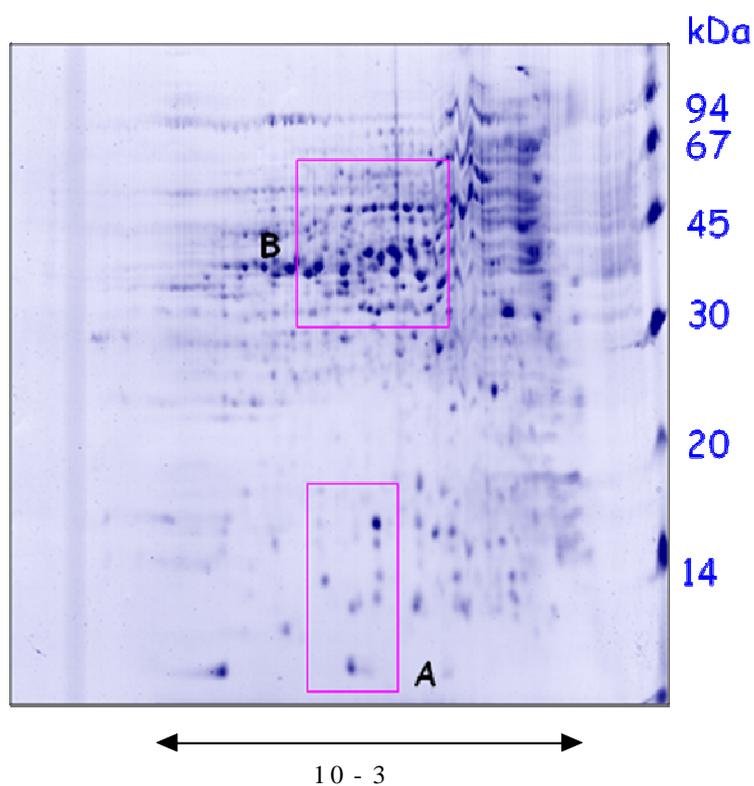
C. neoformans tratado com fluconazol

Figura 4: Eletroforese bidimensional do extrato protéico total de *C. neoformans* na faixa de pH de 3 a 10 com tratamento com fluconazol na concentração de 750 $\mu\text{g/mL}$ corados pelo azul de Coomassie.

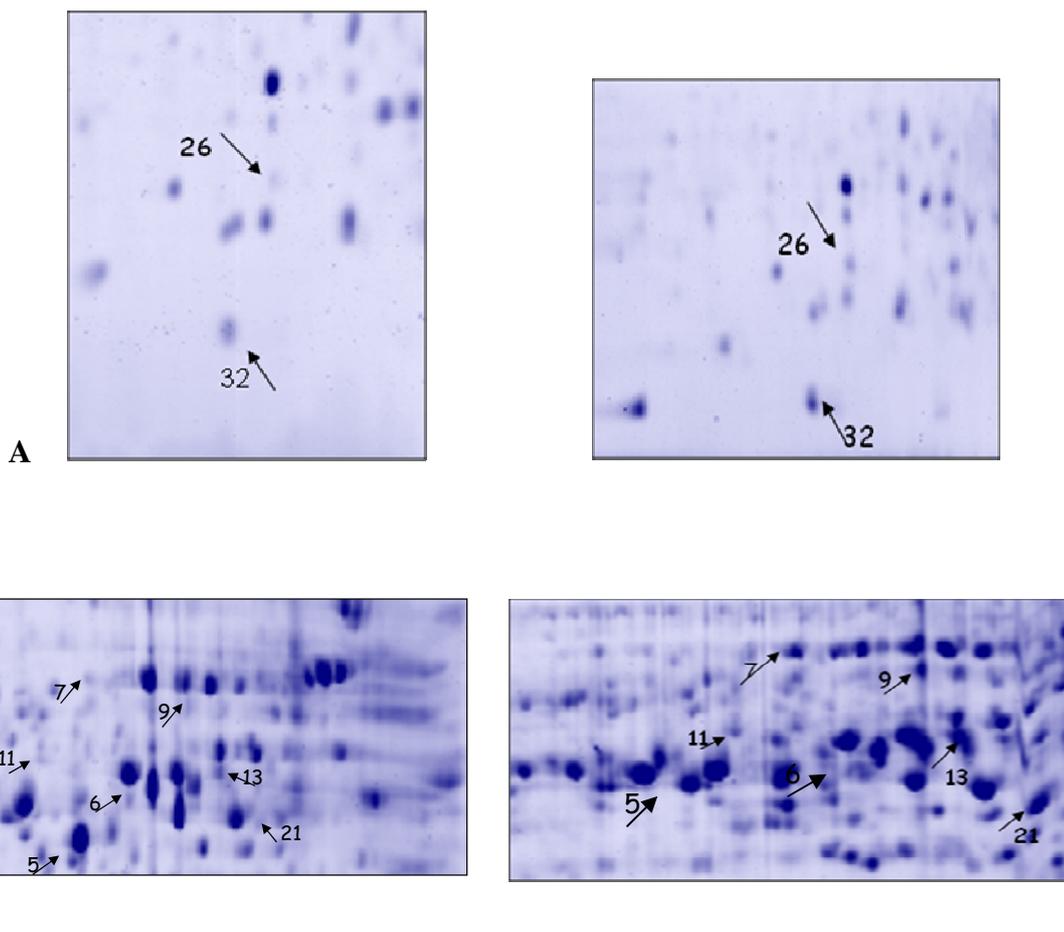


Figura 5: Eletroforese bidimensional dos componentes protéicos totais de *C. neoformans* com tratamento com fluconazol na concentração de 750µg/mL. Em A e B tem-se uma visão ampliada das proteínas alteradas.

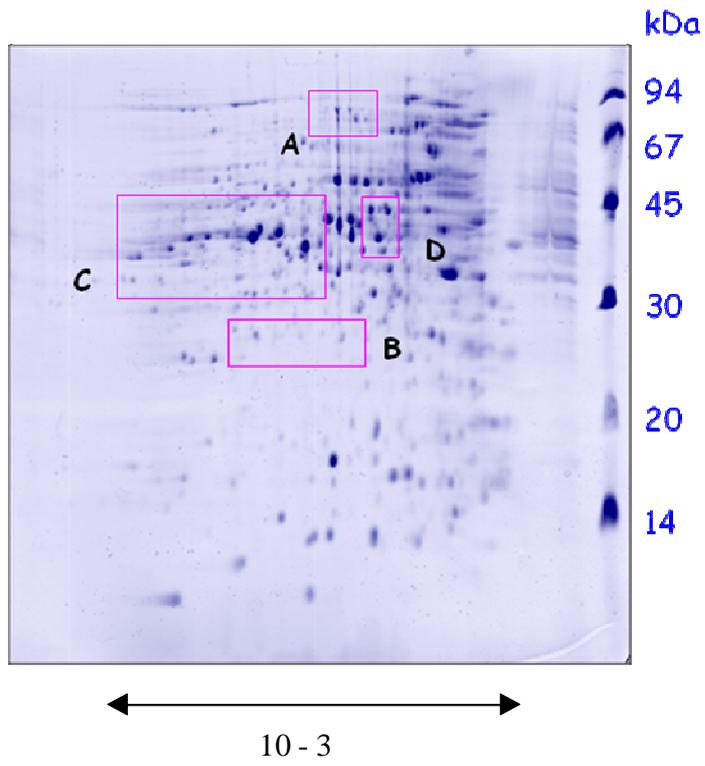
Quadro 5. Seleção de *spots* demonstrados nas figuras 4 e 5 e as alterações observadas com o tratamento com fluconazol (FCZ).

Spot	Massa Molecular	Alteração na expressão
1	56.308	Aumento de 7,32 vezes com FCZ
2	56.308	Aumento de 3,65 vezes com FCZ
3	55.035	Aumento de 2,41 vezes com FCZ
4	56.308	Aumento de 4,80 vezes com FCZ
5	51.385	Aumento de 6,54 vezes com FCZ
6	50.917	Diminuição de 2,70 vezes com FCZ

7	50.684	Aumento de 6,39 vezes com FCZ
8	49.312	Aumento de 3,64 vezes com FCZ
9	47.323	Aumento de 3,34 vezes com FCZ
10	44.724	Diminuição de 1,18 vezes com FCZ
11	42.319	Aumento de 5,35 vezes com FCZ
12	41.802	Aumento de 4,52 vezes com FCZ
13	41.291	Aumento de 5,59 vezes com FCZ
14	40.662	Aumento de 3,22 vezes com FCZ
15	39.432	Aumento de 2,42 vezes com FCZ
16	39.432	Aumento de 7,77 vezes com FCZ
17	38.357	Aumento de 1,35 vezes com FCZ
18	38.831	Aumento de 3,08 vezes com FCZ
19	37.772	Diminuição de 1,25 vezes com FCZ
20	36.742	Diminuição de 1,97 vezes com FCZ
21	36.294	Aumento de 6,58 vezes com FCZ
22	35.631	Diminuição de 2,18 vezes com FCZ
23	35.304	Aumento de 10,43 vezes com FCZ
24	33.200	Aumento de 3,48 vezes com FCZ
25	30.464	Aumento de 3,97 vezes com FCZ
26	30.434	Aumento de 1,51 vezes com FCZ
27	29.925	Aumento de 4,44 vezes com FCZ
28	29.258	Aumento de 8,23 vezes com FCZ
29	29.040	Aumento de 4,08 vezes com FCZ
30	16.855	Aumento de 2,43 vezes com FCZ
31	13.679	Aumento de 2,71

		vezes com FCZ
32	10.059	Aumento de 1,76 vezes com FCZ

C. neoformans sem tratamento



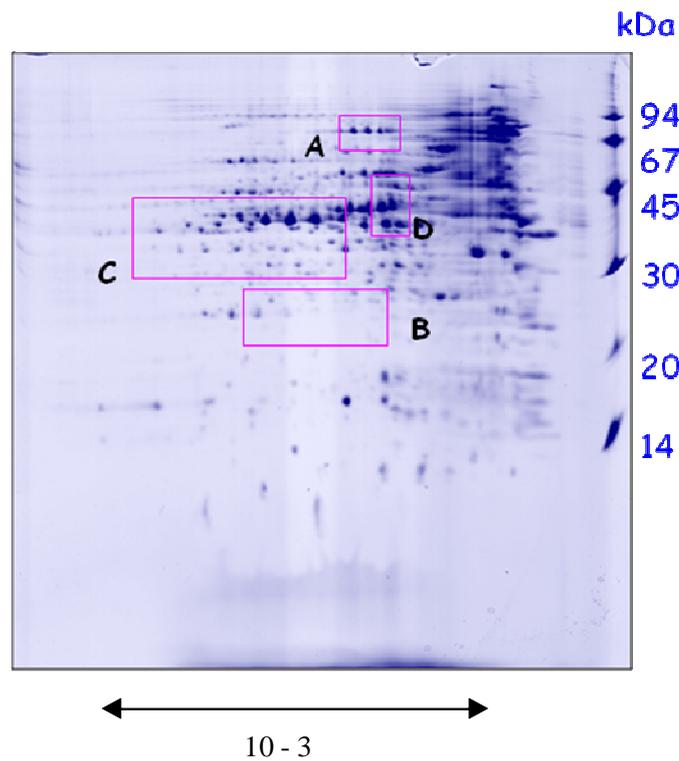
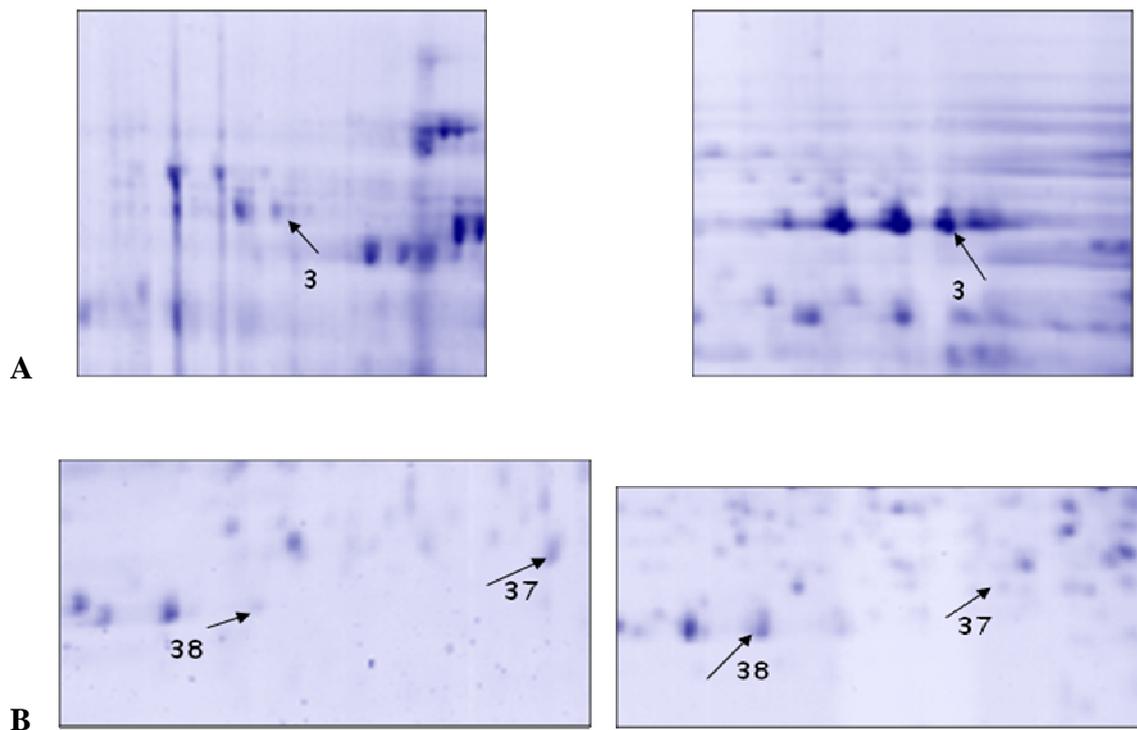
C. neoformans tratado com pedalitina

Figura 6: Eletroforese bidimensional do extrato protéico total de *C. neoformans* na faixa de pH de 3 a 10 com tratamento com a substância pedalitina com concentração 10 vezes maior que a CIM; géis corados pelo azul de Coomassie.



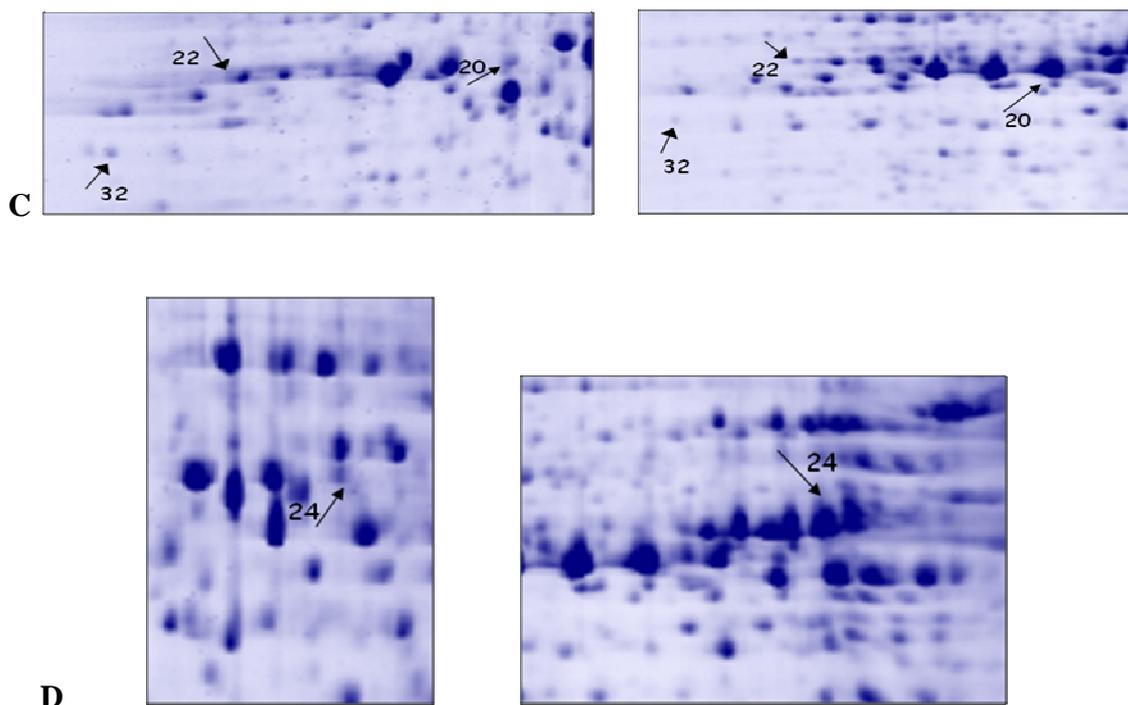


Figura 7: Eletroforese bidimensional dos componentes protéicos totais de *C. neoformans* tratado com a substância pedalitina, na concentração de 39µg/mL. Em A, B, C e D têm-se visão ampliada das proteínas alteradas.

Quadro 6. Seleção de *spots* demonstrados nas figuras 6 e 7 e as alterações observadas com o tratamento com a substância pura de *P. nitens*, pedalitina.

Spot	Massa Molecular	Alteração na expressão
1	83.967	Diminuição de 3,16 vezes com Pedalitina
2	82.921	Diminuição de 2,42 vezes com Pedalitina
3	70.006	Aumento de 6,32 vezes com Pedalitina
4	64.592	Diminuição de 2,63 vezes com Pedalitina
5	66.087	Aumento de 3,12

		vezes com Pedalítina
6	56.051	Aumento de 6,57 vezes com Pedalítina
7	55.035	Aumento de 2,95 vezes com Pedalítina
8	55.541	Aumento de 4,76 vezes com Pedalítina
9	55.035	Aumento de 4,60 vezes com Pedalítina
10	50.917	Diminuição de 2,89 vezes com Pedalítina
11	50.684	Diminuição de 2,84 vezes com Pedalítina
12	49.765	Aumento de 1,11 vezes com Pedalítina
13	50.917	Aumento de 7,71 vezes com Pedalítina
14	46.892	Diminuição de 3,91 vezes com Pedalítina
15	44.450	Diminuição de 4,34 vezes com Pedalítina
16	41.802	Aumento de 4,74 vezes com Pedalítina
17	41.546	Aumento de 3,76 vezes com Pedalítina
18	40.913	Aumento de 11,78 vezes com Pedalítina
19	40.913	Aumento de 5,34 vezes com Pedalítina
20	39.432	Aumento de 7,30 vezes com Pedalítina
21	38.831	Aumento de 4,66 vezes com Pedalítina

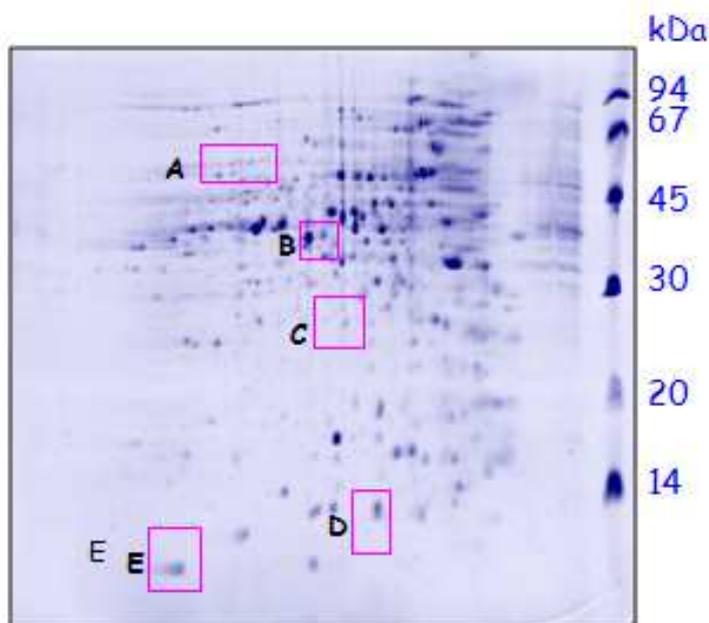
22	38.593	Diminuição de 7,18 vezes com Pedalitura
23	39.070	Aumento de 4,63 vezes com Pedalitura
24	38.005	Aumento de 11,16 vezes com Pedalitura
25	37.541	Aumento de 1,18 vezes com Pedalitura
26	37.082	Aumento de 3,61 vezes com Pedalitura
27	37.082	Diminuição de 2,97 vezes com Pedalitura
28	36.517	Aumento de 1,34 vezes com Pedalitura
29	36.294	Aumento de 3,11 vezes com Pedalitura
30	35.522	Diminuição de 1,28 vezes com Pedalitura
31	33.303	Aumento de 1,80 vezes com Pedalitura
32	32.395	Diminuição de 2,23 vezes com Pedalitura
33	30.841	Aumento de 3,06 vezes com Pedalitura
34	29.925	Aumento de 6,67 vezes com Pedalitura
35	29.258	Aumento de 3,71 vezes com Pedalitura
36	28.895	Diminuição de 1,16 vezes com Pedalitura
37	26.207	Diminuição de 3,68 vezes com Pedalitura
38	24.556	Aumento de 4,61 vezes com

		Pedalitina
39	16.953	Aumento de 2,31 vezes com Pedalitina
40	9.772	Diminuição de 3,39 vezes com Pedalitina

Na análise de proteínas totais da cepa tratada com fluconazol e com a substância pura pedalitina, foi observada alteração significativa em 32 e 40 spots, respectivamente. Em ambos os casos, após o contato com o agente antifúngico, a maioria das proteínas apresentou um aumento na expressão.

Realizou-se também uma comparação do perfil protéico da cepa ATCC 90012 com um isolado clínico resistente (figura 6). A análise diferencial das proteínas das duas cepas pode ser vista no quadro 7.

C. neoformans cepa ATCC 90012



C. neoformans cepa resistente

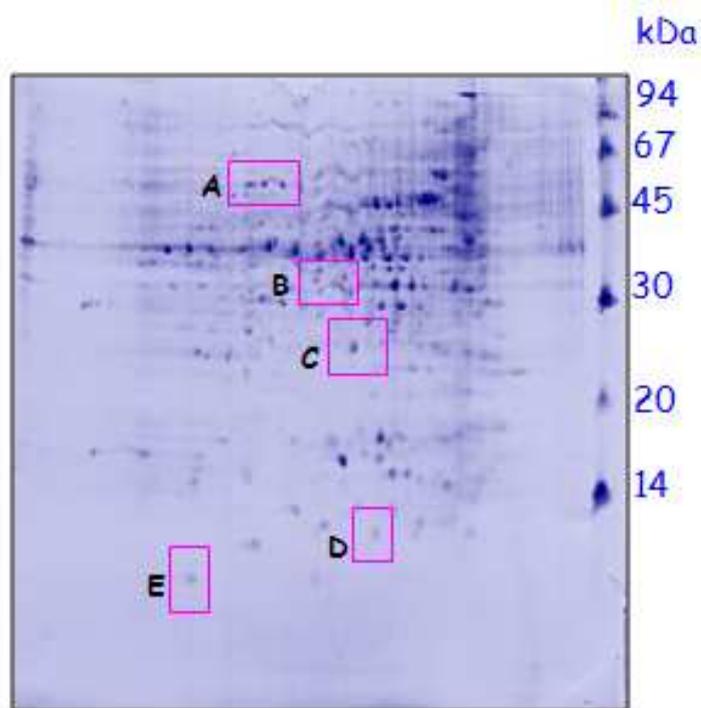
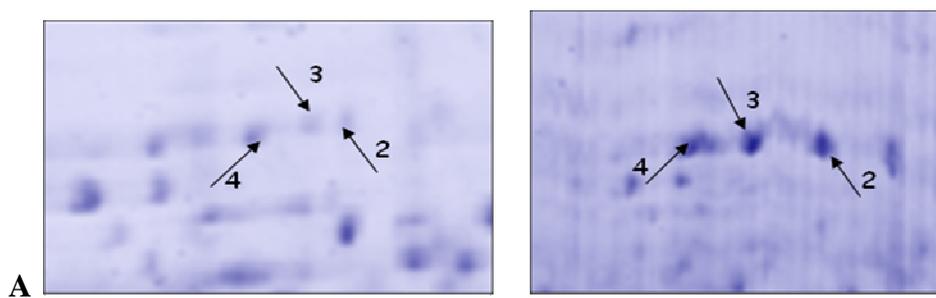


Figura 8: Eletroforese bidimensional do extrato protéico total de *C. neoformans* cepa ATCC 90012 na faixa de pH de 3 a 10, comparada com *C. neoformans* resistente a fluconazol, em géis corados pelo azul de Coomassie.



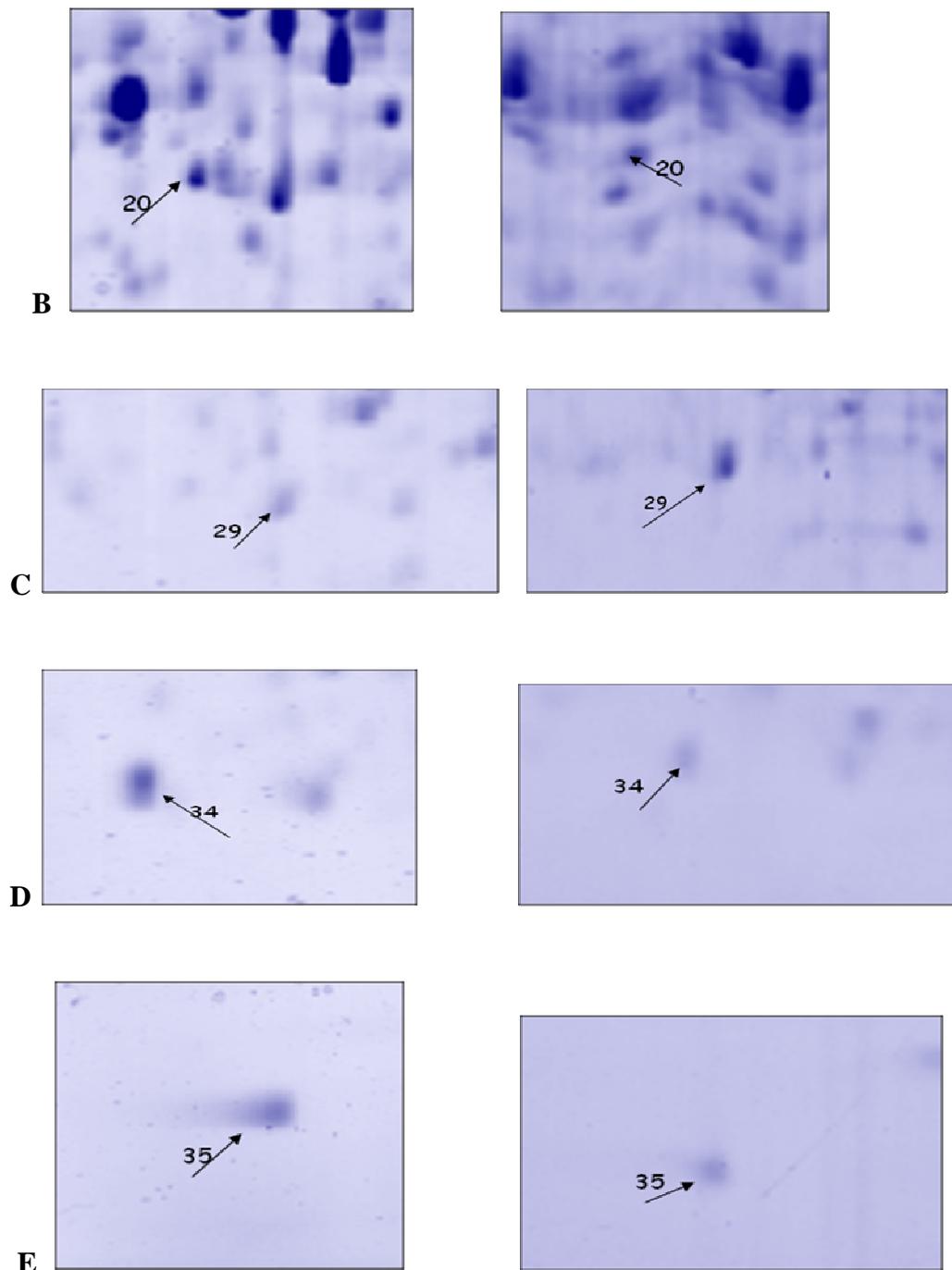


Figura 9: Eletroforese bidimensional do extrato protéico total de *C. neoformans* cepa ATCC 90012 na faixa de pH de 3 a 10, comparada com *C. neoformans* resistente a fluconazol. Em A, B, C, D e E tem-se visão ampliada das proteínas.

Quadro 7. Seleção de *spots* demonstrados nas figuras 8 e 9 e as diferenças observadas entre a cepa ATCC e o isolado clínico resistente.

Spot	Massa Molecular	Alteração na expressão
1	60.862	Aumento de 3,20 vezes
2	56.308	Aumento de 10,10 vezes
3	56.051	Aumento de 5,73 vezes
4	54.533	Aumento de 6,95 vezes
5	53.300	Aumento de 4,52 vezes
6	51.857	Aumento de 2,34 vezes
7	50.223	Aumento de 2,25 vezes
8	50.684	Aumento de 3,25 vezes
9	49.312	Aumento de 3,32 vezes
10	43.238	Aumento de 2,06 vezes
11	41.802	Aumento de 3,71 vezes
12	41.291	Aumento de 3,95 vezes
13	40.913	Diminuição de 2,01 vezes
14	40.662	Aumento de 3,00 vezes
15	39.070	Aumento de 3,46 vezes
16	39.675	Aumento de 2,08 vezes
17	38.122	Diminuição de 1,55 vezes
18	39.070	Diminuição de 1,85 vezes
19	38.005	Aumento de 10,95 vezes
20	36.742	Diminuição de 5,28 vezes
21	36.855	Diminuição de 2,39 vezes
22	33.714	Aumento de 3,35 vezes

23	32.997	Diminuição de 2,56 vezes
24	33.200	Aumento de 4,07 vezes
25	31.511	Aumento de 3,55 vezes
26	30.841	Aumento de 5,65 vezes
27	30.464	Aumento de 4,33 vezes
28	30.464	Aumento de 3,60 vezes
29	26.207	Aumento de 3,78 vezes
30	23.475	Aumento de 3,55 vezes
31	18.764	Aumento de 3,74 vezes
32	16.855	Aumento de 3,13 vezes
33	16.044	Diminuição de 1,75 vezes
34	12.686	Diminuição de 3,46 vezes
35	9.715	Diminuição de 3,71 vezes

Na análise das proteínas totais da cepa ATCC 90012 e isolado clínico resistente foram encontradas 35 proteínas diferencialmente expressas.

5.6. Testes de infecção de *C. neoformans* em cultura de células epiteliais

O ensaio de infecção de *C. neoformans* foi realizado com culturas de células epiteliais pulmonares (A549), previamente padronizado em nosso laboratório. Os isolados foram tratados por 1 hora com pedalitina, fluconazol e anfotericina B na concentração inibitória mínima para cada situação, lavados para a remoção destas e, então colocados em contato com as células epiteliais de pulmão por mais 1 hora. Decorrida esta segunda incubação, as células foram fixadas, coradas por Giemsa e, então, foram realizadas contagens do número de fungos em 1000 células, determinando-se a porcentagem total de infecção. Foram realizadas triplicatas de três experimentos independentes.

Após contagem, a cepa ATCC sem tratamento apresentou índice de adesão de 2,8%, enquanto que o isolado clínico sensível e o resistente ao fluconazol apresentaram índices de 2,6% e 3,5%, respectivamente (Figura 7). Quando se comparou a porcentagem de infecção em relação à cepa ATCC, o isolado sensível apresentou uma infecção 8% menor enquanto o isolado resistente apresentou aumento de 25%.

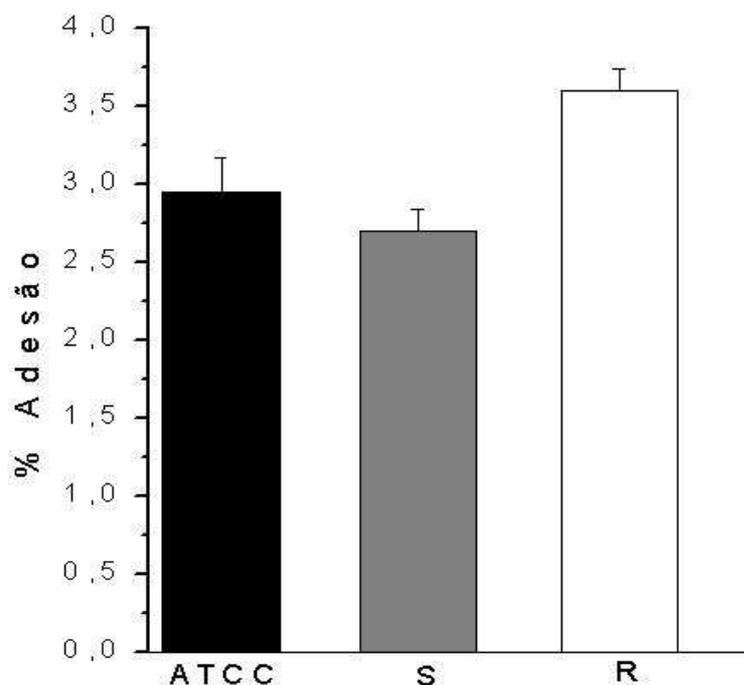


Figura 10: Comparação do padrão de capacidade de adesão de *C. neformans* cepa ATCC 90012 e dos isolados clínicos, sensível (S) e resistente (R) ao fluconazol, após 1h de incubação com células A549.

Pelos resultados obtidos, verificou-se que após os tratamentos de 1 hora com pedalitina, fluconazol e anfotericina B na concentração inibitória mínima para cada situação houve redução na capacidade de adesão do fungo às células epiteliais, de acordo com as figuras 8, 9 e 10. Com relação à cepa ATCC, verificou-se redução no índice de adesão em 46,4%, 53,6% e 60,7% para a pedalitina, fluconazol e anfotericina B, respectivamente. Para o isolado clínico sensível ao fluconazol obteve-se redução de 42,3%, 50% e 61% enquanto que para o isolado clínico resistente foi verificado uma diminuição em 37,2%, 40% e 48,6% quando tratados com pedalitina, fluconazol e anfotericina B.

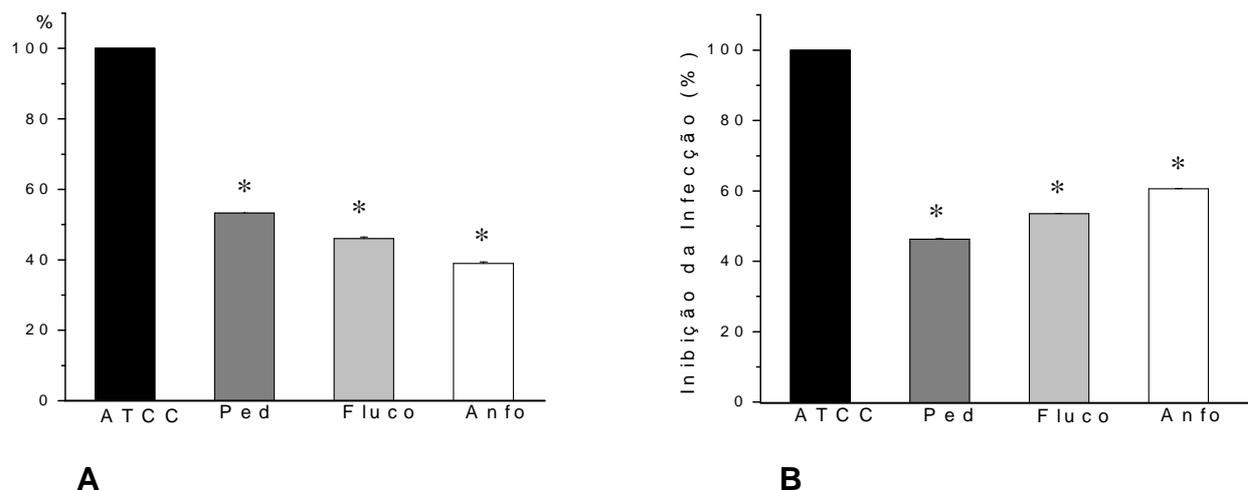


Figura 11: Porcentagem de adesão (A) e de inibição da adesão (B) da cepa ATCC 90012 de *C. neoformans* após 1 hora de tratamento com pedalitina (Ped), fluconazol (Fluco) e anfotericina B (Anfo) e 1 hora em sistema de infecção com células epiteliais A549.

* $p < 0,0001$

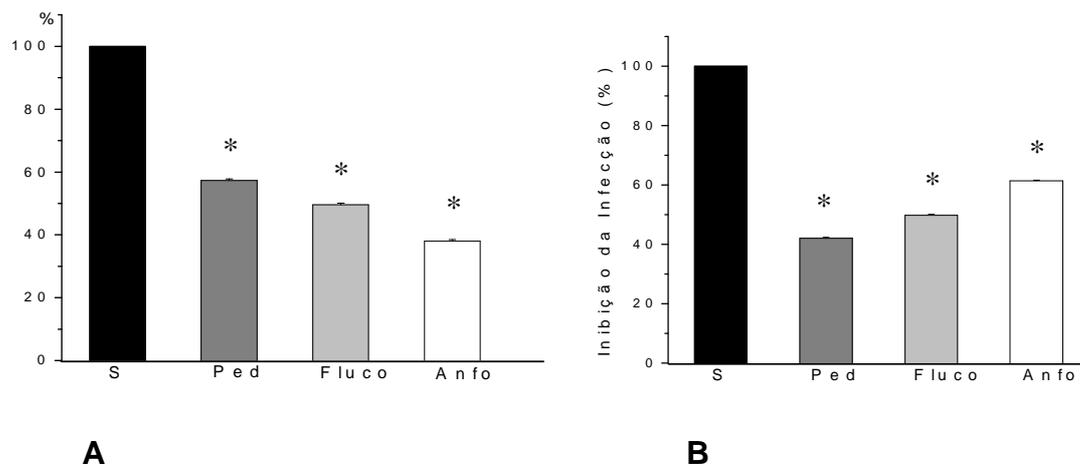


Figura 12: Porcentagem de adesão (A) e de inibição da adesão (B) do isolado clínico de *C. neoformans* sensível ao fluconazol (S) após 1 hora de tratamento com pedalitina (Ped), fluconazol (Fluco) e anfotericina B (Anfo) e 1 hora em sistema de infecção com células epiteliais A549.

* $p < 0,0001$

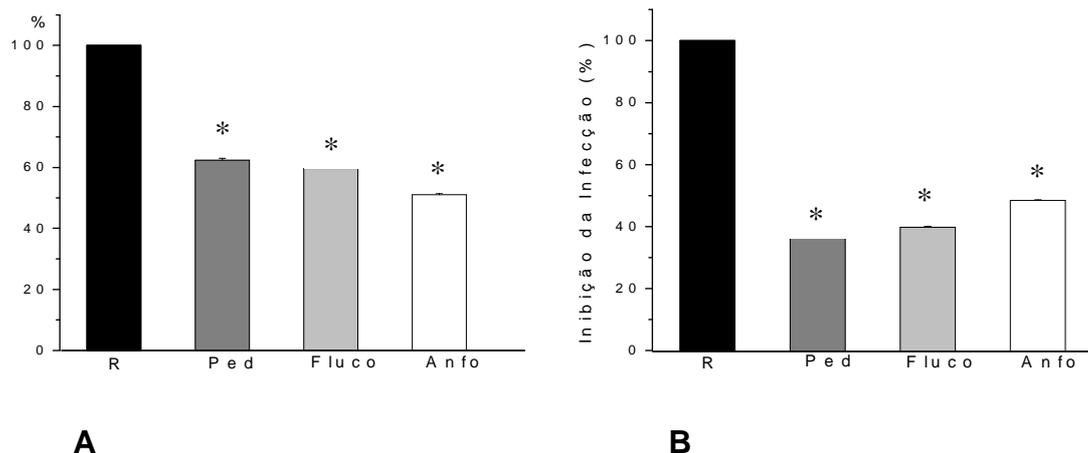


Figura 13: Porcentagem de adesão (A) e de inibição da adesão (B) do isolado clínico de *C. neoformans* resistente ao fluconazol (R) após 1 hora de tratamento com pedaltina (Ped), fluconazol (Fluco) e anfotericina B (Anfo) e 1 hora em sistema de infecção com células epiteliais A549.

* $p < 0,0001$

Quando se compara a porcentagem de adesão considerando o isolado sem tratamento como referência (100%), todos os tratamentos diminuíram a infecção significativamente ($p < 0,0001$). Já com a comparação entre os tratamentos, demonstrou que a pedaltina foi tão eficiente quanto fluconazol e anfotericina B para todos os isolados testados, porém para o isolado resistente, o tratamento com pedaltina não demonstrou diferença estatística em relação ao tratamento com fluconazol provavelmente devido às características próprias deste isolado.

6. DISCUSSÃO

Neste trabalho foram estudados extratos e substâncias puras de plantas de diferentes famílias e foi verificado pela primeira vez que *P.nitens* e a substância pedalitina foram as que apresentaram melhores CIMs contra *C.neoformans*. Associação entre estas e drogas sintéticas podem ser alternativas eficientes conforme nossos resultados em ensaios de tabuleiro e efeito sobre a adesão a pneumócitos. Análise preliminar indicou também alteração de perfil protéico da célula fungica quando em contato com padalitina e fluconazol.

Na última década, a incidência das infecções fúngicas tem aumentado consideravelmente. As terapias antifúngicas disponíveis estão limitadas a um pequeno número de substâncias. A infecção causada por *C. neoformans* é cada vez mais diagnosticada, sendo comumente observada na prática clínica.

A toxicidade é um problema nos tratamentos à base de anfotericina B (GALLIS et al, 1990; SANGLARD, 2003; CARILLO-MUÑOZ et al, 2006; CHAPMAN; SULLIVAN; CLEARY, 2008); a resistência está emergindo como um problema com relação aos azóis (SANGLARD, 2003, CASALINUOVO et al, 2004; MARTINS & REX, 1996; CHAPMAN; SULLIVAN; CLEARY, 2008; ESPINEL-INGROFF, 2008), e a má absorção oral limita o uso das candinas (MORRISON, 2006). Tem-se observado aumento nos casos de resistência aos medicamentos por vários fungos patogênicos humanos principalmente entre as leveduras e *C. neoformans* nos últimos anos, devido às terapias de manutenção entre os indivíduos portadores do HIV (HOF, 2008; ALMEIDA et al, 2007; PAPPALARDO, 2008) verificando-se então a urgência de novos agentes antifúngicos, sendo as plantas uma das alternativas para o desenvolvimento dos mesmos. A crise econômica, o elevado custo dos medicamentos industrializados, o acesso público ineficiente aos cuidados médicos e farmacêuticos, além dos efeitos colaterais causados pelas drogas sintéticas são alguns dos aspectos que contribuem para o uso das plantas medicinais no cuidado a saúde (HOLETZ et al., 2002; ROJAS et al., 2006; ABAD et al., 2007). As novas gerações de drogas antifúngicas como as equinocandinas e os últimos azóis (voriconazol) são de custo alto e ainda inacessíveis no Brasil (SLOAN et al, 2008).

Há poucos exemplos da descoberta de substâncias bioativas da biodiversidade brasileira que têm servido como protótipo para desenvolvimento de agentes fitoterápicos e produtos farmacêuticos no Brasil. Nos últimos anos, a interação entre universidades e empresas privadas, bem como a legislação sobre patentes brasileiras foi insuficiente para a transformação de resultados das investigações no sentido de desenvolver produtos e patentes (E SILVA et al, 2009; GIORGETTI et al, 2007).

Os medicamentos fitoterápicos constituem uma fonte potencialmente importante de medicamentos novos e seguros para o tratamento de infecções microbianas e outras doenças (MOSHI et al, 2009). Os produtos naturais ou substâncias derivadas com propriedades antifúngicas poderão ser utilizados na criptococose.

Vários métodos podem ser utilizados para verificar a atividade antifúngica de substâncias obtidas de plantas, porém eles não são igualmente sensíveis e cada grupo de pesquisa emprega diferentes tipos de testes. Técnicas de diluição seriada foram recomendadas para determinação da atividade antifúngica de produtos naturais (SCORZONI et al, 2007a; SCORZONI et al, 2007b, HADACEK & GREGER, 2000; PAULI & KUBECZKA, 1996). Alguns exemplos são os óleos essenciais vegetais, que foram exaustivamente testados por suas propriedades antimicrobianas (MONDELLO et al, 2003). Tamokou et al (2009) utilizaram extratos e frações obtidos das cascas do caule de *Vismia rubescens* contra quatro espécies de leveduras (*Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* and *Cryptococcus neoformans*). Para *C. neoformans* bons resultados foram observados, sendo que o extrato bruto apresentou CIM de 500µg/mL e após a obtenção das frações obteve-se CIM entre 3,12 e 12,5µg/mL. Por outro lado, Peng et al., 2010, verificaram potente atividade antineuroinflamatória de manzaminas e esta pode proporcionar grandes benefícios para a prevenção e tratamento de infecções cerebrais como as causadas por *Cryptococcus*. Além disso, foi mostrado que esta permeia a barreira hemato-encefálica (BBB) em um modelo *in vitro*, utilizando uma monocamada MDR-MDCK células.

Na busca de novas fontes de substâncias antifúngicas, assim como o entendimento de seu mecanismo de ação, nosso grupo tem estudado atividade antifúngica de espécies de plantas originárias do Cerrado e Mata Atlântica do

Brasil. Dentre os extratos, frações, e substâncias estudadas, 85,7%, 100% e 100% dos extratos brutos, frações e substâncias puras, respectivamente apresentaram atividade contra *C. neoformans*. Entre as espécies que apresentaram os melhores resultados de concentração inibitória mínima, destaca-se a planta *Pterogyne nitens*, pertencente à família Fabaceae, a qual apresentou bons valores de CIM. Desta forma, a substância pedalitina, isolada de *P. nitens*, foi selecionada neste estudo por apresentar acentuada atividade antifúngica.

A família Fabaceae é uma das maiores famílias botânicas e é também conhecida como Leguminosae (leguminosas), de ampla distribuição geográfica. É tradicionalmente dividida em três subfamílias: Caesalinoideae, Faboideae e Mimosoideae, compreendendo cerca de 650 gêneros e 1800 espécies (OLIVEIRA, 1999). *Pterogyne nitens*, conhecida popularmente como “tipa”, “viraró”, “Cocal”, “amendoizeiro”, “amendoim-bravo” de acordo com a região onde cresce. É o único membro do gênero *Pterogyne*, e distribuída principalmente no Brasil, Bolívia, Paraguai e Argentina. Sua madeira é amplamente utilizada na construção civil e, são mínimos os relatos sobre utilizações medicinais para esta espécie (BURKART, 1952; LORENZI, 1998). De acordo com a literatura, desta planta foram isolados alcalóides guanidínicos e flavonas. Os flavonóides apresentaram potente inibição para a enzima mieloperoxidase (MPO), presente em neutrófilos humanos, que desempenha papel na infecção e inflamação, convertendo peróxido de hidrogênio e cloreto em ácido hipocloroso e água. A atividade excessiva da MPO e a produção principalmente de ácido hipocloroso implicam em muitos processos inflamatórios (HEINECKE et al, 1993; WINTERBOURN et al, 2000; FERNANDES et al, 2008; REGASINI et al, 2008c).

Dentre as frações desta planta, destacou-se a substância pedalitina, obtida através da fração acetato de etila da espécie *P. nitens*, a qual apresentou acentuada atividade antifúngica com valor de concentração inibitória mínima igual a 3,9µg/mL apresentando ação fungicida nesta concentração para a cepa de *C. neoformans* ATCC 90012. Assim, esta substância também foi testada para dois isolados clínicos, um sensível e outro resistente ao fluconazol, obtendo-se CIM igual a 1,95 e 15,6µg/mL, respectivamente, ambas as concentrações fungicidas. Desta forma, nosso

interesse voltou-se para esta molécula pelo fato de não termos encontrado nenhum relato na literatura sobre a atividade antifúngica desta substância e apenas um relato sobre esta espécie de planta (BOLZANI et al., 1999). Adicionalmente a pedalitina não foi citotóxica para células de pulmão A549 em concentração $\leq 31,2\mu\text{g/mL}$ aproximadamente 10x o valor da CIM.

Samoylenko et al (2009) estudaram frações da planta *Prosopis glandulosa* var. *glandulosa* e um dos compostos isolados (1) apresentou potente atividade antifúngica contra *C. neoformans* e *Aspergillus fumigattus*, com valores de 0,4 e 3,0 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Atividade fungicida contra *C. neoformans* foi verificada em quatro compostos isolados. O composto 1 mostrou também potente atividade *in vivo* em murinos que apresentavam criptococose, na concentração de 0,0625mg/kg/dia durante 5 dias, reduzindo a infecção por *C. neoformans* no cérebro em 76%, mostrando atividade semelhante quando comparado a anfotericina B, a qual reduz a infecção em 83% com uma dose de 1,5mg/kg/dia.

Sinergismo é ação combinada de dois ou mais constituintes e é maior que o efeito de cada constituinte quando avaliado isoladamente. Estudos a respeito de combinação de substâncias de fontes vegetais já são aplicados para desenvolvimento de fitocomplexos e na potencialização de medicamentos alopáticos para uso em diversas terapias. Sinergismo entre constituintes de uma mesma droga a partir da planta *Hypericum perforatum* foi estudado para terapia antidepressiva (DI CARLO et al, 2001; BUTTERWECK et al, 2003). Em relação aos efeitos sinérgicos avaliados para atividade antimicrobiana, relatos da literatura indicam que piperina, substância isolada da planta *Piper nigrum* (pimenta negra) aumenta a biodisponibilidade de rifampicina e teofilina (ERNST, 2000). Trabalhos que verificam a atividade sinérgica entre compostos ou substâncias puras, associadas ou não a drogas sintéticas alopáticas ainda são incipientes na terapia contra fungos patogênicos humanos. Han & Lee (2005) estudaram a combinação de anfotericina B e berberina, alcalóide comum em algumas espécies de plantas, contra *C. albicans* e os testes de sensibilidade foram realizados evidenciando o efeito sinérgico da combinação. Ainda neste estudo, ensaios *in vivo* foram realizados em camundongos que apresentavam candidíase disseminada e o tratamento com berberina e anfotericina B combinadas permitiu que os camundongos sobrevivessem 22

dias a mais do que quando tratados apenas com anfotericina B. Adicionalmente os dados obtidos mostraram que a combinação das duas substâncias reduziu em 75% a dose de anfotericina B. Em 2007, Han realizou um estudo semelhante, combinando anfotericina B com extrato de semente de uva, obtendo os mesmos resultados do estudo anterior. Resultados idênticos foram notados em nosso estudo com as combinações de pedalitina e anfotericina B, onde ocorreu a redução de exatamente 75% na concentração de anfotericina B, indicando que pedalitina supostamente auxilia os efeitos da droga no fungo e mimetiza, portanto a concentração de anfotericina B. Em outro estudo, van Vuurena & Viljoen (2008), verificaram a atividade antimicrobiana de extratos de cascas, raízes e folhas de *Croton gratissimus* isoladamente e em combinação. Os testes foram realizados com várias espécies de bactérias e com as leveduras *C. albicans* e *C. neoformans* e os melhores resultados obtidos foram para *C. neoformans* com a combinação de extratos de raiz e folhas.

A avaliação das combinações antifúngicas é realizada através de estudos *in vitro*, em modelos animais ou, ainda, em estudos clínicos. Estudos experimentais em animais usando AMB em associação com FCZ apresenta, na maioria das vezes, efeitos aditivos ou sinérgicos (SUGAR et al., 1995), com poucas exceções (SCHAFFNER & BOHLER, 1993).

Em nosso estudo, para realização da metodologia do “tabuleiro de xadrez”, foram utilizadas as combinações das frações ACOEt com BuOH e EtOH com HA da planta *Pterogyne nitens*; pedalitina em combinação com: a fração ACOEt de *Kielmyera rubriflora*; a fração EtOH de *Kielmyera rubriflora*; o extrato bruto de *Garcinia sp*; e com as drogas sintéticas fluconazol e anfotericina B.

Observou-se efeito sinérgico com a combinação das frações ACOEt e BuOH de *P. nitens* nas concentração de 15,6µg/mL de cada e também com as frações EtOH e HA da mesma planta, na concentração de 31,2µg/mL de cada. Pedalitina é o constituinte prevalente na fração ACOEt e portanto quando combinada com a fração BuOH que se constitui majoritariamente pelos alcalóides piteroginina e piteroginidina, apresentou efeito sinérgico. Estas substâncias em baixas concentrações não são citotóxicas para células tumorais e possuem atividade anticarcinogênica (DUARTE et al, 2010 in press).

A pedalitina na concentração de 0,97µg/mL quando combinada com 1,95µg/mL da fração ACOEt e 1,95µg/mL da fração EtOH de *K. rubriflora* apresentou atividade sinérgica. Estas frações são constituídas de xantonas que também apresentam atividade antifúngica (MONTEIRO et al, 1996). Quando a pedalitina foi associada com o extrato bruto de *Garcinia sp* as concentrações em que foi verificado sinergismo foi 0,97µg/mL e 15,6 µg/mL, respectivamente. As substâncias prevalentes nestes extratos são novamente as xantonas (PEDRAZA-CHAVERRI et al., 2008) e em estudo realizado verificou-se que estas apresentam atividade antifúngica, incluindo contra *C. neoformans* (PINTO et al., 2005).

De acordo com nossos resultados, pode-se verificar que a pedalitina mostrou atividade sinérgica quando combinada tanto com extratos brutos e frações de origem vegetal quanto com as drogas sintéticas utilizadas no tratamento da criptococose. A substância pura de *P. nitens* também foi combinada com fluconazol e anfotericina B, obtendo-se atividade sinérgica nas seguintes concentrações: 0,97µg/mL de pedalitina com 0,5µg/mL de fluconazol; 0,48µg/mL de pedalitina com 0,5 µg/mL de fluconazol; 0,0312µg/mL de anfotericina com 0,97µg/mL e 0,48µg/mL de pedalitina. Os dados indicaram que a pedalitina inibe o crescimento de *C. neoformans* e esta, ao ser combinada com fluconazol e anfotericina B proporcionou uma atividade notavelmente melhorada contra a levedura. De acordo com cálculos matemáticos, a concentração de anfotericina B foi reduzida em 75% o que também foi verificado com fluconazol, quando em combinação com a pedalitina. Assim, sugere-se que esta molécula é uma substância promissora como agente fitoterápico para o tratamento de infecção por *C. neoformans*, evidenciando o efeito sinérgico com substâncias de origem sintética e/ou natural.

Existem vários mecanismos propostos de sinergismo relacionados aos antifúngicos. (1) A inibição de diferentes estágios da mesma via bioquímica representa um tipo de interação. Um exemplo é a combinação da terbinafina e azóis (BARCHIESI et al, 1998; BARCHIESI et al, 1997; CARILLO-MUNOZ & TUR-TUR, 1997; PEREA et al, 2002), em que ambas as substâncias inibem a biossíntese do ergosterol prejudicando assim a função das membranas celulares dos fungos. (2) O aumento da penetração de um agente antifúngico

como resultado da atividade de outro agente antifúngico na parede celular ou membrana celular. Essa interação tem sido proposta para combinações de anfotericina B ou fluconazol com agentes antibacterianos, tais como a rifampicina (BEGGS et al, 1976; MEDOFF, 1983; MEDOFF et al, 1972) e quinolonas (SUGAR & LIU, 2000; SUGAR et al, 1997) e permite que estes agentes atravessem facilmente a membrana da célula fúngica para alcançar seu alvo na síntese de DNA do fungo. Esse mecanismo pode explicar também o potencial sinergismo entre os azóis (ALLEENDOERFER et al, 1991; BARCHIESI et al, 1999; BARCHIESI et al, 2001; LARSEN et al, 1996; MAYANJA-KIZZA et al, 1998; NGUYEN et al, 1995; YAMAMOTO et al, 1997) ou anfotericina B (MEDOFF et al, 197; POLAK, 1978) e flucitosina, caso em que os danos pelos azólicos ou poliênicos à membrana da célula fúngica, permite aumento da captação de flucitosina. (3) A interação nos transportes na membrana é proposta para a combinação de anfotericina B e flucitosina (BEGGS, 1986; BEGGS et al, 1981; BEGGS & SAROSI, 1982), na qual anfotericina B age sobre a membrana celular de fungos inibindo o efluxo de flucitosina através da membrana celular. Neste esquema, flucitosina exerce os seus efeitos letais em qualquer fungo impedindo a degradação da membrana pela anfotericina B através de deterioração oxidativa, permitindo que flucitosina permaneça no sítio de ação dentro da célula. (4) Inibição simultânea de diferentes alvos da célula fúngica, como parede e membrana celular, também é possível. Esse mecanismo tem sido sugerido para as interações aparentemente sinérgicas entre equinocandinas (parede celular) e anfotericina B (ARIKAN et al, 2002; BARTIZAL et al, 1997; FRANZOT & CASADEVALL, 1997). (5) Potente atividade de um agente fungicida, como a anfotericina B, reduzir a carga de fungos, o que permite então que outro agente, posteriormente, trabalhe bem com um número reduzido de células fúngicas (LEWIS et al, 1998), é outro mecanismo possível (JOHNSON, 2004). Mecanismos semelhantes aos citados podem estar ocorrendo nas combinações que foram realizadas neste estudo. Assim abordagens genômicas e proteômicas são necessárias para evidenciar os mecanismos de ação de substâncias com atividade antifúngica.

Nas últimas décadas, os códigos genéticos de diversos organismos têm sido seqüenciados, representando um grande avanço no conhecimento da área

genômica. Atualmente, tem-se dado grande ênfase a genômica funcional, que visa à identificação da seqüência e função dos genes e proteínas através de estudos do transcriptoma e proteoma dos organismos. A proteômica possui muitas aplicações, como no estudo da expressão diferencial de proteínas, modificações pós-traducionais, interações proteína-proteína, estudos estrutural e de função das proteínas (DIAS et al, 2007).

Mesmo com a sua importância em análises filogenéticas, seqüências gênicas e tecnologia de DNA recombinante, o genoma completo do organismo gera somente uma visão relativamente estática do potencial funcional de um organismo, sendo limitado quando é necessário o conhecimento das proteínas realmente expressas em uma condição fisiológica específica ou identificação das modificações pós-traducionais (DUTT & LEE, 2000; LOTTSPREICH, 1999). A população de RNAm, da mesma forma que o genoma, tem limitações em proporcionar tais informações (LOTTSPREICH, 1999). Dessa forma, a análise do proteoma torna-se importante em estudos de comparações de expressão gênica em diferentes estados fisiológicos de um organismo.

O estudo do proteoma é importante porque pode levar a três vertentes básicas com implicações diretas em vários campos da biologia e da biotecnologia. Primeiro, a caracterização proteômica pode mostrar caminhos metabólicos nas diversas etapas celulares, gerando um conhecimento sem precedentes na biologia celular. Este conhecimento tornará possível identificar novos alvos farmacológicos específicos, relacionados, por exemplo, a determinada etapa de desenvolvimento de uma célula cancerosa. Segundo, viabiliza a identificação de novas moléculas bioativas em extratos biológicos naturais, levando ao desenvolvimento de novos medicamentos. Terceiro, permite a identificação e caracterização de marcadores biológicos, ou seja, moléculas endógenas ou exógenas específicas de um determinado estado patológico. A capacidade de identificar essas moléculas é extremamente útil no diagnóstico precoce de doenças e no acompanhamento da evolução do tratamento (EMBRAPA, 2005).

Alguns autores apresentam diferentes maneiras de generalizar as abordagens proteômicas. Entretanto, de uma forma prática pode-se dizer que com relação ao tipo de estudo, os experimentos proteômicos podem ter abordagem global ou direcionada (específica). A abordagem global do

proteoma inclui uma comparação quantitativa de proteínas em amostras distintas (perfil protéico); a análise de interação proteína-proteína e os estudos de composição em proteínas, definido pela detecção de todas as proteínas na amostra (proteoma preditivo) onde o interesse quantitativo é menor. Cada um pode ter um enfoque mais objetivo. O ideal é o estudo do proteoma global o qual é capaz de examinar todas as proteínas na célula ou tecido, assim como fazer a comparação dos níveis de proteínas celulares na presença e na ausência de um agente externo (físico, químico ou biológico). Estes estudos têm potencial para descobrir novas proteínas e vias celulares associadas aos parâmetros experimentais investigados (SMOLKA & AEBERSOLD, 2002; MANN, 2006).

A análise proteômica também tem auxiliado no entendimento dos fenômenos de resistência às drogas antifúngicas. Com o objetivo de detectar alterações protéicas durante o desenvolvimento da resistência, a análise proteômica de cepas sensíveis e resistentes de *C. albicans* ao fluconazol, revelou que proteínas envolvidas na síntese do ergosterol estavam alteradas (HOOSHDARAN et al., 2004).

A eletroforese bidimensional junto com a espectrometria de massas e modernos “softwares” tem possibilitado o estudo e detecção de diferentes modificações, com grande precisão e rapidez. (KUSTER & MANN, 1997). A espectrometria de massa permite a identificação de proteínas em pequenas concentrações por seqüenciamento ou por características como modificações pós-traducionais, massa molecular e impressão digital de massas (MO & KARGER, 2002).

Desta forma, neste estudo, procurou-se verificar quais proteínas estariam envolvidas na resposta destas leveduras à substância pedaltina e a droga comercial fluconazol, a qual foi utilizada como controle. Existe uma crescente necessidade de se obter drogas efetivas contra novos alvos, sendo as proteínas potenciais alvos na descoberta de novas drogas. Assim, identificar um alvo protéico essencial à célula é um desafio importante e as tecnologias proteômicas são fundamentais nesse campo (SCORZONI, 2008). Apesar da complexidade das estruturas e funções das proteínas, as indústrias farmacêuticas e de biotecnologia tem investido enorme quantidade de recursos para decifrar e utilizar os dados proteômicos no desenvolvimento de drogas

mais eficazes e bem sucedidas (WALGREN et al., 2004; KOPEC et al., 2005; GOMASE et al., 2008).

A análise das proteínas, obtidas pelo software Image Master 2D Platinum resultou na detecção de mais de 300 *spots* com massa molecular (MM) entre 9 e 84 kDa, e pontos isoelétricos compreendendo a faixa 3 a 10. Após o contato de *C. neoformans* com fluconazol, foram reveladas modificações significativas na expressão de 32 proteínas, a maioria com aumento, estando de acordo com estudos anteriores em outro microrganismo (GAUTAM et al, 2008; SCORZONI, 2008). Por outro lado, o tratamento com a substância pedalitina da planta *P. nitens* influenciou na expressão de 40 proteínas, também com a maioria destas potencializando a expressão. Tanto no tratamento com fluconazol quanto com a molécula pedalitina, a maioria das proteínas apresentou um aumento na expressão. Este fato pode ser ocasionado devido ao estresse provocado pelo contato com a droga, onde o microrganismo aumenta a expressão de algumas proteínas, como um provável mecanismo de defesa. Desta forma, pode-se sugerir a hipótese de que o aumento da expressão destas proteínas possa contribuir para uma maior proteção celular e capacidade de reparação dos danos causados pelo agente antifúngico. Com relação às proteínas que diminuíram diretamente sua expressão, pode-se sugerir uma interferência pontual ocasionada pelo agente antifúngico. Estas provavelmente se constituem de alvos importantes, sendo necessário o seqüenciamento dos *spots* em prioridade. Estudos posteriores a respeito da identificação e funcionalidade destas proteínas seriam extremamente importantes para se verificar se estas são essenciais ao fungo, constituindo-se, portanto de excelentes alvos.

Também foi comparado o perfil de proteínas da cepa ATCC e do isolado clínico resistente, revelando modificações na expressão de 35 proteínas com a maioria aumentando a expressão. Na cepa resistente, pode-se verificar um aumento de até 10,95 vezes na expressão de proteínas, sugerindo que além dos mecanismos de resistência previamente descritos, pode-se considerar que esta cepa evoluiu para o aumento da expressão de proteínas que possivelmente está relacionado com a resistência do microrganismo e/ou sua patogenicidade (MARICHAL et al, 1997; LOPES-RIBOT et al, 1998). Marichal et al (1997), analisaram o perfil protéico de isolados de *C. glabrata* sensíveis e resistente

aos azólicos observando significativas diferenças na expressão dos dois isolados. Maiores informações poderão ser obtidas após o seqüenciamento e identificação destas proteínas, expressas após o contato com a substância vegetal. A análise proteômica de componentes de superfície de *A. fumigatus* identificou vinte seis proteínas, entre elas, a principal proteína presente nos conídios, possivelmente os principais causadores do processo alérgico, sendo assim, essas proteínas seriam grandes candidatas a produção de vacinas (ASIF et. al., 2006). Modificações no proteoma de *C. albicans* foram observadas quando esta levedura foi tratada com droga inibidora da -(1,3)-glucana sintetase, semelhante às equinocandinas e também com dois triazóis mostrando que por meio de estudos proteômicos é possível distinguir diferentes mecanismos de ação de antifúngicos (BRUNEAU et al., 2003). Outros proteomas além do fúngico foram estudados, Caldelari e colaboradores (2000) com o objetivo de entender os mecanismos de resistência de *Streptococcus gordonii* à penicilina analisaram seu proteoma por eletroforese bidimensional e verificaram que o microrganismo resistente apresentou duas proteínas com intensidade aumentada, as quais mostraram relação com resistência à penicilina. O protozoário *Trichomonas vaginalis*, transmitido por via sexual e que infecta a área urogenital humana causando a tricomoníase, teve seu primeiro mapa de referência proteômico descrito (DE JESUS et al., 2007). As pesquisas são facilitadas nesses organismos, em razão de seu proteoma ser relativamente pequeno, além disso, muitos já foram descritos, baseando-se em estudos avançados de seqüências genômicas. Como resultado do seqüenciamento gênico e análise proteômica muitos genes e proteínas estão sendo descritos e disponibilizados para serem estudados como novos alvos para drogas (FERNANDES, 2001; MANN, 2006).

Várias abordagens podem ser atribuídas ao estudo à cerca do proteoma. Uma delas seria a verificação do mesmo em sistemas de infecção. A ação da droga no fungo em estado patogênico ou sob a interação com moléculas expressas durante a virulência pode ser diferente.

A capacidade do fungo em aderir ao tecido pulmonar durante a interação inicial com as células do epitélio alveolar é uma etapa crucial para se estabelecer a doença. Uma vez aderido ao tecido pulmonar o fungo pode proliferar levando a formação da lesão primária no pulmão. A interação fungo-

hospedeiro durante a infecção criptocócica é extremamente complexa e estudos relacionados a esta interação são de grande importância.

Em um trabalho realizado por PORTELA (2006), foi verificado o efeito da substância Saquinavir sobre a adesão de fungo e determinou-se que na concentração de 100 μ M ocorreu redução de 50% no índice de adesão mostrando ser um protótipo promissor à droga para inibição do crescimento de *Candida* sp em sistema de infecção.

MARTINS et al 2009, estudaram a inibição da adesão da R-goniotalamina (lactona presente em abundância no gênero *Goniothalamus*) e seu enantiômero não natural S-goniotalamina contra *C. albicans* e *C. dubliniensis*. As leveduras foram mantidas em contato com as substâncias durante uma hora, em seguida incubadas com células epiteliais de boca por mais uma hora e as células aderidas foram quantificadas por microscópio óptico. Para a espécie *albicans*, R-goniotalamina e S-goniotalamina inibiram a adesão das leveduras nas células do epitélio bucal com índice de 62 a 79%, quando comparados com controle sem tratamento. Para *C. dubliniensis*, no tratamento com S-goniotalamina foi observado uma redução de 76% no índice de adesão e com R-goniotalamina houve inibição de 60% na adesão às células epiteliais de boca.

Estudos de interação, utilizando modelos de culturas de células têm sido amplamente explorados em nosso laboratório, especialmente em *Paracoccidioides brasiliensis* (MENDES-GIANNINI et al., 2008). Assim, pretendeu-se neste estudo, verificar o padrão de adesão de *C. neoformans* em linhagem A549 de pneumócitos e, tendo em vista a atividade antifúngica apresentada pela substância pedalitina, obtida de *P. nitens*, foram realizados ensaios para verificar o índice de infecção antes e após o tratamento com a mesma, bem como com as drogas sintéticas fluconazol e anfotericina B. O ensaio de adesão de *C. neoformans* foi realizado utilizando culturas de células de pneumócitos, linhagem A549 (BARBOSA et al., 2006). O índice de adesão foi determinado contando-se o número de fungos aderidos em 1000 células. As condições testadas foram os tratamentos com pedalitina, fluconazol e anfotericina, obtendo-se inibição de adesão, respectivamente de 42,3%, 50% e 61% para o isolado sensível ao fluconazol; 37,2%, 40% e 48,6% para o isolado resistente ao fluconazol e 46,4%, 53,6% e 60,7% para a cepa ATCC.

Desta forma, observou-se que os tratamentos diminuíram significativamente o índice de adesão nos três isolados testados, sugerindo interferência em proteínas de superfície provavelmente fundamentais para a ligação do fungo às células epiteliais de pulmão, possivelmente naquelas que reduziram sua expressão após contato com a molécula ativa. Novamente o seqüenciamento e a identificação destas proteínas, bem como a verificação do proteoma da interação do fungo com as células após contato com a substância natural ativa serão necessários para a caracterização do mecanismo de ação desta molécula.

Em todas as condições testadas neste estudo, não foram observadas células de *C. neoformans* internalizadas, possivelmente, devido à limitação da metodologia empregada. Estudos utilizando citometria de fluxo para avaliar a capacidade do fungo em aderir e invadir células em cultura tem demonstrado que a quantidade de *C. neoformans* internalizado é em torno de 30 a 50% (CHAKA et al., 1995; BARBOSA et al., 2006).

Nossos dados apontam que as frações da planta *P. nitens* e a pedalitina constituem-se de protótipos promissores para o desenvolvimento de novos fármacos. Fitocomplexos a partir das frações combinadas com atividade sinérgica poderiam futuramente ser estudados quanto à toxicidade e ensaios de segurança para aplicação como demais ativos da área de saúde. Quanto à molécula pedalitina, resultados anteriores mostraram que esta não é citotóxica e iniciamos estudos a respeito do seu mecanismo de ação aditiva quando se analisou o efeito desta sobre a adesão às células epiteliais de pulmão.

Portanto da atividade fungicida não citotóxica, modificações no proteoma, efeito redutor da adesão do fungo promovido pela molécula ativa e atividade sinérgica da mesma, mostraram grandes avanços para continuarmos o estudo dos mecanismos de ação e identificação de novos alvos, uma vez que sua atividade foi também eficiente em isolados resistentes. A identificação pontual das moléculas alvos apontadas neste estudo é fundamental para a obtenção de um novo fármaco para o tratamento da criptococose.

6. CONCLUSÕES

A substância pedalitina da planta *P. nitens* apresentou boa atividade antifúngica contra *C. neoformans* tanto para a cepa ATCC 90012, como para os isolados clínicos, sensível e resistente a fluconazol.

A pedalitina quando combinada com outros compostos de origem vegetal apresentou atividade sinérgica, porém, melhor efeito foi verificado quando combinada com anfotericina B e fluconazol.

Várias proteínas tiveram expressão diferenciada quando *C. neoformans* cepa ATCC 90012 foi tratado com a substância pedalitina de *P. nitens*, bem como com fluconazol. O mesmo ocorreu quando foi comparado o perfil protéico da cepa ATCC com o isolado clínico resistente a fluconazol.

A inibição da adesão de *C. neoformans* aos pneumócitos foi observada após o tratamento com pedalitina, fluconazol e anfotericina B.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABAD, M. J.; ANSUATEGUI, M.; BERMEJO, P. Active antifungal substances from natural sources. **Arkivoc.**, v. 7, p.116-145, 2007.
- ABEGG, M.A.; CELLA, F.L.; FAGANELLO, J.; VALENTE, P.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M.H. *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* isolated from the excreta of psittaciformes in a southern Brazilian zoological garden. **Mycopathologia**, v.161, n.2, p.83-91, 2006.
- AGARWAL, A. K.; XU, T.; JACOB, M. R.; FENG, Q.; LI, X. C.; WALKER, L. A.; CLARK, A. M. Genomic and genetic approaches for the identification of antifungal drug targets. **Infect Disord Drug Targets**, v. 8(1), p.2-15, 2008.
- ALLENDOERFER, R.; MARQUIS, A.J.; RINALDI, M.G.; GRAYBILL, J.R. Combined therapy with fluconazole and flucytosine in murine cryptococcal meningitis. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.35, p.726–729, 1991.
- ALLER, A. I.; MARTIN-MAZUELOS, E.; LOZANO, F.; GOMEZ-MATEOS, J.; STEELE-MOORE, L.; HOLLOWAY, W. J.; GUTIERREZ, M. J.; RECIO, F. J.; ESPINEL-INGROFF, A. Correlation of fluconazole MICs with clinical outcome in cryptococcal infection. **Antimicrob Agents Chemother**, v.44, p.1544–1548, 2000.
- ALMEIDA, A.M.F. **Caracterização molecular de polimorfismos e do gene ERG11 associados a mecanismos de resistência a drogas antifúngicas em isolados clínicos de *Cryptococcus neoformans***. 2005. Tese (Doutorado em Análises Clínicas). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP-Araraquara, 2005.
- ALMEIDA, A.M.F. ; MATSUMOTO, M.T. ; BAEZA, Lilian C ; SILVA, R ; KLAINER, A.A.P. ; MELHEM, M C S ; MENDES-GIANNINI, M. J. S. ; & The Laboratory Group on Cryptococcosis . Molecular typing and antifungal susceptibility of clinical sequential isolates of *Cryptococcus neoformans* from Sao Paulo State, Brazil. **FEMS Yeast Research**, v. 7, p. 152-164, 2007.
- ARIKAN, S.; LOZANO-CHIU, M.; PAETZNICK, V.; REX, J.H. *In vitro* synergy of caspofungin and amphotericin B against *Aspergillus* and *Fusarium spp.* **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.46, p.245–247, 2002.
- ASIF, A.R.; OELLERICH, M.; AMSTRONG, V.W.; RIEMENSCHNEIDER, B.; MONOD, M.; REICHARD, U. Proteome of conidial surface associated proteins

of *Aspergillus fumigatus* reflecting potential vaccine candidates and allergens. **J Proteome Res.**, v. 5, p. 954-962, 2006.

BACAL, N.S.; FAULHABER, M.H.W. Aplicação prática em citometria de fluxo. São Paulo: Editora Atheneu, 90p. 2003.

BAKER, D.J.; REBOLI, A.C. Images in clinical medicine. Cutaneous cryptococcosis. **N. Engl. J. Med.**, v. 336, n. 14, p. 998, 1997.

BANERJEE, U.; DATTA, K.; CASADEVALL, A. Serotype distribution of *Cryptococcus neoformans* in patients in a tertiary care center in India. **Med Mycol.**, v.42 (2), p.181–186, 2004.

BARBOSA, F.M.; FONSECA, F.L.; HOLANDINO, C.; ALVIANO, C.S.; NIMRICHTER, L.; RODRIGUES, M.L. Glucuronoxylomannan-mediated interaction of *Cryptococcus neoformans* with human alveolar cells results in fungal internalization and host cell damage. **Microbes Infect.**, v. 8, p. 493-502, 2006.

BARONI, F.A.; PAULA, C.R.; SILVA, E.G.; VIANI, F.C.; RIVERA, I.N.; OLIVEIRA, M.T. et al. *Cryptococcus neoformans* strains isolated from church towers in Rio de Janeiro City, RJ, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**, v. 48, n. 2, p. 71-75, 2006.

BARCHIESI, F.; SCHIMIZZI, A. M.; NAJVAR, L. K.; BOCANEGRA, R.; CASELLI, F.; DI CESARE, S.; GIANNINI, D.; DI FRANCESCO, L. F.; GIACOMETTI, A.; CARLE, F.; SCALISE, G.; GRAYBILL, J.R. Interactions of posaconazole and flucytosine against *Cryptococcus neoformans*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.45, p.1355–1359, 2001.

BARCHIESI, F.; GALLO, D.; CASELLI, F.; DI FRANCESCO, L.F.; ARZENI, D.; GIACOMETTI, A.; SCALISE, G. *In-vitro* interactions of itraconazole with flucytosine against clinical isolates of *Cryptococcus neoformans*. **J. Antimicrob. Chemother.**, v.44, p.65–70, 1999.

BARCHIESI, F.; DI FRANCESCO, L.F.; COMPAGNUCCI, P.; ARZENI, D.; GIACOMETTI, A.; SCALISE, G.. *In-vitro* interaction of terbinafine with amphotericin B, fluconazole and itraconazole against clinical isolates of *Candida albicans*. **J. Antimicrob. Chemother.**, v.41, p.59–65, 1998.

BARCHIESI, F.; FALCONI, D.F.; SCALISE, G. *In vitro* activities of terbinafine in combination with fluconazole and itraconazole against isolates of *Candida*

albicans with reduced susceptibility to azoles. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.41, p.1812–1814, 1997.

BARQUIST, E.; FEIN, E.; SHADICK, D.; JOHNSON, J.; CLARK, J.; SHATZ, D.A. Randomized prospective trial of amphotericin B lipid emulsion versus dextrose colloidal solution in critically ill patients. **J. Trauma.**, v.47, p.336-340, 1999.

BARRETT, D. From natural products to clinically useful antifungals. **Biochim Biophys Acta.**, v.1587, p.224-33, 2002.

BARTIZAL, K.; GILL, C.J.; ABRUZZO, G.K.; FLATTERY, A.M.; KONG, L.; SCOTT, P.M.; SMITH, J.G.; LEIGHTON, C.E.; BOUFFARD, A.; DROPINSKI, J.F.; BALKOVEC, J. *In vitro* preclinical evaluation studies with the echinocandin antifungal MK-0991 (L-743,872). **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.41, p.2326–2332, 1997.

BASSO, L.A.; SILVA, L.H.P.; FETT-NETO, A.G.; JUNIOR, W.F.A.; MOREIRA, I.S.; PALMA, M.S.; CALIXTO, J.B.; FILHO, S.A.; SANTOS, R.R.; SOARES, M.B.P.; SANTOS, D.S. The use of biodiversity as source of new chemical entities against defined molecular targets for treatment of malaria, tuberculosis, and T-cell mediated diseases. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, v. 100, Rio de Janeiro, 2005.

BEGGS, W. H.; SAROSI, G.A.; WALKER, M.I. Synergistic action of amphotericin B and rifampin against *Candida* species. **J. Infect. Dis.** v.133, p. 206–209, 1976.

BEGGS, W.H. Mechanisms of synergistic interactions between amphotericin B and flucytosine. **J. Antimicrob. Chemother.**, v.17, p.402–404, 1986.

BEGGS, W.H.; ANDREWS, F.A.; SAROSI, G.A. Combined action of amphotericin B and 5-fluorocytosine on pathogenic yeasts susceptible to either drug alone. **Chemotherapy**, v.27, p.247–251, 1981.

BEGGS, W.H.; SAROSI, G.A. Further evidence for sequential action of amphotericin B and 5-fluorocytosine against *Candida albicans*. **Chemotherapy**, v.28, p.341–344, 1982.

BENADUCCI, T. “Tipos moleculares de *Cryptococcus neoformans* correlacionados com perfis de sensibilidade à drogas sintéticas e de plantas determinadas por Citometria de Fluxo” 2009. Dissertação (Mestrado

em Análises Clínicas). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP-Araraquara, 2009.

BENNETT, J. E.; KWON-CHUNG, K. J.; THEODORE, T. S. Biochemical differences between serotypes of *Cryptococcus neoformans*. **Sabouraudia**, v.16, p.167-174, 1978.

BIASOLI, M. S.; TOSELLO, M. E.; MAGARO, H. M. Adherence of *Candida* strains isolated from gastrointestinal tract. **Mycoses**, v. 45, p. 465-69, 1999.

BICANIC, T.; HARRISON, T.; NIEPIEKLO, A.; DYAKOPU, N.; MEINTJES, G. Symptomatic relapse of HIV-associated cryptococcal meningitis after initial fluconazole monotherapy: the role of fluconazole resistance and immune reconstitution. **Clin Infect Dis** 15;43(8):1069-73. 2006.

BLACKSTOCK, W.P.; WEIR, M.P. Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins. **Trends in Biotechnology**, v.17 (3), p.121-127, 1999.

BOEKHOUT, T.; THEELAN, B.; DIAS, M.; FELL, J.W.; HOP, W.C.J.; ABELN, E.C.A.; DROMER, F.; MEYER, W. Hybrid genotypes in the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans*. **Microbiology**, v.147, p.891-907, 2001.

BOLZANI, V. S.; YOUNG, C. M.; FURLAN, M.; CAVALHEIRO, A. J., ARAÚJO, A. R.; SILVA, D. H.; LOPES, M. N. Search for antifungal and anticancer compounds from native plant species of Cerrado and Atlantic forest. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v.71, n.2, p.181-187, 1999.

BOVERS, M.; HAGEN, F.; BOEKHOUT, T. Diversity of the *Cryptococcus neoformans-Cryptococcus gattii* species complex. **Revista Iberoamericana de Micologia**. v.25, p.4-12, 2008.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Bioch.** v .72, p. 248-254, 1976.

BRAGA, F.G.; BOUZADA, M.L.; FABRI, R.L.; de O MATOS, M.; MOREIRA, F. O.; SCIO, E.; COIMBRA, E.S. Antileishmanial and antifungal activity of plants used in traditional medicine in Brazil. **Journal of Ethnopharmacology** v.111, p.396-402, 2007.

BRUNEAU, J .M; MAILLET, I; TAGAT, E; LEGRAND, R; SUPATTO, F; FUDALI, C; CAER, J. P; LABAS, V; LECAQUE, D; HODGSON. Drug induced proteome changes in *Candida albicans*: comparison of the effect of beta(1,3)

glucan synthase inhibitors and two triazoles, fluconazole and itraconazole. *J. Proteomics*. v. 3, p.325-336, 2003.

BURKART A. "Las Leguminosas Argentinas," **Aemé Agency**, Buenos Aires, p.156, 1952.

BUTTERWECK, V.; LIEFLÄNDER-WULF, U.; WINTERHOFF, H.; NAHRSTEDT, A. Plasma levels of hypericin in presence of procyanidin B2 and hyperoside: a pharmacokinetic study in rats. **Planta Med**, v.69(03), p.189-92, 2003.

CALDELARI, I.; LOELIGER, B.; LANGEN, H.; GLAUSER, M. P.; MOREILLON, P. Deregulation of the arginine deiminase (*arc*) operon in penicillin-tolerant mutants of *Streptococcus gordonii*. **Antimicrob. Agents. Chemother.**, v. 44, p. 2802-2810, 2000.

CARRILLO-MUÑOZ, A. J.; GIUSIANO, G.; EZKURRA, P. A.; QUINDÓS, G. Antifungal agents: Mode of action in yeast cells. **Rev. Esp. Quimioterap.**, v.19 (2), p.130-139, 2006.

CARILLO-MUNOZ, A. J., TUR-TUR, C. Comparative study of antifungal activity of sertaconazole, terbinafine, and bifonazole against clinical isolates of *Candida spp.*, *Cryptococcus neoformans* and dermatophytes. **Chemotherapy**, v.43, p.387–392, 1997.

CASADEVALL, A., PERFECT, J.R. *Cryptococcus neoformans*. Washington, DC: **American Society for Microbiology Press**, 1998.

CASALI, A.K.; STAATS, C.C.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M.H. *Cryptococcus neoformans*: aspectos moleculares e epidemiológicos. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, v.20, p.34-37, 2001.

CASALI, A.K.; GOULART, L.; ROSA E SILVA L.K.; RIBEIRO, A.M.; AMARAL, A.A.; ALVES, S.H. et al. Molecular typing of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* isolates in the Brazilian state Rio Grande do Sul. **FEMS Yeast. Res.** v. 3, n. 4, p. 405-415, 2003.

CASALINUOVO I.A., DI FRANCESCO P., GARACI E., **Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.**, v.8, p.69-77, 2004.

CHAKA, W.; SCHARRINGA, J.; VERHEUL, A.F.; VERHOEF, J.; VAN STRIJP, A.G.; HOEPELMAN, I.M. Quantitative analysis of phagocytosis and killing of *Cryptococcus neoformans* by human peripheral blood mononuclear cells by flow cytometry. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, v. 2, v. 753-759, 1995.

CHAPMAN, S.W.; SULLIVAN, D.C.; CLEARY, J.D. In Search of the Holy Grail of Antifungal Therapy. Baton Rouge: Transactions of the American Clinical and Climatological Association, v.119, p.197-218, 2008.

CHATURVEDI, S.; RODEGHIER, B.; FAN, J.; MCCLELLAND, C.M.; WICKES, B.; CHATURVEDI, V. Direct PCR of *Cryptococcus neoformans* MAT α and MATa pheromones to determine mating types, ploidy, and variety: a tool for epidemiological and molecular pathogenesis studies. **Journal of Clinical Microbiology**, v.38, n.5, p.2007-9, 2000.

CHAYAKULKEEREE, M.; PERFECT, J.R. Cryptococcosis. **Infectious Disease Clinics of North America**, v.20, p.507-44, 2006.

CHEN, J.; VARMA, A.; DIAZ, M.R.; LITVINTSEVA, A.P.; WOLLENBERG, K.K.; KWON-CHUNG, K.J. *Cryptococcus neoformans* strains and infection in apparently immunocompetent patients, China. **Emerg Infect Dis.** v.14(5), p.755–762, 2008;.

CHUCK, S.L.; SANDE, M.A. Infections with *Cryptococcus neoformans* in the acquired immunodeficiency syndrome. **N. Engl. J. Med.**, v.321, n.12, p.794-799, 1989.

CLANCY C.J., NGUYEN M.H. Comparison of a photometric method with standardized methods of antifungal susceptibility testing of yeasts. **J Clin Microbiol**; v.35, p.2878-82, 1997.

CLSI. Método de referência para testes de diluição em caldo para a determinação da sensibilidade a terapia antifúngica das leveduras: Norma aprovada. Brasília, DF, 2002. p. 1-51. (CLSI Documento M27-A2. v. 22, n. 15).

CRIVOS M.; MARTINEZ M.R.; POCHETTINO M.L.; REMORINI C.; SY A.; TEVES L. **J. Ethnobiol. Ethnomed.**, v.2, p.1-12, 2007.

CRUZ, M.C.; SANTOS, P.O.; BARBOSA, A.M.J.R.; DE MÉLO, D.L.; ALVIANO, C.S.; ANTONIOLLI, A.R.; ALVIANO, D.S.; TRINDADE, R.C. Antifungal activity of Brazilian medicinal plants involved in popular treatment of mycoses. **J Ethnopharmacol.**, v.111(2), p.409-12, 2007.

DE JESUS, J. B.; CUERVO, P.; JUNQUEIRA, M.; BRITTO, C.; SILVA-FILHO, F. C.; SABÓIA-VAHIA, L.; GONZÁLEZ, L.J.; BARBOSA DOMONT, G. Application of twodimensional electrophoresis and matrix-assisted laser desorption/ionization time-offlight mass spectrometry for proteomic analysis of

the sexually transmitted parasite *Trichomonas vaginalis*. **J. Mass. Spectrom.**, v.42, p.1463-1473, 2007.

DELFINO, V.D.A.; MATNI, A.M.; GORDAN, P.A. Micoses profundas em transplantados renais: indicação de alerta clínico. **J. Bras. Nefrol.** v.16, n.3, p. 143-148, 1994.

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

DIAS, L.L.C; FLOH, C.; SILVEIRA, V. Proteômica comparativa aplicada a cultura de tecidos e plantas. *Revista Brasileira de Horticultura Ornamental*. v.13S, p.2002-2008, 2007.

DI CARLO, G.; BORELLI, F.; ERNST, E.; IZZO, A. A. St John's wort: Prozac from the plant kingdom. **TRENDS in Pharmacological Sciences**, v.22 (6), 2001.

DIXIT, A.; CARROLL, S.F.; QURESHI, S.T. *Cryptococcus gattii*: An Emerging Cause of Fungal Disease in North America. **Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases**. 2009.

DORNEANU, O.; FILIP, O.; MIFTODE, E.; RADU, I.; NICOLAU, C.; DAMIAN, I.; LUCA, V. *Cryptococcus meningitis*, five years of experience and literature review. **Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi**, v. 112(1), p. 100-3, 2008.

DROMER, F.; BERNEDE BAUDUIN, C.; GUILLEMOT, D.; LORTHOLARY, O. Major role for amphotericin B-flucytosine combination in severe cryptococcosis. **Plos One** 3:e2870, 2008.

DROMER, F.; MATHOULIN-PELISSIER, S.; LAUNAY, O.; LORTHOLARY, O.; FRENCH CRYPTOCOCCOSIS STUDY GROUP. Determinants of Disease Presentation and Outcome during Cryptococcosis: The CryptoA/D Study. **PLoS Med.** v. 4, p. 297-308, 2007.

DROMER, F.; MATHOULIN-PELISSIER, S.; FONTANET, A.; RONIN, O.; DUPONT, B.; LORTHOLARY, O.; FRENCH. Cryptococcosis STUDY GROUP. Epidemiology of HIV-associated cryptococcosis in France. (1985-2001): comparation of the pre- and post-HAART eras. **AIDS.**, v.20, p. 555-562, 2004.

DROMER, F., MATHOULIN, S., DUPONT, B., LETENNEUR, L. RONIN, O. Individual and environmental factors associated with infection due to *Cryptococcus neoformans* serotype D. French Cryptococcosis Study Group. **Clin Infect Dis.**, v.23, p.91–96, 1996.

DROMER F., VARMA A., RONIN O., MATHOULIN S., DUPONT B.: Molecular typing of *C. neoformans* serotype D clinical isolates. **J.Clin. Microbiol.** v.32, p.2364–2371, 1994.

DUARTE, R.A.; MELLO, E.R.; ARAKI, C.; MORAIS, M.C.C.; BOLZANI, V.S.; SILVA, D.H.S.; REGASINI, L.O.; SILVA, T.G.A.; XIMENES, V.F.; SOARES, C.P. alkaloids extracted from *Pterogyne nitens* induce apoptosis in malignant breast cell line. **Tumor Biology**, in press, 2010.

DUTT, M.J.; LEE, K. H. Proteomic analysis. **Current Opinion in Biotechnology**, v.11, p. 176-179, 2000.

ELLERBROEK, P.M.; WALENKAMP, A.M.; HOEPELMAN, A.I.; COENJAERTS, F.E. Effects of the capsular polysaccharides of *Cryptococcus neoformans* on phagocyte migration and inflammatory mediators. **Curr Med Chem.**, v. 11, p. 253–266, 2004.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa e Agropecuária. Comunicado Técnico: Eletroforese Bidimensional e Análise de Proteomas. 2005.

ERNST, E. Herbal Medicine A concise overview for professionals. Butterworth-Heinemann, London, 2000, 115p.

E SILVA, F.M.; DE PAULA, J.E.; ESPINDOLA, L.S. Evaluation of the antifungal potential of Brazilian Cerrado medicinal plants. **Mycoses.**, 2009.

ESPINEL-INGROFF, A. Novel antifungal agents, targets or therapeutic strategies for the treatment of invasive fungal diseases: a review of the literature (2005-2009); **Rev Iberoam Micol.**, v.26(1), p.15-22, 2009.

ESPINEL-INGROFF, A. Mechanisms of resistance to antifungal agents: yeasts and filamentous fungi. *Revista Iberoamericana de Micologia*, v.25(3), p.101-106, 2008.

FERNANDES, D.C.; REGASINI, L.O.; OKUMURA, L.L.; STRADIOTTO, N.R.; BOLZANI, V.S.; SILVA, D.H.S. Avaliação eletroquímica de flavonóides isolados de *Pterogyne nitens* (Fabaceae) empregando voltametria cíclica. **Sociedade Brasileira de Química (SBQ). 30ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, 2007.

FERNANDES, D.C.; REGASINI, L.O.; VELLOSA, J.C.R.; PAULETTI, P.M.; CASTRO-GAMBOA I.; BOLZANI, V.S.; OLIVEIRA, O.M.M.; SILVA, D.H.S. Myeloperoxidase inhibitory and radical scavenging activities of flavones from *Pterogyne nitens*. **Chem. Pharm. Bull.**, v.56, p.723-726, 2008.

FERNANDES, P.B. Molecular recognition: identifying compounds and their targets. **J Cell. Biochem. Suppl.**, v.37, p.1-6, 2001.

FERREIRA, F.G.; REGASINI, L.O.; OLIVEIRA, A.M.; CAMPOS, J.A.D.B.; SILVA, D.H.S.; CAVALHEIRO, A.J.; SANTOS, R.A.; BASSI, C.L.; BOLZANI, V.S.; SOARES, C.P. Avaliação da mutagenicidade e antimutagenicidade de diferentes frações de *Pterogyne nitens* (Leguminosae), utilizando o ensaio de micronúcleo em *Tradescantia pallida*. **Rev Bras Farmacogn** v.19, p. 61-67, 2009.

FERREIRA, M.E.; COLOMBO, A.L.; PAULSEN, I.; REN, Q.; WORTMAN, J.; HUANG, J.; GOLDMAN, M.H.; GOLDMAN, G.H. The ergosterol biosynthesis pathway, transporter genes, and azole resistance in *Aspergillus fumigatus*. **Med Mycol.** v.43, p.313-9, 2005.

FORTES, S.T. Fontes sapróbias e sexualidade de isolados clínicos e ambientais de *Cryptococcus (Filobasidiella) neoformans* no estado de Roraima – Brasil. Rio de Janeiro, 2001. 95 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Parasitária) – Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ.

FRANZOT, S.P.; HAMDAN, J.S.; CURRIE, B.P.; CASADEVALL, A. Molecular epidemiology of *Cryptococcus neoformans* in Brazil and the United States: evidence for both local genetic differences and a global clonal population structure. **Journal of Clinical Microbiology**, v.35, n.9, p.2243-51, 1997.

FRANZOT, S.P.; SALKIN, I.F.; CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*: separate varietal status for *Cryptococcus neoformans* serotype A isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v.37, p.838-40, 1999.

FRIEDMAN, G.D.; JEFFREY-FESSEL, W.; UDALTSOVA, N.V.; HURLEY, L.B. Cryptococcosis: the 1981-2000 epidemic. **Mycoses**. v.48, p.122-5, 2005.

FRIEZ, B. C.; GOLDMAN, D. L.; CHERNIAK, R.; JU, R.; CASADEVALL, A.; Phenotypic switching in *Cryptococcus neoformans* results in changes in cellular morphology and glucuronoxylomannan structure. **Infection and Immunity**. v.67, p.6076–6083, 1999.

GALLIS H.A., DREW R.H., PICKARD W.W., **Rev. Infect. Dis.**, v.12, p.308-329, 1990.

GAUTAM, P.; Shankar, J.; Madan, T.; Sirdeshmukh, R.; Sundaram, C.S.; Gade, W.N.; Basir, S.F.; Sarma, P.U.; Proteomic and Transcriptomic Analysis of

Aspergillus fumigatus on Exposure to Amphotericin B. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.52(12), p.420-27, 2008.

GIORGETTI, M.; NEGRI, G.; RODRIGUES, E.; Brazilian plants with possible action on the central nervous system – a study of historical sources from 16th to 19th century. **J. Ethnopharmacol.**, v.109, p.38-347, 2007.

GIROIS, S.B.; CHAPUIS, F.; DECULLIER, E.; REVOL, B.G. Adverse effects of antifungal therapies in invasive fungal infections: review and meta-analysis. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 25, p. 138-49, 2006.

GOLDMAN, G.H.; DA SILVA FERREIRA, M.E.; DOS REIS MARQUES E.; SAVOLDI, M.; PERLIN, D.; PARK, S.; GODOY MARTINEZ, P.C.; GOLDMAN, M. H.; COLOMBO, A. L. Evaluation of fluconazole resistance mechanisms in *Candida albicans* clinical isolates from HIV-infected patients in Brazil. **Diagn Microbiol Infect Dis.** v.50, p.25-32, 2004.

GOMASE, V.S.; KALE, K.V.; TAGORE, S.; HATTURE, S.R. Proteomics: technologies for protein analysis. **Curr. Drug .Metab.**, v.9, p.213-220, 2008.

GRANADOS, D.P.; CASTAÑEDA, E. Isolation and characterization of *Cryptococcus neoformans* varieties recovered from natural sources in Bogotá, Colombia, and study of ecological conditions in the area. **Microbial Ecology**, v.49, p. 282-90, 2005.

GRAVES, P.R.; HAYSTEAD, E.T.A. Molecular biologist's guide to proteomics. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v.66 (1), p.39-63, 2002.

GRAYBILL, J.R.; MONTALBO, E.; KIRKPATRICK, W.R.; LUTHER, M.F.; REVANKAR, S.G.; PATTERSON, T.F. Fluconazole versus *Candida albicans*: a complex relationship. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.42, p.2938-2942, 1998.

GUERRERO, A.; FRIES, B.C.; Phenotypic switching in *Cryptococcus neoformans* contributes to virulence by changing the immunological host response. **Infect. Immun.**, v. 76, p.4322-31, 2008.

GUERRERO, A.; JAIN, N.; GOLDMAN, D.L.; FRIES, B.C. Phenotypic switching in *Cryptococcus neoformans*. **Microbiology**, v. 152, p. 3-9, 2006.

GUIMARÃES, A.J.; FRASES, S.; CORDERO, R.J.; NIMRICHTER, L.; CASADEVALL, A.; NOSANCHUK, J.D. *Cryptococcus neoformans* responds to mannitol by increasing capsule size in vitro and in vivo. **Cell Microbiol.**, [Epub ahead of print], 2010.

GYGI, S.P., RIST, B. et al. Measuring gene expression by quantitative proteome analysis. **Curr. Opin. Biotechnol.**, v.11 (4), p.396-401, 2000.

HADECEK, F.; GREGER, H. Testing of antifungal natural products: methodologies, comparability of results and assay of choice. **Phytochem. Anal.**, v.11, p.137-147, 2000.

HAN, Y.; Synergic effect of grape seed extract with amphotericin B against disseminated candidiasis due to *Candida albicans*. **Phytomedicine**, v.14, p.733–738, 2007.

HAN, Y.; LEE, J.H. Berberine Synergy with Amphotericin B against Disseminated Candidiasis in Mice. **Biol. Pharm. Bull.**, v.28(3), p.541-544, 2005.

HARVEY, A.L. Natural products as a screening resource. **Curr Opin Chem Biol.** v.11, p.480-484, 2007.

HEINECKE, J.W.; LI, W.; DAEHNKE, H.L.; GOLDSTEIN, J.A. Dityrosine, a specific marker of oxidation, is synthesized by the myeloperoxidase-hydrogen peroxide system of human neutrophils and macrophages. **J. Biol. Chem.**, v.268, p.4069-4077, 1993.

HERNÁNDEZ, R.N.; PÉREZ, R.B. Aspectos clínicos y microbiológicos en un paciente inmunocompetente con criptococosis del sistema nervoso central. **Rev. Cubana Med. Milit.**, v. 28, p. 67-72, 1999.

HOLETZ, F. B.; PESSINI, G. L.; SANCHES, N. R.; CORTEZ, D. A.; NAKAMURA, C.V.; FILHO, B.P. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, v.7, p.1027-31, 2002.

HOOSHDARAN, M. Z.; BARKER, K. S.; HILLIARD, G. M.; KUSCH, H.; MORSCHHÄUSER, J.; ROGERS, P. D. Proteomic analysis of azole resistance in *Candida albicans* clinical isolates. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.48, p.2733-2735. 2004.

IDNURM, A.; BAHN, Y.S.; NIELSEN, K.; LIN, X.; FRASER, J.A.; HEITMAN, J. Deciphering the model pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 3, p. 753-764, 2005.

JANBON, G. *Cryptococcus neoformans* capsule biosynthesis and regulation. **FEMS Yeast Research.** v.3, p.753-64, 2004.

JARVIS, J.N.; DROMER, F.; HARRISON, T. S.; LORTHOLARY, O. Managing cryptococcosis in the immunocompromised host. **Curr. Opin. Infect. Dis.**, v.21(6), p.596-603, 2008.

JOHNSON, M.D.; MACDOUGALL, C.; OSTROSKY-ZEICHMER, I.; PERFECT, J.R.; REX, J.H. Combination antifungal therapy. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.48, p.693-715, 2004.

JOHNSON, E.; ESPINEL-INGROFF, A.; SZEKELY, A.; HOCKEY, H.; TROKE, P. Activity of voriconazole, itraconazole, fluconazole and amphotericin B in vitro against 1763 yeasts from 472 patients in the voriconazole phase III clinical studies. **Int. J. Antimicrob. Agents.**, v.32(6), p.511-4, 2008.

JONKERS, D.; van den BROEK, E.; van DOOREN, I.; THIJS, C.; DORANT, E.; HAGEMAN, G.; STOBBERINGH, E. Antibacterial effect of garlic and omeprazole on *Helicobacter pylori*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.43, p.837-839, 1999.

KANTARCIOGLU, A.S.; BOEKHOUT T, DE HOOG GS, THEELEN B, YUCEL A, EKMEKCI TR, et al. Subcutaneous cryptococcosis due to *Cryptococcus diffluens* in a patient with sporotrichoid lesions case report, features of the case isolate and in vitro antifungal susceptibilities. **Med. Mycol.** v.45(2), p.173–181, 2007.

KARKOWSKA-KULETA, J.; RAPALA-KOZIK, M.; KOZIK, A. Fungi pathogenic to humans: molecular bases of virulence of *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigatus*. **Acta Biochim. Pol.** v.56(2), p.211-24, 2009.

KAUFFMAN, C.A.; Clinical efficacy of new antifungal agents. **Curr. Op. Microb.**, v.9, p.483-488, 2006b.

KECHICHIAN, T.B.; SHEA, J.; DEL POETA, M. Depletion of alveolar macrophages decreases the dissemination of a glucosylceramide-deficient mutant of *Cryptococcus neoformans* in immunodeficient mice. **Infect. Immun.**, v.75, p.4792–4798, 2007.

KHAWCHAROENPORN, T.; APISARNTHANARAK, A. MUNDY, L. M. Non-neoformans cryptococcal infections: a systematic review. **Infection**, v.35, p.51-8. 2007.

KLOSE, J.; KOBALZ, U. 2-Dimensional electrophoresis of proteins – an update protocol and implications for a functional analysis of the genome. **Electrophoresis**, Weinheim, v.6, n.16, p. 1034-1059, 1995.

KOBAYASHI, C.C.B.A.; HASIMOTO E SOUZA, L.K.; FERNANDES, O.F.L.; BRITO, S.C.A.; SILVA, A.C.; SOUSA, E.D.; SILVA, M.R.R. Characterization of *Cryptococcus neoformans* isolated from urban environmental sources in Goiânia, Goiás, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.47, n.4, p.203-7, 2005.

KONTOYIANNIS, D.P.; LEWIS, R.E. Antifungal drug resistance of pathogenic fungi. **Lancet.**, v. 359, p. 1135-44, 2002.

KOPEC, K. K.; BOZYCZKO-COYNE D.; WILLIAMS, M. Target identification and validation in drug discovery: the role of proteomics. **Biochem. Pharmacol.** v. 69, p.1133-1339, 2005.

KOVACS, J.A.; KOVACS, A.A.; POLIS, M.; WHRIGHT, W.C.; GILL, V.J.; TUAZON, C.U.; GELMANN, E.P.; LANE, H. C.; LONGFIELD, R.; OVERTUF, G.; MACHER, A.M.; FAUCI, A.S.; PARRILO, J.E.; BENNETT, J.E.; & MASUR, H. Cryptococcosis in the acquired immunodeficiency syndrome. **Ann. Inter. Med.** v.103, p.533-538.1985.

KUSTER, B.; MANN, M. Identifying proteins and post-translational modifications by mass-spectrometry. **Current opinion in structural biology.** London, v.8, p.393-400, 1998.

KWON-CHUNG, K.J.; BENNETT, J.E. Cryptococcosis. **Medical Mycology**, p. 397-446., Philadelphia. 1992.

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

KWON-CHUNG, K.J.; BENNETT, J.E.; RHODES, J.C. Taxonomic studies on *Filobasidiella* species and their anamorphs. **Antonie van Leeuwenhoek.** v.48, p.25-38, 1982.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LARSEN, R.A.; BAUER, M.; WEINER, J.M.; DIAMOND, D.M.; LEAL, M.E.; DING, J.C.; RINALDI, M.G.; GRAYBILL, J.R. Effect of fluconazole on fungicidal

activity of flucytosine in murine cryptococcal meningitis. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.40, p.2178–2182, 1996.

LAZÉRA, M.S.; CAVALCANTI, M.A.S.; TRILLES, L.; NISHIKAWA, M.M.; WANKE, B. *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* – evidence for a natural habitat related to decaying wood in a pottery tree hollow. **Medical Mycology**, v.36, p.119-22, 1998.

LAZÉRA, M. S.; CAVALCANTI, M.A.S.; LONDERO, A.T.; TRILLES, L.; NISHIKAWA, M.M. ; WANKE, B. Possible primary ecological niche of *Cryptococcus neoformans*. **Medical Mycology**, v.38, n.5, p.379-383, 2000.

LEAL, A.L.; FAGANELLO, J.; FUENTEFRIA, A.M.; BOLDO, J.T.; BASSANESI, M.C.; VAINSTEIN, M.H. Epidemiological profile of cryptococcal meningitis patients in Rio Grande do Sul, Brazil. **Mycopathologia**. v.166, p.71-75, 2008.

LEE, J.H.; LEE, B.K.; KIM, J.H.; LEE, S.H.; HONG, S.K. Comparison of chemical compositions and antimicrobial activities of essential oils from three conifer trees; *Pinus densiflora*, *Cryptomeria japonica*, and *Chamaecyparis obtusa*. **J. Microbiol. Biotechnol.** v.19(4), p.391-62 2009.

LEE, J.H.; HONG, S. K. Comparative Analysis of Chemical Compositions and Antimicrobial Activities of Essential Oils from *Abies holophylla* and *Abies koreana*. **J. Microbiol. Biotechnol.** v.19(4), p.372–377, 2009.

LENGELER, K.B.; COX, G.M.; HEITMAN, J. Serotype AD strains of *Cryptococcus neoformans* are diploid or aneuploid and are heterozygous at the mating-type locus. **Infection and Immunity**, v.69, p.115-22, 2001.

LEVITZ, S.M.; The ecology of *Cryptococcus neoformans* and the epidemiology of cryptococcosis. **RID**. v.1, p.1163-1169, 1991.

LEVITZ, S.M.; SPECHT, C.A.. The molecular basis for the immunogenicity of *Cryptococcus neoformans* mannoproteins. **FEMS Yeast Res.**, p.6513-524, 2006.

LEWIS, R.E.; LUND, B.C.; KLEPSE, M.E.; ERNST, E.J.; PFALLER, M.A. Assessment of antifungal activities of fluconazole and amphotericin B administered alone and in combination against *Candida albicans* by using a dynamic in vitro mycotic infection model. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.42, p.1382–1386, 1998.

LI, H.; LU, Q.; WAN, Z.; ZHANG, J. In vitro combined activity of amphotericin B, caspofungin and voriconazole against clinical isolates of *Trichosporon asahii*. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v.35(6), p.550-552, 2010.

LIFSON, A.R.; RHAME, F.S.; BELLOSO, W.H.; DRAGSTED, U.B.; EL-SADR, W.M.; GATELL, J.M. Reporting and Evaluation of HIV-Related Clinical Endpoints in Two Multicenter International Clinical Trials. **HIV.Clin.Trials**, v. 7, n. 3, p. 125-141, 2006.

LIN, R.D.; CHIN, Y.P.; LEE, M.H. Antimicrobial Activity of Antibiotics in Combination with Natural Flavonoids against Clinical Extended-Spectrum β – Lactamase (ESBL)-producing *Klebsiella pneumonia*. **Phytother. Res.**, v.19, p.612–617, 2005.

LIN, X.; HEITMAN, J. The Biology of the *Cryptococcus neoformans* Species Complex. **Annual Review of Microbiology**. v.60, p.69-105, 2006.

LIN, X. *Cryptococcus neoformans*: morphogenesis, infection and evolution. **Infection Genetics and Evolution**, v.9, p.401-16, 2009.

LITVINTSEVA, A.P.; KESTENBAUM, L.; VILGALYS, R.; MITCHELL, T.G. Comparative analysis of environmental and clinical populations of *Cryptococcus neoformans*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.43, n.2, p.556-64, 2005.

LOPEZ, M.F. Proteome analysis I. Gene products are where the biological action is. **Journal of chromatography**, Amsterdam, v.722, n. 1, p. 191-202, 1999.

LORENZI H., “Árvores brasileiras: Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas do Brasil,” **Plantarum**, v.1, p.162 Nova Odessa, 1998.

LOTTSPREICH, F. Proteome analysis: a pathway to the functional analysis of proteins. **Angewandte Chemie** (International Edition in English), v.38, n.17, p.2476-2492. 1999.

LU, T.H.; CHANG, H.J.; CHEN, L.S.; CHU, M.H.; OU, N.M.; JEN, I. Changes in causes of death and associated conditions among persons with HIV/AIDS after the introduction of highly active antiretroviral therapy in Taiwan. **J. Formos. Med. Assoc.**, v. 105, n. 7, p. 604-609, 2006.

LUPO, P.; CHANG, Y.C.; KELSALL, B.L.; FARBER, J.M.; PIETRELLA, D.; VECCHIARELLI, A.; LEON, F.; KWON-CHUNG, K.J. The presence of capsule in *Cryptococcus neoformans* influences the gene expression profile in dendritic

cells during interaction with the fungus. **Infect Immun.**, v. 76, p. 1581–1589, 2008.

MA, H.; MAY, R.C.; Virulence in *Cryptococcus* species. **Advances in Applied Microbiology**, v.67, p.131-90, 2009.

MANN, M. Functional and quantitative proteomics using SILAC. **Nature Reviews - Molecular Cell Biology**, v.7 (12), p.952-958, 2006.

MANSOUR MK, LEVITZ SM. Interactions of fungi with phagocytes. **Curr. Opin. Microbiol.**, v.5, p.359–365. 2002.

MARICHAL, P.; VANDEN BOSSCHE, H.; ODDS, F.C.; NOBELS, G.; WARNOCK, D.W.; TIMMERMAN, V.; VAN, B.C.; FAY, S.; MOSE-LARSEN, P. Molecular biological characterization of an azole-resistant *Candida glabrata* isolate. **Antimicrob. Agents. Chemother.**, v.41, p.2229-2237, 1997.

MARTINS M.A.; PAPPALARDO, M.C.; MELHEM, M.S.; PEREIRA-CHIOCCOLA, V.L. Molecular diversity of serial *Cryptococcus neoformans* isolates from AIDS patients in the city of São Paulo, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** 102(7):777-84, 2007

MARTINEZ-ROSSI, N.M.; PERES, N.T.A.; ROSSI, A. Antifungal resistance mechanisms in dermatophytes. **Mycopathologia**, 2008.

MARTINS M.D., REX J.H., **New Horiz.**, v.4, p.338-344, 1996.

MASCHMEYER, G.; HAAS, A. The epidemiology and treatment of infections in cancer patients. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v.31, p.193-197, 2008.

MATSUMOTO, M.T.; FUSCO-ALMEIDA, A.M.; BAEZA, L.C.; MELHEM, M.S.C.; MENDES-GIANNINI, M.J.S. Genotyping, serotyping and determination of mating-type of *Cryptococcus neoformans* clinical isolates from São Paulo State, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, reg.45/06, 2007.

MAYANJA-KIZZA, H., OISHI, K.; MITARAI, S.; YAMASHITA, H.; NALONGO, K.; WATANABE, K.; IZUMI, T.; OCOCI, J.; AUGUSTINE, K.; MUGERWA, R.; NAGATAKE, T.; MATSUMOTO, K. Combination therapy with fluconazole and flucytosine for cryptococcal meningitis in Ugandan patients with AIDS. **Clin. Infect. Dis.**, v.26, p.1362–1366, 1998.

MCCOY Jr, J.P. Basic principles of flow cytometry. **Hematology Oncol Clin N Am.** v.16, p.22-243, 2002.

MÉAN, M.; MARCHETTI, O.; CALANDRA, T.; Bench-to-bedside review: Candida infections in the intensive care unit. **Crit Care.**, v. 204, 2008.

MEDOFF, G. Antifungal action of rifampin. **Rev. Infect. Dis.**, 5(Suppl.3):S614–S619, 1983.

MEDOFF, G.; KOBAYASHI, G.S.; KWAN, C.N.; SCHLESSINGER, D.; VENKOV, P. Potentiation of rifampicin and 5-fluorocytosine as antifungal antibiotics by amphotericin B (yeast-membrane permeability-ribosomal RNAeukaryotic cell-synergism). **Proc. Natl. Acad. Sci.**, USA v.69, p.196–199, 1972.

MEDOFF, G.; COMFORT, M., KOBAYASHI, G.S. Synergistic action of amphotericin B and 5-fluorocytosine against yeast-like organisms. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v.138, p.571–574, 1971.

MENDES-GIANNINI, M.J.; MONTEIRO DA SILVA, J.L.; DE FÁTIMA DA SILVA, J; DONOFRIO, F.C.; MIRANDA, E.T.; ANDREOTTI, P.F.; SOARES, C.P. Interactions of *Paracoccidioides brasiliensis* with host cells: recent advances. **Mycopathologia**;165(4-5):237-48. 2008. Review.

MENTZ, J. P.; RODRIGUEZ, R.; CABRERA, G.; MENTZ, L. M.; MENTZ, M.; GRAZZIOTIN, R. Z. Criptococose Cutânea Primária Mimetizando Carcinoma Basocelular - Relato de Caso. 2001. Net. Disponível em: <http://www.medstudents.com.br/original/relato/criptoco/criptoco.htm>>.

MEYER, W.; MARSZEWSKA, K.; AMIRMOSTOFIAN, M.; IGREJA, R.P.; HARDTKE, C.; METHLING, K.; VIVIANI, M.A.; CHINDAMPORN, A.; SUKROONGREUNG, S.; JOHN, M.A.; ELLIS, D.H.; SORREL, T.C.; Molecular typing of global isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* by polymerase chain reaction fingerprinting and randomly amplified polymorphic DNA – a pilot study to standardize techniques on which to base a detailed epidemiological survey. **Electrophoresis**, v. 20, p. 1790-1799, 1999.

MEYER, W.; CASTAÑEDA, A.; JACKSON, S.; HUYNH, M.; CASTAÑEDA, E.; IBERO AMERICAN CRYPTOCOCCAL STUDY GROUP. Molecular Typing of IberoAmerican *Cryptococcus neoformans* isolates. **Emerg. Infect. Dis.**, v.9, p. 189-195, 2003.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde; Programa Nacional de DST e AIDS. Consenso Antiretroviral, 2008.

- MITCHELL, T.G.; PERFECT, J.R. Cryptococcosis in the era of AIDS – 100 years after the discovery of *Cryptococcus neoformans*. **Clinical Microbiology Reviews**, v.8, n.4, p. 515-48, 1995.
- MO, W.; KARGER, B.L. Analytical aspects of mass spectrometry and proteomics. **Current Opinion in Chemical Biology**, v.6. p.666-675, 2002.
- MONDELLO F, DE BERNARDIS F, GIROLAMO A, SALVATORE G, CASSONE A. *In vitro* and *in vivo* activity of tea tree oil against azole-susceptible and -resistant human pathogenic yeasts. **J. Antimicrob. Chemother**, v.51, p.1223-1229, 2003.
- MONTEIRO, M.C.M.; SILVA. G. H.; CANDIDA V. S.; LOPES, M, N.; BOLZANI, V.S.; YOUNG, M. C.M. Estudo químico dos caules de *Kielmeyera rubriflora* (Clusiaceae). **Sociedade Brasileira de Química (SBQ) 29a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, 1996.
- MOREIRA, T.A.; FERREIRA, M.S.; RIBAS, R.M.; BORGES, A.S. Cryptococcosis: clinical epidemiological laboratorial study and fungi varieties in 96 patients. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.39, n.3, p.255-8. 2006
- MORETTI, M.L.; RESENDE, M.R.; LAZÉRA, M.S.; COLOMBO, A.L.; SHIKANAI-YASUDA, M.A. Guidelines in cryptococcosis – 2008. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.41, p.524-44, 2008.
- MORRISON V.A., **Expert Rev. Anti. Infect. Ther.**, v.4, p.325-342, 2006.
- MORSCHHAUSER, J. Regulation of multidrug resistance in pathogenic fungi. **Fungal Genet Biol.**, 2009.
- MOSHI, M.J.; INNOCENT, E.; MASIMBA, P.J.; OTIENO, D.F.; WEISHEIT, A.; MBABAZI, P.; LYNES, M.; MEACHEM, K.; HAMILTON, A.; URASSA, I. Antimicrobial and brine shrimp toxicity of some plants used in traditional medicine in Bukoba District, north-western Tanzania. **Tanzan J Health Res.** v.11, p.23-8, 2009.
- MOYRAND, F.; KLAPROTH, B.; HIMMELREICH, U.; DROMER, F.; JANBON, G. Isolation and characterization of capsule structure mutant strains of *Cryptococcus neoformans*. **Mol. Microbiol.**, v. 45, n. 3, p. 837-849, 2002.
- MURPHY, A. R. & KAVANAGH, K. A. Adherence of clinical isolates of *Saccharomyces cerevisiae* to buccal epithelial cells. **Med. Mycol.**, v. 39, p. 123-27, 2001.

- NASCIMENTO, G.G.F.; LOCATELLI, J.; FREITAS, PAULO C. et al. Atividade de extratos vegetais e fitofármacos sobre bactérias resistentes a antibióticos. **Braz. J. Microbiol.**, v.31, p.247-256, 2000
- NEILSON, J.B.; FROMTLING, R.A.; BULMER, G.S. *Cryptococcus neoformans*: size range of infectious particles from aerosolized soil. **Infect. Immun.**, v.17, n.3, p.634-638, 1977.
- NEUHOFF, V.; AROLD, N.; TAUBE, D.; EHRHARDT, W. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. **Electrophoresis**, v.9, p.255-62, 1988.
- NGUYEN, M.H.; BARCHIESI, F.; MCGOUGH, D.A.; YU, V.L.; RINALDI, M.G. *In vitro* evaluation of combination of fluconazole and flucytosine against *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.39, p.1691–1695, 1995.
- NISHIKAWA, M.M.; LAZÉRA, M.S.; BARBOSA, G.G.; TRILLES, L.; BALASSIANO, B.R.; MACEDO, R.C.L.; BEZERRA, C.C.F.; PÉREZ, M.A.; CARDARELLI, P.; WANKE, B. Serotyping of 467 *Cryptococcus neoformans* isolated from clinical and environmental sources in Brazil: Analysis of host and regional patterns. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, n.1, p.73-7, 2003.
- ODDS, F.C. Synergistic, antagonism, and what the chequerboard puts between them. **J. Antimicrob. Chemother.**, v.52, p.1, 2003.
- OHKUSU, M.; TANGONAN, N.; TAKEO, K.; KISHIDA, E.; OHKUBO, M.; AOKI, S.; NAKAMURA, K.; FUJII, T.; SIQUEIRA, I.C.; MACIEL, E.A.P.; SAKABE, S.; ALMEIDA, G.M.D.; HEINS-VACCARI, E.M.; LACAZ, C.S. Serotype, mating type and ploidy of *Cryptococcus neoformans* strains isolated from patients in Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.44, n.6, p.299-302, 2002.
- OLIVEIRA, D.M.T. Morfo anatomia do embrião de leguminosas arbóreas nativas. **Rev. Bras. Bot.**, v.22, n.3, 1999.
- OLIVEIRA NETO, I.C. et al. Meio século de criptococose no Brasil; revisão de 308 casos (1942-1992). **Âmb. Hosp.**, v.5, p.5-16, 1993.
- PAPPALARDO, M.C.S.M.; MELHEM, M.S.C. Cryptococcosis: a review of the Brazilian experience for the disease. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.45, n.6, p.299-305, 2003.

- PAPPALARDO, M.C.; PASCHOAL, R.C.; MELHEM, M.S. AIDS-associated central nervous system cryptococcosis: a Brazilian case study. **AIDS**, 12;21(14):1971-2, 2007.
- PASSOS, X.S.; SANTOS, S. D.A.C.; FERRI, P. H.; FERNANDES, O.D.E.F.; PAULA, T.D.E.F.; GARCIA, A.C.; SILVA, M.D.O.R. Antifungal activity of *Caryocar brasiliensis* (Caryocaraceae) against *Cryptococcus neoformans*. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 35, p. 623-7, 2002.
- PATTERSON T.F.; KIRKPATRICK W.E.; WHITE M.H.; HIEMENZ J.W.; WINGARD J.R.; DUPONT B. Invasive aspergillosis: disease spectrum, treatment practices, and outcomes. **Medicine (Baltimore)**, v.79, p.250-60, 2000.
- PAULI, A.; KUBECZKA, K.H. Evaluation of inhibitory data of essential oil constituents obtained with different microbiological testing methods. In: FRANZ, C.; MATHE, A.; BUCHBAUER, G. (Ed). Essential oils: basic and applied research. **Carol Stream: Allured Pub. Corp.**, p.33-36, 1996.
- PEDRAZA-CHAVERRI, J.; CÁRDENAS-RODRÍGUEZ, N.; OROZCO-IBARRA, M.; PÉREZ-ROJAS, J.M.; Medicinal properties of mangosteen (*Garcinia mangostana*). **Food and Chemical Toxicology**, v.46, p.3227–3239, 2008.
- PENG, J.; KUDRIMOTI, S.; PRASANNA, S.; ODDE, S.; DOERKSEN, R.J.; PENNAKA, H.K.; CHOO, Y.M. RAO, K.V.; TEKWANI, B.L.; MADGULA, V.; KHAN, S.I.; WANG, B.; MAYER, A.M.; JACOB, M.R.; TU, L.C.; GERTSCH, J.; HAMANN, M.T. Structure-activity relationship and mechanism of action studies of manzamine analogues for the control of neuroinflammation and cerebral infections. **J Med Chem**. 2010 Jan 14;53(1):61-76.
- PEREA, S., GONZALEZ, G.; FOTHERGILL, A.W.; SUTTON, D.A.; RINALDI, M.G. *In vitro* activities of terbinafine in combination with fluconazole, itraconazole, voriconazole, and posaconazole against clinical isolates of *Candida glabrata* with decreased susceptibility to azoles. **J. Clin. Microbiol.** v.40, p.1831–1833, 2002.
- PERFECT, J.R.; CASADEVALL, A. Cryptococcosis. **Infect. Dis. Clin. N.Am.** v.16, p.837–838, 2002.
- PERLIN, D.S.; SETO-YOUNG, D.; MONK, B.C. The Plasma Membrane H (+)-ATPase of Fungi. A Candidate Drug Target? **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v.3, p. 609-617, 1997.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J.; GIBBS, D. L.; NEWELL, V. A.; BIJIE, H.; DZIERZANOWSKA, D.; KLIMKO, N. N.; LETSCHER-BRU, V.; LISALOVA, M.; MUEHLETHALER, K.; RENNISON, C.; ZAIDI, M.; the Global Antifungal Surveillance Group. Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Study, 1997 to 2007: A 10.5-Year Analysis of Susceptibilities of Noncandidal Yeast Species to Fluconazole and Voriconazole Determined by CLSI Standardized Disk Diffusion Testing. **J. Clin. Microbiol.**, 2008.

PFALLER, M.A.; BOYKEN, L.; HOLLIS, R.J.; MESSER, S.A.; TENDOLKAR, S.; DIEKEMA, D.J. In vitro susceptibilities of clinical isolates of *Candida* species, *Cryptococcus neoformans*, and *Aspergillus* species to itraconazole: global survey of 9,359 isolates tested by clinical and laboratory standards institute broth microdilution methods. **J. Clin. Microbiol.**, v.43, p.3807-3810, 2005.

PINTO JÚNIOR, V.L. et al. Criptococose associada à Aids. A importância do cultivo da urina no seu diagnóstico. **Rev. Soc.Bras. Med. Trop.**, v. 39, p. 230-232, 2006.

PINTO, M.M.; SOUSA, M.E.; NASCIMENTO, M.S. Xanthone derivatives: new insights in biological activities. **Curr. Med. Chem.**, v.12, p.2517–2538, 2005.

POLACHEK, I.; PLATT, Y.; ARONOVITCH, J. Catecholamines and virulence of *Cryptococcus neoformans*. **Infect. Immun.**, v.58, n.9, p.2919-2922, 1990.

POLAK, A. Synergism of polyene antibiotics with 5-fluorocytosine. **Chemotherapy**, v.24, p.2–16, 1978.

PORTELA, M.B. **Estudo de proteínas funcionais de *Candida spp.* isoladas da cavidade bucal de crianças infectadas pelo vírus da imunodeficiência adquirida.** Tese. Universidade Federal do Rio de Janeiro. 2006.

POWELL, K.E.; DAHL, B.A.; WEEKS, R.J.; TOSH, F.E. Airborne *Cryptococcus neoformans*: particles from pigeon excreta compatible with alveolar deposition. **J. Infect. Dis.**, v. 125, n. 4, p. 412-415, 1972.

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 1996-2006. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.104, p.513-21, 2009.

RABILLOUD, T., Ed. Proteome Research: Two-dimensional gel electrophoresis and identification methods. Principles e practice. **Berlin: Springer Verlag, Principles e practiceed.**, v.I, p.248, 2000.

REGASINI, L.O.; LOPES, A.A.; SILVA, D.H.S.; FURLAN, M.; YOUNG, M.C.M., MARIA DA, BARREIRO, E.J.; BOLZANI, V.S. Antiproliferative effect of *Pterogyne nitens* on melanoma cells. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.**, v.28, p.335-340, 2007.

REGASINI, L.O.; FERNANDES, D.C.; CASTRO-GAMBOA, I.; SILVA, D.H.S.; FURLAN, M.; BOLZANI, V.S.; BARREIRO, E.J.; CARDOSO-LOPES, E.M.; YOUNG, M.C.M.; TORRES, L.B.; VELLOSA, J.C.R.; OLIVEIRA, O.M.M. Constituintes químicos das flores de *Pterogyne nitens* (Caesalpinioideae). **Quim Nova**, v.31, p.802-806, 2008a..

REGASINI, L.O.; OLIVEIRA, C.M.; VELLOSA, J.C.R.; OLIVEIRA, O.M.M.F.; SILVA, D.H.S.; BOLZANI, V.S. Free radical scavenging activity of *Pterogyne nitens* Tul. (Fabaceae). **Afr. J. Biotechnol.**, v.7, p.4609-4613, 2008b.

REGASINI, L.O.; VELLOSA, J.C.R.; SILVA, D.H.S.; FURLAN, M.; OLIVEIRA, O.M.M.; KHALIL, N.M.; BRUNETTI, I.L.; YOUNG, M.C.M.; BARREIRO, E.J.; BOLZANI, V.S. Flavonols from *Pterogyne nitens* and their evaluation as myeloperoxidase inhibitors. **Phytochemistry**, v.69, p.1739-1744 2008c.

REGASINI, L.O.; CASTRO-GAMBOA, I.; SILVA, D.H.; FURLAN, M.; BARREIRO, E.J.; FERREIRA, P.M.; PESSOA, C.; LOTUFO, L.V.; DE MORAES, M.O.; YOUNG, M.C.; BOLZANI, V.D. Cytotoxic Guanidine Alkaloids from *Pterogyne nitens* (big up tri, open). **J. Nat. Prod.**, 2009. [Epub ahead of print].

REX, J. H.; PFALLER, M. A.; WALSH, T. J.; CHATURVEDI, V.; ESPINEL-INGROFF, A.; GHANNOUM, M. A.; GOSEY, L. L.; ODDS, F. C.; RINALDI, M. G.; SHEEHAN, D. J.; WARNOCK, D. W. Antifungal susceptibility testing: practical aspects and current challenges. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.14(4), p.643-58, 2001.

RICHARDSON, M.; LASS-FLORL, C. Changing epidemiology of systemic fungal infections. **Clinical Microbiology and Infection**, v.14, p.5-24, 2008.

RICHARDSON, M.D.; & WARNOCK, D.W. Fungal Infection: diagnosis and management. **Blackwell Scientific Publications**, 1993.

RODRIGUEZ-TUDELA, J.L.; BERENQUER, J.; MARTINEZ-SUAREZ, J.V.; SANCHEZ, R. Comparison of a spectrophotometric microdilution method with RPMI-2% glucose with the National Committee for Clinical Laboratory Standards reference macrodilution method M27-P for in vitro susceptibility

testing of amphotericin B, flucytosine, and fluconazole against *Candida albicans*. **Antimicrob. Agents. Chemother.**; v. 40, p.1998-2003, 1996.

RODRIGUEZ-TUDELA, J.L.; RODERO, L.; CUENCA-ESTRELLA, M.; CÓRDOBA, S. III Curso hispano-argentino de Micología Médica-determinación de la resistencia a los antifúngicos em el laboratorio. 2003

ROJAS, J. J.; OCHOA, V. J.; OCAMPO, S. A.; MUÑOZ, J. F. Screening for antimicrobial activity of ten medicinal plants used in Colombian folkloric medicine: A possible alternative in the treatment of non-nosocomial infections. **BMC Complement. Altern. Med.**, v. 6, p. 2, 2006.

ROLLINGER, J.M.; LANGER, T.; STUPPNER H. Strategies for efficient lead structure discovery from natural products. **Curr. Med, Chem.**, v.13(13), p.1491-507, 2006.

SABLE, C. A.; STROHMAIER, K. M.; CHODAKEWITZ, J. A.; Advances in antifungal therapy. **Annu. Rev. Med.**, v.59, p.361-79, 2008.

SAMOYLENKO, V.; ASHFAQ, M.K.; JACOB, M.R.; TEKWANI, B.L.; KHAN, S.I.; MANLY, S.P.; JOSHI, V.C.; WALKER, L.A.; MUHAMMAD, I. Indolizidine, Antiinfective and Antiparasitic Compounds from *Prosopis glandulosa* var. *Glandulosa*. **J. Nat. Prod.**, v.72, p.92–98, 2009.

SANGLARD, D. Resistance tontifungal drug. In: Dismukes WE, Pappas, PG, Sobel JD (eds). **Clinical Mycology**, New York: Oxford University Press, p.111-124, 2003.

SANGLARD, D.; ODDS, F.C. Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. **Lancet. Infect. Dis.**, v.2, p.73-85, 2002.

SCHAFFNER, A., BOHLER, A. Amphotericin B refractory aspergillosis after itaconazole: evidence for significant antagonism. **Mycoses**, v.36, p.421- 4, 1993.

SCHOP, J. Protective immunity against *Cryptococcus neoformans* infection. **McGill Journal of Medicine**, v.10, p.35-43, 2007.

SCORZONI, L. **Estudo da atividade antifúngica e perfil de expressão de proteínas em leveduras do gênero *Candida* após tratamento com extratos de *Kielmeyera rubriflora***. 2008. Dissertação (Mestrado em Análises Clínicas). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP-Araraquara, 2008.

SCORZONI, L.; BENADUCCI, T.; FUSCO-ALMEIDA, A.M.; SILVA, D.H.S.; BOLZANI, V.S.; MENDES-GIANNINI, M.J.S. Comparative study of disk diffusion and microdilution methods for evaluation of antifungal activity of natural compounds against medical yeasts *Candida spp* and *Cryptococcus sp*. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.28, p.25-34, 2007a.

SCORZONI, L.; BENADUCCI, T.; FUSCO-ALMEIDA, A.M.; SILVA, D.H.S.; BOLZANI, V.S.; MENDES-GIANNINI, M.J.S. The use of standart methodology for determination of antifungal activity of natural products against medical yeasts *Candida sp* and *Cryptococcus sp*. **Braz. J. Microbiol.**, v.38, p.391-397, 2007b.

SEGAL, B.H.; HERBRECHT, R.; STEVENS, D.A.; OSTROSKY-ZEICHNER, L.; SOBEL, J.; VISCOLI, C.; WALSH, T.J.; MAERTENS, J.; PATTERSON, T.F.; PERFECT, J.R.; DUPONT, B.; WINGARD, J.R.; CALANDRA, T.; KAUFFMAN, C.A.; GRAYBILL, J.R.; BADEN, L.R.; PAPPAS, P.G.; BENNETT, J.E.; KONTOYIANNIS, D.P.; CORDONNIER, C.; VIVIANI, M.A.; BILLE, J.; ALMYROUDIS, N.G.; WHEAT, L.J.; GRANINGER, W.; BOW, E.J.; HOLLAND, S.M.; KULLBERG, B.J.; DISMUKES, W.E.; DE PAUW, B.E. Defining responses to therapy and study outcomes in clinical trials of invasive fungal diseases: Mycoses Study Group and European Organization for Research and Treatment of Cancer consensus criteria. **Clin. Infect. Dis.**, v.47, p. 674-83, 2008.

SHAO, X.; MEDNICK, A.; ALVAREZ, M.; VAN ROOIJEN, N.; CASADEVALL, A.; GOLDMAN, D.L. An innate immune system cell is a major determinant of species-related susceptibility differences to fungal pneumonia. **J. Immunol.**, v.175, p.3244–3251, 2005.

SHAO, P.L.; HUANG, L.M.; HSUEH, P.R.; Recent advances and challenges in the treatment of invasive fungal infections. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 30, p. 487-95, 2007.

SHIN, S.; KANG, C.A., Antifungal activity of the essential oil of *Agastache rugosa* Kuntze and its synergism with ketoconazole. **Lett. Appl Microbiol.**, v.36, p.111-115, 2003.

SHI, M.; LI, S.S.; ZHENG, C.; JONES, G.J.; KIM, K.S.; ZHOU, H.; KUBES, P.; MODY, C.H. Real-time imaging of trapping and urease-dependent

transmigration of *Cryptococcus neoformans* in mouse brain. **J. Clin. Invest.**, 3;120(5):1683-93, 2010.

SILVA, P.R.; RABELO, R.A.; TERRA, A.P.; TEIXEIRA, D.N. Susceptibility to antifungal agents among *Cryptococcus neoformans* varieties isolated from patients at a university hospital. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 2, p. 158-62, 2008.

SIONOV E, CHANG YC, GARRAFFO HM, KWON-CHUNG KJ. Heteroresistance to Fluconazole in *Cryptococcus neoformans* Is Intrinsic and Associated with Virulence. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.53(7), p.2804-15, 2009.

SLOAN, D.; DLAMINI, S.; PAUL, N.; DEDICOAT, M. Treatment of acute cryptococcal meningitis in HIV infected adults, with an emphasis on resource-limited settings. **Cochrane Database Syst. Rev.**, v.(4):CD005647, 2008.

SMOLKA, M.B.; AEBERSOLD. R. Proteome analyses using two dimensional gel eletrophoresis and mass spectrometry. In: (Ed.): Editora Humana Press, Proteome analyses using two dimensional gel eletrophoresis and mass spectrometry, 2002.

SORRELL, T.C. *Cryptococcus neoformans* variety *gattii*. **Med Mycol** v.39, p.155–168, 2001.

SORREL, T.C.; ELLIS, D.H.; Ecology of *Cryptococcus neoformans*. **Rev. Iberoam. Micol.**, v.14, p.42-43, 1997.

SPEICHER, D.W. Overview of proteome analysis. In: D. W. Speicher (Ed.). Proteome Analysis. Interpreting the Genome.: Elsevier, B.V, Overview of proteome analysis, p.375, 2004.

STEENBERGEN, J.N.; CASADEVALL, A. The origin and maintenance of virulence for the human pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. **Microbes and Infection**, v.5, p.667-675, 2003.

STEENBERGEN, J.N.; SHUMAN, H.A.; CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* interactions with amoeba suggest an explanation for its virulence and intracelular pathogenic strategy in macrophages. **Microbiology**, v. 98, p. 15245-15250, 2001.

STUDIER, F.W. Analysis of bacteriophage T7 early RNAs and proteins on slab gels. **J. Mol. Biol.**, v. 79, p. 237-48, 1973.

- SUGAR, A. M.; LIU, X.P. Combination antifungal therapy in treatment of murine pulmonary mucormycosis: roles of quinolones and azoles. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.44, p.2004–2006, 2000.
- SUGAR, A. M.; LIU, X.P.; CHEN, R.J. Effectiveness of quinolone antibiotics in modulating the effects of antifungal drugs. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.41, p.2518–2521, 1997.
- SUGAR, A.M. Use of amphotericin B with azole antifungal drugs: what are we doing? **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.39, p.1907-12, 1995.
- TAMOKOU, J.D.D.; TALA, M.F.; WABO, H.K.; KUIATE, J.R.; TANE, P. Antimicrobial activities of methanol extract and compounds from stem bark of *Vismia rubescens*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.124, p.571-575, 2009.
- TAY, S.T.; CHAI, H.C.; NA, S.L.; HAMIMAH, H.; ROHANI, M.Y.; SOO-HOO, T.S. The isolation, characterization and antifungal susceptibilities of *Cryptococcus neoformans* from bird excreta in Klang Valley, Malaysia. **Mycopathologia**, v.159, p.509-13, 2005.
- THAKUR, R.; SARMA, S.; KUSHWAHA, S. Prevalence of HIV-associated cryptococcal meningitis and utility of microbiological determinants for its diagnosis in a tertiary care center. **Indian J Pathol Microbiol.**, v.51, p.212-214, 2008.
- TOLKOFF-RUBIN, N.E.; RUBIN, R.H. Opportunistic fungal and bacterial infection in the renal transplant recipient. **J. Am. Soc. Nephrol.**, v.2, n.12 Suppl, p.S264-S269, 1992.
- TRILLES, L.; LAZÉRA, M.; WANKE, B.; THEELEN, B.; BOEKHOUT, T. Genetic characterization of environmental isolates of the *Cryptococcus neoformans* species complex from Brazil. **Medical Mycology**, v.41, p.383-90, 2003.
- TRILLES, L.; LAZÉRA, M. S.; 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.**, v.103, p.455-62, 2008.
- VAN VUURENA, S.F.; VILJOENB, A.M. In vitro evidence of phyto-synergy for plant part combinations of *Croton gratissimus* (Euphorbiaceae) used in African traditional healing, **Journal of Ethnopharmacology**, 2008.
- VERSTREPEN, K. J. & KLIS, F. M. Flocculation, adhesion and biofilm formation in yeasts. **Mol. Microbiol.**, v.60, n.1, p.5-15, 2006.

- WALGREN, J.L.; THOMPSON, D.C. Application of proteomic technologies in the drug development progress. **Toxicol. Lett.**, v.149, p.377-85, 2004.
- WASINGER, V.C.; CORDWELL, S.J.; CERPA-POLJAK, A.; YAN, J.X.; GOOLEY, A.A.; WILKINS, M.R.; DUNCAN, M.W.; HARRIS, R.; WILLIAMS, K. L.; HUMPHERY-SMITH, I. Progress with gene product mapping the mollicutes: *Mycoplasma genitalium*. **Electrophoresis**. Weinheim, v.16, p.1090-1094, 1995.
- WHITE, T.C.; KIEREN, A.M.; BOWDEN, R.A. Clinical, cellular, and molecular factor that contribute to antifungal drug resistance. **Clin. Microbiol. Reviews**, v.11, p.382-402, 1998.
- WILLIAMSON, E.M. Synergy and other interactions in phytomedicines, **Phytomedicine**, v.8, p. 401–409, 2001.
- WILKINS, M.R.; SANCHEZ, J.C.; GOOLEY, A.A.; APPEL, R.D.; HUMPHERY-SMITH, I.; HOCHSTRASSER, D.F.; WILLIAMS, K.L. Progress with proteome projects: Why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. **Biotechnology & genetic engineering reviews**, Newcastle, v.13, p.19-50, 1995.
- WILKINS, M.R., PASQUALI, C. et al. From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. **Biotechnonology** (N Y), v.14 (1), p.61-65, 1996.
- WILKINS, M.R., SANCHEZ, J.C. et al. Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. **Biotechnol Genet Eng Rev**, v.13, p.19-50, 1996.
- WINTERBOURN, C.C.; VISSERS, M.C.; KETTLE, A.J. Myeloperoxidase. **Curr. Opin. Hemtol.**, v.7; p.53-58, 2000.
- WITTMANN-LIEBOLD, B.; GRAACK, H.R. et al. Two-dimensional gel electrophoresis as tool for proteomics studies in combination with protein identification by mass spectrometry. **Proteomics**, v.6, p. 4688–4703, 2006.
- YAMADA, R.; HORIKAWA, K.; ISHIHARA, S.; HOSHINO, K.; KAWAGUCHI, T.; IYAMA, K.; MITSUYA, H.; ASOU, N. Successful treatment of *Aspergillus* liver abscesses in a patient with acute monoblastic leukemia using combination antifungal therapy including micafungin as a key drug. **Int J Hematol.**, v.91(4); p.711-715, 2010.
- YAMAMOTO, Y.; MAESAKI, S.; KAKEYA, H.; YANAGIHARA, K.; OHNO, H.; OGAWA, K.; HIRAKATA, Y.; TOMONO, K.; TASHIRO, T.; KOHNO, S.

Combination therapy with fluconazole and flucytosine for pulmonary cryptococcosis. **Chemotherapy**, v.43, p.436–441, 1997.

ZARAGOZA, O.; RODRIGUES, M.L.; DE JESUS, M.; FRASES, S.; DADACHOVA, E.; CASADEVALL, A. The capsule of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. **Advances in Applied Microbiology**. v.68, p.133-216, 2009.

ZARAGOZA, O.; CHRISMAN, C.J.; CASTELLI, M.V.; FRASES, S.; CUENCA-ESTRELLA, M.; RODRÍGUEZ-TUDELA, J.L.; CASADEVALL, A. Capsule enlargement in *Cryptococcus neoformans* confers resistance to oxidative stress suggesting a mechanism for intracellular survival. **Cell Microbiol.**, v. 10, p. 2043-2057, 2008.

ZARAGOZA, O.; ALVAREZ, M.; TELZAK, A.; RIVERA, J.; CASADEVALL, A. The relative susceptibility of mouse strains to pulmonary *Cryptococcus neoformans* infection is associated with pleiotropic differences in the immune response. **Infect Immun** v.75, p.2729–2739, 2007.

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.**, v.49, p.4358-4361, 2005.

ZARAGOZA, O.; FRIES, B.C.; CASADEVALL, A. Induction of the capsule growth in *Cryptococcus neoformans* by mammalian serum and CO₂. **Infection and Immunity**, v.71, p.6155-64, 2003.

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](#)