

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS

Suélen Andreia Rossi

“Estudo dos Mecanismos de Resistência e Virulência de Isolados de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* e Quantificação de Genes de Bomba de Efluxo pós Tratamento com Galatos de Alquila”

Araraquara

2014

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

Suélen Andreia Rossi

“Estudo dos Mecanismos de Resistência e Virulência de Isolados de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* e Quantificação de Genes de Bomba de Efluxo pós Tratamento com Galatos de Alquila”

Tese 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 Doutor.

Orientadora: Ana Marisa Fusco Almeida.

Co-orientadora: Maria José Soares Mendes Giannini.

Araraquara

2014

Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

R833e Rossi, Suélen Andreia
Estudo dos mecanismos de resistência e virulência de isolados de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* e quantificação de genes de bomba de efluxo pós tratamento com Galatos de Alquila / Suélen Andreia Rossi . – Araraquara, 2014
126 f.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia
Orientador: Ana Marisa Fusco Almeida
Coorientador: Maria José Soares Mendes Giannini

1. *Cryptococcus neoformans*. 2. *Cryptococcus gattii*. 3. Bomba de efluxo. 4. *Galleria mellonella*. 5. Galatos de Alquila . I. Almeida, Ana Marisa Fusco, orient. II. Giannini, Maria José Soares Mendes, coorient. III. Título.

CAPES: 40300005

*"Foi o tempo que dedicaste à tua rosa que a fez tão
importante"*

(Antoine de Saint-Exupéry - O pequeno príncipe)

Dedicatória

Dedico esse trabalho, primeiramente, a minha família. Aos meus pais, Luiz Antônio Rossi, Cleuza Creto Rossi e ao meu amado irmão Luiz Henrique Rossi. Sem vocês nada disso seria possível. Obrigada por todo carinho e incentivo. Agradeço a Deus por fazer parte desse círculo de amor, dedicação e respeito. Vocês são meus maiores exemplos! Amo vocês!

Dedico também a minha orientadora Profa. Dra. Ana Marisa Fusco Almeida, por toda dedicação dispensada para que esse trabalho fosse realizado. Obrigada pela atenção e pela confiança!

Ao professor Dr. Oscar Zaragoza Hernandez pela oportunidade de aprendizado e pela atenção dedicada. Foi um prazer trabalhar com você! Obrigada por tudo!

E claro, aos meus grandes amigos, Haroldo César de Oliveira, Caroline Maria Marcos, Patrícia Akemi Assato, Lílíana Scorzoni, Ana Carolina Alves de Paula e Silva, Fernanda Sangalli Leite e Rosângela Moraes da Silva. Muito obrigada pela amizade e dedicação! Esse trabalho também é de vocês. Tenho orgulho de ter-los como amigos!

Agradecimentos

A minha co-orientadora Profa. Dra. Maria José Soares Mendes Giannini pela confiança e contribuição desprendida para a evolução deste trabalho.

A grande família Micologia por toda ajuda e paciência. Vocês foram fundamentais para que eu pudesse chegar ao final dessa jornada. Cláudia, Haroldo, Panta, Laranja, Lili, Fer Sangalli, Carol, Jú, Tomate, Carol MG, Junya, Natália, Tati, Fer Gullo, Aline, Nayla, Regina, Jaque e muito outros que já passaram por esse laboratório, mas que ainda estão presentes em meu coração. Muito obrigada por tudo!

A Wanessa e a Mônica que em tão pouco tempo se tornarão mais que colegas de trabalho. E aos amigos e agregados da micologia, Renan, Amanda, Bel, Fer Porva, Cris, Guto, Talita, Sabrina, Tírene, Rosemira, Eliana e Marisinha. Vocês são especiais!

A todos do laboratório de Micologia do Instituto de Saúde Carlos III de Madri. Clara, Rocío, Sara, Cris Rueda, Pepa, Maria José, Ana, Ana Alastruey, Olga, Gema, Teresa, Alicia, Laura, Let, Cris Armentia e Cris Carballo, por me acolherem com tanto carinho e por me darem todo suporte necessário para que eu pudesse desenvolver meu trabalho. Vocês são incríveis!

Em especial agradeço a Nuria, Ana Cecília e a Emi pela dedicação e, principalmente, pela amizade. Muito obrigada por fazerem dos meus dias mais divertidos. Os seis meses que passei com vocês, com certeza, ficarão em meu coração. “Sois geniales! Saudade imensa!

Aos velhos e novos amigos, que tive a oportunidade de encontrar e conviver em Madri. Jesús, Alan, Michele, Gustavo e Ricardo. Sem vocês o sonho de trabalhar e viver em outro país não teria sido tão especial. Vocês são os tesouros que Madri me deu. Obrigada pelas lindas recordações! Os quiero mucho!

A todos os professores e funcionários do curso de pós-graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia, pelo apoio técnico e acadêmico dispensado para a evolução desse trabalho.

Este trabalho foi desenvolvido na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara/SP –
UNESP, sendo a doutoranda contemplada com bolsa CAPES.

Sumário:

1. Introdução	18
2. Objetivos Gerais	30
2.1. Objetivos específicos realizados.	30
2.1.1. <u>Triagem de substâncias puras e frações vegetais, anti-<i>Cryptococcus</i> sp. e avaliação da eficácia de drogas antifúngicas <i>in vitro</i> dos isolados selecionados;</u>	30
2.1.2. <u>Verificação da atividade sinérgica pela associação da molécula G16 com fluconazol;</u>	30
2.1.3. <u>Avaliação da expressão relativa dos genes <i>MDR1</i> e <i>AFR1</i> por PCR em Tempo Real de <i>Cryptococcus</i> spp., antes e após o contato com a molécula G16, bem como da expressão do gene <i>ERG11</i>;</u>	30
2.1.4. <u>Caracterização da virulência dos isolados selecionados a 30°C e 37°C;</u> ...	30
2.1.5. <u>Análise micromorfológica dos isolados de <i>C. neoformans</i> e <i>C. gattii</i>, resistentes e sensíveis a FLZ, durante a infecção em <i>G. mellonella</i>;</u>	30
2.1.6. <u>Análise micromorfológica dos isolados selecionados após indução capsular <i>in vitro</i>;</u>	30
3. Metodologia	30
3.1. <u>Seleção e Cultivo de isolados de <i>C. neoformans</i> e <i>C. gattii</i>.</u>	30
3.2. <u>Teste de sensibilidade frente à AmB e FLZ para confirmação do fenótipo dos isolados.</u>	31
3.3. <u>Teste sensibilidade frente ao ácido gálico e seus derivados.</u>	31
3.4. <u>Concentração Fungicida Mínima</u>	32
3.5. <u>Avaliação da atividade sinérgica entre o G16 e fluconazol.</u>	33
3.7. <u>Extração de RNA total na ausência de galato.</u>	35
3.8. <u>Extração de RNA total de todos os isolados após contato com galato de n-dodecila (G16) e Tacrolimus (FK506).</u>	35
3.9. <u>Síntese de cDNA fita simples</u>	36
3.10. <u>PCR em Tempo Real (Real Time PCR).</u>	36
3.11. <u>Condições de manipulação e incubação de larvas de <i>Galleria mellonella</i>.</u>	37
3.12. <u>Ensaio de virulência a 30°C e 37°C.</u>	37
3.13. <u>Curvas de Sobrevivência em <i>G. mellonella</i></u>	37
3.14. <u>Curva de crescimento a 30°C e 37°C.</u>	37
3.15. <u>Melanização da Hemolinfa.</u>	38
3.16. <u>Morfologia das células após infecção em <i>G. mellonella</i>.</u>	38
3.17. <u>Análise morfológica <i>in vitro</i>.</u>	38
3.18. <u>Ensaio de fagocitose em <i>G. mellonella</i>.</u>	38

4. Resultados	39
4.1. Teste de sensibilidade frente à fluconazol e anfotericina B	39
4.2. Expressão relativa gene <i>ERG11</i>	40
4.3. Teste sensibilidade frente ao ácido gálico e seus derivados	41
4.4. Teste de sinergismo e cálculo do índice de seletividade do galato n-dodecila	41
4.6. Virulência a 30°C e 37°C dos isolados de <i>C. neoformans</i> (26S, 27I e 30R) e dos isolados ambientais de <i>C. gattii</i> (118R e CL)	50
4.7. Curva de Sobrevivência com diferentes concentrações de inóculo	52
4.10. Morfologia das células após infecção em <i>G. mellonella</i>	55
4.11. Indução de cápsula <i>in vitro</i> a 37°C	57
4.12. Ensaio de fagocitose	58
5. Discussão	59
6. Conclusões	71
7. Bibliografia	73
Capítulo II – Participações em Artigos Publicados	98

Lista de Figuras:

Figura 1. Ácido gálico e seus derivados obtidos por síntese parcial (ésteres).

Figura 2. Expressão relativa do gene *ERG11* dos isolados clínicos sequenciais de *C. neoformans* e dos isolados ambientais de *C. gattii*. A) Isolados 26S, 27I e 30R de *C. neoformans*; B) Isolados CL e 118R de *C. gattii*; (***) $P < 0.001$.

Figura 3. Taxa de viabilidade celular em células epiteliais das linhagens A549 e MRC-5 após contato galatos de alquila. A) Taxa de viabilidade celular de células epiteliais da linhagem MRC-5 após contato com galatos de alquila classificados de G1 à G17 em ampla faixa de concentração; B) Taxa de viabilidade celular de células epiteliais da linhagem A549 após contato com galatos de alquila classificados de G1 à G17 em ampla faixa de concentração; C) Taxa de viabilidade celular de células epiteliais da linhagem MRC-5 após contato com galato de n-dodecila (G16) em ampla faixa de concentração; D) Taxa de viabilidade celular de células epiteliais da linhagem A549 após contato com galato de n-dodecila (G16) em ampla faixa de concentração.

Figura 4. Valores de IC_{50} (mg/L) determinados para galatos de alquila classificados de G1 à G17 em linhagens de células epiteliais de pulmão MRC-5 e A549. A) Valores de IC_{50} (mg/L) para galatos de alquila classificados de G1 à G17 em linhagem de célula epitelial de pulmão MRC-5; B) Valores de IC_{50} (mg/L) para galatos de alquila classificados de G1 à G17 em linhagem de célula epitelial de pulmão A549.

Figura 5. Expressão relativa dos isolados clínicos sequenciais de *C. neoformans*, antes e após tratamento com G16 e FK506. A) Cepa ATCC 90012; B) Isolado sensível a FLU 26S; C) Isolado com sensibilidade intermediária 27I; D) Isolado resistente *in vitro* 30R;

Figura 6. Expressão relativa do gene *MDR1* nos isolados ambientais de *C. gattii*, antes e após tratamento com G16 e FK506. A) Cepa ATCC 56990; B) Isolado sensível a FLU CL; C) Isolado resistente *in vitro* 118R;

Figura 7. Expressão relativa do gene *AFR1* nos isolados clínicos sequenciais de *C. neoformans*, antes e após tratamento com G16 e FK506. A) Cepa ATCC 90012; B) Isolado sensível a FLU 26S; C) Isolado com sensibilidade intermediária 27I; D) Isolado resistente *in vitro* 30R;

Figura 8. Expressão relativa do gene *AFR1* nos isolados ambientais de *C. gattii*, antes e após tratamento com G16 e FK506. A) Cepa ATCC 56990; B) Isolado sensível a FLU CL; C) Isolado resistente *in vitro* 118R;

Figura 9. Ensaio de virulência em *G. mellonella*. A) Isolados clínicos sequenciais de *C. neoformans*, 26S, 27I e 30R incubados a 37°C; B) Isolados clínicos sequenciais de *C. neoformans*, 26S, 27I e 30R incubados a 30°C; C) Isolados ambientais de *C. gattii* CL e 118R incubados a 37°C; D) Isolados ambientais de *C. gattii* CL e 118R incubados a 30°C;

Figura 10. Curva de sobrevivência dos isolados 30R, ATCC 56990, CL e 118R com inóculos a 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 2.5×10^7 e 5×10^7 . A) Isolado *C. neoformans* 30R; B) Isolado *C. gattii* 118R; C) ATCC 56990 *C. gattii*; D) Isolado *C. gattii* CL;

Figura 11. Curva de Crescimento isolados clínicos sequenciais de *C. neoformans* e isolados ambientais de *C. gattii* a 30°C e 37°C.

Figura 12. Quantificação da melanização na hemolinfa nos tempos 1, 5 e 24 horas de infecção com os isolados de *C. gattii*. A) Cepa ATCC 56990; B) Isolado sensível a FLU, CL; C) Isolado resistente a FLU, 118R;

Figura 13. Quantificação da melanização entre os isolados de *C. neoformans* e *C. gattii*. A) Cepas ATCCs 90012 de *C. neoformans* e 56990 de *C. gattii*; B) Isolados sensíveis a FLU, 26 *C. neoformans* e CL *C. gattii*; C) Isolados resistentes a FLU, 30R *C. neoformans* e 118R *C. gattii*;

Figura 14. Tamanho da célula total em micrômetros dos isolados de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* após infecção em *G. mellonella*. A) ATCC 90012 e isolados clínicos sequenciais de *C. neoformans* 26S, 27I e 30R; B) ATCC 56990 e isolados ambientais de *C. gattii* CL e 118R.

Figura 15. Tamanho da cápsula em micrômetros dos isolados de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* após infecção em *G. mellonella*. A) ATCC 90012 e isolados clínicos sequenciais de *C. neoformans* 26S, 27I e 30R; B) ATCC 56990 e isolados ambientais de *C. gattii* CL e 118R.

Figura 16. Microscopia dos isolados de *C. neoformans* e *C. gattii* antes da infecção (T0) e depois da infecção em *G. mellonella* (T1, 24 horas) e (T3, 72 horas); A) *C. neoformans* ATCC 90012; B) Isolado *C. neoformans* 26S; C) *C. neoformans* isolado 27I; D) *C.*

neoformans isolado 30R; E) *C. gattii* ATCC 56990; F) Isolado *C. gattii* CL e G) Isolado *C. gattii* 118R.

Figura 17. Indução de cápsula *in vitro* dos isolados clínicos de *C. neoformans* e dos isolados ambientais de *C. gattii*. Tamanho da cápsula demonstrado em Micrômetros; A) Isolados clínicos de *C. neoformans* 26S, 27I e 30R; B) Isolados ambientais de *C. gattii* CL e 118R; Diferença significativa para todos os isolados quando comparados com a situação controle (Sb); $P < 0,05$;

Figura 18. Índice de fagocitose após infecção em *G. mellonella*. A) Isolados 26S, 27I e 30R de *C. neoformans*. B) Isolados 118R e CL de *C. gattii*. As cepas ATCC 90012 de *C. neoformans* e 56990 de *C. gattii* foram utilizadas como cepas controle do experimento. **One-way ANOVA:** * $P < 0,05$.

Lista de quadros:

Quadro 1. Exemplo do esquema de combinação na placa de microdiluição com a concentração do G16 (em negrito) e do Fluconazol (em itálico), para o teste do “tabuleiro de xadrez”. C-, controle negativo; C+, controle positivo.

Quadro 2. Resultado do teste de sensibilidade dos isolados frente às drogas sintéticas anfotericina B e fluconazol realizado de acordo com o documento M27-A3 (2008) - Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para Determinação da Sensibilidade de Leveduras à Terapia Antifúngica: Norma aprovada - do CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*). Valores em mg/L.

Quadro 3. Resultados do teste de sensibilidade dos isolados testados com moléculas de galato de alquila. Concentração inibitória mínima e concentração fungicida mínima em mg/L.

Quadro 4. Valores do índice de concentração inibitória fracionada (ICIF) para a combinação de galato de n-dodecila (G16) e fluconazol frente a isolados de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*, e tipo de atividade obtida em cada caso.

Quadro 5. Valores do índice de Seletividade (IS) encontrados para o galato de alquila G16, frente às células epiteliais de pulmão das linhagens MRC-5 e A549 para isolados de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*.

Lista de abreviaturas:

Anfotericina B – AmB

The American Type Culture Collection - ATCC

Cetoconazol – CTZ

Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI

Concentração fungicida mínima – CFM

Concentração inibitória fracionada - CIF

Concentração inibitória mínima – CIM

Dimetil sulfoxido - DMSO

5-fluoritosina – 5FC

Fluconazol – FLZ

Glyceraldehydo 3-phosphato dehidrogenase - GAPDH

Glucuronoxilomanogalactana - GXM Gal

Glucuronoxilomanana – GXM

Índice de seletividade - IS

Infecções fúngicas invasivas - IFI

Itraconazol – ITZ

Randon Amplified Polimorphic *DNA*– RAPD

Sabouraud - Sb

Tampão salina fosfato - PBS

Síndrome de Imunodeficiência Adquirida - SIDA

Sistema nervoso central – SNC

Voriconazol – VCR

Yeast Extract Peptone Dextrose - YEPD

Resumo

O aumento de micoses invasivas e o desenvolvimento de mecanismos de resistência de algumas espécies de fungos, frente aos fármacos utilizados na terapia, têm sido preocupante. O tratamento antifúngico, geralmente é agressivo e o surgimento da resistência antifúngica acrescenta dificuldades adicionais no tratamento dessas infecções. *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* são os principais agentes etiológicos da criptococose, e afetam principalmente pacientes imunodeprimidos. Nesse trabalho foi realizada a caracterização morfológica e da virulência de três isolados clínicos de *C. neoformans* e dois isolados ambientais de *C. gattii* em *Galleria mellonella*, além da análise do nível de expressão dos genes *MDR1* e *AFR1* envolvidos no funcionamento de bomba de efluxo, através da quantificação relativa por PCR (*polimerase chain reaction*) em tempo real. Uma vez esses genes quantificados, esses isolados foram usados na prospecção de moléculas sintéticas para verificação da atividade inibitória dos genes selecionados, após o contato com as mesmas. Os isolados foram classificados como sensível (26S), sensibilidade intermediária (27I) e resistente (30R) da espécie *neoformans* e da espécie *C. gattii*, um foi resistente (118R) e outro sensível (CL), *in vitro*, a fluconazol. As moléculas selecionadas para os testes foram o ácido gálico e seus derivados sintéticos, e os melhores resultados observados foram obtidos a partir dos galatos de alquila G11, G12, G14, G15, G16 e G17, apresentando ótima atividade antifúngica contra os isolados testados, em especial os galatos G14, G16 e G17, obtendo ótima atividade antifúngica. O galato de n-dodecila (G16), foi selecionado para os demais testes apresentando atividade aditiva no teste de sinergismo, quando utilizado em associação com fluconazol, reduzindo os valores de CIM para o mesmo, o que mostra a possível utilização da molécula não só isolada, como também associada com este fármaco. Os resultados da expressão gênica mostraram que a expressão tanto do gene *MDR1* quanto o gene *AFR1* foram inibidos após tratamento com o galato de n-dodecila, o que torna essa molécula promissora também para a utilização com finalidade de inibição da atividade de bombas de efluxo. Com os ensaios de virulência em *G. mellonella*, foi possível observar que há diferença na virulência entre os isolados clínicos sequenciais de *C. neoformans*, onde 26S se mostrou mais virulento quando comparado com o isolado 30R, e os isolados ambientais de *C. gattii* se mostraram menos virulentos, independente da sensibilidade ao fluconazol. Foi observado também que as células dos isolados sensíveis ao fluconazol de *C. gattii* aumentaram significativamente de tamanho após infecção em *G. mellonella*, quando comparados com o isolado sensível. Assim, a partir desses resultados foi possível verificar que a resistência adquirida por esses isolados foi inversamente proporcional à virulência e que o galato de n-dodecila foi eficaz na inibição dos genes envolvidos em bomba de efluxo.

Abstract

The increase of invasive mycoses and the development of antifungal resistance by some fungi species have been worrying. The antifungal treatment is usually aggressive and inefficient, and the emergence of antifungal resistance increases the difficulties in treating these fungi infections. *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* are the main etiologic agents of cryptococcosis and especially affect immunocompromised patients. In this work the *Galleria mellonella*, was used to perform the morphologic characterization as well as determine the virulence of three sequential clinical isolates of *C. neoformans* and two isolates environmental of *C. gattii*. In addition, was held the analysis of genes expressions (*MDR1*, *ERG11* and *AFR1*), that are involved in efflux pumps and ergosterol synthesis, by real time PCR (*polimerase chain reaction*) assay. After these characterizations the isolates were used in the prospecting of synthetic molecules to verify the inhibitory activity of selected genes. After incubation *in vitro* with fluconazole the *C. neoformans* isolates were classified as sensitive (26S), intermediate sensitivity (27I) and resistant (30R), and the *C. gattii* isolates were resistant (118R) and the other sensitive (LC). The galic acid molecules and their synthetic derivatives were tests against *C. neoformans* and *C. gattii* isolates. The best results were obtained from alkyl gallates G11, G12, G14, G15, G16 and G17 which shows a great antifungal activity, especially G14, G16 e G17. The gallate n-dodecyl (G16), was select to others tests once presented additive activity in synergism test with fluconazole, decreasing the MIC values. The gene expression assay shows that both isolates expressed *MDR1* and *AFR1* (encoding efflux pumps), and the G16 was capable to inhibit these genes which makes this molecule promising for inhibiting efflux. With virulence assays using the *G. mellonella* was possible observed that has a difference between the sequential clinical isolates of *C. neoformans*, and the 26S shows be more virulent when compared to 30R isolate. The environmental isolates were lesser virulent, independent of them sensibility to fluconazole. Other important observation was that *C. gattii* isolates cells sensitive to fluconazole increased their size after infection to *G. mellonella*. Thus, from these results it was verified that the resistance acquired by these strains was inversely related to virulence.

1. Introdução

Nos últimos anos, o aumento da população imunossuprimida foi correlacionado ao aumento da incidência de infecções fúngicas sistêmicas, incluindo a criptococose (Perfect, 2014). É estimado, que globalmente, haja cerca de um milhão de casos de meningite criptocócica por ano, e a maioria dos casos está relacionada à pacientes com Síndrome de Imunodeficiência Adquirida (SIDA), sendo 80% desses casos na África (Park *et al.*, 2009). Apesar do aumento ao acesso a terapia antiretroviral, a incidência e mortalidade por criptococose meningocefalite ainda é alta, e frequentemente o diagnóstico da SIDA é muitas vezes em conjunto com o diagnóstico de criptococose (Meya *et al.*, 2010; Sabiiti e May, 2012). Além disso, a incidência de criptococose meningocefalite não associada a SIDA é crescente no noroeste da América do Norte e no extremo leste da Ásia, causada por cepas hipervirulentas de *Cryptococcus gattii* e *Cryptococcus neoformans*, respectivamente (Chau *et al.*, 2010). Outros fatores de risco têm surgido nos últimos anos. Qualquer indivíduo que esteja sujeito à terapia imunossupressora ou quimioterápica está em risco de doença criptocócica, uma vez que essa micose é a terceira infecção fúngica constatada em pacientes transplantados (Singh *et al.*, 2008; Singh, Forrest e Practice, 2009).

Cryptococcus neoformans e *Cryptococcus gattii* são os principais agentes etiológicos da criptococose, porém outras espécies de *Cryptococcus*, as quais são classicamente consideradas não patogênicas, como *Cryptococcus albidus*, *Cryptococcus laurentii*, entre outras, estão emergindo como patógenos oportunistas ao longo dos anos (Bernal-Martinez *et al.*, 2010; Cleveland, Gelfand e Rao, 2013).

Essas leveduras fazem parte do *Phylum Basidiomyceto*, são capsuladas e a infecção se dá através da inalação das formas infectantes da levedura, os basidiósporos, os quais são encontrados no meio ambiente (Martinez e Casadevall, 2006; Chaturvedi e Chaturvedi, 2011; Negroni, 2012). Em decorrência da infecção, as manifestações, geralmente, ocorrem na forma pulmonar e cerebral, muitas vezes causando o estado mais severo da doença, meningocefalite (Chau *et al.*, 2010; Kessler, Al Kharrat e Kourtis, 2010; Chaturvedi e Chaturvedi, 2011; Negroni, 2012).

As leveduras colonizam, primeiramente, o tecido alveolar, caracterizando a infecção pulmonar como infecção primária da criptococose, a qual pode se desenvolver em forma aguda, subaguda ou crônica (Stie e Fox, 2012). Nos tecidos pulmonares, a doença pode permanecer em estágio de latência por anos, ou manifestar-se por meio de sinais e sintomas bem variáveis, desde forma assintomática ou desenvolver pneumonia grave e insuficiência respiratória (Brizendine, Baddley e Pappas, 2011). Em indivíduos saudáveis, a infecção é efetivamente combatida pela resposta imunológica pró-inflamatória de células-T,

porém em pacientes imunodeprimidos, a levedura se difunde facilmente por via hematogênica, colonizando vários órgãos, sendo seu principal sítio de infecção, o sistema nervoso central (SNC) (Stie e Fox, 2012). Infecções no SNC acometem mais de 70% dos casos de criptococose em pacientes com SIDA e essa alta incidência pode ser explicada pelo tropismo que a levedura apresenta pelo SNC e pela capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica (Kwon-Chung, Polacheck e Popkin, 1982). No SNC, a levedura pode acometer as meninges e se disseminar através do líquido cefalorraquidiano (LCR) causando manifestações, principalmente na forma de meningite; pode também causar lesões na massa encefálica levando a um quadro de encefalite e meningoencefalite, ou ainda, pode desenvolver abscesso (criptococomas) (Kwon-Chung *et al.*, 2000).

Baseada na reação imunológica polissacarídica da cápsula é possível classificar as espécies *C. neoformans* e *C. gattii* em quatro sorotipos: A, B, C e D, sendo sorotipos A e D *C. neoformans* var. *grubii* e *C. neoformans* var. *neoformans*, respectivamente, e *C. gattii* classificados como sorotipos B e C. Além do sorotipo híbrido, AD, de *C. neoformans* (Boekhout *et al.*, 1997; Franzot, Salkin e Casadevall, 1999; Springer e Chaturvedi, 2010). Já, sobre os tipos moleculares a espécie *C. neoformans* pode ser agrupada em AFLP1/VNI e AFLP1A/VNII (sorotipo A), AFLP3/VNIII (Sorotipo AD) e AFLP2/VNIV (sorotipo D), e *C. gattii* AFLP1/VGI, AFLP6/VGII, AFLP5/VGIII e AFLP7/AFLP10/VGIV (sorotipos B e C) (Meyer *et al.*, 2009; Favalessa *et al.*, 2014). Porém, recentemente, o tipo molecular VGII tem sido subdividido em VGIIa, VGIIb e VGIIc, de acordo com as diferenças polimórficas encontradas e devido a diferença na sensibilidade à antifúngicos como anfotericina B (AmB), 5 flucitosina (5FC) e fluconazol (FLU) (Byrnes *et al.*, 2009; Byrnes *et al.*, 2010; Chowdhary *et al.*, 2011; Espinel-Ingroff, Aller, *et al.*, 2012; Espinel-Ingroff, Chowdhary, *et al.*, 2012).

C. neoformans possui distribuição universal e está relacionado a pacientes imunodeprimidos sendo uma das principais causas de morbidade e mortalidade nesses indivíduos (Li e Mody, 2010). *Cryptococcus gattii*, tradicionalmente, é associado a indivíduos imunocompetentes, mas pacientes imunodeprimidos também estão em risco de infecção (Jobbins *et al.*, 2010; Harris *et al.*, 2011). *Cryptococcus gattii* prevalece em regiões com climas tropicais e subtropicais, porém tem sido associado a surtos em humanos e animais, sendo isolado em países de clima temperado, o que demonstra que o fungo pode se adaptar a novos ambientes anteriormente desconhecidos (Kidd *et al.*, 2004; Byrnes e Heitman, 2009; Hagen *et al.*, 2012).

Por muitos anos, *C. neoformans* têm sido isolado de habitats de pombos em áreas urbanas, enquanto que *C. gattii* permaneceu desconhecido (Anzai *et al.*, 2014). Depois do primeiro isolamento de *C. gattii* em detritos de *Eucalyptus camaldulensis* por Ellis e Pfeiffer

(1990), acreditava-se que o seu habitat natural seria distinto de *C. neoformans*. Porém, após o surto ocorrido na ilha de Vancouver, Canadá, em 2004, essa suposição vem sendo revisada, pois *C. gattii* têm sido isolado a partir de amostras de diferentes espécies de árvores, solo, ar e até mesmo de água (Kidd *et al.*, 2004; Galanis *et al.*, 2010; Springer e Chaturvedi, 2010).

No Brasil, criptococose causada pela espécie *neoformans*, ocorre em todas as regiões do país. No entanto, *C. gattii* atua, predominantemente, como patógeno primário, acometendo indivíduos sadios, no Norte e no Nordeste, sendo esporádicos os casos nas regiões Sul e Sudeste (Severo *et al.*, 2009; Mora *et al.*, 2010; Pinto Junior *et al.*, 2010).

Martins *et al.*, (2011) avaliaram 63 casos de meningite criptocócica na região do Piauí e Maranhão, e foi verificada a propagação da infecção por *C. gattii* no norte do Brasil, mostrando que a distribuição geográfica da espécie *gattii* é muito mais ampla do que o relatado na literatura (Gullo *et al.*, 2013).

Recentemente, Falessa *et al.*,(2014) indentificaram 27 isolados clínicos obtidos de 27 pacientes diagnosticados com criptococose admitidos no Hospital Universitário de Cuiabá, Mato Grosso. Nesse trabalho foram identificados, dos 27 pacientes, 14 eram de indivíduos infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), e desses, 13 isolados eram *C. neoformans* VNI e um isolado de *C. gattii* VGII. Havia 13 pacientes que eram HIV negativo, e desses, 10 isolados eram *C. gattii* e três *C. neoformans*. Mostrando mais uma vez que a espécie *C. neoformans* foi mais prevalente em indivíduos imunocomprometidos e a espécie *C. gattii* em pacientes sadios, corroborando os dados já encontrados na literatura, e também demonstrando que *C. gattii* vem sendo encontrado no centro-oeste brasileiro.

Em vários lugares na cidade de Araraquara, São Paulo, através de um estudo realizado por Teodoro, et al., (2013), foi verificado a presença de *Cryptococcus* spp.. Foi analisado um total de 87 amostras ambientais e 66,6% (58) foram positivas para o gênero *Cryptococcus*. Dos 58 isolados analisados, 3,5% (2) foram identificados como *C. ater*, 1,7% (1) *C. laurentii*, 1,7% (1) *C. luteolus*, 5,2% (3) *C. gattii*, 17,2% (10) como *C. neoformans* e 70,7% (41) como *Cryptococcus* spp; Dos pontos de coleta com amostras positivas, 10,3% (6) foram escolas; 10,3% (6) foram parques, praças ou ruas; 24,2% (14) eram barracos abandonados; e 55,2% (32) eram hospitais ou nas proximidades de hospitais e nenhum isolado se demonstrou com sensibilidade reduzida as drogas AmB, FLU, itraconazol (ITZ) e voriconazol (VCR).

O aumento de micoses invasivas e o desenvolvimento de mecanismos de resistência de algumas espécies de fungos, frente às drogas utilizadas na terapia, têm sido

preocupante, uma vez que o tratamento antifúngico, geralmente é agressivo, tóxico e pode ser ineficiente (Spinello, 2013). O flucozanol, permacene ainda, como um importante agente para tratamento de *Candida* spp. e outras leveduras, porém a introdução de outros agentes, como os triazóis (pozaconazol e voriconazol) e as equinocandinas (anidulafungina, caspofungina, e micafungina) aumentou as opções de tratamento das infecções fúngicas invasivas (IFI). Embora a detecção da resistência fúngica a esses agentes seja difícil, tanto o aumento de infecções fúngicas por isolados resistentes, tanto por alteração nos pontos de corte de alguns isolados a agentes já conhecidos, têm sido relatados em pacientes com exposição a terapias de longo prazo (Fera, La Camera e De Sarro, 2009; Wilke, 2011).

Atualmente, os testes de susceptibilidade *in vitro* aos antifúngicos são essenciais para a gestão do paciente e para determinação de cepas resistentes as drogas utilizadas. Porém, embora os ensaios de determinação da concentração inibitória mínima (CIM) forneçam informações indispensáveis para determinação da sensibilidade não é possível saber como o patógeno irá responder ao tratamento e não são precisos em relação à resposta *in vivo* (Cowen, 2001; Cowen, Kohn e Anderson, 2001). Entretanto a resistência aos antifúngicos *in vitro* nem sempre se correlaciona com a resistência clínica. A resistência *in vitro* pode ser classificada em primária ou intrínseca, quando o fungo é resistente sem prévio contato com o antifúngico, ou secundária/adquirida quando existe exposição ao antifúngico. Já a resistência clínica é a falta de resposta do paciente infectado quando em tratamento antifúngico. Os melhores resultados de correlação *in vitro* – clínica, é encontrada em pacientes HIV positivos com candidíase orofaríngea devido aos pontos de cortes já estabelecidos (Pappas *et al.*, 2004; Rogers, 2006; Rodriguez-Tudela *et al.*, 2008).

Definição de resistência antifúngica em *C. neoformans*, nos laboratórios, é difícil devido à ausência de interpretações dos pontos de corte para esse fungo (Govender *et al.*, 2011). Tanto o documento M27-A3 (2008) - Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para Determinação da Sensibilidade de Leveduras à Terapia Antifúngica: Norma aprovada - do CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*), quanto o EUCAST *European Committee Antimicrobial Susceptibility Testing* não possuem padronizados pontos de cortes para FLZ ou outro agente antifúngico para *C. neoformans* (Cheong e McCormack, 2013). Dessa forma, melhorias na capacidade desses métodos de susceptibilidade antifúngica para determinar padrões de resistência emergentes, juntamente com a caracterização molecular dos mecanismos desenvolvidos pelos fungos, fornecem informações indispensáveis para otimização e eficácia da terapia antifúngica (Cuenca-Estrella e Rodriguez-Tudela, 2010; Pfaller e Diekema, 2010; Pfaller, 2012).

Existem quatro classes de antimicóticos utilizados atualmente. Os polienos, 5FC, os azóis e as equinocandinas. Dentre os polienos, o mais importante membro desta classe é AmB, principalmente contra infecções fúngicas sistêmicas devido à baixa ocorrência de resistência adquirida ou intrínscica para este fármaco, e também devido à sua ampla gama de atividade. No entanto, a administração desta é acompanhada por diversos efeitos colaterais, principalmente em nível dos rins e do fígado (Ellis, 2002; Barrett *et al.*, 2003). 5FC é um inibidor de ácidos nucleicos e possui um amplo espectro de atividade, sendo ativa contra *Candida* e *Cryptococcus* sp. (Stiller *et al.*, 1983). Na prática clínica, frequentemente, a utilização deste agente terapêutico é realizada em combinação com outro antifúngico, como a anfotericina B. No entanto, a toxicidade elevada da anfotericina B e o aumento adicional dos efeitos adversos de 5FC, podem levar a combinação terapêutica desta, com azóis (Bennett *et al.*, 1979; Patel, 1998; Perfect *et al.*, 2010) Mesmo quando o tratamento com anfotericina B e 5FC é disponível, a mortalidade está entre 15-30%, e essa porcentagem é ainda maior em países de baixa renda, onde esses antifúngicos não são acessíveis (Lortholary, 2007); (Sabiiti e May, 2012). São utilizados também os azóis (fluconazol, cetoconazol, itraconazol) que afetam a síntese de ergosterol, inibindo a enzima lanosterol 14C desmetilase codificada pelo gene *ERG11* e as equinocandinas (casposfungina, anifulafungina, micafungina) que afetam a síntese da parede celular do fungo por inibição da β -1,3 D-glucana sintase (White, Marr e Bowden, 1998; Morschhäuser, 2010). As equinocandinas são utilizadas contra infecções por *Candida* sp. e *Aspergillus* sp., mas não são eficientes contra *Cryptococcus* sp. (Perlin, 2007).

A estratégia de tratamento antifúngico ideal para pacientes com criptococose permanece em questão, apesar das orientações da Sociedade Americana de Doenças Infecciosas (*Infectious Diseases Society of America- IDSA*) de 2010 (Perfect *et al.*, 2010; Bratton *et al.*, 2013), o tratamento da meningoencefalite criptocócica é baseado em um pequeno número de ensaios clínicos, mas a maioria dos estudos recentes tem sido nas áreas de recursos limitados e podem não refletir a situação com antifúngicos mais recentes em ambientes médicos avançados (Jackson e Hosseinipour, 2010; Warkentien e Crum-Cianflone, 2010). Sem tratamento a criptococose é fatal e mesmo quando o tratamento está disponível, 20% a 60% dos doentes na África morrem da doença, e muitos indivíduos desenvolvem doenças recorrentes (Jarvis, Meintjes e Harrison, 2010).

De acordo com as orientações da Sociedade Americana de Doenças Infecciosas (Perfect *et al.*, 2010), existe discussão da terapia utilizada para meningoencefalite criptocócica em três grupos de risco: (1) indivíduos com SIDA; (2) transplantados e (3) indivíduos não infectados pelo HIV e não transplantados, havendo ainda, recomendações específicas para outras populações de risco exclusivo, como crianças, mulheres grávidas,

peças em ambientes de recursos limitados, e aqueles com infecção por *Cryptococcus gattii*. Assim, três princípios importantes foram adotados para a escolha e manutenção da terapia: (1) recorrer aos fármacos fungicidas, AmB ou 5FC, como terapia de ataque, seguido por regimes de supressão com FLZ; (2) a importância do diagnóstico precoce e tratamento do aumento da pressão intracraniana; e (3) o uso de formulações lipídicas de AmB em pacientes com insuficiência renal.

Resistência antifúngica, desenvolvida pelos fungos, também é uma dificuldade para o manutenção da terapia. Mecanismos de resistência descritos a AmB são raros e podem estar associados com alteração na composição do ergosterol da membrana fúngica, a qual pode ser mediada pelo aumento da atividade da catalase ou defeitos na biossíntese de ergosterol (Joseph-Horne *et al.*, 1996; Rodríguez-Tudela e Martínez-Suarez, 1997; Pemán, Cantón e Espinel-Ingroff, 2009; Mesa-Arango *et al.*, 2014). Já para FLZ, há diversos relatos do desenvolvimento de mecanismos de resistência por alguns fungos patogênicos, principalmente *Candida* sp., seja por falha terapêutica ou de forma intrínseca (Rex *et al.*, 1995; Sanglard *et al.*, 1997; Minea *et al.*, 2014).

Castanheira *et al.*, (2014) realizaram um estudo de sensibilidade com 1717 isolados de fungos frente a nove agentes antifúngicos utilizando os documentos de Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para Determinação da Sensibilidade de Leveduras e Fungos Filamentosos à Terapia Antifúngica do CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*). Dos 1717 isolados, 1487 foram identificados como *Candida* spp., 109 *Aspergillus* spp., e 86 como leveduras, onde 52 isolados eram *C. neoformans* e o restante identificados como diferentes espécies. Após os ensaios, resistência às equinocandinas entre os isolados de *Candida* spp. foi baixa. Já resistência em *Candida glabrata* foi constatada em isolados com mutações no gene *fkx*, sendo esses também resistentes a FLZ. *Candida tropicalis* e *C. glabrata* demonstraram altas taxas de resistência a FLZ, com 6,1% e 6,9%, respectivamente. Voriconazol foi ativo contra todas as espécies de *Candida*, inibindo de 91% a 99,7% dos isolados. Frente aos isolados de *Aspergillus* spp., as equinocandinas foram ativas, e para os isolados de *C. neoformans* todos os agentes antifúngicos, com exceção das equinocandinas e posaconazol, foram eficientes.

A resistência desenvolvida pelos microrganismos é baseada, principalmente, em quatro mecanismos principais: (a) redução do acúmulo do antifúngico no interior da célula fúngica, (b) diminuição da afinidade do agente terapêutico com o seu alvo, (c) utilização de vias compensatórias, e (d) formação de estruturas multicelulares, os biofilmes (Sanglard, Coste e Ferrari, 2009; Vandeputte, Ferrari e Coste, 2012).

Em *C. neoformans*, o relato de cepas resistentes a FLZ, tem sido estudado, e o surgimento de isolados clínicos resistentes ocorre, frequentemente, em pacientes com AIDS, durante a terapia de manutenção com azólicos (Armengou *et al.*, 1996; Venkateswarlu *et al.*, 1997; Berg, Clancy e Nguyen, 1998; Rodero *et al.*, 2003; Andrade-Silva *et al.*, 2013; Van Wyk *et al.*, 2014). Alguns trabalhos já verificaram que a resistência aos azóis, em *C. neoformans*, pode estar associada a alterações na enzima lanosterol 14C desmetilase, codificada pelo gene *ERG11*(Venkateswarlu *et al.*, 1997; Rodero *et al.*, 2003).

Um estudo realizado por Andrade-Silva *et al.*, (2013), em Uberaba, Minas Gerais, Brasil, o perfil de resistência de 176 isolados de *C. neoformans* e *C. gattii* foi analisado, sendo 95 isolados clínicos e 81 ambientais. Dentre esses, oito isolados clínicos eram *C. gattii*. Foi possível observar que 10,5% dos isolados clínicos de *C. neoformans* foram resistentes a anfotericina B (AmB) e 6,2% dos isolados ambientais foram resistentes ao fluconazol (FLZ). Os valores de corte para os isolados ambientais e clínicos foram de 64 e 16µg/mL de FLZ e 1 e 2µg/mL de AmB, respectivamente. Todos os isolados de *C. gattii* apresentaram alta sensibilidade à maioria dos medicamentos avaliados. Os isolados clínicos apresentaram menor susceptibilidade a AmB e itraconazol (ITZ), quando comparados com os isolados ambientais, enquanto os últimos apresentaram menor susceptibilidade para FLZ, voriconazol (VCR), e cetoconazol (CTZ).

Resistência mediada por alterações no gene *ERG11* tem sido amplamente documentado em *C. albicans* nos últimos anos. Utilizando diferentes abordagens, as mutações F72L, F145L, G464S, Y132F, R467K, S405 e L321F pertencentes à sequência da lanosterol 14C desmetilase, foram correlacionadas à resistência aos azólicos. (Sanglard, Ischer, Koymans, *et al.*, 1998; Asai *et al.*, 1999; Favre, Didmon e Ryder, 1999; Kelly, Lamb e Kelly, 1999; Kelly *et al.*, 1999; Kudo *et al.*, 2005; Oliveira Carvalho *et al.*, 2013)Recentemente, através de um estudo com isolados de *C. glabrata*, foi constatado algumas alterações no gene *fks* (F659Y, F659del, S663F, S663P) que podem ser responsáveis pela resistência as equinocandinas nesses isolados (Castanheira *et al.*, 2014). A superexpressão de genes, principalmente o *ERG11*, também já foi descrita como um dos mecanismos que podem estar envolvidos na resistência aos azóis em *C. albicans*, embora estemuitas vezes, aja em conjunto com outras alterações que diminuem a sensibilidade (White, Marr e Bowden, 1998; Cowen *et al.*, 2000).

A resistência em fungos também pode estar relacionada à superexpressão de genes transportadores envolvidos no efluxo de compostos, os transportadores da família ABC (*ATP-Binding Cassette*) e os transportadores MSF (*Major Superfamily Facilitator*)(Sanglard, Coste e Ferrari, 2009). Em *C. albicans*, o gene *CaMDR1* pertence aos transportadores MSF

e a super expressão desse gene confere, geralmente, resistência a FLZ (Fling *et al.*, 1991; Sanglard *et al.*, 1995). Quando *MDR1* foi deletado, observou-se que a sensibilidade dos mutantes de *C. albicans* aumentou frente a várias drogas (Goldway *et al.*, 1995), exibindo diminuição da sensibilidade aos fármacos relevantes como FLZ e voriconazol (VCR), mas não a outros azóis como cetoconazol (CTZ) e itraconazol (ITZ) quando expressados em *Saccharomyces cerevisiae* (Sanglard *et al.*, 1995; Niimi *et al.*, 2006; Wakieć *et al.*, 2007; Morschhäuser, 2010).

A superexpressão dos genes *Cdr1* e *Cdr2*, genes homólogos aos transportadores ABC em *C. albicans*, são responsáveis pela resistência em alguns isolados clínicos recuperados de pacientes com longas terapias antifúngicas (Sanglard, Coste e Ferrari, 2009). Outros estudos demonstraram que mutantes homocigotos de *C. albicans*, com deleção de *CDR1* foram sensíveis aos azólicos, enquanto mutantes que foram submetidos à deleção homocigótica de *CDR2* não foram susceptíveis aos azóis (Sanglard *et al.*, 1996; 1997). No entanto, a combinação de ambas as deleções, *CDR1* e *CDR2*, resultou num aumento da sensibilidade em comparação com a eliminação somente de *CDR1*, sugerindo que *CDR2* contribui para a resistência aos azóis (Sanglard *et al.*, 1997; Shapiro, Robbins e Cowen, 2011).

Em *C. neoformans*, dois transportadores ABC já foram experimentalmente caracterizados, *CneMDR1* e *AFR1* (Thornewell, Peery e Skatrud, 1997; Posteraro *et al.*, 2003) *AFR1* é um transportador que está sendo bem caracterizado nesse fungo (Shapiro, Robbins e Cowen, 2011). Em *Cryptococcus* sp. também já foi descrito que há um padrão de resposta celular aos azóis diferente, denominado heteroresistência. Esse fenômeno é caracterizado por surgirem subpopulações resistentes a FLZ, a partir de uma cepa sensível. Essas subpopulações se adaptam a concentrações superiores a CIM e são capazes de reverterem à sensibilidade após serem cultivadas, repetidamente, em meios livres do fármaco (Sionov *et al.*, 2009). Em um estudo realizado com 130 amostras de isolados clínicos e ambientais de *C. neoformans*, recuperados antes do ano de 1979, observou que todos os isolados apresentaram heteroresistência, confirmando que esse fenômeno não está associado à terapia (Sionov *et al.*, 2009). Heteroresistência em *C. neoformans*, pode estar relacionada à duplicação cromossômica, uma vez que foi observado que ambos os sorotipos, A e D, apresentaram duplicação cromossômica em resposta a pressão de FLZ. Aqueles isolados que demonstraram adaptação a concentrações mais elevadas do que a CIM encontrada, apresentaram duplicação no cromossomo 1, e ao passo que pressão seletiva do agente terapêutico era aumentada, induzia duplicações em outros cromossomos. Após a remoção do fármaco, os isolados retornaram ao nível de susceptibilidade inicial, perdendo também a dissomia cromossômica (Sionov *et al.*, 2010). Dessa forma, esse

mecanismo de adaptação pode contribuir para falhas terapêuticas em pacientes em terapia com FLZ (Mondon *et al.*, 1999). Em estudos posteriores, também foi verificado, que isolados clínicos e ambientais de *C. gattii*, também apresentaram o fenótipo da heteroresistência, e que esse fenômeno pode estar relacionado ao aumento da virulência (Varma e Kwon-Chung, 2010).

Devido ao tratamento contínuo e muitas vezes ineficiente de algumas infecções fúngicas oportunistas, a caracterização de novos alvos nos fungos e a modelagem de novas drogas pode oferecer além de viabilidade sócio-econômica, tecnológica e industrial, tratamento apropriado e eficiente baseado na melhor especificidade da atividade de novas moléculas, principalmente nos casos de emergência de cepas resistentes (Martinez-Rossi, Peres e Rossi, 2008). Criptococose continua a ser uma questão de gestão difícil, com pouco desenvolvimento de medicamentos novos ou estudos definitivos recentes (Perfect *et al.*, 2010).

Através de diversos estudos, compostos fenólicos, tais como o ácido gálico (ácido 3,4,5-triidroxi-benzóico) e seus derivados (ésteres), já se mostram promissores por conter diversas atividades biológicas. Essas moléculas, também conhecidas como galatos, já são amplamente utilizados como antioxidantes pelas indústrias farmacêuticas e alimentícias (Kubo, Fujita e Nihei, 2002; Kubo *et al.*, 2002). E, além disso, já foram descritas outras atividades biológicas importantes para este grupo de moléculas, principalmente mecanismos anticancerígenos, por obter seletividade citotóxica potente a várias linhagens de células tumorais (Fiuza *et al.*, 2004; Kitagawa, Nabekura, Takahashi, *et al.*, 2005; Savi *et al.*, 2005; Veluri *et al.*, 2006; Frey *et al.*, 2007), bem como antibacterianos e propriedades antifúngicas (Fujita e Kubo, 2002; Kubo *et al.*, 2003; Stapleton *et al.*, 2004; Leal *et al.*, 2009; Silva., 2012; Silva *et al.*, 2013; Ito *et al.*, 2014). Atividades anti-HSV-1 e anti-HIV-1, também já foram demonstradas em estudos realizados com ácido gálico e seus derivados (Kratz *et al.*, 2008; Modi *et al.*, 2013).

As diferenças na virulência, e na susceptibilidade de algumas cepas a certos antifúngicos, podem estar relacionadas aos diferentes tipos moleculares. Alguns estudos já demonstram que, além dos oito tipos moleculares principais identificados a partir de técnicas moleculares (*C. neoformans*, VNI, VNII, VNIII, VNIV, e *C. gattii*, VGI, VGII, VGIII e VGIV), VGII tem tido maior interesse por diversos autores nos últimos anos, devido ao aparecimento dos subtipos, VGIIa, VGIIb e VGIIc (Kidd *et al.*, 2004; Bovers, Hagen e Boekhout, 2008; Byrnes *et al.*, 2010); (Hagen *et al.*, 2010);(Chong *et al.*, 2010),(Espinell-Ingroff, Aller, *et al.*, 2012), sendo constatado que através desses estudos que há maior influência na susceptibilidade a FLZ dependendo do tipo molecular.

Recentes estudos epidemiológicos também constataram que, leveduras isoladas de diferentes regiões geográficas (África, Oriente Médio, Ásia-Pacífico e algumas regiões da América Latina) demonstraram sensibilidade alterada para FLZ. Diferente do encontrado em isolados da Europa e da América do Norte. Dentre os isolados utilizados nesse estudo, a levedura mais comum foi *C. neoformans*, com 32,9% (Pfaller *et al.*, 2009).

A cápsula polissacarídica está entre os principais fatores de virulência que as leveduras do gênero *Cryptococcus* apresentam. Esta cápsula protege as células dos processos fagocíticos, sendo crucial para o desenvolvimento da doença, interferindo na função das células-T (Feldmesser *et al.*, 2000; Rodrigues e Nimrichter, 2012). É definida como um complexo superficial de redes compostos por manoproteínas (MPs), glucuronoxilomanana (GXM) e glucuronoxilomanogalactana (GXM Gal), apresentando, cada componente uma ação imunológica, por exemplo, a GXM atua como um importante modulador imunológico, por inibir diretamente a proliferação de células-T; a GXM Gal apresenta a capacidade de indução de apoptose de células-T humanas, inibindo a imunidade mediada por células e também a apoptose em macrófagos; MPs são imunogênicas e induzem a acumulação de TNF α e outras citocinas, IL-12, IL-6, IL-10, IFN- γ e IL-8 em monócitos (Martinez e Casadevall, 2005; Li e Mody, 2010; Cordero *et al.*, 2011; Rodrigues e Nimrichter, 2012; Vecchiarelli e Monari, 2012). Dessa forma, o polissacarídeo capsular contribui para a virulência através de múltiplos efeitos deletérios sobre a resposta imunológica, que por sua vez facilita a propagação de fungos nos tecidos podendo levar o hospedeiro a morte (Zaragoza *et al.*, 2009).

Várias propriedades relacionadas com a virulência foram atribuídas à GXM criptocócica. A primeira evidência foi descrita por Bulmer, *et al.*, (1967), onde avaliaram o comportamento de cepas capsuladas e acapsuladas em camundongos e como resposta observaram que as cepas acapsuladas apresentaram-se como cepas avirulentas. Estes resultados foram posteriormente confirmados por Fromtling, *et al.*, (1982).

Outros fatores de virulência descritos são a deposição de melanina na parede celular, a qual está diretamente relacionada com a patogenicidade da levedura. A melanina, formada a partir de L-Dopa, precursor comum das catecolaminas (dopamina, adrenalina e noradrenalina) do SNC do hospedeiro, e por consequência, a presença destas é um dos prováveis mecanismos responsáveis pelo neurotropismo da levedura (Nosanchuk e Casadevall, 2003). Além disso, há outros fatores como a melanina que confere proteção contra fagocitose e morte oxidativa por macrófagos; o crescimento a 37°C, sendo termotolerantes a temperatura corpórea dos mamíferos; e enzimas extracelulares, como as lacases, que mediam a formação de melanina, a fosfolipase B, que regula a integridade da

parede celular e contribui para invasão do fungo no hospedeiro e a urease, que catalisa a hidrólise de uréia para amônia e carbamato facilitando a invasão do fungo no sistema nervoso central (Casadevall e Pirofski, 1999; 2003; Kronstad *et al.*, 2011).

Adaptação de fungos patogênicos ao hospedeiro é a chave para a compreensão das doenças causadas por estes microrganismos. Durante a infecção, respostas adaptativas são acionadas para evadir a resposta imune e sobreviver no hospedeiro (Zaragoza, 2011). Essas mudanças morfológicas são importantes para o curso da infecção, e fornece ao fungo mecanismos para alcançar novos ambientes nutricionais, evadir a resposta imune do hospedeiro, e se disseminar através do organismo (Zaragoza, 2011).

Em diversos estudos em virulência, e para avaliação da eficácia de antifúngicos em diversos fungos, são utilizados modelos murinos (Okawa, Miyauchi e Kobayashi, 2008). Ao longo dos últimos anos, tem havido um interesse particular no desenvolvimento de modelos alternativos para estudar a virulência microbiana (Mylonakis e Aballay, 2005; Chrisman *et al.*, 2011; Muhammed *et al.*, 2012). *Galleria mellonella* é uma Lepidoptera que tem sido empregada com sucesso como modelo para estudar a virulência de fungos patogênicos, como *Cryptococcus neoformans* *Cryptococcus gattii* (Mylonakis *et al.*, 2005; García-Rodas *et al.*, 2011; Firacative, Duan e Meyer, 2014), *Candida albicans* e outras espécies (Brennan *et al.*, 2002; Rueda, Cuenca-Estrella e Zaragoza, 2014), e *Aspergillus fumigatus* (Cheema e Christians, 2011; Gomez-Lopez *et al.*, 2014). Além disso, também tem sido utilizado para investigar a eficácia de drogas antifúngicas no tratamento de infecções (Cowen *et al.*, 2009; Kelly e Kavanagh, 2011; Mesa-Arango *et al.*, 2012; Scorzoni *et al.*, 2013).

Estes modelos têm proporcionado notável conhecimento em diferentes aspectos da infecção microbiana (Fedhila *et al.*, 2010) e foram desenvolvidos por apresentarem inúmeras vantagens em relação aos modelos de mamíferos, como baixo custo, facilidade de manuseio, possibilidade de trabalhar em larga escala, além de atender às tendências mundiais quanto ao sofrimento animal nas questões éticas e legais atendendo ao princípio dos 3Rs (*Reduction, Replacement and Refinement*) e a lei AROUCA, bem como da necessidade de se desenvolver métodos alternativos aos animais.

O uso de *G. mellonella* na avaliação dos aspectos de virulência e patogênese das infecções fúngicas é de extrema utilidade, sendo recomendada também ao estudo das defesas do hospedeiro contra agentes patogênicos fúngicos, uma vez que essa Lepidoptera possui um sistema imune inato, composto por diferentes tipos de hemócitos, que desempenham um papel na defesa contra o patógeno (Mowlds *et al.*, 2010; Junqueira, 2012).

Em isolados de *C. albicans*, este modelo foi utilizado para estudar o papel da filamentação na virulência e neste estudo cinco cepas com os genes para filamentação BCR1, FLO8, KEM1, SUV3 e TEC1 mutados, apresentavam incapacidade de filamentação nos isolados. Interessantemente, a mutação por deleção do gene FLO8 presente em uma das cepas resultou também na incapacidade de formação de hifas e alterações na formação de biofilmes no modelo *G. mellonella*, apresentando virulência reduzida, assim como ocorreu *in vitro*. Adicionalmente, para determinar se as mutações afetavam as interações das cepas mutantes de *C. albicans* na resposta sistema imune de *G. mellonella*, foi analisado o índice de fagocitose através os hemócitos da hemolinfa da larva, mostrando que o modelo também produziu resultados compatíveis com a redução da virulência das cepas mutantes (Fuchs *et al.*, 2010).

Em nosso laboratório, *G. mellonella* foi utilizada para determinação de modelo alternativo de infecção por *C. krusei* para estudo de virulência e avaliação da eficácia terapêutica. Esta espécie patogênica e naturalmente resistente ao fluconazol matou as larvas dependendo das doses de inoculação da levedura e o fluconazol não foi capaz de oferecer proteção às larvas, enquanto que para o tratamento com os fármacos convencionais da terapia para esta espécie (AmB, VCR e caspofungina) houve eficiência na terapêutica, mostrando que o modelo não mamífero pode ser utilizado para esta finalidade (Scorzoni *et al.*, 2013). Em outro estudo conduzido em nosso grupo este modelo foi recentemente utilizado para estudo da virulência e eficácia terapêutica de AmB e molécula antifúngica de fonte natural (maitenina oriunda da planta *Maitenus illicifolia*) do Projeto BIOTA FAPESP em colaboração com o Instituto de Química da UNESP de Araraquara, frente à espécies patogênicas de *Cryptococcus* utilizando isolados categorizados quanto à capacidade de formação de biofilmes. Isolados de *C. neoformans* e *C. gattii* após indução para formação de biofilmes foram mais virulentos em *G. mellonellae* aCIM necessária para proteção das larvas foi condizente com o aumento da CIM apresentada nos ensaios *in vitro* quando comparados com a CIM das formas planctônicas. Adicionalmente maitenina foi tão eficaz quanto AmB sobre os biofilmes, mostrando que o modelo pode ser utilizado em estudos de prospecção *in vivo* de fármacos antifúngicos (Benaducci, 2013.).

Nesta proposta, seguindo as tendências para utilização deste modelo alternativo, foi estudar a virulência e possíveis alterações morfológicas, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, de isolados resistentes e sensíveis a FLZ, verificando a relação resistência e virulência nestes isolados clínicos e ambientais. Com os dados moleculares será possível entender os mecanismos de resistência ocorridos e as alterações na virulência destes isolados.

2. Objetivos Gerais

Realizar caracterização da virulência de três isolados clínicos sequenciais de *C. neoformans* e dois isolados ambientais de *C. gattii* *in vivo* e *in vitro*. Analisar o nível de expressão dos genes *MDR1*, *AFR1* e *ERG11*, envolvidos no funcionamento de bomba de efluxo e na síntese de ergosterol, através da quantificação relativa por PCR (*polimerase chain reaction*) em tempo real e uma vez esses genes quantificados, utilizar esses isolados para prospecção de moléculas de fontes naturais e sintéticas para verificação da atividade inibitória na expressão dos genes *MDR1* e *AFR1* após o contato com as mesmas.

2.1. Objetivos específicos realizados.

2.1.1. Triagem de substâncias puras e frações vegetais, anti-*Cryptococcus* sp. e avaliação da eficácia de drogas antifúngicas *in vitro* dos isolados selecionados;

2.1.2. Verificação da atividade sinérgica pela associação da molécula G16 com fluconazol;

2.1.3. Avaliação da expressão relativa dos genes *MDR1* e *AFR1* por PCR em Tempo Real de *Cryptococcus* spp., antes e após o contato com a molécula G16, bem como da expressão do gene *ERG11*;

2.1.4. Caracterização da virulência dos isolados selecionados a 30°C e 37°C;

2.1.5. Análise micromorfológica dos isolados de *C. neoformans* e *C. gattii*, resistentes e sensíveis a FLZ, durante a infecção em *G. mellonella*;

2.1.6. Análise micromorfológica dos isolados selecionados após indução capsular *in vitro*;

3. Metodologia

3.1. Seleção e Cultivo de isolados de *C. neoformans* e *C. gattii*.

Para a realização dos ensaios foram selecionados três isolados clínicos sequenciais de *C. neoformans* var. *grubii* sendo um resistente (30R), um com sensibilidade intermediária (27I) e outro sensível (26S) a FLZ, *in vitro* (Matsumoto *et al.*, 2007). Esses isolados foram recuperados de um paciente com SIDA com histórico de recidivas por falha terapêutica e foram caracterizados por tipagem molecular e sensibilidade aos antifúngicos da terapêutica usual. Adicionalmente, estes foram analisados por técnica de RAPD *Random Amplified Polymorphic DNA* e apresentaram perfis genéticos idênticos (dados não mostrados). Foram empregados também dois isolados ambientais de *C. gattii* os quais, um possui sensibilidade reduzida a FLZ (118R) (Raso *et al.*, 2004) e outro é sensível (CL) ao mesmo fármaco *in vitro*. Como cepa padrão foi utilizada a ATCC (*The American Type Culture Collection*) de *C. neoformans* 90012 e a cepa de *C. gattii* 56990, pertencentes à micoteca do Laboratório de Micologia Clínica do Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Araraquara e Instituto Adolfo Lutz, cedidos em colaboração.

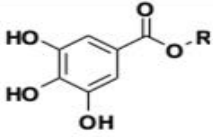
3.2. Teste de sensibilidade frente à AmB e FLZ para confirmação do fenótipo dos isolados.

Todos os isolados foram testados frente aos fármacos fluconazol e anfotericina B, de acordo com o documento M27-A3 (2008) - Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para Determinação da Sensibilidade de Leveduras à Terapia Antifúngica: Norma aprovada - do CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*). As faixas de concentração dos agentes terapêuticos utilizados foram de 128 a 0,125 µg/mL para fluconazol e de 16 a 0,0321µg/mL para anfotericina B.

3.3. Teste sensibilidade frente ao ácido gálico e seus derivados.

O ácido gálico e seus derivados foram obtidos através do projeto Biota-FAPESP e Bioprospecta-FAPESP do Instituto de Química, UNESP, Araraquara, Brasil (Morais *et al.*, 2010). Essa avaliação foi realizada com o ácido gálico e seus derivados semissintéticos, gerados por síntese parcial (ésteres n-alquil), demonstrados na figura 1, de acordo com o documento M27-A3 (2008) do CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*), com adição de glicose e modificações para o teste com as substâncias citadas (Scorzoni *et al.*, 2007). Como controle do teste, foi utilizadas as cepas ATCC 90012 de *C. neoformans* e 56990 de *C. gattii*. Os inóculos utilizados foram preparados a partir de repiques de 48 horas em tampão salina fosfato (PBS), ajustados para uma concentração de 2,5 a 5 x 10⁶ células/mL. Na sequência a concentração dos inóculos em RPMI foi ajustada até a concentração final na placa de 5,0x10² a 2,5x10³. Foram realizadas leituras visuais após 48 horas de incubação a 37°C em agitação (150 rpm). A concentração inibitória mínima foi considerada a menor em que se observou a inibição total do crescimento fúngico.

Figura 1. Ácido gálico e seus derivados obtidos por síntese parcial (ésteres n-aquilo) (De Paula E Silva *et al.*, 2014).

			
R	G1	gallic acid	H
	G2	methyl gallate	CH ₃
	G3	ethyl gallate	CH ₂ CH ₃
	G4	<i>n</i> -propyl gallate	(CH ₂) ₂ CH ₃
	G5	<i>i</i> -propyl gallate	CH(CH ₃) ₂
	G6	<i>n</i> -butyl gallate	(CH ₂) ₃ CH ₃
	G7	<i>n</i> -pentyl gallate	(CH ₂) ₄ CH ₃
	G9	<i>i</i> -butyl gallate	CH ₂ CH(CH ₃) ₂
	G10	<i>n</i> -hexyl gallate	(CH ₂) ₅ CH ₃
	G11	<i>n</i> -heptyl gallate	(CH ₂) ₆ CH ₃
	G12	<i>n</i> -octyl gallate	(CH ₂) ₇ CH ₃
	G14	<i>n</i> -decyl gallate	(CH ₂) ₉ CH ₃
	G15	<i>n</i> -undecyl gallate	(CH ₂) ₁₀ CH ₃
	G16	<i>n</i> -dodecyl gallate	(CH ₂) ₁₁ CH ₃
	G17	<i>n</i> -tetradecyl gallate	(CH ₂) ₁₃ CH ₃

3.4. Concentração Fungicida Mínima

Após a leitura dos valores de CIM realizada no teste descrito anteriormente, 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 35°C, verificou-se o crescimento nos locais em que foram inoculadas e comparadas com a leitura da microplaca. Desta forma, verificou-se qual a concentração em que não houve crescimento, sendo esta denominada de CFM (concentração fungicida mínima).

3.5. Avaliação da atividade citotóxica do galatos de alquila.

Para o teste de citotoxicidade foram empregadas duas linhagens de células epiteliais de pulmão, a A549 (linhagem tumoral) e a MRC-5 (linhagem normal). A atividade citotóxica dos galatos foi avaliada através do ensaio do MTT (brometo de (3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio), utilizado na concentração de 5mg/mL.

A avaliação da viabilidade celular pelos métodos colorimétricos com sais tetrazólicos, como a reação com o sal de MTT, é definida pela redução do sal em derivado azul de formazana, o qual é um precipitado formado pela ação da enzima succinato desidrogenase, produto da respiração mitocondrial; desta forma, este método avalia de forma quantitativa a sobrevivência e proliferação celular, uma vez que a conversão do MTT em formazana ocorre somente em células vivas e a quantidade do precipitado é proporcional ao número de células vivas (Ferrari, Fornasiero e Isetta, 1990). O precipitado de formazana apresenta coloração azul e com adição de um solvente orgânico é possível sua solubilização.

Os galatos foram avaliados nas concentrações de 62,5 a 0,002 mg/L e as soluções de trabalho foram preparadas a partir de soluções estoque e diluídas em meio específico para

cada linhagem celular nas placas previamente preparadas com as células. Inicialmente o meio de cultura foi retirado e foram adicionados 100 µL de cada diluição de cada galato por poço. As placas foram incubadas a 37°C, 5% de CO₂ ao abrigo de luz por 24 horas. Na sequência as soluções foram retiradas e adicionados 10 µL da solução de MTT; então as placas foram incubadas novamente a 37°C por 4 horas, conforme descrito por (Denizot e Lang, 1986). Decorrido o tempo de incubação a solução de MTT foi retirada e foram adicionados 100 µL de isopropanol para diluir o precipitado formado nos poços onde as células encontravam-se vivas, e desta forma realizar a leitura pela alteração da cor do meio de amarelo para violeta. Como controle positivo do teste foi utilizado peróxido de hidrogênio.

As leituras espectrofotométricas foram realizadas em leitor de microplacas ELISA com comprimento de onda de 570 nm. A porcentagem de células viáveis foi calculada pela fórmula: Células viáveis % = média do teste x 100 / média do controle negativo.

As análises de citotoxicidade foram realizadas com os galatos classificados de G1 à G17 (Fig. 1) em três experimentos independentes. Utilizou-se também um controle negativo com células não tratadas, sendo esta leitura considerada um total de 100% de células vivas. A análise estatística foi realizada através do método ANOVA e complementada pelo teste de Bonferroni.

3.6. Avaliação da atividade sinérgica entre o G16 e fluconazol.

A combinação de substâncias foi baseada no procedimento estabelecido pelo CLSI para microdiluição em caldo para teste de sensibilidade antifúngica (CLSI, 2008) e conforme descrito por (Leite, 2010). 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. A concentração final de cada substância utilizada no teste variou de 64,0 a 0,125 µg/ml para FLZ e de 4,0 a 0,063 µg/ml do G16. Na coluna 1, de A à D foi adicionado 200µL de meio de cultura como controle negativo, enquanto que de E à H, 100µL de RPMI com 100µL de inoculo, caracterizando o controle positivo. Na linha H, de 2 a 11 e na coluna 12 de A à H foram colocadas as drogas isoladamente. Em seguida, 50µL de uma das substâncias foi adicionada às colunas 2-11, de A à G, em diferentes concentrações (cada coluna possui a mesma concentração). Da mesma forma, 50µL da outra substância foi adicionado nas linhas A-G, de 2-11, também em diferentes concentrações (cada linha com a mesma concentração). Assim, em cada placa serão avaliadas duas substâncias isoladas e combinadas contra apenas um microrganismo (Leite, 2010). A concentração final do inoculo utilizado foi de $5,0 \times 10^2 - 2,5 \times 10^3$ UFC/mL, o qual foi adicionado 100µL em todos os poços, exceto no controle negativo. As placas foram incubadas à 35°C, 150 rpm e lidas visualmente após 48 horas. O resultado do teste confirmatório é a menor concentração capaz de inibir completamente o crescimento da levedura. Para verificar o efeito combinatório dos

compostos, adotou-se o índice de concentração inibitória fracionada (ICIF). 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 dividida pela CIM da fração 1 quando ela é usada isoladamente. A combinação é definida como sinérgica quando o ICIF é menor ou igual a 0,5; aditiva quando o ICIF é maior que 0,5 e menor ou igual a 1,0; indiferente quando o ICIF é maior que 1,0 e menor ou igual a 4,0; e antagônico quando o ICIF é maior que 4,0. (Rodriguez-Tudela et al., 2003, Johnson et al., 2004).

Quadro1: Exemplo do esquema de combinação na placa de microdiluição com a concentração do G16 (em negrito) e do Fluconazol (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-	64 <i>4</i>	32 <i>4</i>	16 <i>4</i>	8 <i>4</i>	4 <i>4</i>	2 <i>4</i>	1 <i>4</i>	<i>0,5</i> <i>4</i>	<i>0,25</i> <i>4</i>	<i>0,125</i> <i>4</i>	4
B	C-	64 2	32 2	16 2	8 2	4 2	2 2	1 2	<i>0,5</i> 2	<i>0,25</i> 2	<i>0,125</i> 2	2
C	C-	64 1	32 1	16 1	8 1	4 1	2 1	1 1	<i>0,5</i> 1	<i>0,25</i> 1	<i>0,125</i> 1	1
D	C-	64 0,5	32 0,5	16 0,5	8 0,5	4 0,5	2 0,5	1 0,5	<i>0,5</i> 0,5	<i>0,25</i> 0,5	<i>0,125</i> 0,5	0,5
E	C+	64 0,25	32 0,25	16 0,25	8 0,25	4 0,25	2 0,25	1 0,25	<i>0,5</i> 0,25	<i>0,25</i> 0,25	<i>0,125</i> 0,25	0,25
F	C+	64 0,125	32 0,125	16 0,125	8 0,125	4 0,125	2 0,125	1 0,125	<i>0,5</i> 0,125	<i>0,25</i> 0,125	<i>0,125</i> 0,125	0,125
G	C+	64 0,063	32 0,063	16 0,063	8 0,063	4 0,063	2 0,063	1 0,063	<i>0,5</i> 0,063	<i>0,25</i> 0,063	<i>0,125</i> 0,063	0,063
H	C+	64	32	16	8	4	2	1	<i>0,5</i>	<i>0,25</i>	<i>0,125</i>	0,031

3.7. Cálculo do índice de seletividade do galato n-dodecila (G16).

O índice de seletividade (IS), definido para a substância em questão, é calculado a partir da razão da medida do IC₅₀ para cada linhagem celular, e a concentração inibitória mínima (CIM) determinada para a substância teste em questão ($SI = IC_{50} / CIM$), e é considerado significativo quando IS for maior do que 10, ou seja, para valores de IS maiores que 10, pode-se classificar a substância mais seletiva para o patógeno e menos tóxica para as células testadas, garantindo, desta forma, a segurança e a eficácia da molécula, dessa forma foi constatado que a partir da análise dos valores de IS encontrados (Villar *et al.*, 2008; Vicente *et al.*, 2009). Os dados do IC₅₀ foram obtidos e cedidos pelo nosso grupo (De Paula E Silva *et al.*, 2014).

3.8. Extração de RNA total na ausência de galato.

Extração de RNA total foi realizada da fase logarítmica dos isolados após crescimento em YEPD (*Yeast Extract Peptone Dextrose*), usando o método do Trizol® (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA) de acordo com instruções do produto. A concentração e pureza do RNA foi determinado usando NanoVue™ Plus Spectrophotometers, (GE Healthcare) na absorbância de 260nm (OD₂₆₀) e a pureza através da média entre OD₂₆₀/OD₂₈₀.

3.9. Extração de RNA total de todos os isolados após contato com galato de n-dodecila (G16) e Tacrolimus (FK506).

A extração de RNA total dos isolados selecionados foi realizada conforme o item acima, após o contato desses com as substâncias, galato de n-dodecila (G16) e tacrolimus (FK506) (Sigma-Aldrich, Brazil) para verificar se essas substâncias influenciam na expressão dos genes *MDR1* e *AFR1*. O FK506 é um inibidor de calcineurina e nesse estudo foi utilizado como controle positivo. Os isolados foram crescidos em meio YEPD à 37°C com agitação (150 rpm) por 24 horas. Posteriormente, as células foram lavadas com PBS estéril e 1,5 gramas de células foram transferidas para um tubo do tipo Falcon. Cada isolado foi submetido a três tratamentos diferentes, sendo eles: G16, FK506 e DMSO (dimetil sulfoxido - Sigma-Aldrich, Brazil). A concentração selecionada para o tratamento com o G16 foi de cerca de 500 vezes a CIM encontrada para os isolados, baseado no fato de que a quantidade de células contidas em 1,5 gramas é muito maior do que a quantidade de células usadas para o teste de sensibilidade. A concentração usada de FK506 foi de 10 µM, baseado em trabalhos que mostram que esta concentração já possui atividade inibidora de efluxo (Pereira Rangel *et al.*, 2010). Todas as concentrações foram calculadas para um volume final de 5 mL em PBS. Como controle, foi utilizado DMSO na mesma quantidade utilizada na solubilização do G16 no teste, eliminando qualquer tipo de interferência deste

nos resultados. Os tubos foram mantidos a 35°C com agitação, overnight. O tratamento realizado com as substâncias seguiu a metodologia utilizada por (Kelly e Kavanagh, 2010), com modificações.

3.10. Síntese de cDNA fita simples

A síntese da primeira fita de cDNA foi realizada em uma reação contendo 1µg de RNA total, 10pmol/mL da sequência iniciadora (5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCGGG-3') e essa mistura foi aquecida por 2 minutos a 72°C. Em seguida foi acrescentado 10pmol/mL do oligo dT modificado (5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACT(30)N1N, onde N=A, C, G ou T; N1=A, G ou C), 2µL de uma mistura de dNTPs (10 mM), 2µL de RNaseOUT (40U/mL) (Life), 0,4µL de DTT (100mM), 1,2µL de cloreto de magnésio (50mM), 2µL da enzima transcriptase reversa (200U/mL) (RT Superscript II - Life) e 4µL de tampão 5X (Tris-HCl 250mM pH 8,3; KCl 375mM; MgCl₂ 15mM). Esta reação foi incubada a 42°C durante 1 hora e trinta minutos. Após este período foi adicionado 80µL de TE (Tris-HCl 10mM; EDTA 1mM pH 8,0) e aquecida por mais 7 minutos a 72°C. Todas as amostras foram mantidas a -20°C.

3.11. PCR em Tempo Real (Real Time PCR)

Foram utilizados iniciadores específicos para os genes *MDR1* de *Cryptococcus neoformans*, (código de acesso: U62930.1) sense – CGGTCGATTAACCACGTCTT, antisense – GCAGACGTCTCGGGAGTAAG; *MDR1* de *Cryptococcus gattii*, (código de acesso: XM_003191751.1) sense – TAACTCCCGAAACTGCTGCT, antisense – AAGCCAAGTCGCTAGGAACA; *AFR1* de *Cryptococcus* sp., (código de acesso: AJ318062.2) sense – GAACAGCAGGACACTCACGA, antisense – GTTTCGGAACGTGTTGAGGT; e *ERG11* de *Cryptococcus neoformans* (código de acesso AY265353) sense - TGCTCATGCAGCAGAAGAAG; antisense – GAGGTCGAGAGTGGCAGAAG; *ERG11* *Cryptococcus gattii* (código de acesso JF965442.1) – sense – CGAGTCCCGTGACAAGTATG; antisense –TAAGCTTCC TCGGCAGAGAC. O desenho de todos os primers foi feito utilizando o programa Primer3plus (www.bioinformatics.nl/primer3plus), utilizando as sequências gênicas depositadas no Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>). As reações foram realizadas utilizando-se quantidades necessárias de cDNA e de SYBR green ROX mixture (Fermentas), e quantidades suficientes de cada primer, variando as concentrações de 0,5µM ou 0,7µM. Para todas as amostras foram, primeiramente, realizadas testes de otimização dos primers para determinar a menor concentração que gera máxima amplificação. As reações foram realizadas com temperatura inicial de 50°C por 2 minutos, seguido por 10

minutos a 95°C. Depois, 40 ciclos de 95°C por 15 segundos, seguidos de anelamento e síntese a 60°C por um minuto. Em seguida, a análise da curva de *melting* foi realizada a partir de emissão de sinal correspondente a um único produto. As reações foram realizadas com o aparelho Applied Biosystems 7500 cycler. Todos os dados foram analisados por $2^{-\Delta\Delta CT}$. O gene GAPDH (glyceraldehydo 3-phosphato dehydrogenase) foi utilizado como gene de referência. A análise estatística foi realizada através da comparação dos dados pelo método ANOVA, complementado pelo teste de Tukey.

3.12. Condições de manipulação e incubação de larvas de *Galleria mellonella*.

Para todos os experimentos utilizamos *G. mellonella* em estágio larvário. Antes da infecção, foi realizada a assepsia das pró-patas com etanol 70%. Suspensões de leveduras foram injetadas nas larvas com auxílio de seringas Hamilton (Hamilton, EUA) de 10µL. A inspeção das larvas foi realizada e a morte foi avaliada por falta de movimento. Para cada condição, cerca de 20 larvas foram utilizadas e cada experimento foi realizado em triplicata.

3.13. Ensaios de virulência a 30°C e 37°C.

Para esse experimento, foram separadas larvas de *G. mellonella* entre 0,2 - 0,3 gramas em placas de Petri, formando grupos de 8 a 10 larvas. Para cada isolado foram selecionadas dois grupos e após a infecção essas foram monitoradas por oito dias mantidas a 37°C. A concentração do inóculo utilizado foi de 1×10^6 ufc/larva de cada isolado e como controle do ensaio foi usado grupos inoculados com PBS e com a cepa ATCC de *C. neoformans* 90012 e de *C. gattii* 56990. Esse ensaio foi realizado no laboratório de micologia do instituto de saúde Carlos III em Madri sob a supervisão do Prof. Dr. Oscar Zaragoza Hernandez.

3.14. Curvas de Sobrevivência em *G. mellonella*

Ensaio realizado com os isolados que se demonstraram menos virulentos com a concentração de inóculo padrão, 1×10^6 . As condições de manipulação e incubação utilizadas nesse experimento foram as mesmas realizadas para o teste de virulência, aumentando, de forma gradual, a concentração dos inóculos. Foram utilizadas várias concentrações de inóculos, porém as selecionadas foram 5×10^6 , 1×10^7 , 2.5×10^7 e 5×10^7 .

3.15. Curva de crescimento a 30°C e 37°C.

O inóculo utilizado para esse teste foi ajustado a 10^4 em 100 ml de Sabouraud líquido e a cada tempo selecionado foi coletado 1 ml desse crescimento. Essas alíquotas foram lidas em espectrofotômetro a 600nm. A leitura foi realizada após 3, 6, 9, 12, 24, 48 e 72 horas. Como controle foi usado o meio sabouraud estéril.

3.16. Melanização da Hemolinfa.

O ensaio de melanização foi realizado conforme descrito por (Scorzoni *et al.*, 2013). Para isso foi selecionado 10 larvas por tempo para cada isolado e larvas mais escuras ou com manchas foram descartadas. A concentração do inóculo utilizado foi de 1×10^7 e após infecção as larvas foram mantidas a 37°C. 10ul da hemolinfa coletada foi diluída 1:10 em PBS frio e posteriormente centrifugada a 10.000 rpm por cinco minutos e o sobrenadante repassado para uma placa de 96 poços. Essa foi lida a 405nm nos tempos selecionados após infecção de 1, 5 e 24 horas.

3.17. Morfologia das células após infecção em *G. mellonella*.

Para esse experimento foi utilizado cinco larvas de *G. mellonella* por isolado. As larvas após infecção foram maceradas em membrana de nylon de poros de 100 mm (Falcon, BD, USA) com um mL de PBS. Esse líquido foi coletado e centrifugado. O pellet de células foi lavado (1x) e ressuspenso em 300ul de PBS. Posteriormente, uma alíquota desse material foi visualizada com tinta da china em microscópio Leica DMI 3000B. A concentração do inóculo usado foi de 1×10^6 por larva, e as células foram observadas nos tempos 0, 1 e 3 dias após a infecção. O programa Adobe Photoshop CS3 foi utilizado para medir as células. Estatística realizada pelo método ANOVA, complementado pelo teste de Tukey. Esse ensaio foi realizado no laboratório de micologia do instituto de saúde Carlos III em Madri sob a supervisão do Prof. Dr. Oscar Zaragoza Hernandez.

3.18. Análise morfológica *in vitro*.

Para análise morfológica *in vitro*, realizamos o teste de indução de cápsula de todos os isolados. Para isso, os isolados, após crescimento overnight em meio sabouraud líquido, foram mantidos em contato com Mops 50mM pH 7,3 e sabouraud, totalizando 50 ml (49:1). Primeiramente, os inóculos foram concentrados em PBS (1ml) e desse material colocamos 100ul em 50ml de Mops e Sabouraud e análise das células foram realizadas após 24 horas de incubação a 37°C em agitação. A análise foi realizada em microscópio Leica DMI 3000B e o programa Adobe Photoshop CS3 foi utilizado para medir as células. Estatística realizada pelo método ANOVA, complementado pelo teste de Tukey. Esse ensaio foi realizado no laboratório de micologia do instituto de saúde Carlos III em Madri sob a supervisão do Prof. Dr. Oscar Zaragoza Hernandez.

3.19. Ensaios de fagocitose em *G. mellonella*.

Foram separadas cinco larvas de *G. mellonella* para cada isolado, e a concentração do inóculo utilizado foi 1×10^6 corados com Calcofluor White (Sigma, St. Louis, MO) na concentração de 10µ/mL durante 30 min a 37°C. Em seguida, as larvas foram infectadas e a

fagocitose foi analisada após 3 horas de incubação a 37°C. A hemolinfa foi coletada em tubos Eppendorf e diluída 1:2 em PBS frio. A fagocitose foi visualmente quantificada utilizando um microscópio Leica DMI 3000B. *Cryptococcus neoformans* H99 cepa foi utilizada como controle (Mylonakis *et al.*, 2005), pois até o momento não havia estudos sobre a fagocitose da cepa ATCC 90012. Estatística realizada pelo método ANOVA, complementado pelo teste de Tukey. Esse ensaio foi realizado no laboratório de micologia do Instituto de Saúde Carlos III em Madrid sob a supervisão do Prof. Dr. Oscar Zaragoza Hernandez.

4. Resultados.

4.1. Teste de sensibilidade frente à fluconazol e anfotericina B.

Dois dos isolados foram caracterizados como resistente *in vitro* a fluconazol, o isolado 30R de *C. neoformans* e o isolado 118R de *C. gattii* com CIM de 64,0 mg/L. O isolado 27I de *C. neoformans* apresentou CIM de 16mg/L e os demais foram caracterizados como isolados sensíveis a FLZ, com CIMs de 1 e 2mg/L para a cepa ATCC 90012 e 26S, respectivamente. Para os outros isolados de *C. gattii*, CL e ATCC 56990, as CIMs observadas foram de 4 e 2mg/mL. Para Amb, todos os isolados se demonstraram sensíveis a esse fármaco, variando a concentração inibitória mínima entre 0.125 e 0.0625mg/L, conforme demonstrado no quadro 2.

Quadro 2. Resultado do teste de sensibilidade dos isolados frente às drogas sintéticas anfotericina B e fluconazol realizado de acordo com o documento M27-A3 (2008) - Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para Determinação da Sensibilidade de Leveduras à Terapia Antifúngica: Norma aprovada - do CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*). Valores em mg/L.

Cepas/Isolados	FLZ mg/L		AmB mg/L	
	CIM	CFM	CIM	CFM
<i>Cryptococcus neoformans</i> ATCC 90012	1.0	4.0	0.125	0.125
<i>Cryptococcus neoformans</i> 26 (sensível)	1.0	4.0	0.0625	0.0625
<i>Cryptococcus neoformans</i> 27 (intermediário)	16.0	16.0	0.0625	0.0625
<i>Cryptococcus neoformans</i> 30 (resistente <i>in vitro</i>)	64.0	64.0	0.0625	0.0625
<i>Cryptococcus gattii</i> ATCC 56990	2.0	4.0	0.0625	0.0625
<i>Cryptococcus gattii</i> 118 (resistente <i>in vitro</i>)	64.0	64.0	0.0625	0.0625
<i>Cryptococcus gattii</i> (CL- isolado sensível)	4.0	4.0	0.03125	0.03125

4.2. Expressão relativa gene *ERG11*.

Para verificar se a expressão do gene *ERG11* estava influenciando na resistência dos isolados estudados, a expressão relativa desse gene foi quantificado. É possível observar que para os isolados de *C. neoformans*, somente o 27I obteve diferença significativa quando comparado com os isolados 26S e 30R. Já para os isolados de *C. gattii*, o gene *ERG11* do isolado resistente a FLZ, 118R, estava cerca de 20 vezes mais expresso do que o gene *ERG11* do isolado sensível a FLZ.

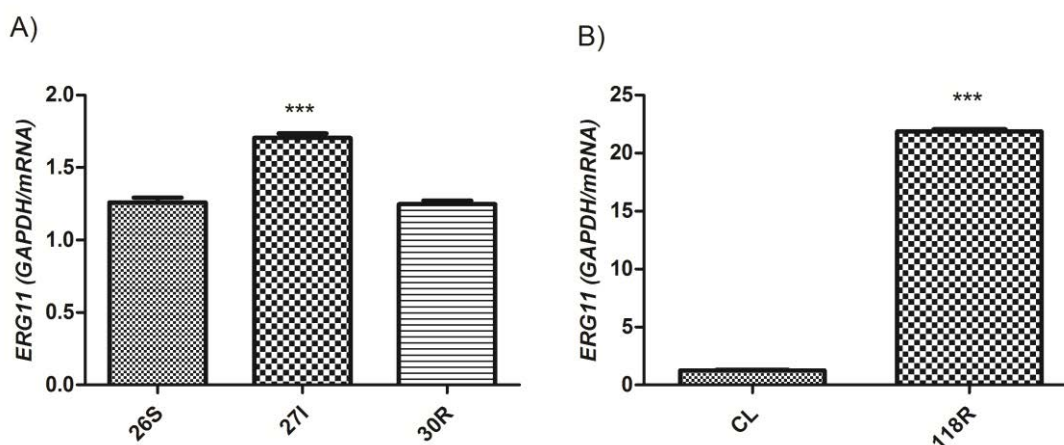


Figura. 2. Expressão relativa do gene *ERG11* dos isolados clínicos sequenciais de *C. neoformans* e dos isolados ambientais de *C. gattii*. A) Isolados 26S, 27I e 30R de *C. neoformans*; B) Isolados CL e 118R de *C. gattii*; (***) $P < 0.001$.

4.3. Teste sensibilidade frente ao ácido gálico e seus derivados.

O teste foi realizado com todos os galatos descritos na figura 1, porém os melhores resultados foram obtidos com os G11, G12, G14, G15, G16 e G17. Os valores da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) encontrados para esses galatos, são mostrados no quadro 3. Os resultados mostram que os galatos de alquila denominados de G11 a G17 apresentaram alta atividade antifúngica (os CIMs variaram entre 0,49 e 1,95 mg/L) contra todas as cepas testadas, inclusive para aquelas que apresentaram resistência *in vitro* ao fluconazol. Além disso, os valores do CIM encontrados para esses galatos foram bem inferiores aos valores de CIM observados frente ao fluconazol, o que indica maior atividade dessas moléculas quando comparada ao agente terapêutico utilizado na terapia atual.

Quadro 3. Resultados do teste de sensibilidade dos isolados testados com moléculas de galato de alquila. Concentração inibitória mínima e concentração fungicida mínima em mg/L.

Cepas/Isolados	G11 mg/L		G12 mg/L		G14 mg/L		G15 mg/L		G16 mg/L		G17 mg/L	
	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM
<i>Cryptococcus neoformans</i> ATCC 90012	1.95	15.63	1.95	7.81	0.98	3.91	0.98	3.91	0.98	3.91	0.98	15.63
<i>Cryptococcus neoformans</i> 26 (sensível)	1.95	15.63	1.95	7.81	0.98	3.91	0.98	3.91	0.98	3.91	0.98	7.81
<i>Cryptococcus neoformans</i> 27 (intermediário)	1.95	15.63	1.95	7.81	0.98	3.91	1.95	3.91	0.98	3.91	1.95	7.81
<i>Cryptococcus neoformans</i> 30 (resistente <i>in vitro</i>)	0.49	0.49	0.49	1.95	0.49	0.49	0.49	0.49	0.49	1.95	0.49	0.98
<i>Cryptococcus gattii</i> ATCC 56990	0.98	15.63	0.98	7.81	0.98	1.95	0.49	3.91	0.98	3.91	0.49	3.91
<i>Cryptococcus gattii</i> 118 (resistente <i>in vitro</i>)	0.98	15.63	1.95	7.81	0.98	3.91	0.98	7.81	0.49	3.91	0.98	3.91
<i>Cryptococcus gattii</i> (CL- isolado de sensível)	0.98	15.63	0.98	15.63	0.49	3.91	0.49	3.91	0.49	3.91	0.49	7.81

4.4. Avaliação da atividade citotóxica dos galatos de alquila

O teste de citotoxicidade foi realizado com duas linhagens de células epiteliais de pulmão, a A549 (linhagem tumoral) e a MRC-5 (linhagem normal). Os resultados obtidos são mostrados nas figuras 3 e 4.

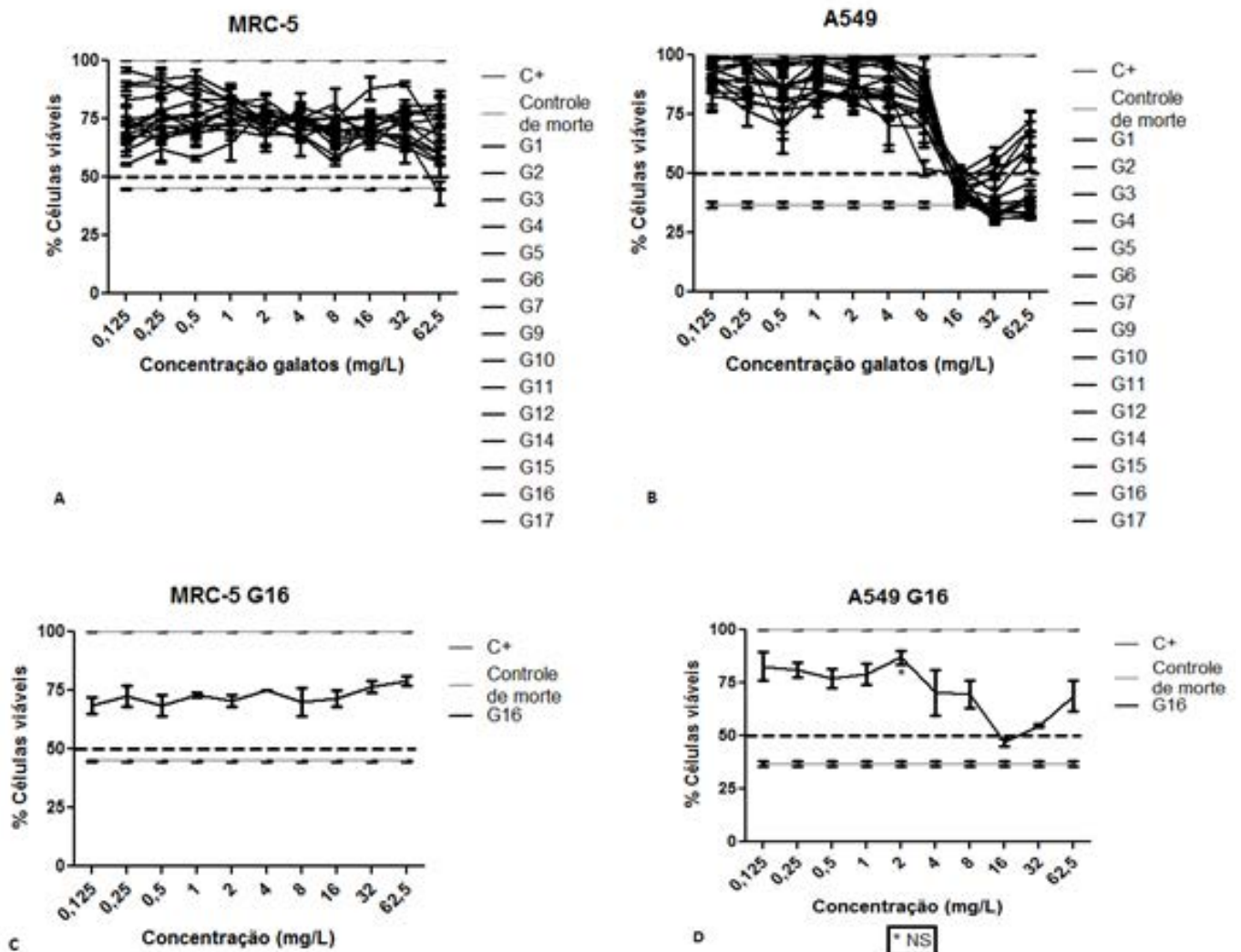
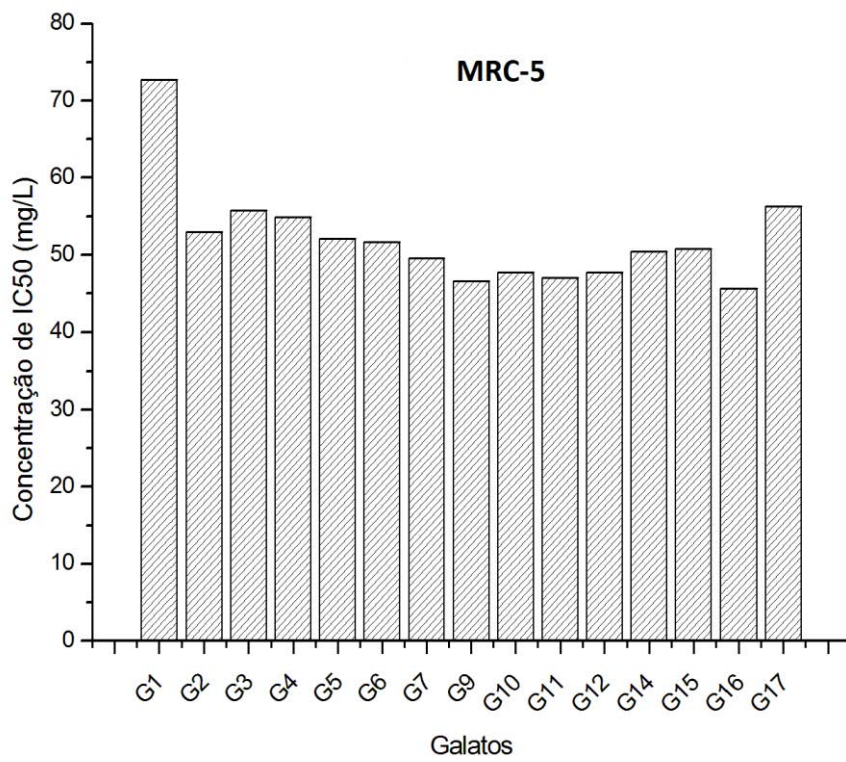
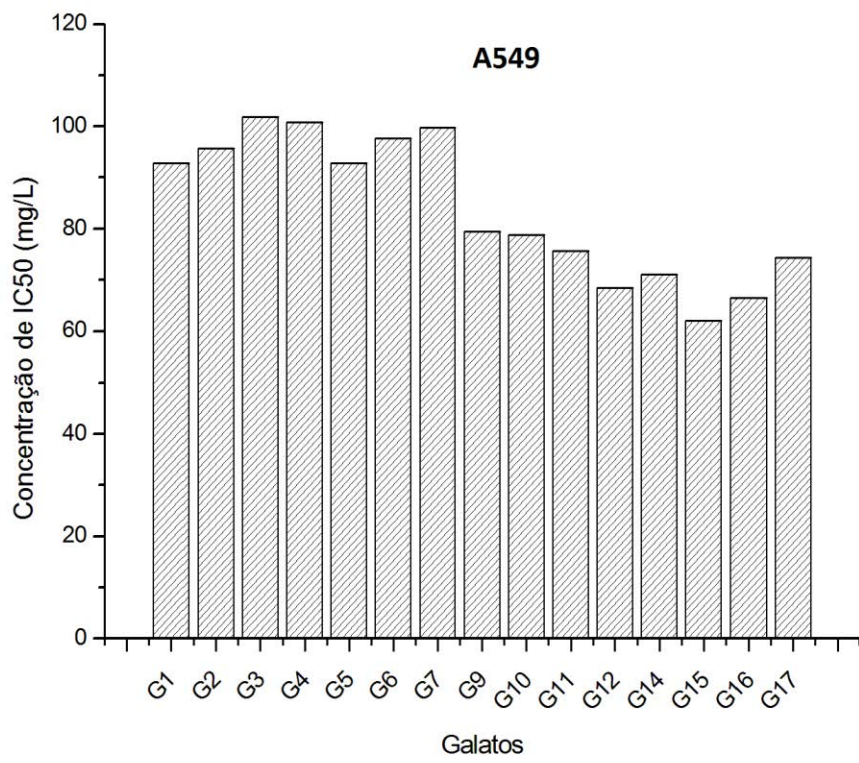


Figura 3. Taxa de viabilidade celular em células epiteliais das linhagens A549 e MRC-5 após contato galatos de alquila. A) Taxa de viabilidade celular de células epiteliais da linhagem MRC-5 após contato com galatos de alquila classificados de G1 à G17 em ampla faixa de concentração; B) Taxa de viabilidade celular de células epiteliais da linhagem A549 após contato com galatos de alquila classificados de G1 à G17 em ampla faixa de concentração; C) Taxa de viabilidade celular de células epiteliais da linhagem MRC-5 após contato com galato de n-dodecila (G16) em ampla faixa de concentração; D) Taxa de viabilidade celular de células epiteliais da linhagem A549 após contato com galato de n-dodecila (G16) em ampla faixa de concentração.



A



B

Figura 4. Valores de IC₅₀ (mg/L) determinados para galatos de alquila classificados de G1 à G17 em linhagens de células epiteliais de pulmão MRC-5 e A549. A) Valores de IC₅₀ (mg/L) para galatos de alquila classificados de G1 à G17 em linhagem de célula epitelial de pulmão MRC-5; B) Valores de IC₅₀ (mg/L) para galatos de alquila classificados de G1 à G17 em linhagem de célula epitelial de pulmão A549.

Na figura 3, os gráficos A e B apresentam a porcentagem de células vivas das linhagens MRC-5 e A549, respectivamente, na faixa de concentração de 62,5 à 0,125 mg/L, para os galatos de alquila classificados de G1 à G17. No gráfico B, a faixa de concentração de 62,5 à 16 mg/L apresenta menor porcentagem de viabilidade celular na linhagem A549 quando comparada com a linhagem MRC-5, e apresentando a taxa de viabilidade celular semelhante ao controle de morte. A faixa de concentração de 8 à 0,125 mg/L, entretanto, mostrou alta taxa de viabilidade celular, apresentando diferença estatística significativa em relação ao controle de morte. Para a linhagem de células MRC-5, entretanto, os valores da taxa de viabilidade celular para todas as concentrações testadas apresentaram diferença estatística significativa em relação ao controle de morte.

Os gráficos C e D na figura 3 mostram isoladamente a taxa de viabilidade celular para o galato de n-dodecila (G16), galato este, selecionado para os demais testes.

A figura 4 apresenta os valores de IC₅₀, em mg/L, determinada para os galatos de alquila (G1 à G17) frente às linhagens celulares MRC-5 e A549. A IC₅₀ é definida como a concentração que causa 50% de inibição do crescimento celular e foi calculado a partir da fórmula: $IC_{50} = ((n\text{-alquil galato} \times 100\%)/C+) - 100\%$, onde C+ é a porcentagem de células viáveis no controle positivo (sem galato); e n-alquil galato é a porcentagem de células viáveis no teste com cada galato. Os gráficos A e B da figura 4, portanto, representam as concentrações requeridas de cada galato para resultar em 50% de morte celular nas linhagens MRC-5 e A549, respectivamente. Através desses gráficos podemos perceber que para a linhagem MRC-5 os valores de IC₅₀ para a maioria dos galatos variaram em torno de 50 mg/L. Para a linhagem A549, de G1 à G7 os valores de IC₅₀ variaram em torno de 95 mg/L e de G9 à G17, em torno de 70 mg/L. Para os galatos de G11 à G17, para os quais observou-se melhor atividade antifúngica, os valores de IC₅₀ para as duas linhagens encontram-se bem acima dos valores de CIM encontrados no teste de sensibilidade, o que dá indícios da segurança da utilização dessas moléculas, entretanto, para se chegar à esta conclusão, é necessária a análise do índice de seletividade obtido para cada um destes galatos.

4.5. Teste de sinergismo e cálculo do índice de seletividade do galato n-dodecila.

O teste do “tabuleiro em xadrez” foi realizado para verificar a atividade combinatória entre o galato de n-dodecila (G16) e fluconazol frente aos isolados testados. O G16 foi selecionado por ter sido um dos derivados com melhor atividade antifúngica, conforme mostrado no quadro 3. Para a maioria das cepas o efeito obtido para a combinação foi aditivo, exceto para o isolado resistente 30R, cuja combinação entre as substâncias foi indiferente, conforme demonstrado no quadro 4.

Quadro 4. Valores do índice de concentração inibitória fracionada (ICIF) para a combinação de galato de n-dodecila (G16) e fluconazol frente a isolados de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*, e tipo de atividade obtida em cada caso.

Cepas/Isolados	ICIF	ATIVIDADE
<i>Cryptococcus neoformans</i> ATCC 90012	1	Aditiva
<i>Cryptococcus neoformans</i> 26 (sensível)	0,75	Aditiva
<i>Cryptococcus neoformans</i> 27 (intermediário)	0,75	Aditiva
<i>Cryptococcus neoformans</i> 30 (resistente <i>in vitro</i>)	1,002	Indiferente
<i>Cryptococcus gattii</i> ATCC 56990	1	Aditiva
<i>Cryptococcus gattii</i> 118 (resistente <i>in vitro</i>)	0,625	Aditiva
<i>Cryptococcus gattii</i> (CL-isolado sensível)	0,75	Aditiva

Exceto para 30R, a atividade resultante da combinação entre G16 e fluconazol foi aditiva, com redução dos valores de CIM para fluconazol. Isto mostra que o uso associado das duas substâncias seria vantajoso principalmente frente aos isolados resistentes a FLZ, como o 118R, uma vez que os valores de CIM para fluconazol neste isolado foi diminuído em 2 vezes. Esses resultados vêm colaborar com os resultados obtidos no teste de sensibilidade para o G16, mostrando o grande potencial de utilização desta molécula como antifúngico, quando usado isoladamente ou em associação com o fluconazol.

Com base nos valores de viabilidade celular obtidos pelo nosso grupo (De Paula E Silva *et al.*, 2014) o índice de seletividade (IS) do G16 foi calculado, e, como resultado foi

constatado valores >10 (quadro 5) para todos os isolados frente às linhagens testadas, mostrando a segurança e a eficácia dessas moléculas para o uso proposto neste trabalho.

Quadro 5. Valores do índice de Seletividade (IS) encontrados para o galato de alquila G16, frente às células epiteliais de pulmão das linhagens MRC-5 e A549 para isolados de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*.

Cepas/Isolados	G16	
	MRC-5	A549
ATCC 90012	23	34
26S	47	68
27I	12	17
30R	47	68
ATCC 56990	23	34
118R	93	136
CL	23	34

4.6. Expressão dos genes *MDR1* e *AFR1* antes e após o contato com galato de n dodecila e FK506.

Em todos os isolados de *C. neoformans* foi possível observar a expressão dos genes *AFR1* e o *MDR1* antes do tratamento com G16 e após o contato com o galato de n-dodecila (G16) essa expressão foi diminuída, tanto para o *MDR1* quanto para o *AFR1*. Essa redução foi estatisticamente significativa para todos os isolados de *C. neoformans* quando comparados com a situação sem tratamento, conforme mostrado nas figuras 5 e 7. O gene *MDR1*, para o isolado 26(S), sensível a FLZ, obteve redução significativa da expressão após o tratamento com o galato G16 de 1,6 vezes quando comparado com o controle sem tratamento ($P < 0.001$). Quando o mesmo isolado foi analisado após o tratamento realizado com a substância FK506 foi constatado que não houve diferença na expressão do gene *MDR1*, mostrando que o G16, nesse caso, foi mais eficiente na inibição deste gene. Para os outros isolados clínicos de *C. neoformans*, 27(I) e o 30(R), foi possível observar que houve a redução da expressão desse gene, onde o 27(I), sensibilidade intermediária a FLZ, a redução da expressão do *MDR1* foi a menor dentre os isolados clínicos sequenciais com 1,2 vezes ($P < 0,05$), porém ainda mais eficaz quando comparado com o tratamento com FK506. No isolado 30(R), observamos que a redução foi significativa tanto para o tratado com G16 ($P < 0,001$) quanto para o tratado com o FK506 ($P < 0,001$), com reduções na expressão de 1,4 vezes após o tratamento com o G16 e 1,3 vezes após o tratamento com

FK506. A cepa ATCC, utilizada como padrão também obteve reduções significativas para ambos os tratamentos.

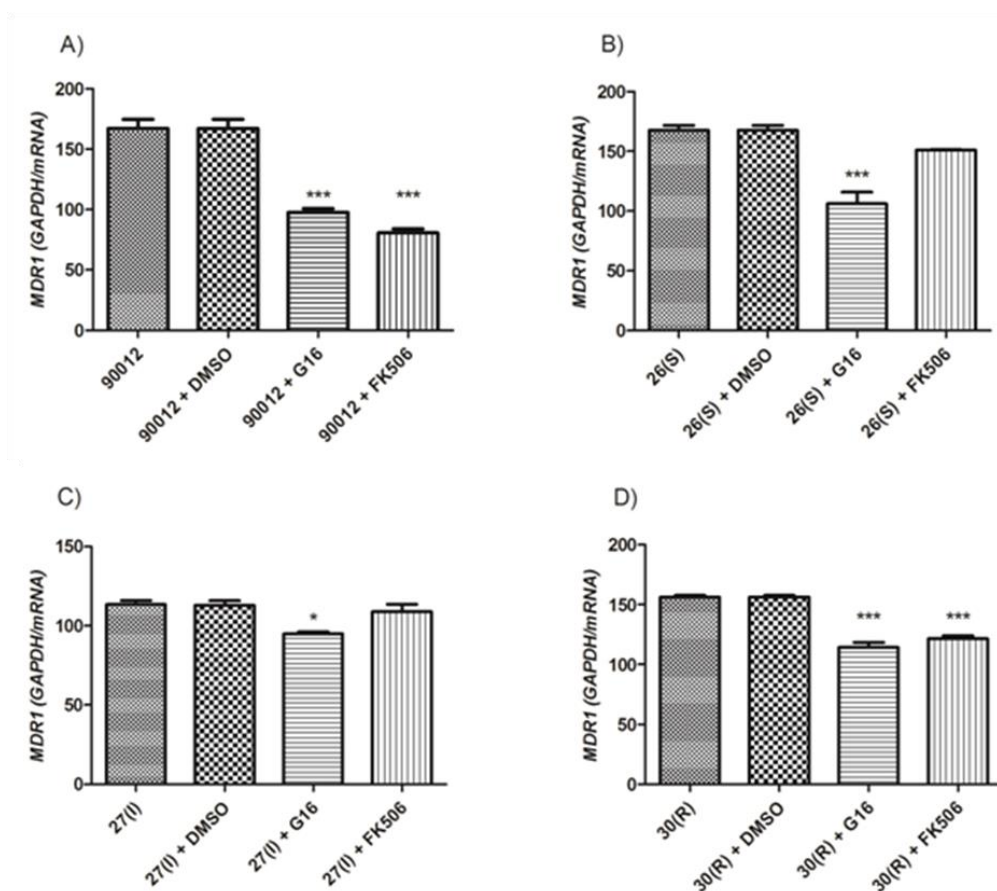


Figura 5. Expressão relativa dos isolados clínicos sequenciais de *C. neoformans*, antes e após tratamento com G16 e FK506. A) Cepa ATCC 90012; B) Isolado sensível a FLZ 26S; C) Isolado com sensibilidade intermediária 27I; D) Isolado resistente *in vitro* 30R;

Quando analisamos os resultados obtidos para os isolados ambientais de *C. gattii*, foi observado que o gene *MDR1* para essa espécie está sendo expresso, porém com níveis muito abaixo quando comparado com a espécie *neoformans* (Fig. 6). Nesse caso, a mesma análise foi realizada para o isolado sensível a FLZ, CL(S), e para o resistente, 118(R), e o nível de expressão do *MDR1* também foi reduzido 2,5 vezes para o isolado sensível e 1,4 vezes para o isolado resistente a FLZ em ambos os tratamentos ($P < 0,001$). No entanto, para cepa ATCC 56990 de *C. gattii* a mesma alteração não foi constatada.

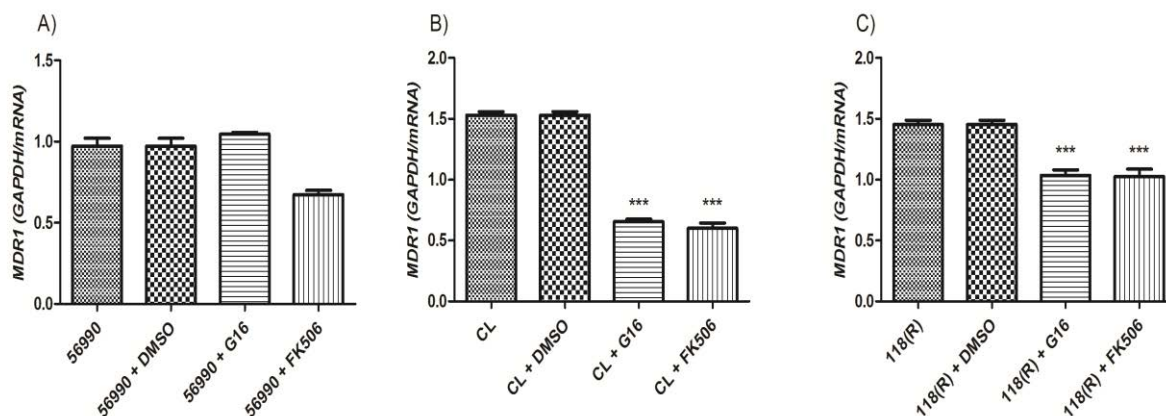


Figura 6. Expressão relativa do gene *MDR1* nos isolados ambientais de *C. gattii*, antes e após tratamento com G16 e FK506. A) Cepa ATCC 56990; B) Isolado sensível a FLZ CL; C) Isolado resistente *in vitro* 118R;

Em relação à análise da redução de expressão do gene *AFR1*, nos isolados clínicos de *C. neoformans* foi verificado que esse gene, antes do tratamento, está sendo expresso. Após o tratamento com G16 foi constatado redução da expressão desse gene para todos os isolados clínicos de *C. neoformans*, conforme mostrado na figura 7. No isolado 26(S), a expressão do gene *AFR1* foi reduzida em 1,5 vezes após o tratamento com G16 ($P < 0,05$). Já, quando tratado com FK506 a expressão não foi alterada. Para os isolados 27(I) e 30(R), a redução da expressão do gene *AFR1* foi mais evidente. Após o tratamento com G16, no isolado clínico 27(I) a redução da expressão do gene *AFR1* foi de 2 vezes ($P < 0,001$) e após o contato com FK506 a redução foi de 1,7 vezes ($P < 0,001$). A expressão do gene *AFR1* na cepa ATCC 90012 de *C. neoformans*, também demonstrou alteração na expressão quando em contato com G16 e o FK506, com redução de 2,3 vezes para ambas as substâncias ($P < 0,001$).

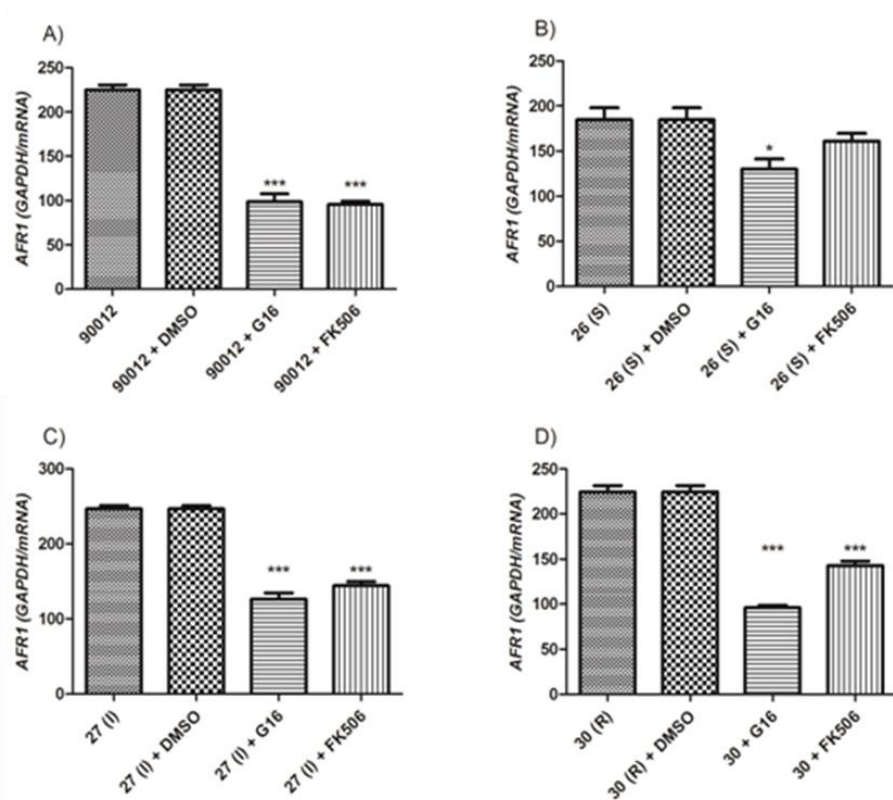


Figura 7. Expressão relativa do gene *AFR1* nos isolados clínicos sequenciais de *C. neoformans*, antes e após tratamento com G16 e FK506. A) Cepa ATCC 90012; B) Isolado sensível a FLZ 26S; C) Isolado com sensibilidade intermediária 27I; D) Isolado resistente in vitro 30R;

Para os isolados ambientais de *C. gattii* foi observado expressão do gene *AFR1* somente no isolado sensível e resiste a FLZ, CL(S) e 118(R), respectivamente, pois na cepa ATCC 56990 a expressão do *AFR1* não foi constatado (Fig. 8). Mais uma vez, a expressão constatada do *AFR1* está bem abaixo, quando comparada com a espécie *neoformans*, mostrando que para esses isolados ambientais de *C. gattii* os dois genes analisados, *MDR1* e *AFR1* estão muito menos expressos, provavelmente, por serem isolados ambientais e por não terem sofrido a pressão dos tratamentos antifúngicos.

Após o tratamento com o G16, foi observado que para os dois isolados ambientais de *C. gattii*, CL e 118(R), a expressão do *AFR1* foi reduzida. Para o isolado CL, essa redução de expressão chegou a 3 vezes menos expresso e para o 118(R) a inibição foi de 1,7 vezes ($P < 0,001$). Quando tratados com o fármaco controle FK506, foi constatado redução semelhante ao que o G16 proporcionou.

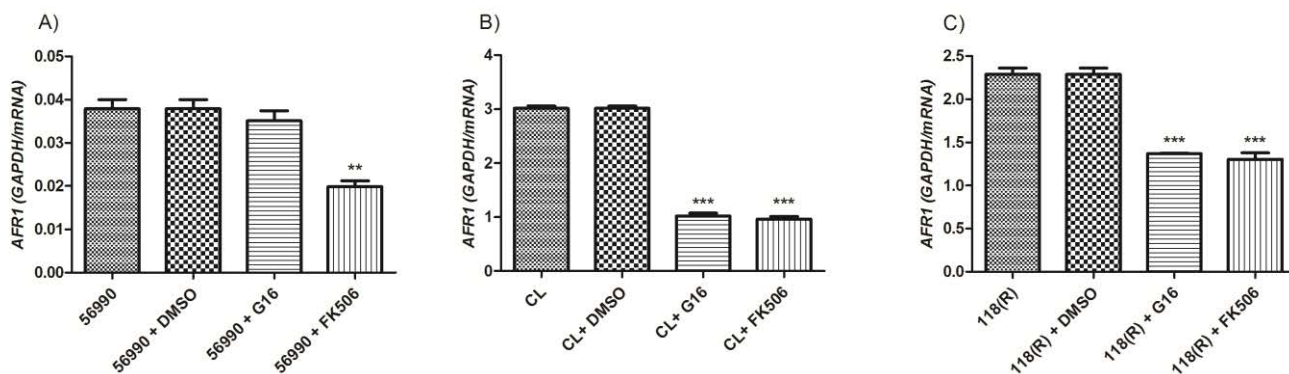


Figura 8. Expressão relativa do gene *AFR1* nos isolados ambientais de *C. gattii*, antes e após tratamento com G16 e FK506. A) Cepa ATCC 56990; B) Isolado sensível a FLZ CL; C) Isolado resistente *in vitro* 118R;

Para o gene *MDR1*, não se observou diferença na expressão quando comparamos o isolado resistente de *Cryptococcus neoformans* (30R) com os sensíveis (ATCC 90012 e 26S). Houve diferença apenas na expressão do isolado de sensibilidade intermediária ao fluconazol (27I), no entanto sua expressão foi menor do que a do sensível 26S, portanto estes dados indicam que a resistência desenvolvida no isolado 30R, provavelmente não esteja relacionada com a expressão do gene *MDR1*.

Com relação ao gene *AFR1*, comparando-se os três isolados sequenciais de *Cryptococcus neoformans*, podemos observar que o isolado com resistência intermediária ao fluconazol 27I e o isolado resistente ao mesmo fármaco 30R apresentam uma maior expressão do gene do que o isolado sensível 26S, com uma diferença estatística significativa ($p < 0,01$) em ambos os casos, sendo que o 27I está expressando o gene *AFR1* 1,3 vezes mais que o 26S e o 30R cerca de 1,2 vezes mais. (dados não mostrados) Estes resultados mostram que a expressão aumentada desse gene codificador de bomba de efluxo pode estar envolvida na resistência ao fluconazol nesses isolados testados.

4.7. Virulência a 30°C e 37°C dos isolados de *C. neoformans* (26S, 27I e 30R) e dos isolados ambientais de *C. gattii* (118R e CL).

Conforme demonstrado nas figuras 9A e 9B é possível observar que os isolados clínicos sequenciais de *C. neoformans* 26S, 27I e 30R possuem um perfil de virulência diferente entre eles, principalmente entre o isolado sensível a FLZ (26S) e o resistente ao mesmo fármaco (30R), tanto a 30°C como a 37°C. A 30°C os isolados de *C. neoformans* foram menos virulentos quando comparados a 37°C, porém o perfil entre eles se manteve, onde o 26S se demonstrou mais virulento, matando 100% das larvas no 6° dia de infecção. A cepa ATCC 90012 também foi utilizada nesse ensaio e seu perfil de virulência é muito

semelhante ao perfil observado do isolado sensível, 26S. Assim, foi possível constatar sua eficiência como controle dos testes. Já para os isolados de *C. gattii*, foi verificado perfis menos virulentos tanto a 37°C quanto a 30°C quando comparados com os isolados da espécie *C. neoformans*. A cepa ATCC 56990 e o isolado resistente a FLZ (118R) se demonstraram avirulentos, enquanto o isolado sensível a FLZ, CL, matou 90% das larvas até o 8º dia de infecção a 37°C (Fig. 9C). A 30°C foi observado um padrão diferente de virulência para os isolados de *C. gattii*, principalmente da cepa ATCC 56990 que matou 50% das larvas e a 37°C essa não matou nenhuma durante o período de infecção. Para comprovar o perfil menos virulento dos isolados de *C. gattii*, foi feito o mesmo experimento de virulência, mas dessa vez, adicionando mais quatro isolados da mesma espécie. Esses isolados foram cedidos pelo Centro de Micologia no Instituto de Saúde Carlos III de Madri, Espanha, e foram identificados como g63, g69, g83 e g84. Mais uma vez, todos os isolados de *C. gattii* foram menos virulentos, comprovando o perfil de virulência encontrado anteriormente (dados não mostrados).

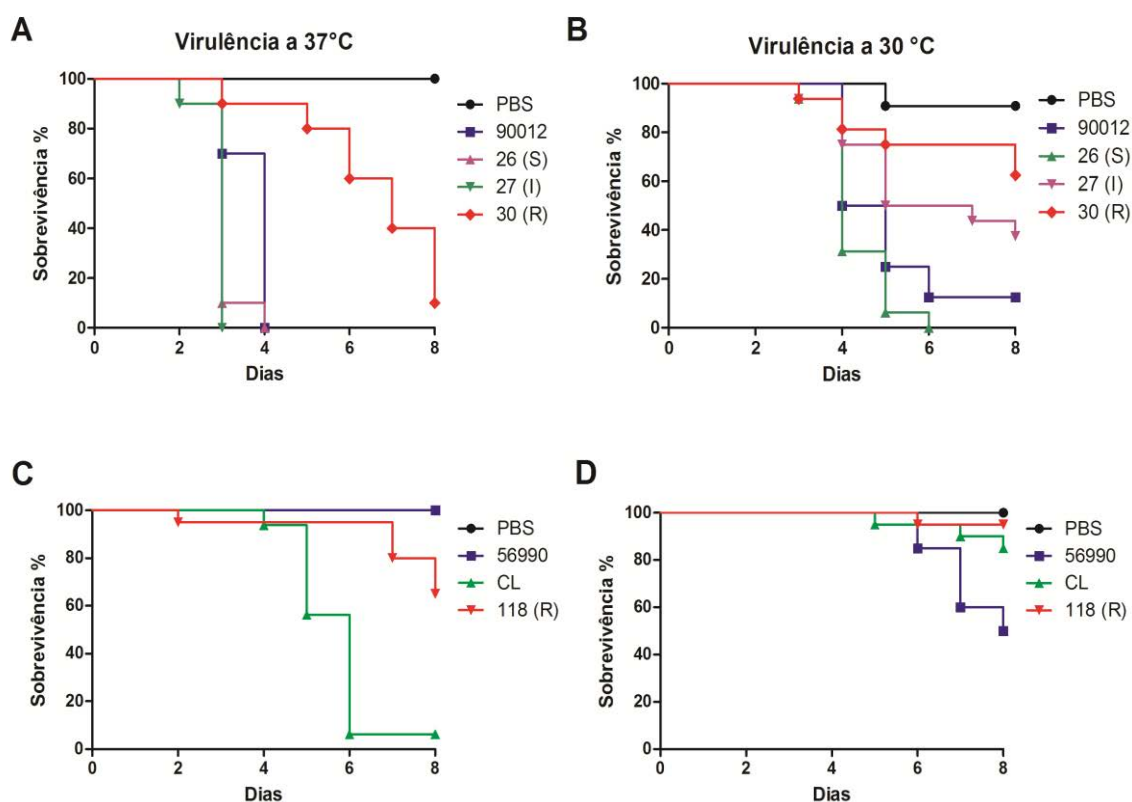


Figura 9. Ensaio de virulência em *G. mellonella*. A) Isolados clínicos sequenciais de *C. neoformans*, 26S, 27I e 30R incubados a 37°C; B) Isolados clínicos sequenciais de *C. neoformans*, 26S, 27I e 30R incubados a 30°C; C) Isolados ambientais de *C. gattii* CL e 118R incubados a 37°C; D) Isolados ambientais de *C. gattii* CL e 118R incubados a 30°C;

4.8. Curva de Sobrevivência com diferentes concentrações de inóculo.

Esse ensaio foi realizado com isolados que se demonstraram menos virulentos com inóculo padrão a 1×10^6 em *G. mellonella*. Como demonstrado na figura 10A, é possível perceber que o isolado de *C. neoformans*, resistente a FLZ, 30R, mesmo aumentando a concentração do inóculo, seu perfil de virulência ainda é menor que o encontrado para os isolados sensíveis da mesma espécie. Somente a partir de 1×10^7 que esse isolado começou a demonstrar um padrão de virulência maior, matando 100% das larvas no 3° dia, na concentração de 5×10^7 (Fig. 10A). Para os isolados de *C. gattii*, o mesmo aconteceu, porém não somente com o isolado resistente, mas para todos os isolados selecionados. Para a cepa ATCC 56990, a última concentração testada foi $2,5 \times 10^7$, onde foi possível verificar alteração no perfil de virulência (Fig. 10C). Já para os isolados ambientais 118R e CL, resistente e sensível a FLZ, respectivamente, o inóculo teve que ser aumentado até 5×10^7 , para que fosse possível constatar alguma mudança, conforme figura 10B e 10D. E mesmo assim, o isolado resistente, 118R, na maior concentração (5×10^7), continua com um padrão de virulência menor quando comparado com os outros isolados sensíveis a FLZ. Concentrações acima de 5×10^7 não foram testadas devido a alta viscosidade da amostra.

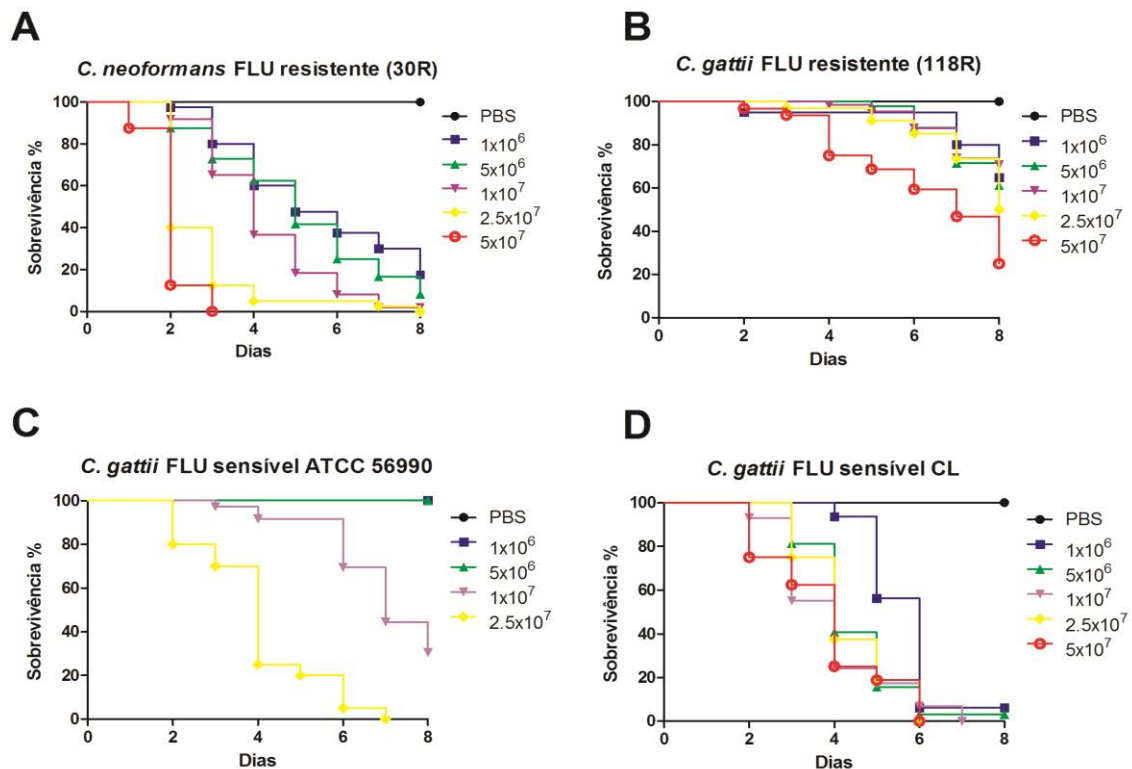


Figura 10. Curva de sobrevivência dos isolados 30R, ATCC 56990, CL e 118R com inóculos a 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 2.5×10^7 e 5×10^7 . A) Isolado *C. neoformans* 30R; B) Isolado *C. gattii* 118R; C) ATCC 56990 *C. gattii*; D) Isolado *C. gattii* CL;

4.9. Curva de crescimento a 30°C e 37°C.

Ensaio realizado para verificar diferenças no crescimento entre os isolados a 30°C e a 37°C. Como demonstrado na figura 11 é possível observar que tanto os isolados de *C. neoformans* quanto os isolados de *C. gattii*, obtiveram melhor crescimento a 30°C do que a 37°C. Os isolados de *C. neoformans* a 37°C apresentaram crescimento mais lento, principalmente o isolado 30R, resistente a FLZ. Quando as curvas de crescimento dos isolados de *C. gattii* foram analisadas, foi constatado que a cepa ATCC 56990 não foi capaz de crescer a 37°C, demonstrando assim, que esse fator pode ser o possível motivo da baixa virulência dessa cepa a essa temperatura. O isolado 118R, também resistente a FLZ, mostrou crescimento bem abaixo, quando comparado com o isolado sensível, CL, a 37°C. Após esse ensaio, foi confirmado que os isolados com baixa virulência em *G. mellonella*, possuem dificuldade de crescimento quando mantidos a 37°C, principalmente os isolados resistentes a FLZ.

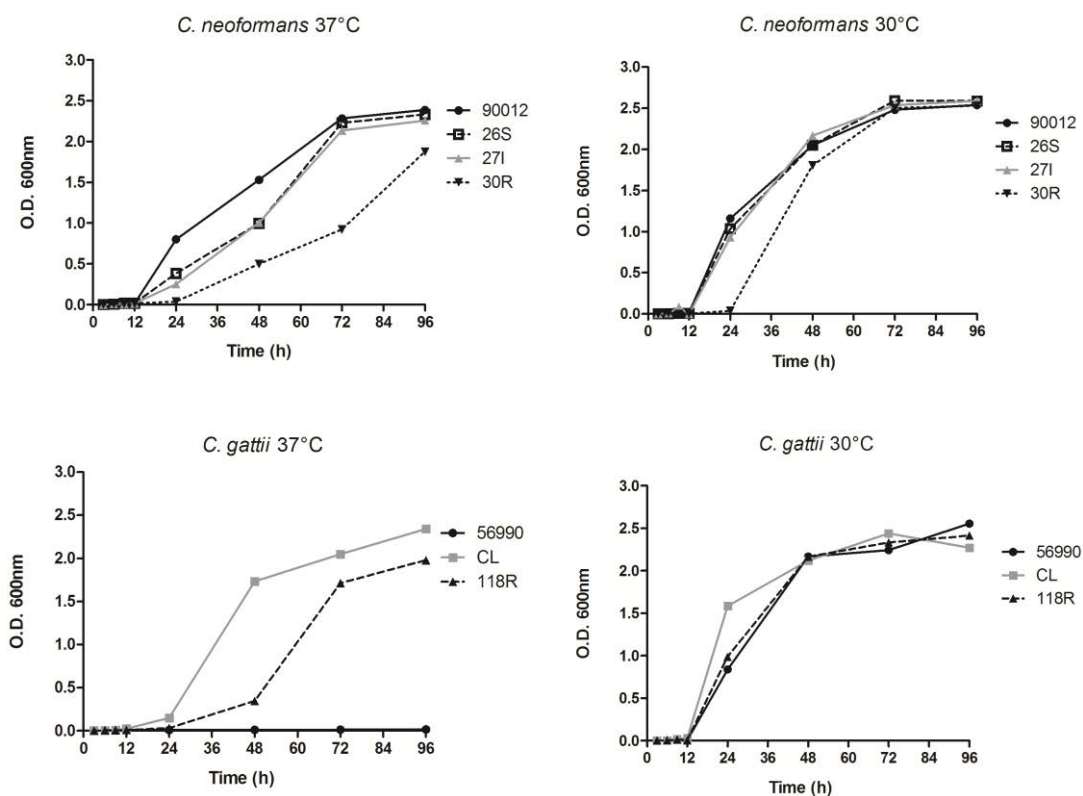


Figura 11. Curva de Crescimento isolados clínicos sequenciais de *C. neoformans* e isolados ambientais de *C. gattii* a 30°C e 37°C.

4.10. Melanização da Hemolinfa.

Após os tempos de infecção selecionados, 1, 5 e 24 horas, foi visto que os isolados de *C. neoformans* não obtiveram diferença estatística quando comparados com os controles. (dados não mostrados). Para os isolados de *C. gattii*, foi possível observar que o tempo de 5 horas de infecção, foi o que resultou maior melanização, sendo estatisticamente diferente em todos os isolados testados, ATCC 56990, CL e 118R (Fig. 12).

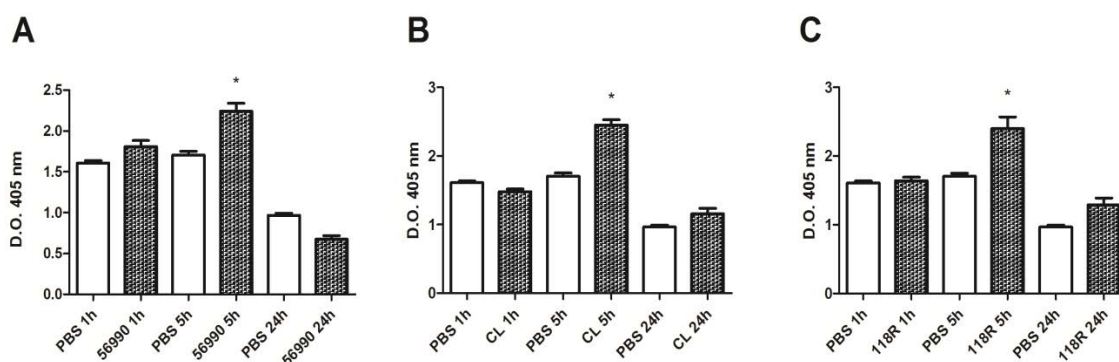


Figura 12. Quantificação da melanização na hemolinfa nos tempos 1, 5 e 24 horas de infecção com os isolados de *C. gattii*. A) Cepa ATCC 56990; B) Isolado sensível a FLZ, CL; C) Isolado resistente a FLZ, 118R;

Posteriormente, os dados obtidos foram analisados comparando os isolados sensíveis, resistentes a FLZ, e os ATCCs entre as espécies de *C. neoformans* e *C. gattii*. Assim, foi possível constatar, que para esses isolados, a espécie *C. gattii*, independente da sensibilidade a FLZ, a hemolinfa estava mais melanizada após 1 e 5 horas de infecção para ATCC 56990, e 5 horas para os demais, quando comparados com os isolados de *C. neoformans* (Fig. 13).

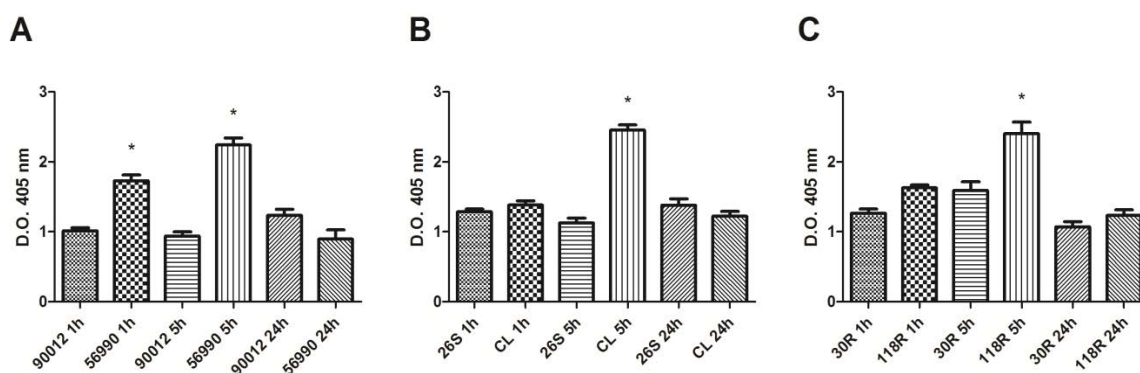


Figura 13. Quantificação da melanização entre os isolados de *C. neoformans* e *C. gattii*. A) Cepas ATCCs 90012 de *C. neoformans* e 56990 de *C. gattii*; B) Isolados sensíveis a FLZ, 26 *C. neoformans* e CL *C. gattii*; C) Isolados resistentes a FLZ, 30R *C. neoformans* e 118R *C. gattii*;

4.11. Morfologia das células após infecção em *G. mellonella*.

Para esse ensaio foram utilizados os isolados clínicos sequenciais de *C. neoformans* 26S, 271 e 30R e a cepa ATCC 90012, dois isolados de *Cryptococcus gattii*, 118R e CL, sendo os isolados 30R e 118 resistentes a fluconazol *in vitro*, com CIM 64mg/L. O tamanho total da célula e da cápsula foi medido imediatamente após a infecção (T0), após 24 horas (T1) e 72 horas (T3). Após comparação dos isolados entre os tempos selecionados, foi possível observar alteração no tamanho total das células. Nos isolados de *C. neoformans* foi observado alteração morfológica para a cepa ATCC 90012 após infecção, sendo significativo os tempos T1 e T3 quando comparados com o tempo T0 (Figura 14A). Para os isolados clínicos sequenciais 26S e 30R, foi observado aumento progressivo das células após infecção em *G. mellonella*, onde algumas células chegaram a 20 μ ($p < 0.05$). Já o isolado 271 não apresentou diferença estatística quando comparado nos diferentes tempos de infecção. Para os isolados ambientais de *C. gattii*, foi observado aumento significativo do tamanho das células na cepa ATCC 50996 e no isolado sensível CL, quando comparados com o T0 (Figura 14B). O maior aumento observado foi da cepa ATCC 56990, onde algumas células no T3 chegaram a 40 μ . Entre os isolados, o sensível a FLZ (CL) obteve um crescimento significativo também, chegando a ultrapassar 20 μ na maioria das células do T3. O isolado resistente a FLZ 118R apresentou alteração significativa somente quando comparado o T0 frente ao T3, porém não foi observado células maiores que 20 μ ($p < 0,05$).

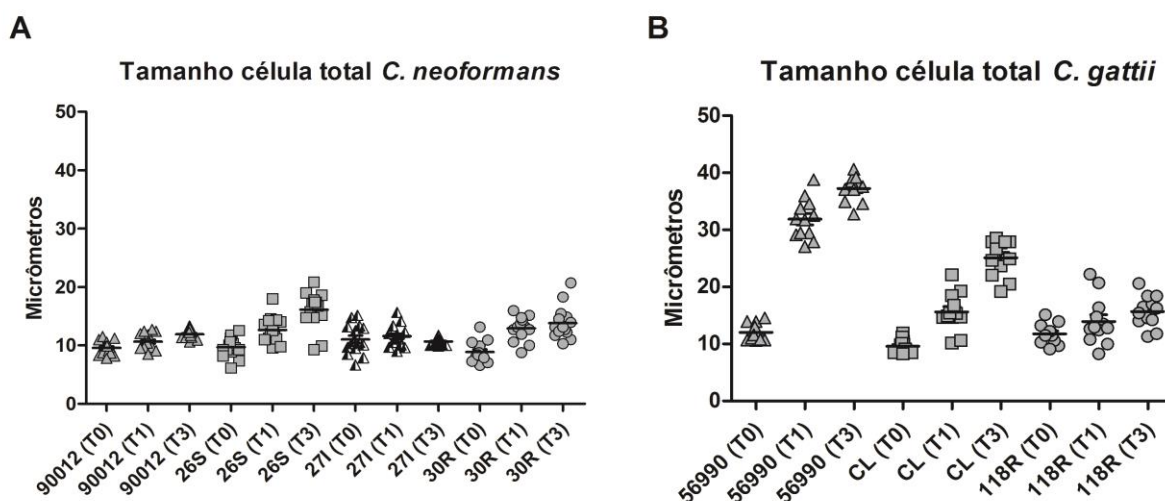


Figura 14. Tamanho da célula total em micrômetros dos isolados de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* após infecção em *G. mellonella*. A) ATCC 90012 e isolados clínicos sequenciais de *C. neoformans* 26S, 271 e 30R; B) ATCC 56990 e isolados ambientais de *C. gattii* CL e 118R.

Após infecção em *G. mellonella*, a cápsula dos isolados também foi medida. Conforme demonstrado na figura 13A foi constatado que, entre os isolados de *C. neoformans*, somente o isolado sensível a FLZ, 26S, obteve crescimento gradual e significativo da cápsula, após os tempos de infecção ($p < 0.05$). Já para o isolado 30R, resistente a FLZ, *in vitro*, o aumento da cápsula foi significativo no tempo 3, quando comparado com o tempo 0, não demonstrando o mesmo crescimento gradual observado no isoaldo 26S. Quando os isolados de *C. gattii* foram analisados, foi observado um crescimento muito maior da cápsula desses isolados quando analisados em conjunto com *C. neoformans* (fig. 12B). As células da cepa ATCC 56990 de *C. gattii* obteve grande alteração após infecção em *G. mellonella*. A cápsula da maioria das células dessa cepa chegou a medir entre 20 μ e 30 μ ($p < 0.05$). A cápsula do isolado ambiental sensível a FLZ, CL, obteve um crescimento gradual sendo significativo em todos os tempos ($p < 0.05$), mas o isolado 118R não demonstrou o mesmo crescimento quando comparados com o isolados sensíveis a FLZ, obtendo diferença estatística somente no tempo 1 quando comparado com o tempo 0 ($p < 0.05$). Na figura 14 é possível constatar as alterações morfológicas ocorridas nos isolados após infecção em *G. mellonella*.

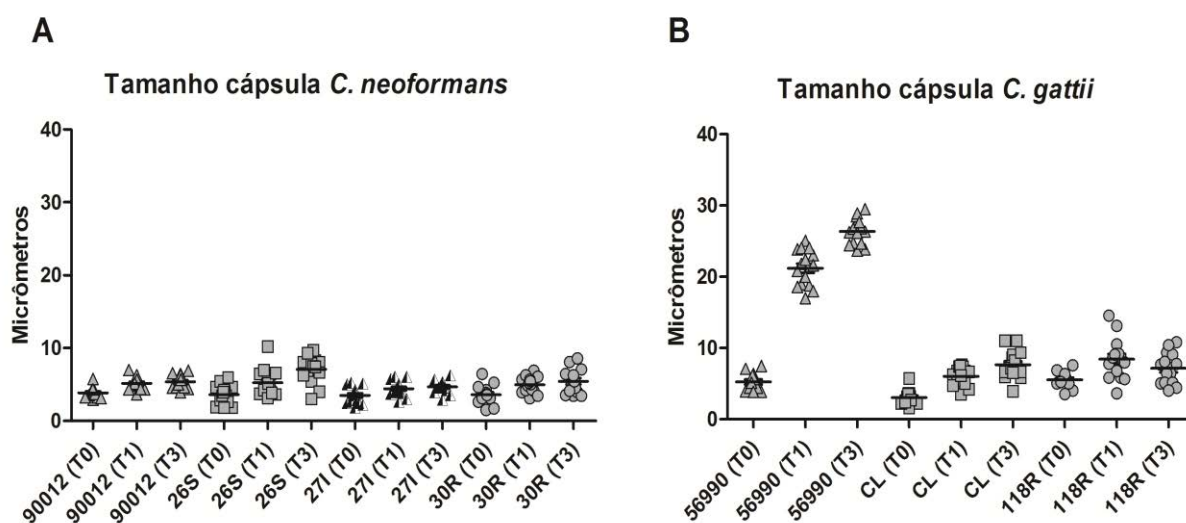


Figura 15. Tamanho da cápsula em micrômetros dos isolados de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* após infecção em *G. mellonella*. A) ATCC 90012 e isolados clínicos sequenciais de *C. neoformans* 26S, 271 e 30R; B) ATCC 56990 e isolados ambientais de *C. gattii* CL e 118R.

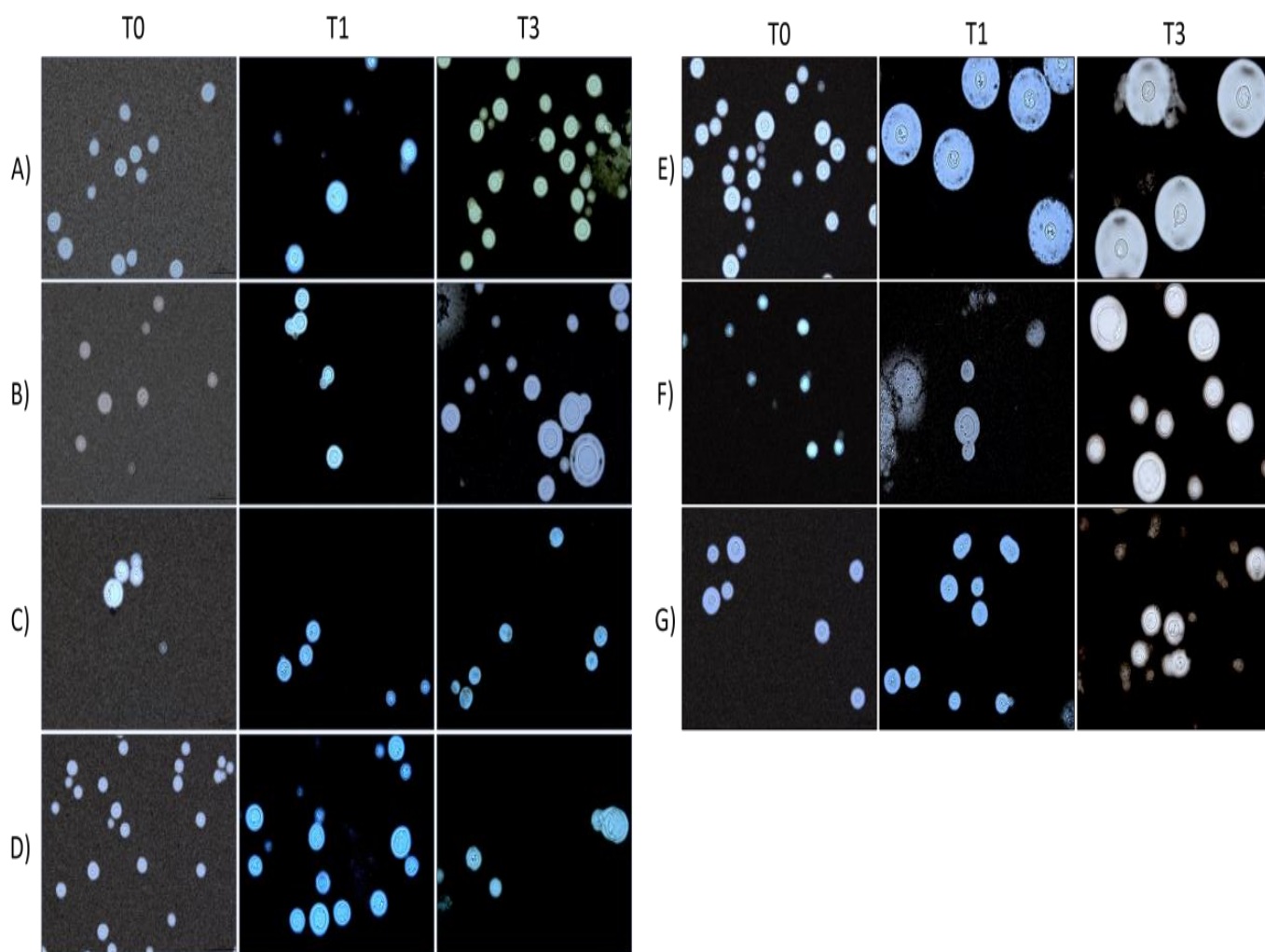


Figura 16. Microscopia dos isolados de *C. neoformans* e *C. gattii* antes da infecção (T0) e depois da infecção em *G. mellonella* (T1, 24 horas) e (T3, 72 horas); A) *C. neoformans* ATCC 90012; B) Isolado *C. neoformans* 26S; C) *C. neoformans* isolado 27I; D) *C. neoformans* isolado 30R; E) *C. gattii* ATCC 56990; F) Isolado *C. gattii* CL e G) Isolado *C. gattii* 118R.

4.12. Indução de cápsula *in vitro* a 37°C.

Esse experimento foi realizado para verificar alterações na morfologia das células dos isolados *in vitro*. Após 24 horas de incubação em meio Sb com Mops, todos os isolados clínicos sequenciais de *C. neoformans* obtiveram aumento na cápsula com diferença significativa quando comparados com o crescimento somente em Sb ($P < 0,05$) (Fig. 17A). Para os isolados de *C. gattii*, foi possível observar que as células dos isolados ambientais tiveram maior indução da cápsula após o teste, conforme demonstrado na figura 17B. A cepa ATCC 56990 usada como padrão, também obteve alteração após 24 horas, uma vez que a cápsula de algumas células dessa cepa chegou a medir cerca de 20 μM ($P < 0,05$). Quando comparamos os isolados sensíveis e resistentes a FLZ das espécies estudadas, foi

constatada diferença estatística somente entre 30R Mops e 90012 Mops, cepa padrão, não havendo significância entre o 30R e 26S na espécie *C. neoformans*. Já para os isolados de *C. gattii*, a diferença encontrada foi significativa entre o isolado resistente a FLZ 118R, CL e a cepa ATCC 56990 ($P < 0,05$). Após essa análise, foi possível observar que tanto para *C. neoformans* quanto para *C. gattii*, o isolado resistente obteve menor alteração de tamanho da cápsula quando comparados com os isolados sensíveis a FLZ, o mesmo ocorrido após análise morfológica *in vivo*.

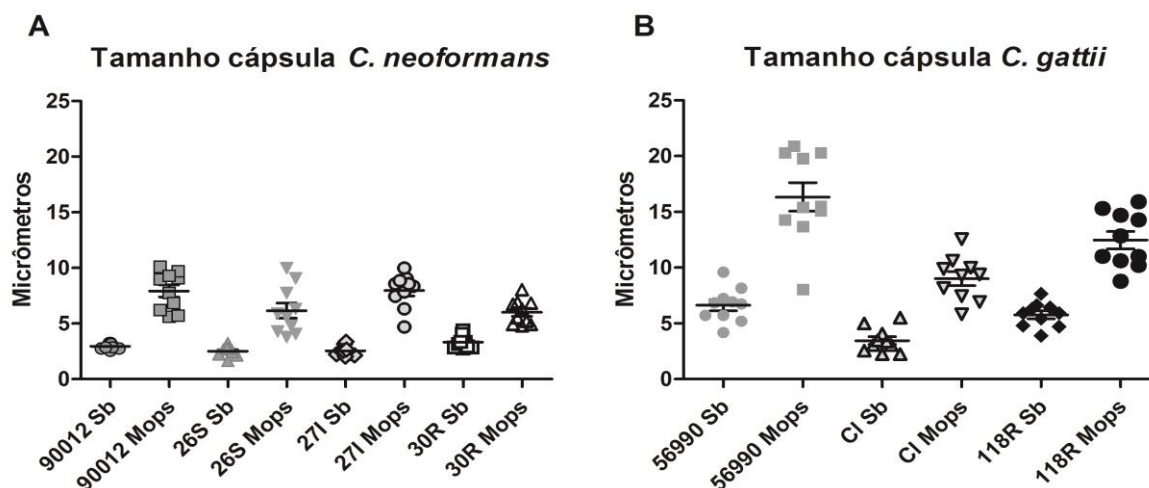


Figura 17. Indução de cápsula *in vitro* dos isolados clínicos de *C. neoformans* e dos isolados ambientais de *C. gattii*. Tamanho da cápsula demonstrado em Microns; A) Isolados clínicos de *C. neoformans* 26S, 271 e 30R; B) Isolados ambientais de *C. gattii* CL e 118R; Diferença significativa para todos os isolados quando comparados com a situação controle (Sb); $P < 0,05$;

4.13. Ensaio de fagocitose

Para compreender melhor os mecanismos de virulência dos isolados selecionados, foi realizado também o teste de fagocitose em *G. mellonella*. Esse ensaio mostrou baixo índice de fagocitose da isolado 30R quando comparado com a cepa ATCC 90012 de *C. neoformans* ($P < 0,05$). Entre o 30R os outros isolados clínicos sequenciais, 26S e 271, não houve diferença significativa na fagocitose (Fig. 18A). Já para os isolados de *C. gattii* o 118R obteve o maior índice de células fagocitadas, com quase 40% de fagocitose quando comparado com o CL e a cepa ATCC 56990 após infecção em *G. mellonella* (Fig. 18B).

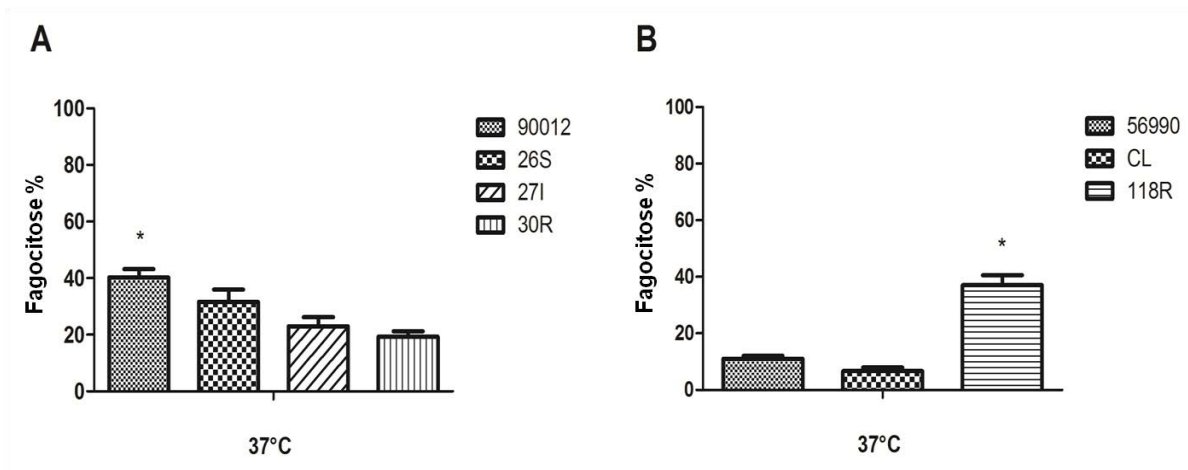


Figura 18. Índice de fagocitose após infecção em *G. mellonella*. A) Isolados 26S, 27I e 30R de *C. neoformans*. B) Isolados 118R e CL de *C. gattii*. As cepas ATCC 90012 de *C. neoformans* e 56990 de *C. gattii* foram utilizadas como cepas controle do experimento. **One-way ANOVA:** * $P < 0,05$.

5. Discussão

Devido ao surgimento crescente de microrganismos multirresistentes, principalmente cepas de bactérias e fungos, há grande preocupação na identificação de novas opções terapêuticas e novos alvos moleculares nesses organismos (Fowler *et al.*, 2011). Fluconazol e outros antifúngicos azólicos são agentes amplamente utilizados para a prevenção e tratamento de infecções por *C. neoformans* e *C. gattii*. Sua eficácia comprovada e a segurança, combinadas com seus excelentes perfis farmacocinéticos torná-los opções terapêuticas extremamente importantes para a gestão de criptococose (Sanguinetti *et al.*, 2006). Em nosso estudo, os valores de CIM para os isolados de *C. neoformans* 26S, 27I e 30R, com perfil genético idêntico, determinados por RAPD, demonstraram evolução de resistência, possivelmente durante o tratamento do paciente. O tratamento da criptococose, principalmente em países onde a 5FC não está disponível, depende dos azóis, os quais possuem como alvo a inibição da enzima *ERG11* que participa da biossíntese de ergosterol.

Em estudos prévios, em nosso laboratório, foi encontrada uma mutação significativa que substituiu o nucleotídeo C (citosina) por T (timina) na posição 1436 do gene *ERG11* de do isolado 30R. Essa substituição de bases no gene ocasionou a troca do aminoácido P (prolina) por L (leucina) na posição 479 (P479L), na sequência da proteína lanosterol 14C desmetilase, ainda não descrita em *C. neoformans* var. *grubii* (dados não publicados). Através da análise da expressão relativa do gene *ERG11*, nos isolados estudados, foi possível observar que para os isolados de *C. neoformans* não houve diferença estatística na expressão desse gene no isolado 30R quando comparado com o isolado 26S, sensível a

FLZ, sendo mais um indício que a resistência a FLZ do isolado 30R pode ser mediada pela mutação encontrada (P479L) (Rossi, 2010).

Prolina e leucina fazem parte do grupo de aminoácidos alifáticos juntamente com a alanina, valina, leucina e isoleucina. Nessa classe de aminoácidos todos são não polares e hidrofóbicos e suas cadeias laterais tendem a se agrupar dentro das proteínas, estabilizando a estrutura protéica por meio de interações hidrofóbicas, com exceção da prolina. A prolina possui uma cadeia lateral alifática com estrutura cíclica diferente. O grupo amino dos resíduos de aminoácidos desta é mantido em uma conformação rígida que reduz a flexibilidade estrutural das regiões polipeptídicas contendo prolina (Lehninger, 2006).

São conhecidos três tipos de conformações secundárias nas proteínas, as α -hélices, as folhas β e as dobras β . A α -hélice é uma estrutura secundária comum nas proteínas e a sequência de aminoácidos afeta a estabilidade da α -hélice. Nem todos os peptídicos podem formar uma estrutura dessa estável, e interações entre cadeias laterais de aminoácidos podem estabilizar ou desestabilizar uma α -hélice. Uma das restrições para a formação de uma α -hélice é a presença de prolina. Na prolina o átomo de nitrogênio é parte de um anel rígido. Dessa forma um resíduo de prolina introduz uma torção em uma α -hélice. Além disso, o átomo de nitrogênio de um resíduo de prolina na ligação peptídica não possui o substituinte hidrogênio para participar nas ligações com outros aminoácidos. Por isso a prolina é raramente encontrada dentro de uma α -hélice. As folhas β são conformações mais estendidas das cadeias polipeptídicas, organizadas em folhas. Nas conformações β o esqueleto da cadeia polipeptídica é estendido em vez de estrutura helicoidal. Já as dobras β são conformações de dobras ou alças onde a cadeia polipeptídica reverte sua direção. Esses elementos conectam corridas sucessivas de α -hélice ou conformação β . Os resíduos de Prolina ocorrem frequentemente em dobras β , porque as ligações peptídicas envolvendo o nitrogênio da prolina facilmente assumem a configuração cis, forma que favorece uma dobra mais firme (Lehninger, 2006). Dessa forma, acreditamos que a substituição ocorrida na sequência da proteína *ERG11* do isolado 30R de *C. neoformans*, pode de alguma forma, desestabilizar a estrutura conformacional da proteína ou até mesmo deslocar a α -hélice próxima ao grupamento de ligação heme, fazendo com que haja inibição do encaixe das moléculas de FLZ com os sítios ativos da proteína lanosterol 14C desmetilase.

Embora alguns trabalhos demonstrem que o desenvolvimento da resistência de isolados de *C. neoformans* aos azóis é raro (Pfaller *et al.*, 2005; Aller *et al.*, 2007), há diversos outros estudos que relatam o contrário, principalmente em indivíduos com SIDA, expostos a longos períodos de tratamento (Paugam *et al.*, 1994; Armengou *et al.*, 1996;

Berg, Clancy e Nguyen, 1998; Sanglard, Ischer, Calabrese, *et al.*, 1998; Vanden Bossche *et al.*, 1998; Brandt *et al.*, 2001; Cowen, Anderson e Kohn, 2002; Bow, 2005).

O Grupo de Vigilância Global ARTMIS DISK (*ARTEMIS DISK Global Surveillance Group*), identificou que de 2001 a 2007 houve um aumento da resistência em isolados de *C. neoformans* de 5.1-22.6% na região da Ásia-Pacífico, 7.0-33,3% na África/Oriente Médio e 4.2-7,1% na Europa, mas houve diminuição de isolados resistentes a FLZ (3.7-0,0%) na América do Norte (Pfaller *et al.*, 2009).

Diversos estudos mostram que as taxas de mortalidade e da utilização de recursos aumentam, significativamente, quando a terapia é atrasada ou inadequada, ressaltando ainda mais a importância de informações detalhadas de dados epidemiológicos (Garey *et al.*, 2006; Kollef *et al.*, 2012).

Portanto, com base na problemática da existência de isolados resistentes, neste estudo buscamos o desenvolvimento de novas opções terapêuticas para a criptococose a partir da investigação de novas moléculas antifúngicas.

Compostos fenólicos são produtos naturais que possuem largo espectro de atividades biológicas (Nazaruk, Czechowska, Markiewicz, & Borawska, 2008). Ácido gálico (*3,4,5-trihydroxybenzoic acid*) é um metabólito secundário encontrado em quase todas as plantas e é conhecido por conter propriedades antimicrobianas, antivirais, antiinflamatórias, antioxidantes e propriedades citotóxicas (Aruoma, Murcia, Butler, e Halliwell, 1993;. Kroes, van den Berg, van Ufford, van Dijk, e Labadie, 1992; (Fiuza *et al.*, 2004; Kubo *et al.*, 2004; Kratz *et al.*, 2008).

Na literatura é possível encontrar relatos das diversas aplicações e atividades encontradas para o ácido gálico e seus derivados e dentre algumas propriedades foi constatado que essas moléculas também possuem citotoxicidade seletiva contra algumas variedades de células tumorais com efeitos mais elevados do que o mostrado contra linhagens de células não tumorais (Serrano *et al.*, 1998; Yoshioka *et al.*, 2000; Salucci *et al.*, 2002).

Já se sabe que galatos de alquila, principalmente propila, octila e o dodecila, são utilizados como aditivos alimentares, devido à sua atividade antioxidante (Kubo *et al.*, 2002), e que esses compostos demonstraram propriedades farmacológicas mais favoráveis, muitas vezes sendo mais eficazes do que os efeitos constatados com o ácido gálico (Locatelli, Filippin-Monteiro e Creczynski-Pasa, 2013).

Derivados sintéticos do ácido gálico, com oito ou mais átomos de carbono na cadeia lateral possuem atividades antiviral, antifúngica, antioxidantes e antitumorais mais eficientes (Savi *et al.*, 2005; Locatelli *et al.*, 2008; Locatelli *et al.*, 2009; Locatelli *et al.*, 2012), e no que diz respeito à atividade antifúngica, Kubo, et al., (2001), demonstraram que octil galato foi efetivo contra *Saccharomyces cerevisiae*, *Zygosaccharomyces bailii*, *Candida albicans* e *Aspergillus niger* e, nesse estudo os autores observaram também que o comprimento do grupo alquila foi importante para atividade antifúngica obtida (Kubo, Xiao e Fujita, 2001).

Leal, et al., (2009) testaram o ácido gálico e os galatos de alquila, do metil ao octadecil, contra os fungos, *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Microsporium gypseum*, *Epidermophyton floccosum*, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*, e os resultados mostraram que a atividade antifúngica dessas moléculas, pode variar de acordo com os fungos testados, principalmente entre os grupos de leveduras, dermatófitos ou hialohyphomycetes, e, que entre os galatos de alquila, os compostos mais ativos foram heptil, octil, nonil e decil galatos, com um espectro de ação mais amplo inibindo leveduras, dermatófitos e hialohyphomycetes.

Em nosso estudo, verificamos que os galatos de alquila, heptila, octila, decila, undecila, dodecila e tetradecila foram ativos contra todos os isolados testados, principalmente frente aos isolados 30R e 118R, resistentes a FLZ. Quando observamos a concentração fungicida mínima (CFM), também é possível notar que os valores, principalmente para o isolado resistente 30R são baixos para todos os galatos de alquila testados, e, para o G16 (dodecil) a CFM foi $\leq 3,91$ mg/L quando em contato com os isolados. Nossos resultados demonstraram que esses compostos (G11, G12, G14, G15, G16 e G17) inibiram o crescimento fúngico dos isolados da espécie *neoformans*, com CIMs mais baixas do que as encontradas na literatura, e, pela primeira vez foi constatado que essas moléculas também são ativas contra a espécie *gattii*, tanto para isolados sensíveis quanto para isolados resistentes a FLZ.

A terapia utilizada em casos criptococose ainda é subótima, principalmente devido à toxicidade do tratamento e o aparecimento de cepas de *C. gattii* menos sensíveis a FLZ. Dessa forma, pesquisas envolvendo novas alternativas de tratamento são de extrema importância.

Foi realizado neste trabalho o teste de sinergismo com o composto G16 e FLZ. Essa combinação foi sinérgica para a maioria dos isolados. Terapias combinadas podem servir como tratamentos alternativos, porém essa opção ainda é pouco explorada (Rosato *et al.*, 2012). De Paula e Silva, et al.,(2014) *in press*, além de mostrarem que os galatos de alquila

são efetivos contra diversos fungos patogênicos humanos, demonstraram que esses compostos mostraram baixa citotoxicidade quando em contato com as linhagens celulares de pulmão, A549 e MRC5 (material complementar). Nos resultados apresentados por este grupo, o galato G16 apresentou alta porcentagem de viabilidade celular para a linhagem celular MRC5 em todas as concentrações testadas, e para a linhagem A549 a partir da concentração 8 mg/mL. Estes dados corroboram com os dados obtidos pelo nosso estudo, uma vez que a proposta do uso sinérgico deste galato com o fluconazol leva a uma diminuição da concentração de ambos os compostos, afastando a possibilidade de qualquer índice de citotoxicidade. Com base nestes valores de viabilidade celular o índice de seletividade (IS) do G16 foi calculado, e, como resultado foi constatado para todos os isolados frente às linhagens testadas, mostrando a segurança e a eficácia dessas moléculas para o uso proposto neste trabalho.

Nosso grupo vem trabalhando com os mecanismos moleculares de resistência de *Cryptococcus* sp. e em estudos anteriores além de investigar as mutações pontuais na enzima alvo de fluconazol também verificou outros motivos envolvidos na aquisição da resistência de isolados clínicos e ambientais.

Um importante mecanismo de resistência aos fármacos antifúngicos é a super expressão de proteínas de transporte da família ABC (*ATP-Binding Cassette*) e os transportadores MSF (*Major Superfamily Facilitator*), que conferem resistência a muitos compostos, resultando na diminuição das concentrações intracelulares das drogas (Cannon *et al.*, 2009). Transportadores ABC constituem uma grande família de transportadores dependentes de ATP que bombeiam aminoácidos, peptídios, proteínas, íons metálicos, vários lipídios, sais biliares e muitos outros compostos hidrofóbicos, incluindo drogas, para fora das células e contra um gradiente de concentração (Lehninger, 2006). Um transportador ABC em humanos, o transportador multidroga (*MDR1*), é responsável pela impressionante resistência de certos tumores a algumas drogas que, em geral, são efetivas como antitumorais. Já os transportadores pertencentes à superfamília MFS são secundários e utilizam o gradiente eletroquímico de prótons através da membrana plasmática para efluxo de substratos (Cannon *et al.*, 2009).

O uso generalizado e prolongado de antifúngicos pode resultar, não somente ao desenvolvimento da tolerância em relação à droga em uso, mas também no desenvolvimento da resistência a outros compostos não relacionados, denominado como resistência a múltiplas drogas (MDR) (Prasad e Rawal, 2014). Vários isolados clínicos de *C. albicans*, *A. fumigatus* e *C. neoformans*, resistentes a azóis, exibiram ativação da transcrição de genes de codificadores de bomba de efluxo, mostrando acúmulo intracelular reduzido da

droga, confirmando assim o papel das proteínas de efluxo na tolerância a esses compostos (Prasad, Panwar e Smriti, 2002).

Em fungos, a super expressão do gene *MDR1*, em uma cepa de *S. cerevisiae* sensível resultou num aumento da resistência a fluconazol e a itraconazol, mas não para os polienos e equinocandinas (Niimi *et al.*, 2006).

O rompimento de *AFR1* em *C. neoformans* levou a maior susceptibilidade a FLZ, e quando houve a complementação do gene, a resistência foi restaurada (Posteraro *et al.*, 2003). Dados *in vivo* demonstram também, que *AFR1* também pode ser importante para a virulência do fungo, além da resistência, pois uma cepa de *C. neoformans* que com *AFR1* super expresso, aumentou significativamente sua virulência e resistência, e o mutante *AFR1* exibiu sensibilidade a FLZ (Sanguinetti *et al.*, 2006). Outros estudos também demonstram que, *AFR1* pode ter um papel importante na modulação da resposta imune do hospedeiro, uma vez que mutantes resistentes a FLZ com *AFR1* super expresso, são mais resistentes à atividade anticriptocócica mediada pela microglia, frente a isolados isogênicos sensíveis a mesma droga (Orsi *et al.*, 2009), uma vez que, mesmo sendo fagocitadas de forma semelhante, foi observada reduzida acidificação e retardo na maturação em fagossomos contendo o mutante com o gene *AFR1* super expresso.

Nossos resultados demonstram que, independente da sensibilidade a FLZ, tanto o gene *MDR* quanto o *AFR1* estão sendo expressos nos isolados estudados e que o composto G16 foi capaz de diminuir essa expressão após o tratamento.

Já se sabe, que a super expressão da glicoproteína-P (P-gp), transportador de membrana plasmática, é responsável pela expulsão de agentes quimioterápicos das células cancerosas, e, têm sido associadas com resistência as múltiplas a drogas (*MDR*) (Kitagawa, Nabekura, Kamiyama, *et al.*, 2005). Compostos como o verapamil e ciclosporina A conseguiram reverter o efluxo mediado pela P-gp devido à inibição desse transportador (Bosch e Croop, 1996; Sharom, 1997). Além desses compostos, tem sido demonstrado que os polifenóis também conseguem modular a atividade da P-gp (Castro e Altenberg, 1997; Shapiro e Ling, 1997; Conseil *et al.*, 1998; Zhang e Morris, 2003; Nabekura, Kamiyama e Kitagawa, 2005).

Um estudo realizado por Kitagawa, *et al.*, (2005), examinaram os efeitos de três galatos de alquila, n-butyl, n-octil e n-dodecil, cujo número de átomos de carbono nas suas cadeias de alquilo são 4, 8 e 12, respectivamente, sobre o acúmulo de rodamina 123 em células KB-C2. Através dos resultados obtidos foi possível constatar que entre os galatos de alquila testados, galatos n-octila e o n-dodecila, que possuem cadeias alquil longas,

aumentou o acúmulo dentro das células da rodamina 123, 3,5 vezes e 5,2 vezes, respectivamente, onde o efeito do n-dodecil galato, foi tão eficiente quando comparado com o efeito observado pelo verapamil (Kitagawa, Nabekura, Kamiyama, *et al.*, 2005). Nesse mesmo estudo, os autores observaram também que, os galatos de alquila reforçaram a toxicidade da daunorrubicina, indicando que esses compostos podem reverter o efeito MDR em células KB-C2, possivelmente através da inibição da atividade da P-gp. Em outro estudo, foi constatado que os derivados do ácido gálico, com pelo menos oito e com menos de 16 átomos de carbono na cadeia lateral, conseguiu inibir o efeito do efluxo mediado pela proteína Pdr5 na cepa com super expressão dessa proteína, e, que o decil e o docecil galato inibiram, quase que completamente a atividade da ATPase Pdr5 e da UTPase de maneira dose dependente, tais como o FK506 (Pereira Rangel *et al.*, 2010).

Galatos de alquila com cadeias laterais longas parece ser necessária para inibição da proteína Pdr5, *in vitro* (Fiuza *et al.*, 2004; Rosso *et al.*, 2006), uma vez que a lipofilicidade fornecido pelo aumento do comprimento da cadeia lateral e a hidrofobicidade prejudicada por grupos hidroxila associados com o anel de benzeno é importante para inibição da atividade da ATPase (Pereira Rangel *et al.*, 2010). A lipofilicidade é importante para atividade dos derivados do ácido gálico como antioxidante, inibidores de enzimas e como compostos citotóxicos para algumas linhagens de células (Fiuza *et al.*, 2004).

Dessa forma, nossos resultados mostram a importância de mais estudos no intuito de elucidar os mecanismos de ação do G16 nos fungos, uma vez que esse galato pode ser promissor para o tratamento da criptococose, principalmente, em cepas menos sensíveis a FLZ, pois além da sua atividade antifúngica frente os isolados testados de *C. neoformans* e *C. gattii*, esse composto também conseguiu inibir a expressão dos genes envolvidos em bomba de efluxo.

Fk506 é um agente imunossupressor que suprime a resposta imune por inibição das vias conservadas de transdução de sinal, se ligando aos receptores intracelulares, imunofilinas, e, criando compostos na superfície que bloqueiam seu alvo, a calcineurina (Ho *et al.*, 1996). A via de calcineurina é importante na cascata de sinalização em eucariotos, e, desempenha um papel central na regulação da homeostase, na morfogênese, na integridade da parede celular e na patogenicidade fúngica (Fox *et al.*, 2001; Fox e Heitman, 2002; Kraus e Heitman, 2003; Juvvadi, Lamothe e Steinbach, 2014), controlando também o crescimento em pH alcalino e em altas temperaturas, o estresse na membrana, regulando o mating e participando na virulência tanto em *C. albicans* quanto em *C. neoformans* (Odom *et al.*, 1997; Cruz, Fox e Heitman, 2001). Em estudos prévios, foi reportado que em fungos filamentosos, calcineurina implica na progressão do ciclo celular (Rasmussen *et al.*, 1994),

na ramificação das hifas (Prokisch *et al.*, 1997) e na adaptação ao estresse (Juvvadi *et al.*, 2003).

Dessa forma, calcineurina se mostra um alvo promissor em fungos por ser um alvo distinto dos demais agentes antifúngicos, podendo ser eficaz em cepas resistentes e auxiliar na terapia sinérgica (Steinbach *et al.*, 2007).

Fk506 também já é conhecido como inibidor de bomba de efluxo dependente de ATP (Rao e Scarborough, 1994). Estudos demonstram que esse composto é capaz de reverter à resistência a múltiplas drogas em diferentes tipos de células eucarióticas, devido ao bloqueio de bombas de efluxo dependentes de ATP, em humanos, através da inibição da atividade da P-gp, em *C. albicans* Cdr1p / Cdr2p, e, mais recentemente, em *C. krusei* Abc1p (Rao e Scarborough, 1994; Schuetzer-Muehlbauer *et al.*, 2003; Lamping *et al.*, 2009). A reversão da resistência a múltiplas drogas também foi constatado através do efeito sinérgico do Fk506 em combinação com voriconazol (VCR) frente a isolados de *C. krusei* resistentes. Ricardo *et al.*, (2014), verificaram através dos ensaios de sensibilidade por microdiluição e por disco-difusão que bombas de efluxo contribuía para o fenótipo de resistência e que após a junção do FK506 com VCR, as bombas de efluxo foram possivelmente bloqueadas e o VCR foi efetivo. Dessa forma, em nosso trabalho, também foi possível observar que o FK506 influenciou na expressão dos genes *MDR1* e *AFR1* dos isolados de *C. neoformans* e *C. gattii*, após o tratamento, porém o G16 conseguiu ser ainda mais efetivo, indicando que o G16 pode atuar de forma semelhante ao FK506.

Neste contexto, nosso estudo foi conduzido à verificação da virulência destes isolados sensíveis e resistentes. Através de diversos estudos sabe-se que as diferenças na virulência, e na susceptibilidade de algumas cepas a certos antifúngicos, também podem estar relacionadas aos diferentes tipos moleculares (Espinell-Ingroff, Chowdhary, *et al.*, 2012). Em nosso estudo, foi observado que entre os isolados estudados, há diferenças na susceptibilidade e claramente, diferenças nos padrões de virulência. Para espécie *neoformans*, o isolado resistente a FLZ (30R), foi menos virulento quando comparado com o isolado sensível 26S, a cepa ATCC 90012 e o isolado com resistência intermediária, 27I, em *G. mellonella*, tanto a 30°C quanto a 37°C. Já para os isolados de *C. gattii*, tanto o resistente a FLZ, 118R, quanto a cepa ATCC 56990 se demonstraram menos virulentos quando comparados com o isolado sensível a FLZ, CL, a 37°C. A 30°C, foi observado que para todos os isolados de *C. gattii*, independente da sensibilidade a FLZ, mais de 50% das larvas estavam vivas no final do período de observação.

Tanto o isolado 30R quanto os isolados de *C. gattii*, sensíveis e resistentes necessitaram de concentrações de inóculos bem maiores para que a virulência aumentasse,

mostrando que a virulência nesses isolados é dependente da quantidade de inoculo introduzido nas larvas.

Scorzoni, et al., (2013) realizaram um estudo com cepas de *C. krusei* e *C. albicans* em *G. mellonella*, e nesse trabalho foi possível verificar que *G. mellonella* foi sensível a infecção por *C. krusei*, porém essa espécie intrinsecamente resistente a FLZ, necessitou de inóculos mais concentrados para aumentar sua virulência. Em comparação com as cepas de *C. albicans*, *C. krusei* foi menos virulento em *G. mellonella*, pois *C. albicans* obteve maior taxa de mortalidade com inóculos menos concentrados. No entanto, através de um estudo com isolados clínicos e isogênicos de *Aspergillus fumigatus*, resistentes aos azóis, observou-se que mesmo com algumas mutações no gene *cyp51A*, todas as cepas demonstraram crescimento similar *in vitro* e eram igualmente virulentas em *G. mellonella* (Gomez-Lopez et al., 2014).

Quando analisamos as curvas de crescimento dos isolados de *C. neoformans*, foi constatado que a 37°C, o isolado resistente a FLZ obteve um crescimento mais demorado quando comparado com os outros isolados. Já a cepa ATCC 56990, não foi capaz de crescer a 37°C, demonstrando que a falta de crescimento pode ser o responsável pela baixa virulência em *G. mellonella*. O isolado sensível a FLZ, CL e o resistente 118R, ao contrário da cepa ATCC 56990, foram capazes de crescer a 37°C, porém o resistente 118R cresceu menos a essa temperatura, mostrando que independente da espécie, a resistência de alguma forma pode afetar o crescimento a 37°C nesses isolados.

Crescimento a temperatura corporal do hospedeiro é uma exigência para a virulência (Perfect, 2006) e em *C. neoformans*, a termotolerância pode ter uma importância desproporcionada sobre qualquer outro fator de virulência, pois ao comparar *C. neoformans* com outras espécies, muitos possuem fatores de virulência, como cápsulas e a produção de lacase, mas não são conhecidos como patógenos, simplesmente por não serem capazes de crescer a temperatura corporal de mamíferos (Petter et al., 2001). Garcia-Solache, et. al., (2013), verificaram que cepas não patogênicas de *Cryptococcus* foram intolerantes a temperatura, sendo dependentes do aumento de organismos inoculados para obtenção de uma maior virulência, em *G. mellonella*, enquanto que para *C. neoformans* var. *grubii*, a virulência aumentou a temperaturas mais altas, mostrando que a replicação rápida a partir de 32°C pode ser responsável por uma maior virulência. O aumento da virulência de *C. neoformans* var. *grubii* em temperaturas mais elevadas do que a temperatura ótima de crescimento, poderia ser consequência de um aumento da resposta ao estresse do fungo, tornando-o mais apto a sobreviver em condições hostis (Brown, Campbell e Lodge, 2007).

Quantificação de melanina na hemolinfa das larvas, após infecção com os isolados de *C. neoformans* e *C. gattii*, foi verificada, e através desse ensaio foi visto que entre os isolados de *C. neoformans* não houve diferença estatística nos diferentes tempos quando comparado com o controle (larvas inoculadas com PBS). Após infecção das larvas com os isolados de *C. gattii*, foi observado que houve maior melanização, em todos os isolados, após 5 horas de infecção quando comparados com os controles.

A melanina desempenha um papel importante na defesa de *G. mellonella* e em outros organismos invertebrados. A resposta humoral em *G. mellonella*, consiste na produção de diversas moléculas com propriedades antimicrobianas, incluindo a enzima fenoloxidase (Eisenman *et al.*, 2014). A melanização é uma reação catalisada pela enzima fenoloxidase e ocorre através da formação de cápsulas que rodeiam partículas estranhas em *G. mellonella* (Bidla *et al.*, 2009). Scorzoni, *et al.*, (2013), observaram que o processo de melanização foi rápido após infecção com *C. krusei* em *G. mellonella*. O grau de melanização dependeu da concentração de inóculo e não da viabilidade das células, indicando que a melanização é um processo inespecífico que depende da presença de partículas estranhas.

A partir de diversos estudos, sabe-se que a produção de melanina é um dos fatores de virulência em *C. neoformans*, auxiliando sua sobrevivência no ambiente e o protegendo contra as defesas do hospedeiro (Kwon-Chung, Polacheck e Popkin, 1982; Rhodes, Polacheck e Kwon-Chung, 1982; Wang, Aisen e Casadevall, 1995), porém essa associação de melanina e virulência não é exclusiva dessa espécie, sendo conservado também em inúmeras bactérias e outras espécies de fungos (Liu e Nizet, 2009). Em modelos murinos foi observado que a pré-melanização de *C. neoformans*, resultou em altas cargas fúngicas encontradas nos pulmões e no cérebro após períodos curtos de infecção (Bryan *et al.*, 2010). Em *G. mellonella*, estudos recentes demonstraram ao contrário, onde surpreendentemente, as larvas infectadas com células de *C. neoformans* melanizadas viveram mais do que aquelas infectadas com fungos não melanizados, sendo constatada uma maior resposta nas larvas infectadas com células melanizadas. Estes resultados sugerem que a melanina fúngica ativa a resposta imune de *G. mellonella*, resultando assim na diminuição da virulência observada com células melanizadas (Eisenman *et al.*, 2014).

Adaptação de fungos patogênicos ao hospedeiro é a chave para a compreensão das doenças causadas por estes microrganismos. Durante a infecção, respostas adaptativas são acionadas para evadir a resposta imune e sobreviver no hospedeiro (Zaragoza, 2011). Além disso, os fungos patogênicos frequentemente mudam de morfologia celular. Por exemplo, é bem conhecido como diferentes tipos de leveduras induzem pseudohifas durante a infecção.

Estas formas celulares têm sido bem caracterizadas em *Candida albicans* e são produzidos por outras espécies de *Candida* (Whiteway e Bachewich, 2007). Essas mudanças morfológicas são importantes para o curso da infecção, e fornece ao fungo mecanismos para alcançar novos ambientes nutricionais, evadir a resposta imune do hospedeiro, e se disseminar através do organismo (Zaragoza, 2011).

Em nosso trabalho, a caracterização morfológica *in vivo* e *in vitro* também foi analisada. Quando comparamos a morfologia dos isolados de *C. neoformans* após infecção em *G. mellonella*, foi observado que tanto o isolado sensível a FLZ, 26S, quanto o isolado resistente a mesma droga, 30R, tiveram um aumento progressivo no tamanho total das células, onde algumas dessas chegaram a medir 20 μ após 72 horas de infecção (T3). Porém, quando o crescimento da cápsula foi analisado, foi constatado que o aumento da cápsula foi mais significativo no isolado 26S, quando comparado com os outros isolados, mostrando que esse aumento na cápsula pode ser responsável pela diferença na virulência entre os isolados de *C. neoformans*.

Em *C. neoformans*, já foi estabelecido que a sua virulência a 37°C não foi relacionado a um melhor crescimento em altas temperaturas, mas sim, pela diminuição da fagocitose e o aumento, tanto o corpo da célula quanto da cápsula a 37 °C, uma vez que através destes dados foi possível observar que o aumento da cápsula foi mais significativo a 37 °C do que a 30°C, e possivelmente, a imunidade de *G. mellonella* pode ser prejudicada a altas temperaturas (García-Rodas *et al.*, 2011).

Nossos resultados demonstraram que os isolados de *C. neoformans* sensíveis a FLZ foram mais fagocitados após infecção em *G. mellonella*, e mesmo assim esses foram mais virulentos quando comparados com o isolado resistente a FLZ, que foi menos fagocitado.

Já foi visto que *Cryptococcus neoformans* não causa uma redução no número de hemócitos nas duas primeiras horas após infecção (Mylonakis *et al.*, 2005; García-Rodas *et al.*, 2011), e isso pode estar relacionado com o fato de que este fungo é um agente patogênico intracelular facultativo e pode sobreviver em células fagocíticas sem afetar sua viabilidade (Feldmesser, Tucker e Casadevall, 2001; García-Rodas e Zaragoza, 2012). Os isolados sensíveis a FLZ de *C. gattii* foram menos fagocitados quando comparados com o isolado resistente a mesma droga, provavelmente devido ao aumento da cápsula e do corpo celular observados após infecção em *G. mellonella*.

Os isolados de *C. gattii*, após infecção em *G. mellonella*, também alteraram de tamanho. A cepa ATCC 56990 e o isolado sensível a FLZ obtiveram um crescimento significativo, aonde algumas células chegaram a medir 40 μ e 30 μ para cepa ATCC 56990 e

o isolado sensível a FLZ, CI, respectivamente. O isolado resistente a FLZ, 118R, não demonstrou o mesmo aumento. Após o mesmo período de infecção, as cápsulas desses isolados foram analisadas e mais uma vez, houve um aumento significativo na cepa ATCC 56990 e no isolado sensível a FLZ, CL. Já para o isolado 118R, o mesmo aumento não foi observado. A falta de virulência da cepa ATCC 56990, pode ser explicada tanto pela falta de crescimento, quanto através do tamanho obtido após infecção, acredita-se que por demonstrar alteração significativa, o reconhecimento pelo sistema imune da *G. mellonella* contra esse patógeno tenha sido ativado de forma mais rápida e a infecção contida, uma vez que a melanização da hemolinfa das larvas infectadas por essa cepa foi mais alta após 1 hora de infecção, fenótipo não observado em outros isolados.

Após comparação do tamanho da cápsula entre isolados das espécies *neoformans* e *gattii*, foi verificado que o tamanho da cápsula de *C. gattii* era significativamente maior quando comparado aos isolados de *C. neoformans*, revelando que essa diferença de tamanho ocorre entre espécies e tipos moleculares (Thompson *et al.*, 2014).

Análise da alteração morfológica também foi realizada *in vitro*, e mais uma vez, é possível observar que para todos os isolados estudados, houve aumento da cápsula após 24 horas de incubação a 37°C, porém, quando analisados os isolados sensíveis com os isolados resistentes a FLZ, foi visto que novamente, os isolados 30R e 118R, obtiveram menor indução da cápsula.

Alterações morfológicas também podem ser consideradas um fator de virulência, pois dessa forma, o patógeno pode fugir do reconhecimento imunológico do hospedeiro e disseminar a infecção (Coelho, Bocca e Casadevall, 2014). Alguns estudos já demonstraram que o aparecimento de pseudohifas em *C. neoformans*, aumenta sua resistência no ambiente, porém sua virulência diminui *in vivo* (Magditch *et al.*, 2012). Outro tipo de alteração morfológica é o aparecimento de células gigantes em *C. neoformans*. Diversos estudos já demonstraram esse fenômeno, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (Okagaki *et al.*, 2010; Zaragoza *et al.*, 2010; García-Rodas *et al.*, 2011). Três variações morfológicas e fenotípicas em *C. neoformans* foram identificadas, mudanças na estrutura da cápsula, alterações no tamanho da cápsula e mudanças no tamanho total da célula, o que pode ser alcançado pela formação de células gigantes, levando a consequências importantes na interação com o hospedeiro durante a infecção (Zaragoza, 2011). Em nossos resultados, foi possível observar que tanto alterações no tamanho das células quanto no aumento da cápsula foram detectadas na maioria dos isolados, principalmente após infecção *in vivo*. Porém, o aumento de tamanho das células dos isolados de *C. gattii* (ATCC 56990 e CL) não os levaram a serem mais virulentos, pelo contrário, provavelmente, o aumento dessas células foi decisivo

para o reconhecimento mais rápido do sistema imune da *G. mellonella* e conseguir conter a infecção. Em *C. neoformans*, o isolado sensível a FLZ, se demonstrou mais virulento que o 30R (resistente a FLZ) em *G. mellonella*, e nesse isolado, provavelmente o aumento da cápsula após infecção in vivo e o crescimento eficiente a 37°C foram decisivos.

O surto ocorrido por infecções de *C. gattii* no noroeste do Pacífico, indica que há necessidade de melhor compreensão das diferenças na virulência dessa espécie e das opções terapêuticas disponíveis para esse patógeno emergente (Thompson *et al.*, 2014). Alguns pacientes com essas infecções respondem mal aos antifúngicos administrados, e altas concentrações inibitórias mínimas, frente aos azóis, têm sido relatadas para os isolados de *C. gattii* no noroeste do pacífico. Após estudo realizado por de Gast, et al., (2013), com isolados de *C. gattii* (VGII), verificou-se que nem variações na sequência do gene *ERG11* nem a super expressão deste gene foram responsáveis pelas elevadas CIMs encontradas para esses isolados.

Já foi constatado que há diferenças clínicas entre as infecções por *C. neoformans* e *C.gattii*, e, que o tratamento por períodos mais longos em pacientes afetados por espécies *gattii* obtiveram melhores resultados (Marr, 2011; Ngamskulrunroj *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2013). Desse modo, a compreensão dos mecanismos responsáveis por essas diferenças fenotípicas e clínicas são extremamente importantes, uma vez que a expressão de fatores de virulência associados a cada uma das espécies ainda necessita de um melhor entendimento, uma vez que, estudos de virulência realizados, principalmente com *C. neoformans*, são essenciais, mas ainda é difícil extrapolar os resultados destes estudos rigorosamente controlados para isolados clínicos, em que vários determinantes de virulência são expressos de forma diferente (Clancy *et al.*, 2006).

O tratamento da criptococose ainda continua sendo uma questão de difícil gestão, devido ao pouco desenvolvimento de novos medicamentos e de estudos recentes definitivos (Perfect *et al.*, 2010).

6. Conclusões.

1. Foi possível observar que os isolados clínicos sequenciais de *C. neoformans* 26S, 27I e 30R possuem perfis de virulência em *G. mellonella* inversamente proporcional à sensibilidade dos isolados tanto nos ensaios de sobrevivências quanto para a determinação dos índices de fagocitose, principalmente entre o isolado sensível (26S) e o resistente (30R).
2. Para os isolados clínicos sequenciais de *C. neoformans*, foi observado aumento progressivo discreto das células também inversamente proporcional à sensibilidade após infecção em *G. mellonella* (células maiores nos isolados mais sensíveis). Entretanto para os

isolados ambientais de *C. gattii* o mesmo ocorreu com o aparecimento de células gigantes para o isolado sensível (CL).

3. Em relação ao tamanho da cápsula nos ensaios de indução *in vitro*, foi observado que para os isolados sequenciais de *C. neoformans*, a cápsula expressou um tamanho maior no isolado sensível (26S) quando comparado com o isolado 30R. Em contraste, a expressão da cápsula nos isolados de *C. gattii* foi maior no isolado resistente (118R).

4. Todos os derivados de galatos de alquila selecionados G11, G12, G14, G15, G16 e G17 apresentaram ótima atividade antifúngica contra as cepas testadas, em especial os galatos G14, G16 e G17, que apresentaram espectro para as duas espécies independentemente do perfil de sensibilidade dos isolados.

5. Os derivados G14, G16 e G17 não se mostraram citotóxicos sobre as células epiteliais de pulmão A549 e MRC-5 e foram os que tiveram melhores índices de seletividade em especial o maior índice foi para a espécie *C. gattii*, mostrando a segurança e a eficácia dessas moléculas para o uso proposto neste trabalho.

6. O galato de n-dodecila (G16), selecionado para os demais testes também apresentou atividade aditiva no teste de sinergismo, quando utilizado em associação com fluconazol, reduzindo os valores de CIM quando associada com este fármaco.

7. Os resultados da expressão dos genes codificadores de bombas de efluxo (*MDR1* e *AFR1*) mostraram que os isolados clínicos sequenciais de *C. neoformans* que foram recuperados do paciente durante a terapia com fluconazol expressaram as bombas, embora estes pareçam não estarem envolvidos na resistência ao fluconazol especificamente nos isolados 30R e 118R, exceto para o gene *AFR1* no qual houve diferença estatística significativa entre sua expressão na cepa sensível de *Cryptococcus neoformans* (26S) e na de sensibilidade intermediária (27I) e a resistente (30R).

8. O galato de n-dodecila, G16, foi capaz de inibir a expressão dos genes codificadores de bombas de efluxo, *MDR1* e *AFR1*, o que torna essa molécula promissora também para a utilização com finalidade de inibição da atividade de bombas de efluxo em células que utilizam o aumento da expressão desses genes como mecanismo de resistência.

7. Bibliografia:

ALLER, A. I. et al. Antifungal susceptibility of *Cryptococcus neoformans* isolates in HIV-infected patients to fluconazole, itraconazole and voriconazole in Spain: 1994-1996 and 1997-2005. **Chemotherapy**, v. 53, n. 4, p. 300-5, 2007. ISSN 1421-9794. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17496416> >.

ANDRADE-SILVA, L. et al. Susceptibility profile of clinical and environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in Uberaba, Minas Gerais, Brazil. **Med Mycol**, v. 51, n. 6, p. 635-40, Aug 2013. ISSN 1460-2709. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23343452> >.

ANZAI, M. C. et al. *Cryptococcus gattii* VGII in a *Plathymenia reticulata* hollow in Cuiabá, Mato Grosso, Brazil. **Mycoses**, v. 57, n. 7, p. 414-8, Jul 2014. ISSN 1439-0507. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24612138> >.

ARMENGOU, A. et al. Possible development of resistance to fluconazole during suppressive therapy for AIDS-associated cryptococcal meningitis. **Clin Infect Dis**, v. 23, n. 6, p. 1337-8, Dec 1996. ISSN 1058-4838. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8953097> >.

ASAI, K. et al. Formation of azole-resistant *Candida albicans* by mutation of sterol 14-demethylase P450. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 43, n. 5, p. 1163-9, May 1999. ISSN 0066-4804. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10223930> >.

BARRETT, J. P. et al. A systematic review of the antifungal effectiveness and tolerability of amphotericin B formulations. **Clin Ther**, v. 25, n. 5, p. 1295-320, May 2003. ISSN 0149-2918. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12867214> >.

BENADUCCI, T. **Sensibilidade de biofilmes de *Cryptococcus* spp. aos antifúngicos sintéticos e naturais**. 2013. 141. Análises Clínicas., **Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara-UNESP.**, Araraquara, São Paulo- Brasil.

BENNETT, J. E. et al. A comparison of amphotericin B alone and combined with flucytosine in the treatment of cryptococcal meningitis. **N Engl J Med**, v. 301, n. 3, p. 126-31, Jul 1979. ISSN 0028-4793. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/449951> >.

BERG, J.; CLANCY, C. J.; NGUYEN, M. H. The hidden danger of primary fluconazole prophylaxis for patients with AIDS. **Clin Infect Dis**, v. 26, n. 1, p. 186-7, Jan 1998. ISSN 1058-4838. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9455533> >.

BERNAL-MARTINEZ, L. et al. Susceptibility profile of clinical isolates of non-*Cryptococcus neoformans*/non-*Cryptococcus gattii* *Cryptococcus* species and literature review. **Med Mycol**, v. 48, n. 1, p. 90-6, Feb 2010. ISSN 1460-2709. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19235546> >.

BIDLA, G. et al. Activation of insect phenoloxidase after injury: endogenous versus foreign elicitors. **J Innate Immun**, v. 1, n. 4, p. 301-8, 2009. ISSN 1662-8128. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20375588> >.

BOEKHOUT, T. et al. Molecular typing of *Cryptococcus neoformans*: taxonomic and epidemiological aspects. **Int J Syst Bacteriol**, v. 47, n. 2, p. 432-42, Apr 1997. ISSN 0020-7713. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9103633> >.

BOSCH, I.; CROOP, J. P-glycoprotein multidrug resistance and cancer. **Biochim Biophys Acta**, v. 1288, n. 2, p. F37-54, Oct 1996. ISSN 0006-3002. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8876632> >.

BOVERS, M.; HAGEN, F.; BOEKHOUT, T. Diversity of the *Cryptococcus neoformans*-*Cryptococcus gattii* species complex. **Rev Iberoam Micol**, v. 25, n. 1, p. S4-12, Mar 2008. ISSN 1130-1406. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18338917> >.

BOW, E. J. Long-term antifungal prophylaxis in high-risk hematopoietic stem cell transplant recipients. **Med Mycol**, v. 43 Suppl 1, p. S277-87, May 2005. ISSN 1369-3786. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16110821> >.

BRANDT, M. E. et al. Trends in antifungal drug susceptibility of *Cryptococcus neoformans* isolates in the United States: 1992 to 1994 and 1996 to 1998. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 45, n. 11, p. 3065-9, Nov 2001. ISSN 0066-4804. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11600357> >.

BRATTON, E. W. et al. Approaches to antifungal therapies and their effectiveness among patients with cryptococcosis. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 57, n. 6, p. 2485-95, Jun 2013. ISSN 1098-6596. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23478968> >.

BRENNAN, M. et al. Correlation between virulence of *Candida albicans* mutants in mice and *Galleria mellonella* larvae. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 34, n. 2, p. 153-7, Oct 2002. ISSN 0928-8244. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12381467> >.

BRIZENDINE, K. D.; BADDLEY, J. W.; PAPPAS, P. G. Pulmonary cryptococcosis. **Semin Respir Crit Care Med**, v. 32, n. 6, p. 727-34, Dec 2011. ISSN 1098-9048. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22167400> >.

BROWN, S. M.; CAMPBELL, L. T.; LODGE, J. K. *Cryptococcus neoformans*, a fungus under stress. **Curr Opin Microbiol**, v. 10, n. 4, p. 320-5, Aug 2007. ISSN 1369-5274. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17707685> >.

BRYAN, R. A. et al. Radioimmunotherapy is more effective than antifungal treatment in experimental cryptococcal infection. **J Infect Dis**, v. 202, n. 4, p. 633-7, Aug 2010. ISSN 1537-6613. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20594103> >.

BULMER, G. S.; SANS, M. D.; GUNN, C. M. Cryptococcus neoformans. I. Nonencapsulated mutants. **J Bacteriol**, v. 94, n. 5, p. 1475-9, Nov 1967. ISSN 0021-9193. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6057803> >.

BYRNES, E. J. et al. Molecular evidence that the range of the Vancouver Island outbreak of Cryptococcus gattii infection has expanded into the Pacific Northwest in the United States. **J Infect Dis**, v. 199, n. 7, p. 1081-6, Apr 2009. ISSN 0022-1899. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19220140> >.

BYRNES, E. J.; HEITMAN, J. Cryptococcus gattii outbreak expands into the Northwestern United States with fatal consequences. **F1000 Biol Rep**, v. 1, 2009. ISSN 1757-594X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20150950> >.

BYRNES, E. J. et al. Emergence and pathogenicity of highly virulent Cryptococcus gattii genotypes in the northwest United States. **PLoS Pathog**, v. 6, n. 4, p. e1000850, Apr 2010. ISSN 1553-7374. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20421942> >.

CANNON, R. D. et al. Efflux-mediated antifungal drug resistance. **Clin Microbiol Rev**, v. 22, n. 2, p. 291-321, Table of Contents, Apr 2009. ISSN 1098-6618. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19366916> >.

CASADEVALL, A.; PIROFSKI, L. A. Host-pathogen interactions: redefining the basic concepts of virulence and pathogenicity. **Infect Immun**, v. 67, n. 8, p. 3703-13, Aug 1999. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10417127> >.

_____. Microbial virulence results from the interaction between host and microorganism. **Trends Microbiol**, v. 11, n. 4, p. 157-8; author reply 158-9, Apr 2003. ISSN 0966-842X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12706990> >.

CASTANHEIRA, M. et al. Activity of echinocandins and triazoles against a contemporary (2012) worldwide collection of yeast and moulds collected from invasive infections. **Int J Antimicrob Agents**, v. 44, n. 4, p. 320-6, Oct 2014. ISSN 1872-7913. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25129315> >.

CASTRO, A. F.; ALTENBERG, G. A. Inhibition of drug transport by genistein in multidrug-resistant cells expressing P-glycoprotein. **Biochem Pharmacol**, v. 53, n. 1, p. 89-93, Jan 1997. ISSN 0006-2952. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8960067> >.

CHATURVEDI, V.; CHATURVEDI, S. Cryptococcus gattii: a resurgent fungal pathogen. **Trends Microbiol**, v. 19, n. 11, p. 564-71, Nov 2011. ISSN 1878-4380. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21880492> >.

CHAU, T. T. et al. A prospective descriptive study of cryptococcal meningitis in HIV uninfected patients in Vietnam - high prevalence of Cryptococcus neoformans var grubii in the absence of underlying disease. **BMC Infect Dis**, v. 10, p. 199, 2010. ISSN 1471-2334. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20618932> >.

CHEEMA, M. S.; CHRISTIANS, J. K. Virulence in an insect model differs between mating types in Aspergillus fumigatus. **Med Mycol**, v. 49, n. 2, p. 202-7, Feb 2011. ISSN 1460-2709. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20818921> >.

CHEN, S. C. et al. Antifungal therapy and management of complications of cryptococcosis due to Cryptococcus gattii. **Clin Infect Dis**, v. 57, n. 4, p. 543-51, Aug 2013. ISSN 1537-6591. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23697747> >.

CHEONG, J. W.; MCCORMACK, J. Fluconazole resistance in cryptococcal disease: emerging or intrinsic? **Med Mycol**, v. 51, n. 3, p. 261-9, Apr 2013. ISSN 1460-2709. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22989195> >.

CHONG, H. S. et al. In vitro susceptibility of the yeast pathogen cryptococcus to fluconazole and other azoles varies with molecular genotype. **J Clin Microbiol**, v. 48, n. 11, p. 4115-20, Nov 2010. ISSN 1098-660X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20844209> >.

CHOWDHARY, A. et al. In vitro antifungal susceptibility profiles and genotypes of 308 clinical and environmental isolates of Cryptococcus neoformans var. grubii and Cryptococcus gattii serotype B from north-western India. **J Med Microbiol**, v. 60, n. Pt 7, p. 961-7, Jul 2011. ISSN 1473-5644. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21393452> >.

CHRISMAN, C. J. et al. Phospholipids trigger Cryptococcus neoformans capsular enlargement during interactions with amoebae and macrophages. **PLoS Pathog**, v. 7, n. 5, p. e1002047, May 2011. ISSN 1553-7374. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21637814> >.

CLANCY, C. J. et al. Cryptococcus neoformans var. grubii isolates recovered from persons with AIDS demonstrate a wide range of virulence during murine meningoencephalitis that correlates with the expression of certain virulence factors. **Microbiology**, v. 152, n. Pt 8, p. 2247-55, Aug 2006. ISSN 1350-0872. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16849791> >.

CLEVELAND, K. O.; GELFAND, M. S.; RAO, V. Posaconazole as successful treatment for fungemia due to Cryptococcus albidos in a liver transplant recipient. **QJM**, v. 106, n. 4, p. 361-2, Apr 2013. ISSN 1460-2393. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22843711> >.

COELHO, C.; BOCCA, A. L.; CASADEVALL, A. The tools for virulence of *Cryptococcus neoformans*. **Adv Appl Microbiol**, v. 87, p. 1-41, 2014. ISSN 0065-2164. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24581388> >.

CONSEIL, G. et al. Flavonoids: a class of modulators with bifunctional interactions at vicinal ATP- and steroid-binding sites on mouse P-glycoprotein. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 95, n. 17, p. 9831-6, Aug 1998. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9707561> >.

CORDERO, R. J. et al. Chronological aging is associated with biophysical and chemical changes in the capsule of *Cryptococcus neoformans*. **Infect Immun**, v. 79, n. 12, p. 4990-5000, Dec 2011. ISSN 1098-5522. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21968999> >.

COWEN, L. E. Predicting the emergence of resistance to antifungal drugs. **FEMS Microbiol Lett**, v. 204, n. 1, p. 1-7, Oct 2001. ISSN 0378-1097. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11682169> >.

COWEN, L. E.; ANDERSON, J. B.; KOHN, L. M. Evolution of drug resistance in *Candida albicans*. **Annu Rev Microbiol**, v. 56, p. 139-65, 2002. ISSN 0066-4227. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12142485> >.

COWEN, L. E.; KOHN, L. M.; ANDERSON, J. B. Divergence in fitness and evolution of drug resistance in experimental populations of *Candida albicans*. **J Bacteriol**, v. 183, n. 10, p. 2971-8, May 2001. ISSN 0021-9193. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11325923> >.

COWEN, L. E. et al. Evolution of drug resistance in experimental populations of *Candida albicans*. **J Bacteriol**, v. 182, n. 6, p. 1515-22, Mar 2000. ISSN 0021-9193. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10692355> >.

_____. Harnessing Hsp90 function as a powerful, broadly effective therapeutic strategy for fungal infectious disease. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 106, n. 8, p. 2818-23, Feb 2009. ISSN 1091-6490. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19196973> >.

CRUZ, M. C.; FOX, D. S.; HEITMAN, J. Calcineurin is required for hyphal elongation during mating and haploid fruiting in *Cryptococcus neoformans*. **EMBO J**, v. 20, n. 5, p. 1020-32, Mar 2001. ISSN 0261-4189. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11230126> >.

CUENCA-ESTRELLA, M.; RODRIGUEZ-TUDELA, J. L. The current role of the reference procedures by CLSI and EUCAST in the detection of resistance to antifungal agents in vitro. **Expert Rev Anti Infect Ther**, v. 8, n. 3, p. 267-76, Mar 2010. ISSN 1744-8336. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20192681> >.

DE PAULA E SILVA, A. C. et al. Antifungal activity of decyl gallate against several species of pathogenic fungi. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2014.

DENIZOT, F.; LANG, R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. **J Immunol Methods**, v. 89, n. 2, p. 271-7, May 1986. ISSN 0022-1759. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3486233> >.

EISENMAN, H. C. et al. Reduced virulence of melanized *Cryptococcus neoformans* in *Galleria mellonella*. **Virulence**, v. 5, n. 5, p. 611-8, Jul 2014. ISSN 2150-5608. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24846144> >.

ELLIS, D. Amphotericin B: spectrum and resistance. **J Antimicrob Chemother**, v. 49 Suppl 1, p. 7-10, Feb 2002. ISSN 0305-7453. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11801575> >.

ELLIS, D. H.; PFEIFFER, T. J. Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. **J Clin Microbiol**, v. 28, n. 7, p. 1642-4, Jul 1990. ISSN 0095-1137. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2199524> >.

ESPINEL-INGROFF, A. et al. *Cryptococcus neoformans*-*Cryptococcus gattii* Species Complex: an International Study of Wild-Type Susceptibility Endpoint Distributions and Epidemiological Cutoff Values for Fluconazole, Itraconazole, Posaconazole, and Voriconazole. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 56, n. 11, p. 5898-906, Nov 2012. ISSN 1098-6596. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22948877> >.

_____. *Cryptococcus neoformans*-*Cryptococcus gattii* species complex: an international study of wild-type susceptibility endpoint distributions and epidemiological cutoff values for amphotericin B and flucytosine. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 56, n. 6, p. 3107-13, Jun 2012. ISSN 1098-6596. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22391546> >.

FAVALESSA, O. C. et al. Molecular typing and in vitro antifungal susceptibility of *Cryptococcus* spp from patients in Midwest Brazil. **J Infect Dev Ctries**, v. 8, n. 8, p. 1037-43, 2014. ISSN 1972-2680. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25116671> >.

FAVRE, B.; DIDMON, M.; RYDER, N. S. Multiple amino acid substitutions in lanosterol 14 α -demethylase contribute to azole resistance in *Candida albicans*. **Microbiology**, v. 145 (Pt 10), p. 2715-25, Oct 1999. ISSN 1350-0872. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10537193> >.

FEDHILA, S. et al. Comparative analysis of the virulence of invertebrate and mammalian pathogenic bacteria in the oral insect infection model *Galleria mellonella*. **J Invertebr Pathol**, v. 103, n. 1, p. 24-9, Jan 2010. ISSN 1096-0805. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19800349> >.

FELDMESSER, M. et al. Cryptococcus neoformans is a facultative intracellular pathogen in murine pulmonary infection. **Infect Immun**, v. 68, n. 7, p. 4225-37, Jul 2000. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10858240> >.

FELDMESSER, M.; TUCKER, S.; CASADEVALL, A. Intracellular parasitism of macrophages by Cryptococcus neoformans. **Trends Microbiol**, v. 9, n. 6, p. 273-8, Jun 2001. ISSN 0966-842X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11390242> >.

FERA, M. T.; LA CAMERA, E.; DE SARRO, A. New triazoles and echinocandins: mode of action, in vitro activity and mechanisms of resistance. **Expert Rev Anti Infect Ther**, v. 7, n. 8, p. 981-98, Oct 2009. ISSN 1744-8336. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19803707> >.

FERRARI, M.; FORNASIERO, M. C.; ISETTA, A. M. MTT colorimetric assay for testing macrophage cytotoxic activity in vitro. **J Immunol Methods**, v. 131, n. 2, p. 165-72, Aug 1990. ISSN 0022-1759. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2391427> >.

FIRACATIVE, C.; DUAN, S.; MEYER, W. Galleria mellonella model identifies highly virulent strains among all major molecular types of Cryptococcus gattii. **PLoS One**, v. 9, n. 8, p. e105076, 2014. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25133687> >.

FIUZA, S. M. et al. Phenolic acid derivatives with potential anticancer properties--a structure-activity relationship study. Part 1: methyl, propyl and octyl esters of caffeic and gallic acids. **Bioorg Med Chem**, v. 12, n. 13, p. 3581-9, Jul 2004. ISSN 0968-0896. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15186842> >.

FLING, M. E. et al. Analysis of a Candida albicans gene that encodes a novel mechanism for resistance to benomyl and methotrexate. **Mol Gen Genet**, v. 227, n. 2, p. 318-29, Jun 1991. ISSN 0026-8925. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2062311> >.

FOWLER, Z. L. et al. Development of non-natural flavanones as antimicrobial agents. **PLoS One**, v. 6, n. 10, p. e25681, 2011. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22039419> >.

FOX, D. S. et al. Calcineurin regulatory subunit is essential for virulence and mediates interactions with FKBP12-FK506 in Cryptococcus neoformans. **Mol Microbiol**, v. 39, n. 4, p. 835-49, Feb 2001. ISSN 0950-382X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11251806> >.

FOX, D. S.; HEITMAN, J. Good fungi gone bad: the corruption of calcineurin. **Bioessays**, v. 24, n. 10, p. 894-903, Oct 2002. ISSN 0265-9247. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12325122> >.

FRANZOT, S. P.; SALKIN, I. F.; CASADEVALL, A. Cryptococcus neoformans var. grubii: separate varietal status for Cryptococcus neoformans serotype A isolates. **J Clin Microbiol**, v. 37, n. 3, p. 838-40, Mar 1999. ISSN 0095-1137. Disponible em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9986871> >.

FREY, C. et al. Comparative cytotoxicity of alkyl gallates on mouse tumor cell lines and isolated rat hepatocytes. **Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol**, v. 146, n. 4, p. 520-7, Apr 2007. ISSN 1095-6433. Disponible em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16707268> >.

FROMTLING, R. A.; SHADOMY, H. J.; JACOBSON, E. S. Decreased virulence in stable, acapsular mutants of cryptococcus neoformans. **Mycopathologia**, v. 79, n. 1, p. 23-9, Jul 1982. ISSN 0301-486X. Disponible em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6750405> >.

FUCHS, B. B. et al. Role of filamentation in Galleria mellonella killing by Candida albicans. **Microbes Infect**, v. 12, n. 6, p. 488-96, Jun 2010. ISSN 1769-714X. Disponible em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20223293> >.

FUJITA, K.; KUBO, I. Antifungal activity of octyl gallate. **Int J Food Microbiol**, v. 79, n. 3, p. 193-201, Dec 2002. ISSN 0168-1605. Disponible em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12371654> >.

GALANIS, E. et al. Epidemiology of Cryptococcus gattii, British Columbia, Canada, 1999-2007. **Emerg Infect Dis**, v. 16, n. 2, p. 251-7, Feb 2010. ISSN 1080-6059. Disponible em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20113555> >.

GARCIA-SOLACHE, M. A. et al. Fungal virulence in a lepidopteran model is an emergent property with deterministic features. **MBio**, v. 4, n. 3, p. e00100-13, 2013. ISSN 2150-7511. Disponible em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23631914> >.

GARCÍA-RODAS, R. et al. Cryptococcus neoformans capsular enlargement and cellular gigantism during Galleria mellonella infection. **PLoS One**, v. 6, n. 9, p. e24485, 2011. ISSN 1932-6203. Disponible em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21915338> >.

GARCÍA-RODAS, R.; ZARAGOZA, O. Catch me if you can: phagocytosis and killing avoidance by Cryptococcus neoformans. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 64, n. 2, p. 147-61, Mar 2012. ISSN 1574-695X. Disponible em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22029633> >.

GAREY, K. W. et al. Time to initiation of fluconazole therapy impacts mortality in patients with candidemia: a multi-institutional study. **Clin Infect Dis**, v. 43, n. 1, p. 25-31, Jul 2006. ISSN 1537-6591. Disponible em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16758414> >.

GAST, C. E. et al. Azole Resistance in Cryptococcus gattii from the Pacific Northwest: Investigation of the Role of ERG11. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 57, n. 11, p. 5478-85,

Nov 2013. ISSN 1098-6596. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23979758> >.

GOLDWAY, M. et al. Multidrug resistance in *Candida albicans*: disruption of the BENr gene. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 39, n. 2, p. 422-6, Feb 1995. ISSN 0066-4804. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7726508> >.

GOMEZ-LOPEZ, A. et al. An invertebrate model to evaluate virulence in *Aspergillus fumigatus*: the role of azole resistance. **Med Mycol**, v. 52, n. 3, p. 311-9, Apr 2014. ISSN 1460-2709. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24577012> >.

GOVENDER, N. P. et al. Trends in antifungal drug susceptibility of *Cryptococcus neoformans* isolates obtained through population-based surveillance in South Africa in 2002-2003 and 2007-2008. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 55, n. 6, p. 2606-11, Jun 2011. ISSN 1098-6596. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21444707> >.

GULLO, F. P. et al. Cryptococcosis: epidemiology, fungal resistance, and new alternatives for treatment. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 32, n. 11, p. 1377-91, Nov 2013. ISSN 1435-4373. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24141976> >.

HAGEN, F. et al. Autochthonous and dormant *Cryptococcus gattii* infections in Europe. **Emerg Infect Dis**, v. 18, n. 10, p. 1618-24, Oct 2012. ISSN 1080-6059. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23017442> >.

_____. In vitro antifungal susceptibilities and amplified fragment length polymorphism genotyping of a worldwide collection of 350 clinical, veterinary, and environmental *Cryptococcus gattii* isolates. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 54, n. 12, p. 5139-45, Dec 2010. ISSN 1098-6596. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20855729> >.

HARRIS, J. R. et al. *Cryptococcus gattii* in the United States: clinical aspects of infection with an emerging pathogen. **Clin Infect Dis**, v. 53, n. 12, p. 1188-95, Dec 2011. ISSN 1537-6591. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22016503> >.

HO, S. et al. The mechanism of action of cyclosporin A and FK506. **Clin Immunol Immunopathol**, v. 80, n. 3 Pt 2, p. S40-5, Sep 1996. ISSN 0090-1229. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8811062> >.

ITO, S. et al. Antifungal activity of alkyl gallates against plant pathogenic fungi. **Bioorg Med Chem Lett**, v. 24, n. 7, p. 1812-4, Apr 2014. ISSN 1464-3405. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24618299> >.

JACKSON, A.; HOSSEINIPOUR, M. C. Management of cryptococcal meningitis in sub-saharan Africa. **Curr HIV/AIDS Rep**, v. 7, n. 3, p. 134-42, Aug 2010. ISSN 1548-3576. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20532838> >.

JARVIS, J. N.; MEINTJES, G.; HARRISON, T. S. Outcomes of cryptococcal meningitis in antiretroviral naïve and experienced patients in South Africa. **J Infect**, v. 60, n. 6, p. 496-8, Jun 2010. ISSN 1532-2742. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20307571> >.

JOBINS, S. E. et al. Immunoproteomic approach to elucidating the pathogenesis of cryptococcosis caused by *Cryptococcus gattii*. **J Proteome Res**, v. 9, n. 8, p. 3832-41, Aug 2010. ISSN 1535-3907. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20545298> >.

JOSEPH-HORNE, T. et al. Amphotericin B resistant isolates of *Cryptococcus neoformans* without alteration in sterol biosynthesis. **J Med Vet Mycol**, v. 34, n. 3, p. 223-5, 1996 Jun-Jul 1996. ISSN 0268-1218. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8803806> >.

JUNQUEIRA, J. C. *Galleria mellonella* as a model host for human pathogens: recent studies and new perspectives. **Virulence**, v. 3, n. 6, p. 474-6, Oct 2012. ISSN 2150-5608. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23211681> >.

JUVVADI, P. R. et al. Functional analysis of the calcineurin-encoding gene *cnaA* from *Aspergillus oryzae*: evidence for its putative role in stress adaptation. **Arch Microbiol**, v. 179, n. 6, p. 416-22, Jun 2003. ISSN 0302-8933. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12709783> >.

JUVVADI, P. R.; LAMOTH, F.; STEINBACH, W. J. Calcineurin-Mediated Regulation of Hyphal Growth, Septation, and Virulence in *Aspergillus fumigatus*. **Mycopathologia**, Aug 2014. ISSN 1573-0832. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25118871> >.

KELLY, J.; KAVANAGH, K. Proteomic analysis of proteins released from growth-arrested *Candida albicans* following exposure to caspofungin. **Med Mycol**, v. 48, n. 4, p. 598-605, Jun 2010. ISSN 1460-2709. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20392151> >.

_____. Caspofungin primes the immune response of the larvae of *Galleria mellonella* and induces a non-specific antimicrobial response. **J Med Microbiol**, v. 60, n. Pt 2, p. 189-96, Feb 2011. ISSN 1473-5644. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20947665> >.

KELLY, S. L.; LAMB, D. C.; KELLY, D. E. Y132H substitution in *Candida albicans* sterol 14 α -demethylase confers fluconazole resistance by preventing binding to haem. **FEMS Microbiol Lett**, v. 180, n. 2, p. 171-5, Nov 1999. ISSN 0378-1097. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10556708> >.

KELLY, S. L. et al. The G464S amino acid substitution in *Candida albicans* sterol 14 α -demethylase causes fluconazole resistance in the clinic through reduced affinity. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 262, n. 1, p. 174-9, Aug 1999. ISSN 0006-291X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10448088> >.

KESSLER, A. T.; AL KHARRAT, T.; KOURTIS, A. P. Cryptococcus neoformans as a cause of bronchiolitis obliterans organizing pneumonia. **J Infect Chemother**, v. 16, n. 3, p. 206-9, Jun 2010. ISSN 1437-7780. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20169387> >.

KIDD, S. E. et al. A rare genotype of Cryptococcus gattii caused the cryptococcosis outbreak on Vancouver Island (British Columbia, Canada). **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 101, n. 49, p. 17258-63, Dec 2004. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15572442> >.

KITAGAWA, S. et al. Effects of alkyl gallates on P-glycoprotein function. **Biochem Pharmacol**, v. 70, n. 8, p. 1262-6, Oct 2005. ISSN 0006-2952. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16139251> >.

_____. Structure-activity relationships of the inhibitory effects of flavonoids on P-glycoprotein-mediated transport in KB-C2 cells. **Biol Pharm Bull**, v. 28, n. 12, p. 2274-8, Dec 2005. ISSN 0918-6158. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16327165> >.

KOLLEF, M. et al. Septic shock attributed to Candida infection: importance of empiric therapy and source control. **Clin Infect Dis**, v. 54, n. 12, p. 1739-46, Jun 2012. ISSN 1537-6591. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22423135> >.

KRATZ, J. M. et al. Anti-HSV-1 and anti-HIV-1 activity of gallic acid and pentyl gallate. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 5, p. 437-42, Aug 2008. ISSN 1678-8060. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18797755> >.

KRAUS, P. R.; HEITMAN, J. Coping with stress: calmodulin and calcineurin in model and pathogenic fungi. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 311, n. 4, p. 1151-7, Nov 2003. ISSN 0006-291X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14623301> >.

KRONSTAD, J. W. et al. Expanding fungal pathogenesis: Cryptococcus breaks out of the opportunistic box. **Nat Rev Microbiol**, v. 9, n. 3, p. 193-203, Mar 2011. ISSN 1740-1534. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21326274> >.

KUBO, I.; FUJITA, K.; NIHEI, K. Anti-Salmonella activity of alkyl gallates. **J Agric Food Chem**, v. 50, n. 23, p. 6692-6, Nov 2002. ISSN 0021-8561. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12405763> >.

KUBO, I. et al. Anti-Salmonella activity of (2E)-alkenals. **J Appl Microbiol**, v. 96, n. 4, p. 693-9, 2004. ISSN 1364-5072. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15012807> >.

_____. Non-antibiotic antibacterial activity of dodecyl gallate. **Bioorg Med Chem**, v. 11, n. 4, p. 573-80, Feb 2003. ISSN 0968-0896. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12538022> >.

_____. Antioxidant activity of dodecyl gallate. **J Agric Food Chem**, v. 50, n. 12, p. 3533-9, Jun 2002. ISSN 0021-8561. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12033824> >.

KUBO, I.; XIAO, P.; FUJITA, K. Antifungal activity of octyl gallate: structural criteria and mode of action. **Bioorg Med Chem Lett**, v. 11, n. 3, p. 347-50, Feb 2001. ISSN 0960-894X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11212107> >.

KUDO, M. et al. Effects of Y132H and F145L substitutions on the activity, azole resistance and spectral properties of *Candida albicans* sterol 14-demethylase P450 (CYP51): a live example showing the selection of altered P450 through interaction with environmental compounds. **J Biochem**, v. 137, n. 5, p. 625-32, May 2005. ISSN 0021-924X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15944416> >.

KWON-CHUNG, K. J.; POLACHEK, I.; POPKIN, T. J. Melanin-lacking mutants of *Cryptococcus neoformans* and their virulence for mice. **J Bacteriol**, v. 150, n. 3, p. 1414-21, Jun 1982. ISSN 0021-9193. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6804444> >.

KWON-CHUNG, K. J. et al. Cryptococcosis: clinical and biological aspects. **Med Mycol**, v. 38 Suppl 1, p. 205-13, 2000. ISSN 1369-3786. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11204147> >.

LAMPING, E. et al. Abc1p is a multidrug efflux transporter that tips the balance in favor of innate azole resistance in *Candida krusei*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 53, n. 2, p. 354-69, Feb 2009. ISSN 1098-6596. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19015352> >.

LEAL, P. C. et al. Relation between lipophilicity of alkyl gallates and antifungal activity against yeasts and filamentous fungi. **Bioorg Med Chem Lett**, v. 19, n. 6, p. 1793-6, Mar 2009. ISSN 1464-3405. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19232493> >.

LEHNINGER, A. **Princípios de Bioquímica**. 2006.

LI, S. S.; MODY, C. H. *Cryptococcus*. **Proc Am Thorac Soc**, v. 7, n. 3, p. 186-96, May 2010. ISSN 1943-5665. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20463247> >.

LIU, G. Y.; NIZET, V. Color me bad: microbial pigments as virulence factors. **Trends Microbiol**, v. 17, n. 9, p. 406-13, Sep 2009. ISSN 1878-4380. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19726196> >.

LOCATELLI, C. et al. Antimetastatic activity and low systemic toxicity of tetradecyl gallate in a preclinical melanoma mouse model. **Invest New Drugs**, v. 30, n. 3, p. 870-9, Jun 2012. ISSN 1573-0646. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21221709> >.

LOCATELLI, C.; FILIPPIN-MONTEIRO, F. B.; CRECZYNSKI-PASA, T. B. Alkyl esters of gallic acid as anticancer agents: a review. **Eur J Med Chem**, v. 60, p. 233-9, Feb 2013. ISSN 1768-3254. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23291333> >.

LOCATELLI, C. et al. Gallic acid ester derivatives induce apoptosis and cell adhesion inhibition in melanoma cells: The relationship between free radical generation, glutathione depletion and cell death. **Chem Biol Interact**, v. 181, n. 2, p. 175-84, Oct 2009. ISSN 1872-7786. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19577552> >.

_____. Ester derivatives of gallic acid with potential toxicity toward L1210 leukemia cells. **Bioorg Med Chem**, v. 16, n. 7, p. 3791-9, Apr 2008. ISSN 1464-3391. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18295493> >.

LORTHOLARY, O. Management of cryptococcal meningitis in AIDS: the need for specific studies in developing countries. **Clin Infect Dis**, v. 45, n. 1, p. 81-3, Jul 2007. ISSN 1537-6591. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17554705> >.

MAGDITCH, D. A. et al. DNA mutations mediate microevolution between host-adapted forms of the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. **PLoS Pathog**, v. 8, n. 10, p. e1002936, 2012. ISSN 1553-7374. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23055925> >.

MARR, K. A. *Cryptococcus gattii*: the tip of the iceberg. **Clin Infect Dis**, v. 53, n. 12, p. 1196-8, Dec 2011. ISSN 1537-6591. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22016500> >.

MARTINEZ, L. R.; CASADEVALL, A. Specific antibody can prevent fungal biofilm formation and this effect correlates with protective efficacy. **Infect Immun**, v. 73, n. 10, p. 6350-62, Oct 2005. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16177306> >.

_____. Susceptibility of *Cryptococcus neoformans* biofilms to antifungal agents in vitro. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 50, n. 3, p. 1021-33, Mar 2006. ISSN 0066-4804. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16495265> >.

MARTINEZ-ROSSI, N. M.; PERES, N. T.; ROSSI, A. Antifungal resistance mechanisms in dermatophytes. **Mycopathologia**, v. 166, n. 5-6, p. 369-83, 2008 Nov-Dec 2008. ISSN 0301-486X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18478356> >.

MARTINS, L. M. et al. Genotypes of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* as agents of endemic cryptococcosis in Teresina, Piauí (northeastern Brazil). **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 6, p. 725-30, Sep 2011. ISSN 1678-8060. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22012227> >.

MATSUMOTO, M. T. et al. Genotyping, serotyping and determination of mating-type of *Cryptococcus neoformans* clinical isolates from São Paulo State, Brazil. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 49, n. 1, p. 41-7, 2007 Jan-Feb 2007. ISSN 0036-4665. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17384819> >.

MESA-ARANGO, A. C. et al. The non-mammalian host *Galleria mellonella* can be used to study the virulence of the fungal pathogen *Candida tropicalis* and the efficacy of antifungal drugs during infection by this pathogenic yeast. **Med Mycol**, Nov 2012. ISSN 1460-2709. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23170962> >.

_____. The production of reactive oxygen species is an universal action mechanism of Amphotericin B against pathogenic yeasts and contributes to the fungicidal effect of this drug: AMPHORES study. **Antimicrob Agents Chemother**, Aug 2014. ISSN 1098-6596. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25155595> >.

MEYA, D. B. et al. Cost-effectiveness of serum cryptococcal antigen screening to prevent deaths among HIV-infected persons with a CD4+ cell count < or = 100 cells/microL who start HIV therapy in resource-limited settings. **Clin Infect Dis**, v. 51, n. 4, p. 448-55, Aug 2010. ISSN 1537-6591. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20597693> >.

MEYER, W. et al. Consensus multi-locus sequence typing scheme for *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. **Med Mycol**, v. 47, n. 6, p. 561-70, 2009. ISSN 1460-2709. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19462334> >.

MINEA, B. et al. Species distribution and susceptibility profile to fluconazole, voriconazole and MXP-4509 of 551 clinical yeast isolates from a Romanian multi-centre study. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, Sep 2014. ISSN 1435-4373. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25224578> >.

MODI, M. et al. Ellagic acid & gallic acid from *Lagerstroemia speciosa* L. inhibit HIV-1 infection through inhibition of HIV-1 protease & reverse transcriptase activity. **Indian J Med Res**, v. 137, n. 3, p. 540-8, Mar 2013. ISSN 0971-5916. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23640562> >.

MONDON, P. et al. Heteroresistance to fluconazole and voriconazole in *Cryptococcus neoformans*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 43, n. 8, p. 1856-61, Aug 1999. ISSN 0066-4804. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10428902> >.

MORA, D. J. et al. Genotype and mating type distribution within clinical *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* isolates from patients with cryptococcal meningitis in Uberaba, Minas Gerais, Brazil. **Med Mycol**, v. 48, n. 4, p. 561-9, Jun 2010. ISSN 1460-2709. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19905964> >.

MORAIS, M. C. et al. Suppression of TNF- α induced NF κ B activity by gallic acid and its semi-synthetic esters: possible role in cancer chemoprevention. **Nat Prod Res**, v. 24, n. 18, p. 1758-

65, Nov 2010. ISSN 1478-6427. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20408045>>.

MORSCHHÄUSER, J. Regulation of multidrug resistance in pathogenic fungi. **Fungal Genet Biol**, v. 47, n. 2, p. 94-106, Feb 2010. ISSN 1096-0937. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19665571>>.

MOWLDS, P. et al. Dose-dependent cellular and humoral responses in *Galleria mellonella* larvae following beta-glucan inoculation. **Microbes Infect**, v. 12, n. 2, p. 146-53, Feb 2010. ISSN 1769-714X. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19925881>>.

MUHAMMED, M. et al. The role of mycelium production and a MAPK-mediated immune response in the *C. elegans*-*Fusarium* model system. **Med Mycol**, v. 50, n. 5, p. 488-96, Jul 2012. ISSN 1460-2709. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22225407>>.

MYLONAKIS, E.; ABALLAY, A. Worms and flies as genetically tractable animal models to study host-pathogen interactions. **Infect Immun**, v. 73, n. 7, p. 3833-41, Jul 2005. ISSN 0019-9567. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15972468>>.

MYLONAKIS, E. et al. *Galleria mellonella* as a model system to study *Cryptococcus neoformans* pathogenesis. **Infect Immun**, v. 73, n. 7, p. 3842-50, Jul 2005. ISSN 0019-9567. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15972469>>.

NABEKURA, T.; KAMIYAMA, S.; KITAGAWA, S. Effects of dietary chemopreventive phytochemicals on P-glycoprotein function. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 327, n. 3, p. 866-70, Feb 2005. ISSN 0006-291X. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15649425>>.

NEGRONI, R. Cryptococcosis. **Clin Dermatol**, v. 30, n. 6, p. 599-609, 2012 Nov-Dec 2012. ISSN 1879-1131. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23068147>>.

NGAMSKULRUNGROJ, P. et al. The primary target organ of *Cryptococcus gattii* is different from that of *Cryptococcus neoformans* in a murine model. **MBio**, v. 3, n. 3, 2012. ISSN 2150-7511. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22570277>>.

NIIMI, K. et al. Overexpression of *Candida albicans* CDR1, CDR2, or MDR1 does not produce significant changes in echinocandin susceptibility. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 50, n. 4, p. 1148-55, Apr 2006. ISSN 0066-4804. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16569823>>.

NOSANCHUK, J. D.; CASADEVALL, A. Budding of melanized *Cryptococcus neoformans* in the presence or absence of L-dopa. **Microbiology**, v. 149, n. Pt 7, p. 1945-51, Jul 2003. ISSN 1350-0872. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12855745>>.

ODOM, A. et al. Calcineurin is required for virulence of *Cryptococcus neoformans*. **EMBO J**, v. 16, n. 10, p. 2576-89, May 1997. ISSN 0261-4189. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9184205> >.

OKAGAKI, L. H. et al. Cryptococcal cell morphology affects host cell interactions and pathogenicity. **PLoS Pathog**, v. 6, n. 6, p. e1000953, 2010. ISSN 1553-7374. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20585559> >.

OKAWA, Y.; MIYAUCHI, M.; KOBAYASHI, H. Comparison of pathogenicity of various *Candida tropicalis* strains. **Biol Pharm Bull**, v. 31, n. 8, p. 1507-10, Aug 2008. ISSN 0918-6158. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18670080> >.

OLIVEIRA CARVALHO, V. et al. The new mutation L321F in *Candida albicans* ERG11 gene may be associated with fluconazole resistance. **Rev Iberoam Micol**, Feb 2013. ISSN 2173-9188. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23402828> >.

ORSI, C. F. et al. The ABC transporter-encoding gene AFR1 affects the resistance of *Cryptococcus neoformans* to microglia-mediated antifungal activity by delaying phagosomal maturation. **FEMS Yeast Res**, v. 9, n. 2, p. 301-10, Mar 2009. ISSN 1567-1364. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19220870> >.

PAPPAS, P. G. et al. Guidelines for treatment of candidiasis. **Clin Infect Dis**, v. 38, n. 2, p. 161-89, Jan 15 2004. ISSN 1537-6591 (Electronic)

1058-4838 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14699449 >.

PARK, B. J. et al. Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. **AIDS**, v. 23, n. 4, p. 525-30, Feb 2009. ISSN 1473-5571. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19182676> >.

PATEL, R. Antifungal agents. Part I. Amphotericin B preparations and flucytosine. **Mayo Clin Proc**, v. 73, n. 12, p. 1205-25, Dec 1998. ISSN 0025-6196. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9868423> >.

PAUGAM, A. et al. Increased fluconazole resistance of *Cryptococcus neoformans* isolated from a patient with AIDS and recurrent meningitis. **Clin Infect Dis**, v. 19, n. 5, p. 975-6, Nov 1994. ISSN 1058-4838. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7893896> >.

PEMÁN, J.; CANTÓN, E.; ESPINEL-INGROFF, A. Antifungal drug resistance mechanisms. **Expert Rev Anti Infect Ther**, v. 7, n. 4, p. 453-60, May 2009. ISSN 1744-8336. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19400764> >.

PEREIRA RANGEL, L. et al. Inhibitory effects of gallic acid ester derivatives on *Saccharomyces cerevisiae* multidrug resistance protein Pdr5p. **FEMS Yeast Res**, v. 10, n. 3, p. 244-51, May 2010. ISSN 1567-1364. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20132313> >.

PERFECT, J. R. *Cryptococcus neoformans*: the yeast that likes it hot. **FEMS Yeast Res**, v. 6, n. 4, p. 463-8, Jun 2006. ISSN 1567-1356. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16696642> >.

_____. Cryptococcosis: a model for the understanding of infectious diseases. **J Clin Invest**, v. 124, n. 5, p. 1893-5, May 2014. ISSN 1558-8238. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24743152> >.

PERFECT, J. R. et al. Clinical practice guidelines for the management of cryptococcal disease: 2010 update by the infectious diseases society of america. **Clin Infect Dis**, v. 50, n. 3, p. 291-322, Feb 2010. ISSN 1537-6591. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20047480> >.

PERLIN, D. S. Resistance to echinocandin-class antifungal drugs. **Drug Resist Updat**, v. 10, n. 3, p. 121-30, Jun 2007. ISSN 1368-7646. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17569573> >.

PETTER, R. et al. A survey of heterobasidiomycetous yeasts for the presence of the genes homologous to virulence factors of *Filobasidiella neoformans*, CNLAC1 and CAP59. **Microbiology**, v. 147, n. Pt 8, p. 2029-36, Aug 2001. ISSN 1350-0872. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11495981> >.

PFALLER, M. A. Antifungal drug resistance: mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment. **Am J Med**, v. 125, n. 1 Suppl, p. S3-13, Jan 2012. ISSN 1555-7162. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22196207> >.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J. Epidemiology of invasive mycoses in North America. **Crit Rev Microbiol**, v. 36, n. 1, p. 1-53, 2010. ISSN 1549-7828. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20088682> >.

PFALLER, M. A. et al. Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Study, 1997 to 2007: 10.5-year analysis of susceptibilities of noncandidal yeast species to fluconazole and voriconazole determined by CLSI standardized disk diffusion testing. **J Clin Microbiol**, v. 47, n. 1, p. 117-23, Jan 2009. ISSN 1098-660X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19005141> >.

_____. Global trends in the antifungal susceptibility of *Cryptococcus neoformans* (1990 to 2004). **J Clin Microbiol**, v. 43, n. 5, p. 2163-7, May 2005. ISSN 0095-1137. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15872236> >.

PINTO JUNIOR, V. L. et al. Cryptococcus gattii molecular type VGII as agent of meningitis in a healthy child in Rio de Janeiro, Brazil: report of an autochthonous case. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 43, n. 6, p. 746-8, 2010 Nov-Dec 2010. ISSN 1678-9849. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21181039> >.

POSTERARO, B. et al. Identification and characterization of a Cryptococcus neoformans ATP binding cassette (ABC) transporter-encoding gene, CnAFR1, involved in the resistance to fluconazole. **Mol Microbiol**, v. 47, n. 2, p. 357-71, Jan 2003. ISSN 0950-382X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12519188> >.

PRASAD, R.; PANWAR, S. L.; SMRITI. Drug resistance in yeasts--an emerging scenario. **Adv Microb Physiol**, v. 46, p. 155-201, 2002. ISSN 0065-2911. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12073653> >.

PRASAD, R.; RAWAL, M. K. Efflux pump proteins in antifungal resistance. **Front Pharmacol**, v. 5, p. 202, 2014. ISSN 1663-9812. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25221515> >.

PROKISCH, H. et al. Impairment of calcineurin function in Neurospora crassa reveals its essential role in hyphal growth, morphology and maintenance of the apical Ca²⁺ gradient. **Mol Gen Genet**, v. 256, n. 2, p. 104-14, Sep 1997. ISSN 0026-8925. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9349701> >.

RAO, U. S.; SCARBOROUGH, G. A. Direct demonstration of high affinity interactions of immunosuppressant drugs with the drug binding site of the human P-glycoprotein. **Mol Pharmacol**, v. 45, n. 4, p. 773-6, Apr 1994. ISSN 0026-895X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7514263> >.

RASMUSSEN, C. et al. The calmodulin-dependent protein phosphatase catalytic subunit (calcineurin A) is an essential gene in Aspergillus nidulans. **EMBO J**, v. 13, n. 16, p. 3917-24, Aug 1994. ISSN 0261-4189. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8070419> >.

RASO, T. F. et al. Cryptococcosis outbreak in psittacine birds in Brazil. **Med Mycol**, v. 42, n. 4, p. 355-62, Aug 2004. ISSN 1369-3786. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15473361> >.

REX, J. H. et al. Antifungal susceptibility testing of isolates from a randomized, multicenter trial of fluconazole versus amphotericin B as treatment of nonneutropenic patients with candidemia. NIAID Mycoses Study Group and the Candidemia Study Group. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 39, n. 1, p. 40-4, Jan 1995. ISSN 0066-4804. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7695326> >.

RHODES, J. C.; POLACHEK, I.; KWON-CHUNG, K. J. Phenoloxidase activity and virulence in isogenic strains of *Cryptococcus neoformans*. **Infect Immun**, v. 36, n. 3, p. 1175-84, Jun 1982. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6807845> >.

RICARDO, E. et al. In Vivo and In Vitro Acquisition of Resistance to Voriconazole by *Candida krusei*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 58, n. 8, p. 4604-11, Aug 2014. ISSN 1098-6596. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24867987> >.

RODERO, L. et al. G484S amino acid substitution in lanosterol 14-alpha demethylase (ERG11) is related to fluconazole resistance in a recurrent *Cryptococcus neoformans* clinical isolate. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 47, n. 11, p. 3653-6, Nov 2003. ISSN 0066-4804. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14576140> >.

RODRIGUES, M. L.; NIMRICHTER, L. In good company: association between fungal glycans generates molecular complexes with unique functions. **Front Microbiol**, v. 3, p. 249, 2012. ISSN 1664-302X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22787459> >.

RODRIGUEZ-TUDELA, J. L. et al. Clinical relevance of resistance to antifungals. **Int J Antimicrob Agents**, v. 32 Suppl 2, p. S111-3, Nov 2008. ISSN 0924-8579 (Print)

0924-8579 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19013333 >.

RODRÍGUEZ-TUDELA, J. L.; MARTINEZ-SUAREZ, J. V. Fluconazole and amphotericin B antifungal susceptibility testing by National Committee for Clinical Laboratory Standards broth microdilution method compared with E-test and semiautomated broth microdilution test. **J Clin Microbiol**, v. 35, n. 1, p. 336-7, Jan 1997. ISSN 0095-1137. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8968944> >.

ROGERS, T. R. Antifungal drug resistance: limited data, dramatic impact? **Int J Antimicrob Agents**, v. 27 Suppl 1, p. 7-11, Jun 2006. ISSN 0924-8579 (Print)

0924-8579 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16701982 >.

ROSATO, A. et al. In vitro synergy testing of anidulafungin with fluconazole, tioconazole, 5-flucytosine and amphotericin B against some *Candida* spp. **Med Chem**, v. 8, n. 4, p. 690-8, Jul 2012. ISSN 1875-6638. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22530916> >.

ROSSI, S. A. **CARACTERIZAÇÃO DO GENE ERG11 ENVOLVIDO NA RESISTÊNCIA DE *Cryptococcus neoformans* E *Cryptococcus gattii* ÀS DROGAS AZÓLICAS E IDENTIFICAÇÃO DE NOVOS ALVOS A PARTIR DE PRODUTOS NATURAIS**. 2010. 104 Análises Clínicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, UNESP., Araraquara - São Paulo - Brasil.

ROSSO, R. et al. Relationship between the lipophilicity of gallic acid n-alkyl esters' derivatives and both myeloperoxidase activity and HOCl scavenging. **Bioorg Med Chem**, v. 14, n. 18, p. 6409-13, Sep 2006. ISSN 0968-0896. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16759870> >.

RUEDA, C.; CUENCA-ESTRELLA, M.; ZARAGOZA, O. Paradoxical growth of *Candida albicans* in the presence of caspofungin is associated with multiple cell wall rearrangements and decreased virulence. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 58, n. 2, p. 1071-83, 2014. ISSN 1098-6596. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24295973> >.

SABIITI, W.; MAY, R. C. Mechanisms of infection by the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. **Future Microbiol**, v. 7, n. 11, p. 1297-313, Nov 2012. ISSN 1746-0921. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23075448> >.

SALUCCI, M. et al. Flavonoids uptake and their effect on cell cycle of human colon adenocarcinoma cells (Caco2). **Br J Cancer**, v. 86, n. 10, p. 1645-51, May 2002. ISSN 0007-0920. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12085217> >.

SANGLARD, D.; COSTE, A.; FERRARI, S. Antifungal drug resistance mechanisms in fungal pathogens from the perspective of transcriptional gene regulation. **FEMS Yeast Res**, v. 9, n. 7, p. 1029-50, Oct 2009. ISSN 1567-1364. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19799636> >.

SANGLARD, D. et al. Multiple resistance mechanisms to azole antifungals in yeast clinical isolates. **Drug Resist Updat**, v. 1, n. 4, p. 255-65, 1998. ISSN 1368-7646. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16904408> >.

_____. Amino acid substitutions in the cytochrome P-450 lanosterol 14 α -demethylase (CYP51A1) from azole-resistant *Candida albicans* clinical isolates contribute to resistance to azole antifungal agents. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 42, n. 2, p. 241-53, Feb 1998. ISSN 0066-4804. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9527767> >.

_____. Susceptibilities of *Candida albicans* multidrug transporter mutants to various antifungal agents and other metabolic inhibitors. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 40, n. 10, p. 2300-5, Oct 1996. ISSN 0066-4804. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8891134> >.

_____. Cloning of *Candida albicans* genes conferring resistance to azole antifungal agents: characterization of CDR2, a new multidrug ABC transporter gene. **Microbiology**, v. 143 (Pt 2), p. 405-16, Feb 1997. ISSN 1350-0872. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9043118> >.

_____. Mechanisms of resistance to azole antifungal agents in *Candida albicans* isolates from AIDS patients involve specific multidrug transporters. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 39, n.

11, p. 2378-86, Nov 1995. ISSN 0066-4804. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8585712> >.

SANGUINETTI, M. et al. Role of AFR1, an ABC transporter-encoding gene, in the in vivo response to fluconazole and virulence of *Cryptococcus neoformans*. **Infect Immun**, v. 74, n. 2, p. 1352-9, Feb 2006. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16428784> >.

SAVI, L. A. et al. Evaluation of anti-herpetic and antioxidant activities, and cytotoxic and genotoxic effects of synthetic alkyl-esters of gallic acid. **Arzneimittelforschung**, v. 55, n. 1, p. 66-75, 2005. ISSN 0004-4172. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15727165> >.

SCHUETZER-MUEHLBAUER, M. et al. Reversal of antifungal resistance mediated by ABC efflux pumps from *Candida albicans* functionally expressed in yeast. **Int J Antimicrob Agents**, v. 22, n. 3, p. 291-300, Sep 2003. ISSN 0924-8579. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13678837> >.

SCORZONI, L. et al. **The use of standard methodology for determination of antifungal activity of natural products against medical yeasts *Candida* sp and *Cryptococcus* sp.** Brazilian Journal of Microbiology. 38 2007.

_____. Antifungal efficacy during *Candida krusei* infection in non-conventional models correlates with the yeast in vitro susceptibility profile. **PLoS One**, v. 8, n. 3, p. e60047, 2013. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23555877> >.

SERRANO, A. et al. Derivatives of gallic acid induce apoptosis in tumoral cell lines and inhibit lymphocyte proliferation. **Arch Biochem Biophys**, v. 350, n. 1, p. 49-54, Feb 1998. ISSN 0003-9861. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9466819> >.

SEVERO, C. B. et al. Cryptococcosis in children. **Paediatr Respir Rev**, v. 10, n. 4, p. 166-71, Dec 2009. ISSN 1526-0550. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19879505> >.

SHAPIRO, A. B.; LING, V. Effect of quercetin on Hoechst 33342 transport by purified and reconstituted P-glycoprotein. **Biochem Pharmacol**, v. 53, n. 4, p. 587-96, Feb 1997. ISSN 0006-2952. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9105411> >.

SHAPIRO, R. S.; ROBBINS, N.; COWEN, L. E. Regulatory circuitry governing fungal development, drug resistance, and disease. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 75, n. 2, p. 213-67, Jun 2011. ISSN 1098-5557. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21646428> >.

SHAROM, F. J. The P-glycoprotein efflux pump: how does it transport drugs? **J Membr Biol**, v. 160, n. 3, p. 161-75, Dec 1997. ISSN 0022-2631. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9425600> >.

SILVA, I. C. et al. Antibacterial activity of alkyl gallates against *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. **J Bacteriol**, v. 195, n. 1, p. 85-94, Jan 2013. ISSN 1098-5530. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23104804> >.

SILVA., D. P. E. **Avaliação por métodos fenotípicos e proteômicos de galatos de alquila com atividade anti – complexo *Paracoccidioides***. 2012. 107. Análises Clínicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, UNESP., Araraquara, São Paulo, Brasil.

SINGH, N. et al. Pulmonary cryptococcosis in solid organ transplant recipients: clinical relevance of serum cryptococcal antigen. **Clin Infect Dis**, v. 46, n. 2, p. e12-8, Jan 2008. ISSN 1537-6591. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18171241> >.

SINGH, N.; FORREST, G.; PRACTICE, A. I. D. C. O. Cryptococcosis in solid organ transplant recipients. **Am J Transplant**, v. 9 Suppl 4, p. S192-8, Dec 2009. ISSN 1600-6143. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20070681> >.

SIONOV, E. et al. Heteroresistance to fluconazole in *Cryptococcus neoformans* is intrinsic and associated with virulence. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 53, n. 7, p. 2804-15, Jul 2009. ISSN 1098-6596. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19414582> >.

_____. *Cryptococcus neoformans* overcomes stress of azole drugs by formation of disomy in specific multiple chromosomes. **PLoS Pathog**, v. 6, n. 4, p. e1000848, Apr 2010. ISSN 1553-7374. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20368972> >.

SPINELLO, A. **New Insights into HIV/AIDS-Associated *Cryptococcosis***. **ISRN AIDS**. Hindawi Publishing Corporation. Volume 2013: 22. p. 2013.

SPRINGER, D. J.; CHATURVEDI, V. Projecting global occurrence of *Cryptococcus gattii*. **Emerg Infect Dis**, v. 16, n. 1, p. 14-20, Jan 2010. ISSN 1080-6059. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20031037> >.

STAPLETON, P. D. et al. Modulation of beta-lactam resistance in *Staphylococcus aureus* by catechins and gallates. **Int J Antimicrob Agents**, v. 23, n. 5, p. 462-7, May 2004. ISSN 0924-8579. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15120724> >.

STEINBACH, W. J. et al. Harnessing calcineurin as a novel anti-infective agent against invasive fungal infections. **Nat Rev Microbiol**, v. 5, n. 6, p. 418-30, Jun 2007. ISSN 1740-1534. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17505522> >.

STIE, J.; FOX, D. Induction of brain microvascular endothelial cell urokinase expression by *Cryptococcus neoformans* facilitates blood-brain barrier invasion. **PLoS One**, v. 7, n. 11, p. e49402, 2012. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23145170> >.

STILLER, R. L. et al. Correlation of in vitro susceptibility test results with in vivo response: flucytosine therapy in a systemic candidiasis model. **J Infect Dis**, v. 147, n. 6, p. 1070-7, Jun 1983. ISSN 0022-1899. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6343524> >.

TEODORO, V. L. et al. Environmental isolation, biochemical identification, and antifungal drug susceptibility of *Cryptococcus* species. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 46, n. 6, p. 759-64, 2013 Nov-Dec 2013. ISSN 1678-9849. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24474019> >.

THOMPSON, G. R. et al. Phenotypic differences of *Cryptococcus* molecular types and their implications for virulence in a *Drosophila* model of infection. **Infect Immun**, v. 82, n. 7, p. 3058-65, Jul 2014. ISSN 1098-5522. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24799631> >.

THORNEWELL, S. J.; PEERY, R. B.; SKATRUD, P. L. Cloning and characterization of *CneMDR1*: a *Cryptococcus neoformans* gene encoding a protein related to multidrug resistance proteins. **Gene**, v. 201, n. 1-2, p. 21-9, Nov 1997. ISSN 0378-1119. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9409767> >.

VAN WYK, M. et al. Multilocus sequence typing of serially collected isolates of *Cryptococcus* from HIV-infected patients in South Africa. **J Clin Microbiol**, v. 52, n. 6, p. 1921-31, Jun 2014. ISSN 1098-660X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24648562> >.

VANDEN BOSSCHE, H. et al. Antifungal drug resistance in pathogenic fungi. **Med Mycol**, v. 36 Suppl 1, p. 119-28, 1998. ISSN 1369-3786. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9988500> >.

VANDEPUTTE, P.; FERRARI, S.; COSTE, A. T. Antifungal resistance and new strategies to control fungal infections. **Int J Microbiol**, v. 2012, p. 713687, 2012. ISSN 1687-9198. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22187560> >.

VARMA, A.; KWON-CHUNG, K. J. Heteroresistance of *Cryptococcus gattii* to fluconazole. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 54, n. 6, p. 2303-11, Jun 2010. ISSN 1098-6596. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20385871> >.

VECCHIARELLI, A.; MONARI, C. Capsular Material of *Cryptococcus neoformans*: Virulence and Much More. **Mycopathologia**, Feb 2012. ISSN 1573-0832. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22314939> >.

VELURI, R. et al. Fractionation of grape seed extract and identification of gallic acid as one of the major active constituents causing growth inhibition and apoptotic death of DU145 human prostate carcinoma cells. **Carcinogenesis**, v. 27, n. 7, p. 1445-53, Jul 2006. ISSN 0143-3334. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16474170> >.

VENKATESWARLU, K. et al. Fluconazole tolerance in clinical isolates of *Cryptococcus neoformans*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 41, n. 4, p. 748-51, Apr 1997. ISSN 0066-4804. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9087482> >.

VICENTE, E. et al. Selective activity against *Mycobacterium tuberculosis* of new quinoxaline 1,4-di-N-oxides. **Bioorg Med Chem**, v. 17, n. 1, p. 385-9, Jan 2009. ISSN 1464-3391. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19058970> >.

VILLAR, R. et al. In vitro and in vivo antimycobacterial activities of ketone and amide derivatives of quinoxaline 1,4-di-N-oxide. **J Antimicrob Chemother**, v. 62, n. 3, p. 547-54, Sep 2008. ISSN 1460-2091. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18502817> >.

WAKIEĆ, R. et al. Voriconazole and multidrug resistance in *Candida albicans*. **Mycoses**, v. 50, n. 2, p. 109-15, Mar 2007. ISSN 0933-7407. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17305773> >.

WANG, Y.; AISEN, P.; CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* melanin and virulence: mechanism of action. **Infect Immun**, v. 63, n. 8, p. 3131-6, Aug 1995. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7622240> >.

WARKENTIEN, T.; CRUM-CIANFLONE, N. F. An update on *Cryptococcus* among HIV-infected patients. **Int J STD AIDS**, v. 21, n. 10, p. 679-84, Oct 2010. ISSN 1758-1052. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21139145> >.

WHITE, T. C.; MARR, K. A.; BOWDEN, R. A. Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. **Clin Microbiol Rev**, v. 11, n. 2, p. 382-402, Apr 1998. ISSN 0893-8512. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9564569> >.

WHITEWAY, M.; BACHEWICH, C. Morphogenesis in *Candida albicans*. **Annu Rev Microbiol**, v. 61, p. 529-53, 2007. ISSN 0066-4227. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17506678> >.

WILKE, M. Treatment and prophylaxis of invasive candidiasis with anidulafungin, caspofungin and micafungin and its impact on use and costs: review of the literature. **Eur J Med Res**, v. 16, n. 4, p. 180-6, Apr 2011. ISSN 0949-2321. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21486732> >.

YOSHIOKA, K. et al. Induction of apoptosis by gallic acid in human stomach cancer KATO III and colon adenocarcinoma COLO 205 cell lines. **Oncol Rep**, v. 7, n. 6, p. 1221-3, 2000 Nov-Dec 2000. ISSN 1021-335X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11032918> >.

ZARAGOZA, O. Multiple Disguises for the Same Party: The Concepts of Morphogenesis and Phenotypic Variations in *Cryptococcus neoformans*. **Front Microbiol**, v. 2, p. 181, 2011. ISSN 1664-302X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21922016> >.

ZARAGOZA, O. et al. Fungal cell gigantism during mammalian infection. **PLoS Pathog**, v. 6, n. 6, p. e1000945, 2010. ISSN 1553-7374. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20585557> >.

_____. The capsule of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. **Adv Appl Microbiol**, v. 68, p. 133-216, 2009. ISSN 0065-2164. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19426855> >.

ZHANG, S.; MORRIS, M. E. Effect of the flavonoids biochanin A and silymarin on the P-glycoprotein-mediated transport of digoxin and vinblastine in human intestinal Caco-2 cells. **Pharm Res**, v. 20, n. 8, p. 1184-91, Aug 2003. ISSN 0724-8741. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12948016> >.

Capítulo II – Participações em Artigos Publicados.

Research Article

Antifungal Activity of Decyl Gallate against Several Species of Pathogenic Fungi

Ana Carolina Alves de Paula e Silva,¹ Caroline Barcelos Costa-Orlandi,¹
Fernanda Patricia Gullo,¹ Fernanda Sangalli-Leite,¹ Haroldo Cesar de Oliveira,¹
Julhiany de Fátima da Silva,¹ Liliana Scorzoni,¹ Nayla de Souza Pitangui,¹
Suélen Andrea Rossi,¹ Tatiane Benaducci,¹ Vanessa Gonçalves Wolf,¹
Luis Octávio Regasini,² Maicon Segalla Petrônio,²
Dulce Helena Siqueira Silva,² Vanderlan S. Bolzani,²
Ana Marisa Fusco-Almeida,¹ and Maria José Soares Mendes-Giannini¹

¹ Departamento de Análises Clínicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista Júlio Mesquita Filho (UNESP), Rodovia Araraquara-Jaú, km 1, 14 800 901 Araraquara, SP, Brazil

² Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista Júlio Mesquita Filho (UNESP), Rua Professor Francisco Degni, 55, Bairro Quitandinha, 14800-060 Araraquara, SP, Brazil

Correspondence should be addressed to Ana Carolina Alves de Paula e Silva; ana_alpasi@hotmail.com and Maria José Soares Mendes-Giannini; gianninimj@gmail.com

Received 11 June 2014; Revised 13 October 2014; Accepted 28 October 2014; Published 20 November 2014

Academic Editor: José L. Ríos

Copyright © 2014 Ana Carolina Alves de Paula e Silva et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

This work aims to demonstrate that the gallic acid structure modification to the decyl gallate (G14) compound contributed to increase the antifungal activity against several species of pathogenic fungi, mainly, *Candida* spp., *Cryptococcus* spp., *Paracoccidioides* spp., and *Histoplasma capsulatum*, according to standardized microdilution method described by Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI) documents. Moreover this compound has a particularly good selectivity index value, which makes it an excellent candidate for broad-spectrum antifungal prototype and encourages the continuation of subsequent studies for the discovery of its mechanism of action.

1. Introduction

In the last two decades, there has been a rapid increase in the incidence of invasive fungal infections (IFIs) caused by fungal pathogens with diminished susceptibility or resistance to many standard antifungal agents. The early treatment of IFIs is essential for optimal clinical outcomes. The effectiveness of standard antifungal drugs (polyenes, azoles, and echinocandins) is not predictable against some emerging fungi and may cause undesirable side effects. Furthermore, the use of antifungals is often inappropriate, exposing patients to adverse effects, drug interactions, and the development of resistance to and super infections by other fungi, reducing

their effectiveness and resulting in significant health expenditures. All of these factors are particularly problematic for immunocompromised (IC) or hospitalized patients with serious underlying diseases [1–5]. Considering that the diagnosis of these diseases remains challenging and that treatment is suboptimal, it is difficult to identify and implement the correct therapies.

The use of modified substances from natural compounds as prototypes of molecules for the treatment of diseases has increased abundantly in recent years. However, many of these products have no proven efficacy and safety. The aim of this study was adding new results about the antifungal activity *in vitro* of 14 alkyl gallates against important pathogenic

fungi, mainly, *Candida parapsilosis*, *C. krusei*, *Cryptococcus gattii*, *Histoplasma capsulatum*, and *Paracoccidioides* spp. The literature presents several data about a wide range of biological activities, and its chemical structures have correlation with the antifungal activity and the cytotoxicity [6, 7]. Kubo et al. [8] made an important observation about the length and hydrophobicity of alkyl groups; to a large extent, these factors are associated with their antifungal activity. Because of the wide range of properties and commercial applications, alkyl gallates are compounds of great interest to both pharmaceutical and chemical industries [9]. Besides, we highlighted the decyl gallate role as a promising broad-spectrum antifungal.

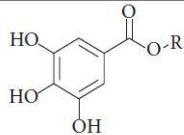
2. Materials and Methods

2.1. Microorganisms. *C. albicans* ATCC 90028 (Ca), *C. krusei* ATCC 6258 (Ck), *C. parapsilosis* ATCC 22019 (Cp), *C. neoformans* ATCC 90012 (Cn), and *C. gattii* ATCC 56990 (Cg) were selected for the study. Four filamentous species were also used, including *T. mentagrophytes* ATCC 11481 (Tm), *T. rubrum* ATCC 28189 (Tr), *A. fumigatus* ATCC 7100 (Af), and *A. niger* ATCC 16404 (An). All species were obtained from the collection of Clinical Mycology Laboratory, School of Pharmaceutical Sciences, UNESP, Araraquara, São Paulo, Brazil. This study also included the dimorphic fungi *H. capsulatum* var. *capsulatum* EH-315 strain (Hc); *P. brasiliensis* isolates 18, D03, and 339 (belonging to the S1 phylogenetic species), isolate 02 (PS2 phylogenetic species), and isolate Epm83 (PS3 phylogenetic species); and *P. lutzii* strain 01 (ATCC MYA-826) and two isolates, EE and 8334MMT (origin is described in Acknowledgments).

2.2. Susceptibility Tests. The minimum inhibitory concentration (MIC; mg L^{-1}) was determined by the antifungal susceptibility test for all species, following the reference broth microdilution method, as outlined in the CLSI. The M27-A3 document [10] was used for yeast and dimorphic fungi species. For dimorphic fungi microdilution test was performed according to de Paula e Silva et al. [11]. The M38-A2 document [12] was used for filamentous species. The determination of the minimum fungicidal concentration (MFC; mg L^{-1}), which is the lowest concentration that did not allow the growth of any fungal colony on the solid medium after the incubation period, was performed as was done by Regasini et al. [13] and Gullo et al. [14]. For this an aliquot from the wells was transferred to a plate with Sabouraud medium (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and incubated at 37°C for the time determined for each species. All the tests were performed in triplicate and in three independent assays. The strain *C. krusei* ATCC 6258 was used also as a quality control for both tests.

The following antifungal drugs were used as controls: amphotericin B (AMB), itraconazole (ITZ), fluconazole (FLZ), terbinafine (TERB), and griseofulvin (GRIS; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). All antifungal drugs were diluted according to the instructions of each CLSI document. The final dilutions and inoculum were in RPMI

TABLE 1: Molecular structure of gallic acid (G1) and alkyl gallates (G2–G17).

			
G1	Gallic acid	H	
G2	Methyl gallate	CH_3	
G3	Ethyl gallate	CH_2CH_3	
G4	Propyl gallate	$(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$	
G5	Isopropyl gallate	$\text{CH}(\text{CH}_3)_2$	
G6	Butyl gallate	$(\text{CH}_2)_3\text{CH}_3$	
G7	Pentyl gallate	$(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$	
R	G9	Isobutyl gallate	$\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$
	G10	Hexyl gallate	$(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$
	G11	Heptyl gallate	$(\text{CH}_2)_6\text{CH}_3$
	G12	Octyl gallate	$(\text{CH}_2)_7\text{CH}_3$
	G14	Decyl gallate	$(\text{CH}_2)_9\text{CH}_3$
	G15	Undecyl gallate	$(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_3$
	G16	Dodecyl gallate	$(\text{CH}_2)_{11}\text{CH}_3$
	G17	Tetradecyl gallate	$(\text{CH}_2)_{13}\text{CH}_3$

1640 medium with L-glutamine without bicarbonate (Gibco; Grand Island, NT, USA) buffered to pH 7.0 with 0.165 M 3-N-morpholinopropanesulfonic acid (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) with 2% glucose.

2.3. Preparation of Alkyl Gallates. Alkyl gallates (Table 1) were synthesized as previously described by Morais et al. [15]. Five milligrams of each dried substance was diluted and solubilized aseptically in appropriate quantities of dimethylsulfoxide (DMSO; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). The amount of DMSO used was previously tested and did not affect the fungal viability (data not shown). For the experiments, the concentration of each substance was calculated for a range of concentrations from 62.5 to 0.002 mg L^{-1} by dilutions in RPMI 1640 medium in a microdilution plate; then the test was performed in accordance with the M27-A3 and M38-A2 documents.

2.4. Cytotoxicity Tests. The cellular cytotoxicity of the alkyl gallates was evaluated against lung tumor cells (A549) and normal fibroblast pulmonary cells (MRC-5), which were obtained from the American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA). The cytotoxicity test was performed by MTT [16] using 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) at 5 mg mL^{-1} . Spectrophotometric readings were taken from microplates in an ELISA reader (Bio-Rad model 3550) at a wavelength of 540 nm. Untreated cells constituted the positive control (viable cells), and cells treated with hydrogen peroxide (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) constituted the negative control (death cells). All the tests were performed

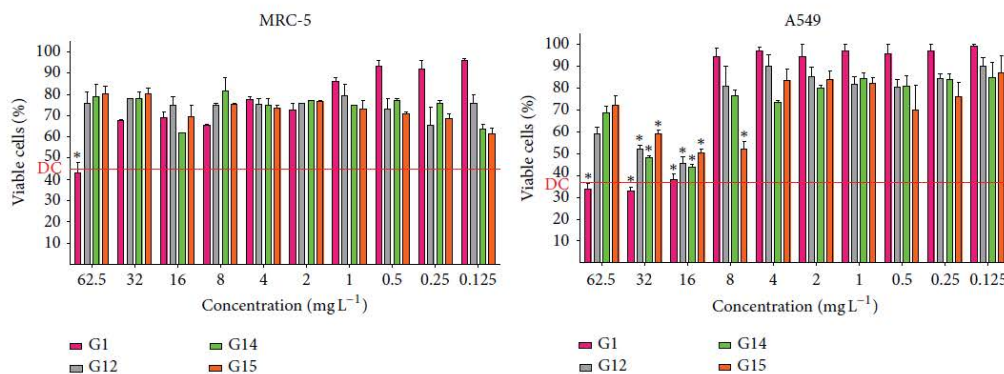


FIGURE 1: Cell viability tested in MRC-5 and A549 after treatment with different concentrations of gallic acid (G1), octyl gallate (G12), decyl gallate (G14), and undecyl gallate (G15). * Indicates that there was no difference statistic ($P > 0.05$) in relation death control (red line represents the mean percentage of viable cells in the death control (DC)).

in triplicate in three independent assays. A test was performed on plates without cells to verify that the reaction cannot occur between alkyl gallates and the reagent to avoid false-positive results (data not shown). Statistical analysis was performed using 2-way ANOVA with Bonferroni post-test using GraphPad Prism 5 software. P values > 0.05 were considered statistically not significant in relation to the death control.

The IC_{50} values of both cell lines were calculated in relation to G1 molecule and the best antifungal activity of alkyl gallate is the G14. This value represents the concentration required for 50% cell death (i.e., the concentration of each alkyl gallate that results in 50% absorbance reduction compared with untreated cells, termed the IC_{50}) [17]. The selective index (SI) was calculated to both cell lines, which is defined as the ratio of the measured IC_{50} in the two cell lines to the MIC of the tested alkyl gallate (i.e., $SI = IC_{50}/MIC$). The SI was considered significant when >10 [18, 19].

3. Results

Table 2 shows the MICs of gallic acid (G1) and the alkyl gallates. These molecules correspond to esters with a different number of carbon chains (G2 to G17, as shown in Table 1). Depending on the fungi, the G1 MIC value varied from 4 to 62.5 mg L^{-1} and the same results were observed for G2 to G11. In general, from the alkyl gallates G12 to G15, there was a decrease in the MIC, ranging from 2 to 16 mg L^{-1} , to the majority of fungal species, except to *Aspergillus sp.* and *C. krusei*, which presented value of 31 and $>62.5 \text{ mg L}^{-1}$. There was an increase in the MIC value to the alkyl gallates G16 and G17. For the genus *Paracoccidioides*, G12 to G15 presented the lowest MICs for the majority of isolates (0.004 to 0.5 mg L^{-1}), and the G16 showed low MIC values (0.015 to 0.125 mg L^{-1}). The MIC value to *H. capsulatum* was 2 mg L^{-1} for the G12 to G15 alkyl gallates.

Some of the best MICs of the alkyl gallates were similar to or lower than the MICs found for current therapeutic antifungal agents. *C. krusei* and *T. rubrum* are FLZ resistant strains with MIC of 64 mg L^{-1} to these agents, and the G12 and G14 presented MICs of $4\text{--}8 \text{ mg L}^{-1}$. Most of the alkyl gallates showed MFC values similar to the MIC values. Nevertheless, G14 had the best MIC when it was evaluated against most fungal species.

The cytotoxicity of gallic acid and the alkyl gallates were evaluated in respiratory epithelial cells showing high cell viability to MRC5 and A549 cells line, revealing the low cytotoxicity of these compounds to both cell lines. Figure 1 shows the results of the cytotoxicity test when the cell lines were treated with G1 and the alkyl gallates G12, G14, and G15, that is, those that had the best antifungal activity against most fungi species tested in this study, and we could observe that these selected alkyl gallates showed low cytotoxicity to both cell lines. In this test, the viability percentage is considered satisfactory when it is above the mean percentage of death control. In Supplementary Material we present the results of the cytotoxicity test to all alkyl gallates used in this study (see Supplementary Material available online at <http://dx.doi.org/10.1155/2014/506273>).

Table 3 presents the IC_{50} values of A549 and MRC-5 cell lines for G1 and G14. These alkyl gallates showed IC_{50} values above the MICs and MFCs determined for the different fungi. The SI was also demonstrated in Table 3, and we could observe that G14 showed the greatest antifungal activity against the majority of fungal species and had higher SI values for both the MRC-5 and A549 cell lines.

4. Discussion

Gallic acid (GA) or 3,4,5-trihydroxybenzoic acid is a natural plant triphenol and it can be produced by acid hydrolysis of tannic acid. The substitution of the GA acid portion allows the obtainment of analogues esters with distinct physicochemical characteristics, especially lipophilicity that is evaluated by

TABLE 2: MICs/MFCs of gallic acid and alkyl gallates against different fungal species.

	Ca	Ck	Cp	Cn	Cg	Tr	Afu	Ani	Hc	EE	8334MMT	01	18	D03	339	02	Emp83
G1	62.5/#	31/#	31/#	31/>62.5	31/>62.5	16/#	>62.5/#	>62.5/#	1/#	8/#	>62.5/#	4/#	16/#	>62.5/#	31/#	4/#	4/#
G2	>62.5/#	>62.5/#	>62.5/#	>62.5/#	16/>62.5	62.5/#	>62.5/#	>62.5/#	31/#	4/#	16/#	2/#	16/#	16/#	16/#	16/#	1/#
G3	>62.5/#	>62.5/#	>62.5/#	>62.5/#	16/>62.5	62.5/#	>62.5/#	>62.5/#	62.5/#	8/#	16/#	1/#	8/#	4/#	8/#	16/#	1/#
G4	>62.5/#	>62.5/#	>62.5/#	>62.5/#	16/>62.5	31/#	>62.5/#	>62.5/#	31/#	2/#	8/#	1/#	8/#	2/#	4/#	4/#	0.25/#
G5	>62.5/#	>62.5/#	>62.5/#	62.5/>62.5	16/>62.5	31/#	>62.5/#	>62.5/#	16/#	2/#	4/#	2/#	16/#	2/#	4/#	4/#	0.015/#
G6	>62.5/#	>62.5/#	>62.5/#	16/>62.5	8/>62.5	31/#	>62.5/#	>62.5/#	16/#	2/#	8/#	2/#	2/#	2/#	4/#	4/#	0.015/#
G7	>62.5/#	>62.5/#	>62.5/#	8/>62.5	4/>62.5	16/#	>62.5/#	>62.5/#	4/#	0.5/#	2/#	0.25/#	0.5/#	0.25/#	1/#	1/#	0.015/#
G9	>62.5/#	>62.5/#	>62.5/#	16/>62.5	4/>62.5	31/#	*	*	8/#	4/#	8/#	1/#	2/#	1/#	4/#	2/#	0.25/#
G10	62.5/#	31/>62.5	31/#	8/31	2/31	16/#	>62.5/#	>62.5/#	4/#	0.5/#	2/#	0.25/#	0.25/#	0.25/#	0.5/#	2/#	1/#
G11	16/31	31/#	31/#	2/16	1/16	4/#	62.5/#	31/#	2/#	0.125/#	0.25/#	0.125/#	0.125/#	0.125/#	0.03/#	0.5/#	0.25/#
G12	8/#	8/#	8/#	2/8	1/8	8/#	31/#	31/#	2/#	0.125/#	0.25/#	0.125/#	0.015/#	0.125/#	0.015/#	0.25/#	0.015/#
G14	4/#	4/31	4/#	1/4	1/2	4/#	31/#	8/#	2/#	0.03/#	0.125/#	0.125/#	0.004/#	0.125/#	0.004/#	0.004/#	0.008/#
G15	2/#	4/>62.5	2/4	1/4	0.5/4	4/#	>62.5/#	>62.5/#	2/#	0.03/#	0.03/#	0.125/#	0.015/#	0.125/#	0.008/#	0.03/#	0.015/#
G16	2/62.5	4/>62.5	4/16	1/4	1/4	4/#	>62.5/#	>62.5/#	4/#	0.03/#	0.03/#	0.125/#	0.125/#	0.125/#	0.06/#	0.015/#	0.5/#
G17	4/>62.5	4/>62.5	31/#	1/16	0.5/4	4/#	>62.5/#	>62.5/#	>62.5/#	0.125/#	0.25/#	0.125/#	0.25/#	0.125/#	0.125/#	0.03/#	0.06/#
AMB	1	2	0.5	0.25	0.5	*	8	4	0.03	0.25	0.25	0.06	0.125	0.008	0.06	0.125	0.06
ITZ	0.5	0.5	0.25	*	*	*	>16	>16	0.03	0.008	0.03	0.008	0.015	0.008	0.015	0.008	0.015
FLZ	1	64	2	4	4	1	64	*	0.125	*	*	*	*	*	*	*	*
TERB	*	*	*	*	*	0.008	0.03	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
GRIS	*	*	*	*	*	1	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*

*MFC = MIC, *compound not tested for this species.

TABLE 3: The IC₅₀ and SI values for both cell lines and all fungi species against gallic acid (G1) and decyl gallate (G14).

	SI			
	G1		G14	
	MRC-5	A549	MRC-5	A549
Ca	0	0	>10	2
Ck	0	0	2	>10
Cp	0	0	>10	>10
Cn	0	0	>10	>10
Cg	0	0	>10	>10
Tm	0	0	>10	>10
Tr	0	0	6	9
Af	0	0	2	2
An	0	0	6	9
Hc	3	2	>10	>10
EE	0	0	>10	>10
8334MMT	0	0	>10	>10
1	1	1	>10	>10
18	0	0	>10	>10
D03	0	0	>10	>10
339	0	0	>10	>10
2	1	1	>10	>10
Epm83	1	1	>10	>10
IC ₅₀ (mg L ⁻¹)	73	93	50	71

the partition coefficient, called alkyl gallates, according to the atom carbon number in the side chain [6, 7]. GA acts as an antiapoptotic agent and protects human cells against oxidative damage, as it has the ability to scavenge and reduce reactive oxygen species (ROS) formation [20]. The alkyl gallates, like methyl, propyl, octyl, and dodecyl gallates, have a wide range of biological activities, used in food manufacturing as antioxidants, as well as in the pharmaceutical and cosmetic industries, as well as antifungal [6, 21], antibacterial [22], antiviral [23], antitumoral [7], and antihemolytic activities [24]. Because of these several interesting properties and commercial applications, alkyl gallates are compounds of great interest to both pharmaceutical and chemical industries.

Our group showed MIC values equivalent to the values found by Leal et al. [6], which confirm the reproducibility of antifungal activity of the alkyl gallates, and brings new results with other important pathogenic fungi, as *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. gattii*, *H. capsulatum*, and *Paracoccidioides* spp. Current increases of antifungal drug resistance in *Candida* spp. and clinical treatment failures are of concern, as invasive candidiasis is a significant cause of mortality in intensive care units [25]. Cryptococcosis is an important globally infectious disease. The majority of illness is among patients with defective cell-mediated immunity. The most common clinical presentation is *Cryptococci* meningitis, with over 1 million cases and 600,000 deaths per year [26]. Between the most commonly endemic mycoses described are paracoccidioidomycosis and histoplasmosis; both are difficult to diagnose, because of limiting factors as isolation conditions

and sensitivity and specificity of microscopic examination of fluids and tissues which does not lead to immediate diagnosis, hindering successful subsequent treatments [27]. These difficulties constitute serious problems and underscore the need for a better understanding of the pathophysiology of different fungal infections, which could help to identify new targets of drug therapy and lead to the development of new antifungal agents [2, 3].

Then, to evaluate the susceptibility to gallic acid and alkyl gallates, 18 fungi species were assayed. G1 showed high MIC value for most isolates and the same results were observed for G2 to G11, suggesting that the esterification process in the original G1 molecule did not improve the antifungal activity. However, the esterification process for the formation of G12 to G15 showed MICs values significantly different; in other words, chains with eight to eleven carbons enhanced the antifungal activity. These findings indicate that this modification contributed positively to improvement of the antifungal activity of the compound. However, this pattern was not observed in G16 and G17 against most isolates. Instead, higher MICs values were recorded, suggesting a cutoff limit for the chain size.

There was not a change in the susceptibility among the alkyl gallates that presented antifungal activity and the species of same genus, but the MIC value found was considered low. This pattern was observed for *Candida* and *Cryptococcus* species, important yeasts more frequently in the last years in critically ill patients [25, 26]. These results confirm the hypothesis that these compounds can be better studied to find the unique compound against the majority of clinical importance fungi.

Histoplasma capsulatum showed constant MIC values to G12 to G15, which indicate that the chains with eight to eleven carbons have the same effect on this fungus, and the *Paracoccidioides* genus is more susceptible to alkyl gallates than the other fungal species tested. These results show that these compounds can be effective in cases of therapies with difficult diagnosis of specific species or genus. High susceptibility between the species *P. lutzii* and *P. brasiliensis* was observed suggesting the necessity of more studies about the mechanism action involved.

We agree with the conclusion presented by Leal et al. [6] that the activity can vary with the fungi tested, mainly between groups of fungi, and that the antifungal activity of alkyl gallates appears to be dependent on the presence of a catechol moiety along with a hydrophobic alkyl chain, similar to the activity of alkanols described by Kubo et al. [28].

Several studies suggest the mechanism of action involves these compounds. Fujita and Kubo [29] suggested by glucose-induced medium acidification method [30] that an alkyl gallate with nine carbons in the chain side causes damage in the cellular membrane including the plasma membrane, because this compound has three hydrophilic hydroxyl groups in the head of gallate acids and the hydrophobic alkyl chain in the tail, disturbing the stable structure of lipid membrane bilayers. The probable explanation is that hydroxyl groups would interact with hydrophilic groups thrusting on the membrane to form hydrogen binds. The nonpolar carbon chains are folded into the membrane bilayers, resulting in

a change of the membrane fluidity. This injury probably resulted in the leakage of potassium ions from fungi cells. This study also suggested that this alkyl gallate might achieve inner membrane of mitochondria, influencing mitochondrial functions related to ROS generation.

The development of an antifungal agent is considered challenging because potential targets can be shared by yeast and mammalian cells; both are eukaryotes and have some homologous metabolic pathways. The optimal antifungal agent should have a wide activity spectrum, have a fungicidal action rather than fungistatic action, be available for oral and parenteral use, be safe in the efficacious dose, have a great cost-effectiveness, and be stable to microbial resistance. Considering all these points, novel and selective molecular targets for the development of new antifungal agents with the goal of minimizing toxicity are of great importance.

In this sense, *in vitro* cytotoxicity assays are the first step to assess whether a compound with potential antifungal activity is promising to become a future antifungal agent. In this study, two lung cell lines were used for the cytotoxicity by MTT assay, since the majority of fungi tested are bound to the respiratory tract. Then, the cell viability for both lines remained greater than 50% at most of concentrations of G14 and the other two alkyl gallates, G12 and G15, considered with good antifungal activity, by the MTT assay.

MTT assay detects the decrease of viable cells number by the reduction of tetrazolium salt to formazan into living cells that occurs mainly through electron transfer at the mitochondrial level [16, 31]. There are in the literature several reports about the cytotoxicity of alkyl gallates. Locatelli et al. [7] described in a review that alkyl gallates are not cytotoxic against rat liver slices and/or nontumoral cell line (monkey kidney fibroblasts, VERO cells), normal mouse brain endothelial cells, human lymphocytes, or when administered in rats or mice.

Another factor to consider is the detachable selectivity index. The SI is an indication of the relative safety of a compound, where higher SI values reflect greater safety, once that this value is defined as the ratio of the IC₅₀ for the MIC value. In other words, the necessary concentration of the alkyl gallate to kill 50% of the health mammalian cells is higher than the concentration considered fungicide. Then SI will be greater than 10 because the values are inversely related. The ratio between the safety and potency of a compound is a very important parameter to consider in the development of therapeutic products [17, 32, 33]. Accordingly, the alkyl gallate G14 had better MIC values and presented an SI above 10 against most fungi, revealing that this alkyl gallate is safe. These data suggest the importance of more studies about the difference of action mechanism between the fungal and mammalian cells, searching for the explanation of the fact that an alkyl gallate with a ten-carbon chain had better activity than the others, with one carbon to more or less.

A point that should be emphasized in favor of this compound is that most of MIC values were similar to or lower than the values of standard antifungal agents, indicating the importance of these substances as promising antifungal agents. One of the major obstacles to antifungal therapy is toxicity, the associated high cost, the development of intrinsic

resistance, or a reduced susceptibility to available antifungal agents.

Amphotericin B is considered the “gold standard” to mainstay of antifungal therapy because of its broad-spectrum activity and few cases of mycological resistance. However, it is associated with frequent and potentially serious adverse effects. The serious adverse effects led to the development of AmB formulations, which presented lower rates of nephrotoxicity, but the cost of these agents is substantial, and access is limited in resource-limited settings [34, 35]. On the other hand, the recent increases in *Candida* spp. resistance to echinocandins and azoles have led to clinical failures. This is a matter of concern because of the limited number of drug classes targeting different fungal components and because the number of patients at risk receiving treatment is continually growing, thus further increasing antifungal drug pressure [25]. In this sense, besides of the possibility of a treatment isolate with this alkyl gallate, a combinatory therapy of the alkyl gallate with the available antifungals agents can be an option that can lead to reduce the dose or improving the action of both antifungal agents.

In conclusion, in this preliminary study, among a series of 14 alkyl gallates, our group selected the decyl gallate that was considered to have the best antifungal activity for a wide variety of pathogenic fungi with clinical importance. These suggest how important the structure activity relationship is to obtain the best antifungal performance. It is a promising compound for further studies once the cytotoxicity tests were compatible with those already described in the literature, and the fungicide action mechanism is not prejudice to mammals cells, showing a SI that guarantees the safety required in this initial step.

Conflict of Interests

The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this paper.

Acknowledgments

This work was financially supported by the Brazilian organizations FAPESP, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), and PADCFCE-UNESP. A. C. A. de Paula e Silva has a fellowship from CAPES. The authors are very grateful to Eduardo Bagagli from the Biosciences Institute of Botucatu, Universidade Estadual Paulista (UNESP), for kindly providing the *Paracoccidioides* isolates and to Maria Lucia Taylor from the Fungal Immunology Laboratory of the Department of Microbiology and Parasitology, School of Medicine, National Autonomous University of Mexico (UNAM), for kindly providing the *H. capsulatum* strain used in this study.

References

- [1] L. Ostrosky-Zeichner, “Invasive mycoses: diagnostic challenges,” *American Journal of Medicine*, vol. 125, no. 1, pp. S14–S24, 2012.

- [2] M. A. Pfaller and D. J. Diekema, "Epidemiology of invasive mycoses in North America," *Critical Reviews in Microbiology*, vol. 36, no. 1, pp. 1–53, 2010.
- [3] M. H. Miceli, J. A. Diaz, and S. A. Lee, "Emerging opportunistic yeast infections," *The Lancet Infectious Diseases*, vol. 11, no. 2, pp. 142–151, 2011.
- [4] A. Martín-Peña, M. Aguilar-Guisado, and J. M. Cisneros, "Does the current treatment of invasive fungal infection need to be reviewed?" *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, vol. 32, no. 8, pp. 523–528, 2014.
- [5] S. C. A. Chen, E. G. Playford, and T. C. Sorrell, "Antifungal therapy in invasive fungal infections," *Current Opinion in Pharmacology*, vol. 10, no. 5, pp. 522–530, 2010.
- [6] P. C. Leal, A. Mascarello, M. Derita et al., "Relation between lipophilicity of alkyl gallates and antifungal activity against yeasts and filamentous fungi," *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, vol. 19, no. 6, pp. 1793–1796, 2009.
- [7] C. Locatelli, F. B. Filippin-Monteiro, and T. B. Creczynski-Pasa, "Alkyl esters of gallic acid as anticancer agents: a review," *European Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 60, pp. 233–239, 2013.
- [8] I. Kubo, P. Xiao, K.-I. Nihei, K.-I. Fujita, Y. Yamagiwa, and T. Kamikawa, "Molecular design of antifungal agents," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 50, no. 14, pp. 3992–3998, 2002.
- [9] I. Kubo, N. Masuoka, T. J. Ha, K. Shimizu, and K.-I. Nihei, "Multifunctional antioxidant activities of alkyl gallates," *The Open Bioactive Compounds Journal*, vol. 3, pp. 1–11, 2010.
- [10] M27-A3, *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeast; Approved Standard*, Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pa, USA, 3rd edition, 2008.
- [11] A. C. de Paula e Silva, H. C. Oliveira, J. F. Silva et al., "Microplate alamarblue assay for paracoccidioides susceptibility testing," *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 51, no. 4, pp. 1250–1252, 2013.
- [12] M38-A2, "Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; approved standard-second edition," in *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)*, Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pa, USA, 2008.
- [13] L. O. Regasini, M. Pivatto, L. Scorzoni et al., "Antimicrobial activity of *Pterogyne nitens* Tul., Fabaceae, against opportunistic fungi," *Revista Brasileira De Farmacognosia-Brazilian Journal of Pharmacognosy*, vol. 20, no. 5, pp. 706–711, 2010.
- [14] F. P. Gullo, J. C. O. Sardi, V. A. F. F. M. Santos et al., "Antifungal activity of maytenin and pristimerin," *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 2012, Article ID 340787, 6 pages, 2012.
- [15] M. C. C. Morais, S. Luqman, T. P. Kondratyuk et al., "Suppression of TNF- α induced NF κ B activity by gallic acid and its semi-synthetic esters: possible role in cancer chemoprevention," *Natural Product Research*, vol. 24, no. 18, pp. 1758–1765, 2010.
- [16] T. Mosmann, "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays," *Journal of Immunological Methods*, vol. 65, no. 1–2, pp. 55–63, 1983.
- [17] M. Adamu, V. Naidoo, and J. N. Eloff, "Some Southern African plant species used to treat helminth infections in ethnoveterinary medicine have excellent antifungal activities," *BMC Complementary and Alternative Medicine*, vol. 12, article 213, 2012.
- [18] R. Villar, E. Vicente, B. Solano et al., "In vitro and in vivo antimycobacterial activities of ketone and amide derivatives of quinoxaline 1,4-di-N-oxide," *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol. 62, no. 3, pp. 547–554, 2008.
- [19] E. Vicente, S. Pérez-Silanes, L. M. Lima et al., "Selective activity against *Mycobacterium tuberculosis* of new quinoxaline 1,4-di-N-oxides," *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, vol. 17, no. 1, pp. 385–389, 2009.
- [20] L. A. Savi, P. C. Leal, T. O. Vieira et al., "Evaluation of antiherpetic and antioxidant activities, and cytotoxic and genotoxic effects of synthetic alkyl-esters of gallic acid," *Arzneimittel-Forschung*, vol. 55, no. 1, pp. 66–75, 2005.
- [21] S. Ito, Y. Nakagawa, S. Yazawa, Y. Sasaki, and S. Yajima, "Antifungal activity of alkyl gallates against plant pathogenic fungi," *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, vol. 24, no. 7, pp. 1812–1814, 2014.
- [22] I. C. Silva, L. O. Regasini, M. S. Petrônio et al., "Antibacterial activity of alkyl gallates against *Xanthomonas citri* subsp. *citri*," *Journal of Bacteriology*, vol. 195, no. 1, pp. 85–94, 2013.
- [23] O. A. Flausino Jr., L. Dufau, L. O. Regasini et al., "Alkyl hydroxybenzoic acid derivatives that inhibit HIV-1 protease dimerization," *Current Medicinal Chemistry*, vol. 19, no. 26, pp. 4534–4540, 2012.
- [24] V. F. Ximenes, M. G. Lopes, M. S. Petrônio, L. O. Regasini, D. H. Siqueira Silva, and L. M. da Fonseca, "Inhibitory effect of gallic acid and its esters on 2,2'-azobis(2-amidino-propane)hydrochloride (AAPH)-induced hemolysis and depletion of intracellular glutathione in erythrocytes," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 58, no. 9, pp. 5355–5362, 2010.
- [25] D. Maubon, C. Garnaud, T. Calandra, D. Sanglard, and M. Cornet, "Resistance of *Candida* spp. to antifungal drugs in the ICU: where are we now?" *Intensive Care Medicine*, vol. 40, no. 9, pp. 1241–1255, 2014.
- [26] D. J. Sloan and V. Parris, "Cryptococcal meningitis: epidemiology and therapeutic options," *Clinical Epidemiology*, vol. 6, no. 1, pp. 169–182, 2014.
- [27] M. J. Buitrago, L. Bernal-Martínez, M. V. Castelli, J. L. Rodríguez-Tudela, and M. Cuenca-Estrella, "Histoplasmosis and paracoccidioidomycosis in a non-endemic area: a review of cases and diagnosis," *Journal of Travel Medicine*, vol. 18, no. 1, pp. 26–33, 2011.
- [28] I. Kubo, H. Muroi, and A. Kubo, "Structural functions of antimicrobial long-chain alcohols and phenols," *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, vol. 3, no. 7, pp. 873–880, 1995.
- [29] K. Fujita and I. Kubo, "Plasma membrane injury induced by nonyl gallate in *Saccharomyces cerevisiae*," *Journal of Applied Microbiology*, vol. 92, no. 6, pp. 1035–1042, 2002.
- [30] R. S. Haworth, E. J. Cragoe Jr., and L. Fliegel, "Amiloride and 5-(N-ethyl-N-isopropyl)amiloride inhibit medium acidification and glucose metabolism by the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*," *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1145, no. 2, pp. 266–272, 1993.
- [31] F. Sangalli-Leite, L. Scorzoni, A. C. Mesa-Arango et al., "Amphotericin B mediates killing in *Cryptococcus neoformans* through the induction of a strong oxidative burst," *Microbes and Infection*, vol. 13, no. 5, pp. 457–467, 2011.
- [32] L. C. Albernaz, J. E. de Paula, G. A. S. Romero et al., "Investigation of plant extracts in traditional medicine of the Brazilian Cerrado against protozoans and yeasts," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 131, no. 1, pp. 116–121, 2010.

- [33] T. F. F. Magalhães, C. M. da Silva, Á. de Fátima et al., "Hydroxyaldimines as potent in vitro anticryptococcal agents," *Letters in Applied Microbiology*, vol. 57, no. 2, pp. 137–143, 2013.
- [34] S. Mistro, I. D. M. Maciel, R. G. de Menezes, Z. P. Maia, R. T. Schooley, and R. Badaró, "Does lipid emulsion reduce amphotericin B nephrotoxicity? A systematic review and meta-analysis," *Clinical Infectious Diseases*, vol. 54, no. 12, pp. 1774–1777, 2012.
- [35] D. Ellis, "Amphotericin B: spectrum and resistance," *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol. 49, 1, pp. 7–10, 2002.

Cryptococcosis: epidemiology, fungal resistance, and new alternatives for treatment

F. P. Gullo · S. A. Rossi · J. de C. O. Sardi · V. L. I. Teodoro ·
M. J. S. Mendes-Giannini · A. M. Fusco-Almeida

Received: 27 March 2013 / Accepted: 11 June 2013
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2013

Abstract Cryptococcosis is an important systemic mycosis and the third most prevalent disease in human immunodeficiency virus (HIV)-positive individuals. The incidence of cryptococcosis is high among the 25 million people with HIV/acquired immunodeficiency syndrome (AIDS), with recent estimates indicating that there are one million cases of cryptococcal meningitis globally per year in AIDS patients. In *Cryptococcus neoformans*, resistance to azoles may be associated with alterations in the target enzyme encoded by the gene ERG11, lanosterol 14 α -demethylase. These alterations are obtained through mutations, or by overexpressing the gene encoding. In addition, *C. gattii* and *C. neoformans* present a heteroresistance phenotype, which may be related to increased virulence. Other species beyond *C. neoformans* and *C. gattii*, such as *C. laurentii*, have been diagnosed mainly in patients with immunosuppression. Infections of *C. albidus* have been isolated in cats and marine mammals. Recent evidence suggests that the majority of infections produced by this pathogen are associated with biofilm growth, which is also related with increased resistance to antifungal agents. Therefore, there is a great need to search for alternative antifungal agents for these fungi. The search for new molecules is currently occurring from nanoparticle drugs of plant peptide origin. This article presents a brief review of the literature regarding the epidemiology of cryptococcosis, as well as fungal resistance and new alternatives for treatment.

Introduction

Cryptococcosis is an important systemic mycosis and the third most prevalent disease in human immunodeficiency virus (HIV)-positive individuals [1]. Among the systemic mycoses, it is ranked as having the highest incidence in immunocompromised patients [2]. It is estimated that one million cases of cryptococcosis per year are associated with HIV worldwide; thus, the increase of systemic mycosis is directly related to the increased incidence of acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) worldwide [3].

The yeasts *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii* are the agents highlighted in cryptococcal meningitis fungal infection [4]. However, there are reports of infections by the species *C. laurentii* and *C. albidus* [5]. The presence of a polysaccharide capsule is considered one of the reasons for the virulence of this yeast, which increases its invasiveness, pathogenicity, and confers resistance to the environment and the host [6, 7].

There are some differences between *C. gattii* and *C. neoformans*. The first difference relates to the ecology of the species, with *C. neoformans* found primarily in soil contaminated by the feces of birds (*Columba livia*) and presenting with a universal distribution [8], while the main niche of *C. gattii* is the hollows of Eucalyptus trees, which is why infection of the species *C. gattii* occurs mostly in immunocompetent individuals in tropical and subtropical regions [9]. Several authors have noted the spread of infection by the species *C. gattii*, since there was an outbreak on Vancouver Island, Canada, the Pacific Northwest, and the southeastern United States, indicating that this yeast shows an adaptation to a temperate climate [10–12].

Cryptococcus infection occurs by the inhalation of infectious cells and is considered a primary pulmonary infection, which may lead to a disseminated infection. The disseminated infection could affect the central nervous system (CNS), causing meningitis, encephalitis, or meningoencephalitis

F. P. Gullo · S. A. Rossi · J. C. O. Sardi · V. L. I. Teodoro ·
M. J. S. Mendes-Giannini · A. M. Fusco-Almeida (✉)
Faculty of Pharmaceutical Sciences of Araraquara,
Department of Clinical Analysis, Laboratory of Clinical Mycology,
Universidade Estadual Paulista (UNESP),
R. Expedicionários do Brasil, 1621, 14801-902 Araraquara,
São Paulo, Brazil
e-mail: ana.marisa@uol.com.br

[13, 14]. The drug of choice in the treatment of cryptococcosis is amphotericin B (AMB), which may or may not be associated with other drugs, such as fluconazole (FCZ) [3]. Despite the effectiveness of treatment, many studies indicate the development of fungal resistance to these drugs, leading to interest in finding new alternatives for the treatment of this systemic mycosis. This review discusses the epidemiology and clinical manifestations of cryptococcosis, mechanisms of yeast resistance, and the latest treatment options for this mycosis.

Epidemiology

Several studies on the ecology of *C. neoformans* and *C. gattii* reveal that there is not a specific niche for these species; they can be found in diverse environmental niches and substrates. The universality and peculiar adaptation of pigeons to urban centers relate to the ubiquity of this fungal agent; it is also easily isolated from environmental sources, such as household dust [8]. Jesus et al. [15] placed ants of the species *Odontomachus bauri*, collected from a hollow tree of the species *Cassia grandis*, in Niger agar with chloramphenicol and amikacin, and left them for 24 h. They subsequently removed the ants and incubated the plates at 25 °C. The plates were examined daily for 4 days. Phenol oxidase-positive colonies were transferred to Sabouraud agar and preserved in glycerol at -70 °C. Biochemical tests were later performed and tested positive for *Cryptococcus* that were genetically typed by restriction fragment length polymorphism (RFLP) with gene URA5, indicating two molecular types of *C. neoformans*, VNI and VNII. According to the current authors, a need exists for a more thorough investigation of samples of insects in and around tree holes, for a longer duration, and at regular intervals to demonstrate that *Odontomachus bauri* and other insects are acting as mechanical vectors of *C. neoformans* and are responsible for the dispersion of this yeast to other substrates. According to Jesus et al. [15], the interaction of fungi with hollow trees and insects forms a system that can be used for understanding the ecology of the fungi.

Advances in molecular studies have refined the epidemiology of isolates of *Cryptococcus*, classifying *C. neoformans* and *C. gattii* into eight molecular types, with the *C. neoformans* var. *grubii* being classified as molecular type VNI and VNII, the variety *neoformans* classified as VNIII and VNIV, and the hybrid *C. gattii* was classified as VGI, VGII, VGIII, and VGIV [16]. This refinement of the isolates of *Cryptococcus* clarified the geographical distribution of species.

The eight types of complex molecular species of *C. neoformans/C. gattii* exhibit large differences in epidemiology, ecological niches, manifestations of infection, type of

reproduction, and virulence. Thus, each strain of *Cryptococcus* behaves differently to various treatment methods. The matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) method is frequently used for fast and accurate identification of the clinical isolates, since phenotypic and genotypic methods such as RFLP, amplified fragment length polymorphism (AFLP), multilocus sequence typing (MLST), and multilocus microsatellite typing (MLMT) are highly expensive and time-consuming [17].

Infection with *C. neoformans* is most common and prevalent in temperate climates and cold, urban areas. The main ecological niche is the dried excreta of birds, especially *Columba livia* pigeons [18, 19], but there are other reports of additional niches, such as dust and tree fragments [20, 21]. The species *C. gattii* is also related to the environment, but the main ecological niche is eucalyptus trees, which clarifies the relationship with rural areas [9], although Brazilian studies show the isolation of this species from urban trees [22, 23].

Many epidemiological studies have shown the prevalence of infection by the species *C. neoformans* across the globe, as well as the direct relationship with immunodeficiency [24]. A study performed by Calvo et al. [25] demonstrated that, of 100 clinical isolates of *C. neoformans* from Brazil, Venezuela, and Chile, of which 60 isolates were from HIV-positive patients, 89 isolates were *C. neoformans* [86 (96.6 %) of which were serotype A] and 11 were *C. gattii* [9 (81.8 %) of which were serotype B]. Meyer et al. [16] studied the incidence of different *Cryptococcus* serotypes evaluated in the IberoAmerican Cryptococcal Study Group: a total of 340 clinical, veterinary, and environmental isolates from Argentina, Brazil, Chile, Colombia, Mexico, Peru, Venezuela, Guatemala, and Spain were tested. Of 177 clinical isolates obtained from patients with AIDS, 86 % were serotype A, 7.4 % were serotype AD hybrid, 3.4 % were serotype D, and the remaining 2.8 % were serotypes B and C. In another study, 178 clinical isolates and 247 environmental isolates obtained from five regions of Colombia (1987–2004) demonstrated a clinical isolate profile of serotypes A (91.1 % of isolates), B (8.4 %), and C (0.5 %), and an environmental isolate profile of serotypes A (44.2 %), B (42.6 %), and C (13.2 %); no serotype D or AD isolates were identified [26]. *C. gattii* affects mainly immunocompetent individuals; therefore, it is a risk for HIV-positive patients [27], as shown in a recent study in Southern California, where the presence of this species in immunocompromised patients was reported, leading to the conclusion of an endemic *C. gattii* infection in this region and its neighboring regions of Mexico [28]. It is possible to observe changes in the concept of infection by *C. gattii*, since this can occur under many conditions of immunosuppression induced by various factors, such as oral corticosteroids, weakened lung function resulting from previous infections, and smoking [29].

Hagen et al. [30] investigated the occurrence of *C. gattii* in Europe, focusing on whether this pathogen is emerging and, if so, how to explain this emergence pattern. Furthermore, they explored whether the infections originated from Europe or were introduced from other continents. They concluded that *C. gattii* is emerging in Europe, and the isolates from Europe can be divided into five genotypic clusters. Most *C. gattii* infections in Europe are probably autochthonous, and several infections are proven to have been acquired outside the European continent, e.g., during visits to *C. gattii*-endemic regions, such as the Vancouver Island outbreak area or before migration to Europe from *C. gattii*-endemic regions in Africa and South America. This finding might suggest that *C. gattii* infections caused by certain genotypes are associated with altered immune status of the human host. Thus, *C. gattii* is probably a more opportunistic pathogen, as has recently been hypothesized, than a strictly primary pathogen [29, 31]. *C. gattii* isolates with genotypes VGIII and VGIV were rarely found in Europe and were all acquired outside the European continent. However, these genotypes have frequently been isolated from HIV-infected persons and other immunocompromised patients in Africa and the American continents [32, 33]. A connection seems to exist between these *C. gattii* genotypes and the host's immune status, but further studies are required to delineate this theory.

Despite the presence of *C. gattii* in tropical and subtropical regions, including Brazil, Africa, Australia, and Southern California, infection by *C. gattii* has been reported in other regions, such as the Pacific Northwest and Vancouver Island (Canada) [10, 11]. The emergence of *C. gattii* in temperate climates suggests a possible adaptation to changing environmental conditions [12]. This species has emerged as a potentially lethal agent in the northeast Pacific and North America, where more than 200 cases of infections with *C. gattii* have been reported in humans and the numbers among domestic animals more than doubled between the years of 1999 and 2006 [34]. Recently, the isolation of this species in Colombia has, again, shown the great potential of adaptation of this yeast [35].

In response to the emergence of *C. gattii* in the United States in 2008, the public health authorities at the state and local levels, as well as the British Columbia Centre for Disease Control (BCCDC), formed a public health group to address *C. gattii*, according to the Centers for Disease Control and Prevention (CDC) [12]. The states began collecting information and sending it to the CDC. In July 2010, 60 cases had been reported to the CDC from four different states in the Pacific Northwest (California, Idaho, Oregon, and Washington), and 48 patients had no history of travel to endemic areas for *C. gattii* or British Columbia. Infection by *C. gattii* is considered endemic in northeast Brazil, while *C. neoformans* is found mainly in the south,

southeast, and center-west areas of Brazil [18]. Recently, Martins et al. [36] evaluated 63 cases of cryptococcal meningitis in the region of Piauí and Maranhão, and checked the spread of *C. gattii* infection in northern Brazil, showing that the geographic distribution of this species is much broader than that reported in the literature.

Colom et al. [37] identified the first case of human cryptococcosis infection in Spain in a 60-year-old heterosexual farmer who tested negative for HIV and had type 2 diabetes that had been identified 2 years prior. Species identification was performed using microscopic morphology, incubation at 37 °C, a urease test, evaluation of the production of phenoloxidase, monitoring the trend of assimilation of carbohydrates, and CGB testing to determine the serotype (Crypto Check test; Iatron). The genetic analyses revealed that the causative agent was *C. neoformans* var. *gattii*, currently referred to as the species *C. gattii*.

Non-*neoformans* cryptococci are generally regarded as saprophytes and have rarely been reported as human pathogens. However, the incidence of infection due to these organisms has increased over the past 40 years, with *C. laurentii* and *C. albidus* being responsible for 80 % of the reported cases [5, 38]. Infections caused by species other than *Cryptococcus* have been increasingly identified.

In 2001, Cheng et al. [39] reported a case of fungal infection caused by *C. laurentii* in a premature infant in which complete clinical resolution occurred after the administration of AMB and removal of a central venous catheter. Conditions associated with impaired cell-mediated immunity are important risks for non-*neoformans* cryptococcal infections and prior azole prophylaxis has been associated with antifungal resistance. *C. laurentii* that has been isolated from the blood of a patient with the diagnosis of ganglioneuroblastoma was reported and identified by Averbuch et al. [40]. Shankar et al. [41] reported a case of pulmonary cryptococcosis caused by *C. laurentii* in a diabetic AIDS patient who was on antituberculosis and antiretroviral treatments. Another case of fungal infection caused by *C. laurentii* was reported in a young man with membranoproliferative glomerulonephritis who was on aggressive immunosuppressive therapy [42].

C. albidus is a ubiquitous saprophytic encapsulated yeast occasionally found on human skin. One study reported different sources of *C. albidus*, including air, nails, lungs, sputum, a beer bottle, bone, blood, chronic balanoposthitis, pigeon excreta, and soil. In another report, *C. albidus* was isolated from the skin and hair of dogs, as well as horse urine samples [43]. Kano et al. [44] were the first to describe a documented case of systemic infection caused by *C. albidus* in a cat. Mclelland et al. [45] isolated *C. albidus* from a juvenile sea lion in California. According to those authors, *C. albidus* should be considered as a potential pathogen with a role in marine mammal mortality and morbidity. Research conducted by Leite et al. [46] in 2012 demonstrated the presence of

Cryptococcus species on dust found on books in three libraries in the city of Cuiabá, in the state of Mato Grosso, Brazil. Of the 84 samples collected from book dust, 18 (21.4 %) were positive for *Cryptococcus* spp. The most frequently isolated species were *C. gattii*: 15 (36.6 %); followed by *C. terreus*: 12 (29.3 %); *C. luteolus*: 4 (9.8 %); *C. neoformans* and *C. uniguttulatus*: 3 each (7.3 %); and *C. albidus* and *C. humicolus*: 2 each (4.6 %). The study by Leite et al. [46] demonstrates the possible infection of cryptococcosis from dust in a public library.

Drugs used in the treatment of cryptococcosis

The class of drugs used to treat cryptococcosis is comprised of polyene antifungal agents, AMB, and nystatin. AMB is used as the gold standard for treating various systemic mycoses, including cryptococcosis [47]. AMB is normally used as a loading dose. Its mechanism of action is related to the presence of ring macrolides, which gives a hydrophobic characteristic and binds to sterols, mainly ergosterol of the fungal cell membrane, changing its permeability, allowing the output of essential nutrients that leads to cell death [47].

Despite the effectiveness of AMB, it has a high toxicity, and is especially known for causing nephrotoxicity and hepatotoxicity [48, 49]. The molecule binds easily to the human cholesterol plasma membrane, which explains this toxic potential. The toxicity of AMB is directly related to the kidneys, decreasing glomerular flow by 80 %. AMB also causes myelotoxicity, leading to anemia by altering the production of erythropoietin by directly acting on bone marrow [50].

Another class of drugs used to treat cryptococcosis is pyrimidine analogs, and a representative of this class of antifungals is 5-fluorocytosine (5-FC), with a mechanism of action of inhibiting cell division. The yeast cell division is inhibited by acting on cytosine deaminase, responsible for converting 5-FC into 5-fluorouracil, which binds to DNA and yeast RNA, and blocks cell functions [47, 51].

The intravenous administration of 5-FC and AMB is recommended for the primary treatment of cryptococcosis, varying the dose for each case, with a treatment time ranging from 2 to 4 weeks. This combination of antifungal drugs is used to reduce the toxicity of AMB, but this association is not currently used in Brazil due to the lack of availability of 5-FC in this country [3].

Azoles, also used in the treatment of cryptococcosis, have a mechanism of action of inhibiting the enzyme, lanosterol 14 α -demethylase cytochrome P450, which is involved in the biosynthesis of ergosterol in fungal membranes. When using an azole, ergosterol is replaced by methylated sterols [47, 52]. FCZ is the drug of choice for maintenance treatment of cryptococcosis, used at a concentration of 400–800 mg/kg/day for at least ten weeks, although this

dosing can lead to resistance problems due to the very long duration of use [48, 49]. Currently, the issue of using azoles is developing resistance [53–58]. Itraconazole is the second drug chosen for a maintenance dose [59]. Among the new-generation azoles are: voriconazole, posaconazole, and ravuconazole. In vitro assays have demonstrated the potent activity of these azoles against *Cryptococcus* spp. [60]. In the maintenance of anti-*Cryptococcus*, azoles exhibit great variability in dosage [3]. For the treatment of pulmonary cryptococcosis, there is the possibility of substituting FCZ as a maintenance dose by other azoles, such as itraconazole, posaconazole, and voriconazole, as well as the combination of these antifungal agents with corticosteroids. FCZ, itraconazole, or highly active antiretroviral therapy (HAART) are frequently used as a prophylactic therapy for immunocompromised individuals [3].

Another class of drugs used in the treatment of cryptococcosis is the echinocandins, which inhibit the synthesis of β -1,3-glucan synthase [61]. Micafungin is presented as a drug that can replace AMB in the future. Although the mechanism of action is not yet well established, studies indicate that micafungin likely has mitochondrial activity and its renal toxic effects are less than those of AMB [62].

Mechanisms of fungal resistance to conventional drugs

Microbial resistance develops due to mutations that occur naturally in cells, with drugs acting as selective agents by naturally selecting for cells without mutations, thereby, causing a more resistant population [63]. Prolonged use of antifungal agents leads to the development of resistance to these compounds, which is evaluated by in vitro susceptibility tests. Thus, resistance is a fault in the clinical response to treatment. The study of the mechanisms of resistance has been a tool for developing new diagnostic and therapeutic targets [47].

Resistance to AMB is relatively rare and related to changes in the composition of the ergosterol in the fungal membrane, which may be mediated by an increase in catalase activity or defects in the biosynthesis of ergosterol [64, 65]. The melanization of *Cryptococcus* that occurs during the process of infection reduces the efficiency of some antifungals, such as caspofungin and AMB [66, 67]. The mechanism of reduced susceptibility of melanized cells to these drugs can be explained by changes in the rate of carbon, nitrogen, and oxygen in the fungal cell. This change prevents drugs from internalizing and performing their intended actions [66]. Although resistance to azoles has been extensively studied, little is known about the molecular mechanisms responsible for resistance in *Cryptococcus*.

Studies performed with yeast species have shown that several mechanisms may be involved in drug resistance, including

the reduction in the accumulation of azole antifungals in fungal cells associated with increased expression of genes encoding proteins that cause the efflux of drugs, overproduction of enzymes, implementing alternative metabolic pathways and/or changes in the target molecule [68–73].

The development of resistance related to changes of transport can occur by changes to the types of transporters, such as ABC transporters, typically consisting of two transmembrane domains (TMD) and two cytoplasmic domains (NBD) [47, 74]. However, mutations in the gene *ERG11* isolated from a patient with AIDS who had relapsed *Cryptococcus* meningoencephalitis have been studied [75]. These studies demonstrate that resistance may be due to heteroresistance, which is one mechanism by which induced resistance can be reversed for a portion of a population. The mutation of target proteins is an antifungal drug resistance mechanism found in many clinical isolates. In *Cryptococcus*, this resistance may be related to the gene *ERG11*. In laboratory studies, values for the minimum inhibitory concentration (MIC) of FCZ in clinical isolates were found to be similar to the genetic profiles of the *ERG11* gene sequence. The resistant isolate showed a point mutation in the nucleotide sequence of the gene when compared to the sequence of the non-resistant isolate. These results suggest that amino acid substitutions occur at sites of interaction for azoles and that a protein may have caused structural changes, with substitutions within the active sites suggesting changes in the affinity of the enzyme. This confirms the presence of mutations associated with resistance, causing structural changes in protein affinity [76].

A study by Sheng et al. [77] indicated that it was possible to interpret the changes occurring in the target enzyme of FCZ and elucidate that the mechanism of resistance resulted from structural changes of the protein.

The development of resistance in pathogenic fungi can be caused by changes in target enzymes and for the overexpression of genes known to two classes of antifungal azoles and candinas. The resistance mediated by changes in *ERG11/CYP51* (target azole) has been widely documented to involve point mutations and/or overexpression of these genes. The overexpression of *ERG11* has often been associated with resistance to the azoles in *Candida albicans* [68, 78–80] and in one isolate of *C. tropicalis* [81]. This resistance mechanism involves the effect of gene dosage, which increases the number of *ERG11* molecules, which prevents saturation by azoles. Itraconazole resistance in clinical isolates of *Aspergillus fumigatus* has been associated with the occurrence of amino acid substitutions in *CYP51A*, the *ERG11* gene ortholog found in this fungal species. Interestingly, mutations at position G54 contributed only to resistance to itraconazole and voriconazole [82, 83]. Alternatively, the mutation in position M220 conferred resistance to itraconazole and voriconazole or at elevated MICs for posaconazole [84].

The heteroresistance of *C. neoformans* involves chromosomal aneuploidies; therefore, the number of drug resistance genes, including *ERG11*, is increased. This mechanism can result in the elevated transcription of *ERG11* [85, 86]. Heteroresistance in *C. neoformans* may be related to chromosomal duplication, since it has been observed that both serotypes A and D had chromosome doubling in response to FCZ. Those isolates that showed adaptation to higher concentrations than the MIC showed duplication on chromosome I. When the selective pressure of the drug was increased, duplication on other chromosomes was induced. After removal of the drug, the isolates returned to the initial level of susceptibility, also losing the chromosome disomy [87]. Thus, this adaptation mechanism may contribute to treatment failure in patients on therapy with FCZ [88]. In later studies, the environmental and clinical isolates of *C. gattii* also showed the phenotype of heteroresistance, with this phenomenon possibly being related to increased virulence [86].

Differences in virulence, and the susceptibility of some strains to certain antifungals, may be related to different molecular types. Some studies have shown that, in addition to the eight major molecular types of *Cryptococcus* spp. identified from molecular techniques (*C. neoformans* VNI, VNII, VNIII, and VNIV and *C. gattii* VGI, VGII, VGIII, and VGIV), VGII has received increased interest in recent years due to the emergence of subtypes, VGIIa, VGIIb, and VGIIc [10, 31, 89–92]. It has been determined that, depending on the molecular type, there is a greater influence of susceptibility to FCZ. The genotypes VGII and VNI showed higher MICs when compared with other genotypes within their respective species.

Recent epidemiological studies have also found that yeasts isolated from different geographic regions (Africa, Middle East, Asia Pacific, and parts of Latin America) showed altered sensitivity to FCZ. Among the isolates used in this current study, the most common yeast was *C. neoformans*, with a prevalence of 32.9 % [93].

Several studies related to acquiring resistance have been conducted in yeasts, such as *C. albicans*, where they undergo selection in response to exposure to antifungal agents. Isolates recovered from patients with oropharyngeal candidiasis associated with an HIV infection, which had been treated multiple times, showed an acquisition of resistance [94]. Studies of *C. albicans* have shown that a reduction in the accumulation of azole antifungal cells of these organisms may be associated with increased expression of genes encoding proteins of drug efflux [69]. Two kinds of proteins involved in the efflux of compounds are known in yeast: the family of ABC (ATP-binding cassette) and MSF (major facilitator superfamily) transporters. The overexpression of genes homologous to ABC transporters in *C. albicans* (CDR1 and CDR2) are responsible for the resistance in some

clinical isolates recovered from patients with long antifungal therapies [47].

Regulating the efflux pump may be the answer to acquired resistance in strains that are resistant to FCZ and itraconazole [95].

Biofilm and resistance

The ability to form biofilm is considered a form of microbial resistance. Biofilm formation is associated with persistent infection because biofilms increase resistance to host immune mechanisms and antimicrobial therapy. Several studies have shown increased resistance in yeast biofilms when compared with a cell suspension [96]. *C. neoformans* actively forms biofilms and colonizes, including forming biofilms on diverse prosthetic devices, including ventricular shunts, peritoneal dialysis fistulas, and cardiac valves [96, 97]. These biofilms comprise yeast cells with vast amounts of polysaccharide, likely preventing successful eradication. *C. neoformans* biofilms are significantly more resistant to AMB and caspofungin than planktonic cells [98]. However, the exposure of *C. neoformans* to FCZ or voriconazole did not inhibit the growth of these yeasts in the biofilm mode, and the exposure of preformed cryptococcal biofilms to the same drugs did not affect the metabolic activities of these biofilms [98]. Because *C. neoformans* is an environmental fungus and only an accidental pathogen, it is not surprising that biofilm formation constitutes an important survival strategy in hostile environmental conditions (e.g., ultraviolet light) and against predation [96].

Molecular mechanisms conferring antifungal resistance in fungal biofilms have not been fully elucidated. In the genus *Candida*, genes encoding drug efflux pumps and ergosterol biosynthesis, both of which are implicated in azole resistance, have been reported to be differentially regulated upon exposure to antimicrobial agents. These genes include MDR1, CDR1, CDR2, and ERG11, which have previously been implicated within the biofilm developmental phase [96, 99, 100]. In *C. albicans* and *C. glabrata*, mRNA transcripts indicated that these genes were rapidly upregulated and may play a defined role in resistance. However, all mechanisms still need to be defined for *Cryptococcus* species.

Cells within a biofilm are protected against phagocytosis and are relatively resistant to host immune mechanisms. In *C. neoformans*, biofilm formation depends on the presence of a polysaccharide capsule composed primarily of GXM, as specific protective antibodies against GXM inhibited biofilm formation [101]. Various mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents have been proposed, including the presence of physical barriers that prevent the penetration of the antimicrobial compounds into the biofilm, slow growth or regulation of the metabolic activity of the biofilm due to

nutrient limitation, activation of the general stress response, and the existence of a subpopulation of cells within the biofilm (known as persisters) that are preserved by antimicrobial pressure [102].

Several studies with various substances or drugs have been proposed for *Cryptococcus* biofilms. de Aguiar Cordeiro et al. [103] evaluated the inhibitory effect of the antifolate combinations of sulfamethoxazole–trimethoprim (SMX/TMP) and sulfadiazine–pyrimethamine (SDZ/PYR) against planktonic cells and biofilms of *C. neoformans* and *C. gattii*. Additionally, they studied the influence of the antifolate combinations on the AMB MIC of planktonic cells. Their results demonstrated that the drug combinations SMX/TMP and SDZ/PYR were able to prevent biofilm formation and showed an inhibitory effect against mature biofilms of both species. Additionally, their study indicated that antifolate drugs reduced the ergosterol content in *C. neoformans* and *C. gattii* planktonic cells. Robertson et al. [104] studied the effect of sublethal concentrations of EDTA in *Cryptococcus* biofilm and noted that it was able to inhibit biofilm formation. Martinez et al. [105] evaluated the use of chitosan in *Cryptococcus* biofilms and demonstrated good results. Further studies have demonstrated the susceptibility of *Cryptococcus* biofilm for different antifungal agents [106–108].

New strategies for the treatment of cryptococcosis

The bioprospecting of natural molecules has become necessary in the search for new antifungal prototypes (Table 1). In Brazil, the Ministry of Health has developed social, economic, and environmental projects, combining sustainability with health issues. According to the World Health Organization (WHO), 80 % of the population uses herbal medicines. Additionally, the large size of Brazil, with a great diversity in climate and soil conditions, favors the development of rational and sustainable exploitation of new metabolites with a therapeutic value [109–112].

Recently, Zhu et al. [113] conducted a literature review related to the number of new drugs from natural products approved by the U.S. Food and Drug Administration (FDA) between 1991 and 2010. Those researchers found that there were 46–126 new drugs derived from natural products, of which 14.5 % were derived from plants that had not been explored. The exploration of 59 new species showed the generation of 85 new drugs, of which 69.4 % were from synthetic molecules modeled from a natural product. The present semi-synthetic modifications to improve molecules are from either structural changes or by mapping the pharmacophore. Such changes reduce some problems from natural products; for example, low potency, poor target selectivity, toxicity, and undesirable pharmacokinetic properties.

Many studies have reported the activity of natural or synthetic substances derived from natural models, with activity against *Cryptococcus* spp. (Table 1). Gullo et al. [114] reported the activity of pure substances maytenin and pristimerin extracted from the plant, *Maytenus ilicifolia*, against a variety of fungi, including sensitive and resistant isolates of *C. neoformans* and *C. gattii*. These substances are classified as triterpenoids and present diverse biological activities. Both showed strong fungicidal activity against isolates. Maytenin presented a lower MIC range, varying between 0.48 and 3.90 µg/ml, while pristimerin presented an MIC range varying between 0.97 and 7.81 µg/ml.

Flavonoids found in a wide variety of plants, called chalcones, are widely applied to various chemical and biological activities. de Carvalho Tavares et al. [115] studied 21 chalcones compounds against various fungi, including *C. gattii*. Two of the compounds showed an interesting activity, with a MIC of 7.80 µg/ml. Nondo et al. [116] evaluated the antimicrobial and antilarval activity of extracts from two plants, *Cissampelos mucronata* A. Rich and *Tephrosia villosa* L. Pers, commonly used in traditional medicine in Tunisia. The ethanol extracts of different plant parts showed high larvicidal activity, with an IC₅₀ in the range 126.11–219.22 mg/l for the extracts of *C. mucronata* and 65–220.00 mg/l for the extracts of *T. villosa*. In addition, both showed high antimicrobial activity, including against *C. neoformans*, with an MIC value of 0.195 mg/l.

The plant, *Dimocarpus longan*, presents several phenolic compounds with pharmacological activities, including ellagic acid and gallic acid. Rangkadilok et al. [117] evaluated the antifungal activity of seed and fruit extracts, as well as isolated compounds (ellagic acid, gallic acid, and corilagin). They observed that the seed extract showed activity against four strains of *C. neoformans*, with MIC values ranging from 500 to 1,000 µg/ml. Ellagic acid and gallic acid showed activity against strains, with MIC ranges varying from 15.63 to 62.50 µg/ml and 800–>16,000 µg/ml, respectively.

Hypericum perforatum is another plant with a wide variety of metabolites and pharmacological potential, including activity against *C. neoformans*. Tocci et al. [118] evaluated the activity of xanthenes and tools to increase production of the metabolite. Those authors demonstrated that the use of chitosan on plant roots for 15 days significantly increased the production of xanthenes, which exhibited an MIC of 39.1 µg/ml. Thus, there is the possibility of using chitosan as a tool for the large-scale production of xanthone.

Many studies report the efficacy of plant-derived compounds as antifungals. Given the large Brazilian biodiversity, natural products are very interesting sources in the discovery of new drugs. The synergistic activity caused by the combination of two compounds is an important parameter for increasing the efficiency of antifungal treatment. Testing using a checkerboard allows the evaluation of 70 different combinations of two compounds for a given strain. This test is based on the microdilution test for determining the sensitivity set by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) in 2002. The checkerboard test is used to determine the fractional inhibitory concentration index (ICIF), which is calculated by the following formula: $ICIF = MIC1_{alone}/MIC1_{in\ combination} + MIC2_{alone}/MIC2_{in\ combination}$. The classification of combinations is given by the value of the ICIF and can be classified as synergistic ($ICIF \leq 0.5$), additive ($0.5 < ICIF < 1.0$), indifferent ($1.0 \leq ICIF < 4.0$), and antagonistic ($ICIF \geq 4.0$) [119–122].

Some studies have reported the use of a conventional drug used in the treatment of cryptococcosis, for example, AMB, that, when added in low concentrations with another compound, may result in potentiation of the drug [123–125]. There is the use of combination drug AMB and 5-FC in the treatment of cryptococcosis. Although this combination has high efficiency, its toxicity limits the use of this association [126]. Schwarz et al. [127] showed a death curve to illustrate the efficiency of combining 5-FC and AMB. When testing only AMB, the concentration of half the MIC value resulted

Table 1 Natural compounds with antifungal activity against *Cryptococcus* spp.

Plants (family)	Plants (species)	Activity (range of MIC)	References
Apiaceae	<i>Apium graveolens</i> L.	0.04–0.64 µl/ml	Marongiu et al. [160]
Araliaceae	<i>Panax ginseng</i>	250–1,000 µl/ml	Fukuyama et al. [161]
Sapindaceae	<i>Dimocarpus longan</i> Lour.	15.63–16,000 µg/ml	Rangkadilok et al. [117]
Myrtaceae	<i>Eugenia uniflora</i>	0.1–3.75 mg/ml	Lago et al. [162]
Ericaceae	<i>Vaccinium macrocarpon</i>	<1.0 µg/ml	Patel et al. [163]
Lauraceae	<i>Laurus nobilis</i>	31–1,000 µg/ml	Fukuyama et al. [164]
Clusiaceae	<i>Hypericum perforatum</i>	39.1 µg/ml	Tocci et al. [118]
Menispermaceae	<i>Cissampelos mucronata</i>	>250–0.195 mg/ml	Nondo et al. [116]
Leguminosae	<i>Tephrosia villosa</i>	62.5–0.195 mg/ml	Nondo et al. [116]
Celastraceae	<i>Maytenus ilicifolia</i>	0.48–7.81 µg/ml	Gullo et al. [114]
Verbenaceae	<i>Lippia lupulina</i>	>250–31.25 µg/ml	Funari et al., 2012 [165]
Fabaceae	<i>Pterogyne nitens</i>	250–1,000 µg/ml	Regasini et al. [166]

in a reduction in the growth of colonies by 2.5 logs. When associated with 5-FC, this reduction increased to 4 logs, showing the synergistic effect of the combination. Thus, AMB plus 5FC is still the “gold standard” in the treatment of cryptococcosis in the country where the pyrimidine analogs are used.

In 2005, Serena et al. [123] evaluated the synergistic activity between micafungin and AMB, FCZ, itraconazole, voriconazole, and ravuconazole against 37 clinical isolates of various species of *Cryptococcus* spp. They observed synergism between all of the associations, and micafungin with AMB presented the highest percentage of synergistic interactions for *C. neoformans* (70 %) and *C. gattii* (80 %).

New antifungal substances, mainly of natural origin, have been studied greatly in combination with conventional drugs. Several natural substances have been found to be able to provide a synergistic effect against *C. neoformans* in the laboratory of the current authors. Leite [128] evaluated the combination of a pure substance, pedalitin, isolated from the plant *Pterogyne nitens*, with antifungal drugs AMB and FCZ against *C. neoformans*. They observed that six combinations presented additive and synergistic effects when testing pedalitin with FCZ and two and four combinations presented with additive and synergistic effects when evaluating pedalitin with AMB (unpublished data). Another study by Suzano [129] reported synergistic activity when combining AMB with natural substances. They found that natural substances isolated from *Eclipta alba* and *Serjania erecta* highly potentiated the effect of AMB, reducing the MIC of AMB by eight times as much for sensitive isolates resistant to *C. neoformans* (unpublished data). Synergism studies for the treatment of cryptococcosis are still compared to trials with isolates of *Candida* spp. Ahmad et al. [130] showed the importance of the synergistic activity between natural compounds and azole-resistant isolates in *Candida* spp.

Cathelicidin peptides have been shown to have killing activity against *C. albicans* and *C. neoformans* that was associated with membrane permeabilization, but they had little activity against molds. However, the cationic proline-rich peptide (SP-B) has shown activity against both yeast species and *A. fumigatus* [62, 131].

Another solution for reducing the toxicity of AMB, its incorporation into lipid carrier systems, has been studied. It was determined that this combination altered the pharmacokinetics and tissue distribution of the drug [132, 133].

Xu et al. [134] studied the efficacy of AMB–polybutylcyanoacrylate nanoparticles (AmB-PBCA-NPs) modified with polysorbate 80 and observed an efficient treatment against cryptococcal meningitis in a mouse model. Wang et al. [135] reported that cholesterol-conjugated G(3)R(6)TAT (CG(3)R(6)TAT) formed cationic nanoparticles via self-assembly, which demonstrated strong antimicrobial activities against various types of microbes in vitro, including using

these nanoparticles for the treatment of *C. neoformans* (yeast)-induced brain infections. The antimicrobial activity of the nanoparticles was tested against 12 clinical isolates of *C. neoformans* in comparison with conventional antifungal agents AMB and FCZ, and the results demonstrated that CG(3)R(6)TAT nanoparticles can be a promising antimicrobial agent for the treatment of brain infections caused by *C. neoformans*. Yaguchi et al. [136] developed an adduct of silver with nanometer-scale particles to peptidic hydrolysates from collagen, GX-95. The antifungal activity of the adduct against pathogenic yeasts and filamentous fungi was examined in terms of MICs and those authors observed that GX-95 possessed strong and broad antifungal activities against all fungi.

Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT) is a promising method which combines a non-toxic photosensitizer (PS) with visible light to cause selective killing of microbial cells. The development of PACT to treat mycoses or kill fungi in the environment depends on identifying an effective PS for the different pathogenic species and delivery systems able to expand and optimize their use. Few studies of photodynamic therapy against *Cryptococcus* spp. have been described, although these studies have demonstrated that *C. neoformans* is sensitive to photodynamic therapy [137–139].

The treatment of cryptococcosis can be accomplished through an immunoregulation agent, which has two parameters: the processing of cytokines and monoclonal antibodies (mAbs) [140].

Several preclinical studies have reported the protective effect of proinflammatory cytokines during pulmonary and systemic infection in a murine model. The administration of IL-12 interleukin murine cryptococcosis generates an increased infiltration of lymphocytes, activation of the classical pathway, and a reduction of the fungal burden, preventing the spread of disease and increasing the survival rate of animals [141, 142]. Considering that the function of IL-12 is related to the stimulation of natural killer (NK) cells and T cells producing IFN- γ , treatment with this cytokine has shown great efficiency, while also enhancing the activity of FCZ [143–145]. Studies have shown the importance of adding IFN- γ to control therapy of cryptococcosis, particularly in HIV-associated cryptococcal meningitis [146]. Jarvis et al. [146] performed randomized clinical trials where patients with cryptococci meningitis were treated with doses of AMB, 5-FC, and IFN- γ in different dosages. The fungal burden was assessed by a culture of cerebrospinal fluid and the results showed a faster and significant reduction of infection with standard treatment associated with IFN- γ when compared to those without the association.

In preclinical studies in the murine model, the administration of interleukin IL-18 presented similar results when compared with the IL-12 tests, since treatment with IL-18 is also associated with increased levels of IFN- γ . Thus, the

combination of IL-12 and IL-18 has a synergistic effect, stimulating the production of IFN- γ and increasing the levels of IL-4 by lung cells [147, 148].

Khan et al. [149] recently evaluated the development of an effective vaccine against *C. neoformans* from cytosolic proteins (Cp) of yeast, which acts as an antigen. These Cp encapsulated in microspheres (PLGA) have a high level of protection, since the immune response mediated by Cp appeared strong in a murine model. In that study, the cytokine profiles showed that the yeast protection is associated with IFN- γ and IL-2 and show an improved reduction in the fungal burden and survival of immunized animals, indicating the possibility of using PLGA to induce an immune response against cryptococcosis.

In addition to the use of cytokines in the treatment of cryptococcosis, many studies have observed an effectiveness of the combination therapy with traditional human monoclonal antibodies. This therapy has been attributed to antimicrobial treatment for several decades, as one of the earliest studies was performed in 1930 to treat pneumonia and meningitis caused by *Streptococcus pneumoniae* bacteria. Studies comparing the association of serum therapy with antimicrobials and antimicrobial isolates indicates the effectiveness of this new treatment strategy [150, 151].

In the past three decades, studies with mAbs had great importance. Some studies have shown that humoral immunity can contribute to the host defense, since yeast may change during infection and the administration of mAbs in a polysaccharide capsule can fight this change [152]. Among the targets of mAbs are glucuronoxylomannan, glucosylceramides, melanin, and B-glucan [67, 152–154]. The immunoregulation of the mAbs are related to increased opsonization and phagocytosis, in the direct inhibition of yeast in reducing the polysaccharide capsule and modulation of cytokine production and inflammatory response [152].

A new therapy called Mycograb (NeuTec Pharma) has activity against the yeast *C. albicans* and *C. neoformans*. It consists of a fragmented recombinant antibody comprising an antigen-combining site and increasing the specificity of therapy [150].

In 1992, Mukherjee et al. [155] reported the importance of using mAbs in the treatment of cryptococcosis. The same group of studies reported an increased efficiency of antifungal activity of AMB with the concurrent administration of mAbs, as well as its protective effects in patients in risk groups [156]. A potentiation of the drug FCZ was also reported with the administration of mAbs [157]. During infection by *C. neoformans*, there is a buildup of capsular tissue material, which contributes to the virulence of the yeast, since it inhibits phagocytosis, leukocyte migration, and immune responses. Therefore, Mukherjee et al. [153] proposed two possible immunotherapeutic strategies: a passive administration of mAbs anti-capsule vaccine and

immunization with tetanus toxin-GXM (GXM-TT), with both strategies demonstrating an increased host immune defense.

The first study of monoclonal anti-(B7 18 mAbs) therapy against *Cryptococcus* in humans was carried out by Larsen et al. [158]. This study demonstrated the success of antibody therapy in the treatment of cryptococcal meningitis, showing safety in the use of mAbs as a human mycosis therapy.

The treatment of systemic fungal infections using radioimmunotherapy (RIT) has been an important form of treatment, preventing the development of fungal resistance. RIT is based on antigen–antibody interactions responsible for delivering cytokine-specific cellular targets for each fungus [67, 159]. This therapy utilizes specific markers as mAbs radiotracers; Zevalin[®] and Bexxar[®] are FDA-approved radiotracers [159]. Jiang et al. [159] demonstrated the influence of RIT for the treatment of cryptococcosis, by prolonged survival of mice infected with *C. neoformans* and treated with radiolabeled B7 18 mAbs. They also observed that RIT depends on the immune status of the host and is considered to be more efficient than the traditional treatment of cryptococcosis.

Two radiotracers are currently reported against *C. neoformans*. The first is ²¹³Bi, which is capable of killing virulent strains of *C. neoformans* when associated with B7 18 mAbs, demonstrating a great reduction in fungal load in mice over a 24-h period of treatment [159]. The other radiolabel used is ¹¹⁸Re [67]. When performing RIT using both radiotracers, melanized and non-melanized yeast are killed, since there is increased melanin production at the time of infection, which reduces the activity of AMB. This method of treatment has been shown to be a more efficient alternative to conventional treatment under experimental conditions, with an attractive option for the development of a future clinical treatment [67].

Conclusion

The incidence and prevalence of serious mycoses continues to be a public health problem. The treatments that now exist are aggressive, but are presenting with an increase of resistant strains. Therefore, this infection is an important cause of morbidity and mortality. The search for new alternatives for the treatment of systemic mycoses is necessary due to the increase of these infections in immunocompetent and immunosuppressed patients. Some alternatives have been studied as an attempt for the bioprospecting of drugs, since there are cases of resistance to conventional antifungal agents, perhaps because this fungus has the ability to form a biofilm. Furthermore, the use of immunotherapy, photodynamic therapy, and the use of nanoparticles for drug delivery at the site of infection are very promising alternatives.

Despite these various studies, these results are still preliminary and there is a need to unite efforts in searching for therapies that could lead to a cure of these infections without causing severe damage to patients.

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

We thank Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for the financial support.

References

- Lanjewar DN (2011) The spectrum of clinical and pathological manifestations of AIDS in a consecutive series of 236 autopsied cases in Mumbai, India. *Pathol Res Int* 2011:547618
- Prado M, Silva MB, Laurenti R, Travassos LR, Taborda CP (2009) Mortality due to systemic mycoses as a primary cause of death or in association with AIDS in Brazil: a review from 1996 to 2006. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104(3):513–521
- Perfect JR, Dismukes WE, Dromer F, Goldman DL, Graybill JR, Hamill RJ, Harrison TS, Larsen RA, Lortholary O, Nguyen MH, Pappas PG, Powderly WG, Singh N, Sobel JD, Sorrell TC (2010) Clinical practice guidelines for the management of cryptococcal disease: 2010 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 50(3):291–322
- Kantarcioglu AS, Boekhout T, De Hoog GS, Theelen B, Yücel A, Ekmekci TR, Fries BC, Ikeda R, Koslu A, Altas K (2007) Subcutaneous cryptococcosis due to *Cryptococcus diffluentis* in a patient with sporotrichoid lesions case report, features of the case isolate and in vitro antifungal susceptibilities. *Med Mycol* 45(2):173–181
- Khawcharoenporm T, Apisarnthanarak A, Mundy LM (2007) Non-*neoformans* cryptococcal infections: a systematic review. *Infection* 35(2):51–58
- Levitz SM, Specht CA (2006) The molecular basis for the immunogenicity of *Cryptococcus neoformans* mannoproteins. *FEMS Yeast Res* 6(4):513–524
- Grechi J, Marinho-Carvalho M, Zancan P, Cinelli LP, Gomes AM, Rodrigues ML, Nimrichter L, Sola-Penna M (2011) Glucuronoxylomannan from *Cryptococcus neoformans* down-regulates the enzyme 6-phosphofructo-1-kinase of macrophages. *J Biol Chem* 286(17):14820–14829
- Filiú WF, Wanke B, Agüena SM, Vilela VO, Macedo RC, Lazera M (2002) Avian habitats as sources of *Cryptococcus neoformans* in the city of Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 35(6):591–595
- Chen S, Sorrell T, Nimmo G, Speed B, Currie B, Ellis D, Marriott D, Pfeiffer T, Parr D, Byth K (2000) Epidemiology and host- and variety-dependent characteristics of infection due to *Cryptococcus neoformans* in Australia and New Zealand. Australasian Cryptococcal Study Group. *Clin Infect Dis* 31(2):499–508
- Kidd SE, Hagen F, Tschärke RL, Huynh M, Bartlett KH, Fyfe M, Macdougall L, Boekhout T, Kwon-Chung KJ, Meyer W (2004) A rare genotype of *Cryptococcus gattii* caused the cryptococcosis outbreak on Vancouver Island (British Columbia, Canada). *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(49):17258–17263
- Byrnes EJ 3rd, Bildfell RJ, Frank SA, Mitchell TG, Marr KA, Heitman J (2009) Molecular evidence that the range of the Vancouver Island outbreak of *Cryptococcus gattii* infection has expanded into the Pacific Northwest in the United States. *J Infect Dis* 199(7):1081–1086
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (2010) Emergence of *Cryptococcus gattii*—Pacific Northwest, 2004–2010. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 59(28):865–868
- Goldman DL, Lee SC, Mednick AJ, Montella L, Casadevall A (2000) Persistent *Cryptococcus neoformans* pulmonary infection in the rat is associated with intracellular parasitism, decreased inducible nitric oxide synthase expression, and altered antibody responsiveness to cryptococcal polysaccharide. *Infect Immun* 68(2):832–838
- Jong A, Wu CH, Shackelford GM, Kwon-Chung KJ, Chang YC, Chen HM, Ouyang Y, Huang SH (2008) Involvement of human CD44 during *Cryptococcus neoformans* infection of brain microvascular endothelial cells. *Cell Microbiol* 10(6):1313–1326
- Jesus MS, Rodrigues WC, Barbosa G, Trilles L, Wanke B, Lazera MdosS, Silva Md (2012) *Cryptococcus neoformans* carried by *Odontomachus bauri* ants. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 107(4):466–469
- Meyer W, Castañeda A, Jackson S, Huynh M, Castañeda E; IberoAmerican Cryptococcal Study Group. (2003) Molecular typing of IberoAmerican *Cryptococcus neoformans* isolates. *Emerg Infect Dis* 9(2):189–195
- Firacative C, Trilles L, Meyer W (2012) MALDI-TOF MS enables the rapid identification of the major molecular types within the *Cryptococcus neoformans*/*C. gattii* species complex. *PLoS One* 7(5):e37566
- Nishikawa MM, Lazera MS, Barbosa GG, Trilles L, Balassiano BR, Macedo RC, Bezerra CC, Pérez MA, Cardarelli P, Wanke B (2003) Serotyping of 467 *Cryptococcus neoformans* isolates from clinical and environmental sources in Brazil: analysis of host and regional patterns. *J Clin Microbiol* 41(1):73–77
- Kwon-Chung KJ (1991) The discovery of creatinine assimilation in *Cryptococcus neoformans*, and subsequent work on the characterization of the two varieties of *C. neoformans*. *Zentralbl Bakteriol* 275(3):390–393
- Passoni LF, Wanke B, Nishikawa MM, Lazera MS (1998) *Cryptococcus neoformans* isolated from human dwellings in Rio de Janeiro, Brazil: an analysis of the domestic environment of AIDS patients with and without cryptococcosis. *Med Mycol* 36(5):305–311
- González-Hein G, González-Hein J, Díaz Jarabrán MC (2010) Isolation of *Cryptococcus neoformans* in dry droppings of captive birds in Santiago, Chile. *J Avian Med Surg* 24(3):227–236
- Dixit A, Carroll SF, Qureshi ST (2009) *Cryptococcus gattii*: an emerging cause of fungal disease in North America. *Interdiscip Perspect Infect Dis* 2009:840452
- Faria RO, Nascente PdaS, Meinerz AR, Cleff MB, Antunes TdeA, Silveira EdaS, Nobre MdeO, Meireles MC, Mello JR (2010) Occurrence of *Cryptococcus neoformans* in pigeon excrement in the city of Pelotas, State of Rio Grande do Sul. *Rev Soc Bras Med Trop* 43(2):198–200
- Day JN, Hoang TN, Duong AV, Hong CT, Diep PT, Campbell JI, Sieu TP, Hien TT, Bui T, Boni MF, Laloo DG, Carter D, Baker S, Farrar JJ (2011) Most cases of cryptococcal meningitis in HIV-uninfected patients in Vietnam are due to a distinct amplified fragment length polymorphism-defined cluster of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* VN1. *J Clin Microbiol* 49(2):658–664
- Calvo BM, Colombo AL, Fischman O, Santiago A, Thompson L, Lazera M, Telles F, Fukushima K, Nishimura K, Tanaka R, Myiajy M, Moretti-Branchini ML (2001) Antifungal susceptibilities, varieties, and electrophoretic karyotypes of clinical isolates of *Cryptococcus neoformans* from Brazil, Chile, and Venezuela. *J Clin Microbiol* 39(6):2348–2350
- Escandón P, Sánchez A, Martínez M, Meyer W, Castañeda E (2006) Molecular epidemiology of clinical and environmental isolates of the *Cryptococcus neoformans* species complex reveals a high genetic diversity and the presence of the molecular type VGII mating type a in Colombia. *FEMS Yeast Res* 6(4):625–635

27. Severo LC, de Mattos Oliveira F, Londero AT (1999) Cryptococcosis due to *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* in Brazilian patients with AIDS. Report of three cases. *Rev Iberoam Micol* 16(3):152–154
28. Bymes EJ 3rd, Li W, Ren P, Lewit Y, Voelz K, Fraser JA, Dietrich FS, May RC, Chaturvedi S, Chaturvedi V, Heitman J (2011) A diverse population of *Cryptococcus gattii* molecular type VGIII in southern Californian HIV/AIDS patients. *PLoS Pathog* 7(9): e1002205
29. MacDougall L, Fyfe M, Romney M, Starr M, Galanis E (2011) Risk factors for *Cryptococcus gattii* infection, British Columbia, Canada. *Emerg Infect Dis* 17(2):193–199
30. Hagen F, Colom MF, Swinne D, Tintelnot K, Iatta R, Montagna MT, Torres-Rodríguez JM, Cogliati M, Velegraki A, Burggraaf A, Kamermans A, Sweere JM, Meis JF, Klaassen CH, Boekhout T (2012) Autochthonous and dormant *Cryptococcus gattii* infections in Europe. *Emerg Infect Dis* 18(10):1618–1624
31. Hagen F, Illnait-Zaragoza MT, Bartlett KH, Swinne D, Geertsens E, Klaassen CH, Boekhout T, Meis JF (2010) In vitro antifungal susceptibilities and amplified fragment length polymorphism genotyping of a worldwide collection of 350 clinical, veterinary, and environmental *Cryptococcus gattii* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 54(12):5139–5145
32. Georgi A, Schneemann M, Tintelnot K, Calligaris-Maibach RC, Meyer S, Weber R, Bosshard PP (2009) *Cryptococcus gattii* meningoencephalitis in an immunocompetent person 13 months after exposure. *Infection* 37(4):370–373
33. Litvintseva AP, Thakur R, Reller LB, Mitchell TG (2005) Prevalence of clinical isolates of *Cryptococcus gattii* serotype C among patients with AIDS in Sub-Saharan Africa. *J Infect Dis* 192(5):888–892
34. Randhawa HS, Kowshik T, Chowdhary A, Preeti Sinha K, Khan ZU, Sun S, Xu J (2008) The expanding host tree species spectrum of *Cryptococcus gattii* and *Cryptococcus neoformans* and their isolations from surrounding soil in India. *Med Mycol* 46(8):823–833
35. Firacative C, Torres G, Rodríguez MC, Escandón P (2011) First environmental isolation of *Cryptococcus gattii* serotype B, from Cúcuta, Colombia. *Biomedica* 31(1):118–123
36. Martins LM, Wanke B, Lazéra MdosS, Trilles L, Barbosa GG, de Macedo RC, Cavalcanti MdoA, Eulálio KD, de Castro JA, da Silva AS, do Nascimento FF, Gouveia VA, do Monte SJ (2011) Genotypes of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* as agents of endemic cryptococcosis in Teresin, Piauí (northeastern Brazil). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 106(6):725–730
37. Colom MF, Frasés S, Ferrer C, Jover A, Andreu M, Reus S, Sánchez M, Torres-Rodríguez JM (2005) First case of human cryptococcosis due to *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* in Spain. *J Clin Microbiol* 43(7):3548–3550
38. McCurdy LH, Morrow JD (2003) Infections due to non-*neoformans* cryptococcal species. *Compr Ther* 29(2–3):95–101
39. Cheng MF, Chiou CC, Liu YC, Wang HZ, Hsieh KS (2001) *Cryptococcus laurentii* fungemia in a premature neonate. *J Clin Microbiol* 39(4):1608–1611
40. Averbuch D, Boekhout T, Falk R, Engelhard D, Shapiro M, Block C, Polachek I (2002) Fungemia in a cancer patient caused by fluconazole-resistant *Cryptococcus laurentii*. *Med Mycol* 40(5):479–484
41. Shankar EM, Kumarasamy N, Bella D, Renuka S, Kownhar H, Suniti S, Rajan R, Rao UA (2006) Pneumonia and pleural effusion due to *Cryptococcus laurentii* in a clinically proven case of AIDS. *Can Respir J* 13(5):275–278
42. Furman-Kuklińska K, Naumnik B, Myśliwiec M (2009) Fungaemia due to *Cryptococcus laurentii* as a complication of immunosuppressive therapy—a case report. *Adv Med Sci* 54(1):116–119
43. Sugita T, Takashima M, Ikeda R, Nakase T, Shinoda T (2001) Intraspecific diversity of *Cryptococcus albidus* isolated from humans as revealed by sequences of the internal transcribed spacer regions. *Microbiol Immunol* 45(4):291–297
44. Kano R, Kitagawat M, Oota S, Oosumi T, Murakami Y, Tokuriki M, Hasegawa A (2008) First case of feline systemic *Cryptococcus albidus* infection. *Med Mycol* 46(1):75–77
45. Mcleland S, Duncan C, Spraker T, Wheeler E, Lockhart SR, Gulland F (2012) *Cryptococcus albidus* infection in a California sea lion (*Zalophus californianus*). *J Wildl Dis* 48(4):1030–1034
46. Leite DP Jr, Amadio JV, Martins ER, Simões SA, Yamamoto AC, Leal-Santos FA, Takahara DT, Hahn RC (2012) *Cryptococcus* spp isolated from dust microhabitat in Brazilian libraries. *J Occup Med Toxicol* 7(1):11
47. Sanglard D, Coste A, Ferrari S (2009) Antifungal drug resistance mechanisms in fungal pathogens from the perspective of transcriptional gene regulation. *FEMS Yeast Res* 9(7):1029–1050
48. Jarvis JN, Dromer F, Harrison TS, Lortholary O (2008) Managing cryptococcosis in the immunocompromised host. *Curr Opin Infect Dis* 21(6):596–603
49. Sloan D, Dlamini S, Paul N, Dedicat M (2008) Treatment of acute cryptococcal meningitis in HIV infected adults, with an emphasis on resource-limited settings. *Cochrane Database Syst Rev* (4):CD005647
50. Catalán M, Montejo JC (2006) Systemic antifungals. Pharmacodynamics and pharmacokinetics. *Rev Iberoam Micol* 23(1):39–49
51. Polak A, Scholer HJ (1975) Mode of action of 5-fluorocytosine and mechanisms of resistance. *Chemotherapy* 21(3–4):113–130
52. Trösken ER, Fischer K, Völkel W, Lutz WK (2006) Inhibition of human CYP19 by azoles used as antifungal agents and aromatase inhibitors, using a new LC-MS/MS method for the analysis of estradiol product formation. *Toxicology* 219(1–3):33–40
53. Kontoyiannis DP, Lewis RE (2002) Antifungal drug resistance of pathogenic fungi. *Lancet* 359(9312):1135–1144
54. Shao LC, Sheng CQ, Zhang WN (2007) Recent advances in the study of antifungal lead compounds with new chemical scaffolds. *Yao Xue Xue Bao* 42(11):1129–1136
55. Johnson E, Espinel-Ingroff A, Szekeley A, Hockey H, Troke P (2008) 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* 32(6):511–514
56. Guerrero A, Fries BC (2008) Phenotypic switching in *Cryptococcus neoformans* contributes to virulence by changing the immunological host response. *Infect Immun* 76(9):4322–4331
57. Silva PR, Rabelo RA, Terra AP, Teixeira DN (2008) Susceptibility to antifungal agents among *Cryptococcus neoformans* varieties isolated from patients at a university hospital. *Rev Soc Bras Med Trop* 41(2):158–162
58. Andrade-Silva L, Ferreira-Paim K, Mora DJ, Silva PR, Andrade AA, Araujo NE, Pedrosa AL, Silva-Vergara ML (2013) Susceptibility profile of clinical and environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in Uberaba, Minas Gerais, Brazil. *Med Mycol* [Epub ahead of print]
59. Andriole VT (1998) Current and future therapy of invasive fungal infections. *Curr Clin Top Infect Dis* 18:19–36
60. Illnait-Zaragoza MT, Martínez GF, Curfs-Breuker I, Fernández CM, Boekhout T, Meis JF (2008) In vitro activity of the new azole isavuconazole (BAL4815) compared with six other antifungal agents against 162 *Cryptococcus neoformans* isolates from Cuba. *Antimicrob Agents Chemother* 52(4):1580–1582
61. Abruzzo GK, Flattery AM, Gill CJ, Kong L, Smith JG, Pikounis VB, Balkovec JM, Bouffard AF, Dropinski JF, Rosen H, Kropp H, Bartizal K (1997) Evaluation of the echinocandin antifungal MK-0991 (L-743,872): efficacies in mouse models of disseminated

- aspergillosis, candidiasis, and cryptococcosis. *Antimicrob Agents Chemother* 41(11):2333–2338
62. Espinel-Ingroff A (2009) Novel antifungal agents, targets or therapeutic strategies for the treatment of invasive fungal diseases: a review of the literature (2005–2009). *Rev Iberoam Micol* 26(1):15–22
 63. White NJ (1998) Preventing antimalarial drug resistance through combinations. *Drug Resist Updat* 1(1):3–9
 64. Rodríguez Tudela JL (1997) The resistance of opportunistic fungi to antifungals. *Rev Clin Esp* 197(Suppl 1):67–74
 65. Pemán J, Cantón E, Espinel-Ingroff A (2009) Antifungal drug resistance mechanisms. *Expert Rev Anti Infect Ther* 7(4):453–460
 66. Nosanchuk JD, Casadevall A (2003) The contribution of melanin to microbial pathogenesis. *Cell Microbiol* 5(4):203–223
 67. Bryan RA, Jiang Z, Howell RC, Morgenstern A, Bruchertseifer F, Casadevall A, Dadachova E (2010) Radioimmunotherapy is more effective than antifungal treatment in experimental cryptococcal infection. *J Infect Dis* 202(4):633–637
 68. Marichal P, Vanden Bossche H (1995) Mechanisms of resistance to azole antifungals. *Acta Biochim Pol* 42(4):509–516
 69. Sanglard D, Ischer F, Monod M, Bille J (1997) Cloning of *Candida albicans* genes conferring resistance to azole antifungal agents: characterization of CDR2, a new multidrug ABC transporter gene. *Microbiology* 143(Pt 2):405–416
 70. Ferreira MJ, Gyémánt N, Madureira AM, Tanaka M, Koós K, Didziapetris R, Molnár J (2005) The effects of jatrophone derivatives on the reversion of MDR1- and MRP-mediated multidrug resistance in the MDA-MB-231 (HTB-26) cell line. *Anticancer Res* 25(6B):4173–4178
 71. Espinel-Ingroff A (2008) Mechanisms of resistance to antifungal agents: yeasts and filamentous fungi. *Rev Iberoam Micol* 25(2):101–106
 72. Monk BC, Niimi K, Lin S, Knight A, Kardos TB, Cannon RD, Parshot R, King A, Lun D, Harding DR (2005) Surface-active fungicidal D-peptide inhibitors of the plasma membrane proton pump that block azole resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 49(1):57–70
 73. Cannon RD, Lamping E, Holmes AR, Niimi K, Baret PV, Keniya MV, Tanabe K, Niimi M, Goffeau A, Monk BC (2009) Efflux-mediated antifungal drug resistance. *Clin Microbiol Rev* 22(2):291–321, Table of Contents
 74. Prasad R, Gaur NA, Gaur M, Komath SS (2006) Efflux pumps in drug resistance of *Candida*. *Infect Disord Drug Targets* 6(2):69–83
 75. Rodero L, Mellado E, Rodríguez AC, Salve A, Guelfand L, Cahn P, Cuenca-Estrella M, Davel G, Rodríguez-Tudela JL (2003) G484S amino acid substitution in lanosterol 14- α demethylase (ERG11) is related to fluconazole resistance in a recurrent *Cryptococcus neoformans* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother* 47(11):3653–3656
 76. Almeida AM, Matsumoto MT, Baeza LC, de Oliveira E Silva RB, Kleiner AA, Melhem MdeS, Mendes Giannini MJ; Laboratory Group on Cryptococcosis (2007) Molecular typing and antifungal susceptibility of clinical sequential isolates of *Cryptococcus neoformans* from Sao Paulo State, Brazil. *FEMS Yeast Res* 7(1):152–164
 77. Sheng C, Miao Z, Ji H, Yao J, Wang W, Che X, Dong G, Lü J, Guo W, Zhang W (2009) Three-dimensional model of lanosterol 14 α -demethylase from *Cryptococcus neoformans*: active-site characterization and insights into azole binding. *Antimicrob Agents Chemother* 53(8):3487–3495
 78. Sanglard D, Kuchler K, Ischer F, Pagani JL, Monod M, Bille J (1995) Mechanisms of resistance to azole antifungal agents in *Candida albicans* isolates from AIDS patients involve specific multidrug transporters. *Antimicrob Agents Chemother* 39(11):2378–2386
 79. Marichal P, Vanden Bossche H, Odds FC, Nobels G, Warnock DW, Timmerman V, Van Broeckhoven C, Fay S, Mose-Larsen P (1997) Molecular biological characterization of an azole-resistant *Candida glabrata* isolate. *Antimicrob Agents Chemother* 41(10):2229–2237
 80. Perea S, López-Ribot JL, Kirkpatrick WR, McAtee RK, Santillán RA, Martínez M, Calabrese D, Sanglard D, Patterson TF (2001) Prevalence of molecular mechanisms of resistance to azole antifungal agents in *Candida albicans* strains displaying high-level fluconazole resistance isolated from human immunodeficiency virus-infected patients. *Antimicrob Agents Chemother* 45(10):2676–2684
 81. Vandeputte P, Larcher G, Bergès T, Renier G, Chabasse D, Bouchara JP (2005) Mechanisms of azole resistance in a clinical isolate of *Candida tropicalis*. *Antimicrob Agents Chemother* 49(11):4608–4615
 82. Diaz-Guerra TM, Mellado E, Cuenca-Estrella M, Rodríguez-Tudela JL (2003) A point mutation in the 14 α -sterol demethylase gene *cyp51A* contributes to itraconazole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob Agents Chemother* 47(3):1120–1124
 83. Mann PA, Parmegiani RM, Wei SQ, Mendrick CA, Li X, Loeberberg D, DiDomenico B, Hare RS, Walker SS, McNicholas PM (2003) Mutations in *Aspergillus fumigatus* resulting in reduced susceptibility to posaconazole appear to be restricted to a single amino acid in the cytochrome P450 14 α -demethylase. *Antimicrob Agents Chemother* 47(2):577–581
 84. Garcia-Effron G, Dilger A, Alcazar-Fuoli L, Park S, Mellado E, Perlin DS (2008) Rapid detection of triazole antifungal resistance in *Aspergillus fumigatus*. *J Clin Microbiol* 46(4):1200–1206
 85. Sionov E, Chang YC, Garraffo HM, Kwon-Chung KJ (2009) Heteroresistance to fluconazole in *Cryptococcus neoformans* is intrinsic and associated with virulence. *Antimicrob Agents Chemother* 53(7):2804–2815
 86. Varma A, Kwon-Chung KJ (2010) Heteroresistance of *Cryptococcus gattii* to fluconazole. *Antimicrob Agents Chemother* 54(6):2303–2311
 87. Sionov E, Lee H, Chang YC, Kwon-Chung KJ (2010) *Cryptococcus neoformans* overcomes stress of azole drugs by formation of disomy in specific multiple chromosomes. *PLoS Pathog* 6(4):e1000848
 88. Mondon P, Pétter R, Amalfitano G, Luzzati R, Concia E, Polacheck I, Kwon-Chung KJ (1999) Heteroresistance to fluconazole and voriconazole in *Cryptococcus neoformans*. *Antimicrob Agents Chemother* 43(8):1856–1861
 89. Bovers M, Hagen F, Kuramae EE, Hoogveld HL, Dromer F, St-Germain G, Boekhout T (2008) AIDS patient death caused by novel *Cryptococcus neoformans* \times *C. gattii* hybrid. *Emerg Infect Dis* 14(7):1105–1108
 90. Byrnes EJ 3rd, Li W, Lewit Y, Ma H, Voelz K, Ren P, Carter DA, Chaturvedi V, Bildfell RJ, May RC, Heitman J (2010) Emergence and pathogenicity of highly virulent *Cryptococcus gattii* genotypes in the northwest United States. *PLoS Pathog* 6(4):e1000850
 91. Espinel-Ingroff A, Aller AI, Canton E, Castañón-Olivares LR, Chowdhary A, Córdoba S, Cuenca-Estrella M, Fothergill A, Fuller J, Govender N, Hagen F, Illnait-Zaragoza MT, Johnson E, Kidd S, Lass-Flörl C, Lockhart SR, Martins MA, Meis JF, Melhem MS, Ostrosky-Zeichner L, Pelaez T, Pfaller MA, Schell WA, St-Germain G, Trilles L, Tumidge J (2012) *Cryptococcus neoformans*–*Cryptococcus gattii* species complex: an international study of wild-type susceptibility endpoint distributions and epidemiological cutoff values for fluconazole, itraconazole, posaconazole, and voriconazole. *Antimicrob Agents Chemother* 56(11):5898–5906
 92. Chong HS, Dagg R, Malik R, Chen S, Carter D (2010) In vitro susceptibility of the yeast pathogen *Cryptococcus* to fluconazole

- and other azoles varies with molecular genotype. *J Clin Microbiol* 48(11):4115–4120
93. Pfäller MA, Diekema DJ, Gibbs DL, Newell VA, Bijie H, Dzierzanowska D, Klimko NN, Letscher-Bru V, Lisalova M, Muehlethaler K, Rennison C, Zaidi M; Global Antifungal Surveillance Group (2009) Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Study, 1997 to 2007: 10.5-year analysis of susceptibilities of noncandidal yeast species to fluconazole and voriconazole determined by CLSI standardized disk diffusion testing. *J Clin Microbiol* 47(1):117–123
 94. Rex JH, Rinaldi MG, Pfäller MA (1995) Resistance of *Candida* species to fluconazole. *Antimicrob Agents Chemother* 39(1):1–8
 95. Morschhäuser J (2010) Regulation of multidrug resistance in pathogenic fungi. *Fungal Genet Biol* 47(2):94–106
 96. Martinez LR, Fries BC (2010) Fungal biofilms: relevance in the setting of human disease. *Curr Fungal Infect Rep* 4(4):266–275
 97. Bach A (1996) Central venous catheter infections. *Intensive Care Med* 22(6):613
 98. Martinez LR, Casadevall A (2006) *Cryptococcus neoformans* cells in biofilms are less susceptible than planktonic cells to antimicrobial molecules produced by the innate immune system. *Infect Immun* 74(11):6118–6123
 99. Ramage G, Bachmann S, Patterson TF, Wickes BL, López-Ribot JL (2002) Investigation of multidrug efflux pumps in relation to fluconazole resistance in *Candida albicans* biofilms. *J Antimicrob Chemother* 49(6):973–980
 100. Mukherjee PK, Zhou G, Munyon R, Ghannoum MA (2005) *Candida* biofilm: a well-designed protected environment. *Med Mycol* 43(3):191–208
 101. Martinez LR, Casadevall A (2005) Specific antibody can prevent fungal biofilm formation and this effect correlates with protective efficacy. *Infect Immun* 73(10):6350–6362
 102. Mah TF, O'Toole GA (2001) Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol* 9(1):34–39
 103. de Aguiar Cordeiro R, Mourão CI, Rocha MF, de Farias Marques FJ, Teixeira CE, de Oliveira Miranda DF, Neto LV, Brillhante RS, de Jesus Pinheiro Gomes Bandeira T, Sidrim JJ (2013) Antifolates inhibit *Cryptococcus* biofilms and enhance susceptibility of planktonic cells to amphotericin B. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 32(4):557–564
 104. Robertson EJ, Wolf JM, Casadevall A (2012) EDTA inhibits biofilm formation, extracellular vesicular secretion, and shedding of the capsular polysaccharide glucuronoxylomannan by *Cryptococcus neoformans*. *Appl Environ Microbiol* 78(22):7977–7984
 105. Martinez LR, Mihi MR, Han G, Frases S, Cordero RJ, Casadevall A, Friedman AJ, Friedman JM, Nosanchuk JD (2010) The use of chitosan to damage *Cryptococcus neoformans* biofilms. *Biomaterials* 31(4):669–679
 106. Pettit RK, Repp KK, Hazen KC (2010) Temperature affects the susceptibility of *Cryptococcus neoformans* biofilms to antifungal agents. *Med Mycol* 48(2):421–426
 107. Quindós G, Del Palacio A, Pontón J (2007) Present and future of voriconazole in the treatment of invasive mycoses: the inseparable binomial diagnosis-treatment. *Rev Iberoam Micol* 24(3):179–180
 108. Quindós G, Villar-Vidal M, Eraso E (2009) Activity of micafungin against *Candida* biofilms. *Rev Iberoam Micol* 26(1):49–55
 109. Nascimento GGF, Locatelli J, Freitas PC, Silva GL (2000) Atividade de extratos vegetais e fitofármacos sobre bactérias resistentes a antibióticos. *Braz J Microbiol* 31(4):247–256
 110. Basso LA, da Silva LH, Fett-Neto AG, de Azevedo WF Jr, Moreira IdeS, Palma MS, Calixto JB, Astolfi Filho S, dos Santos RR, Soares MB, Santos DS (2005) The use of biodiversity as source of new chemical entities against defined molecular targets for treatment of malaria, tuberculosis, and T-cell mediated diseases—a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 100(6):475–506
 111. Rojas JJ, Ochoa VJ, Ocampo SA, Muñoz JF (2006) 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* 6:2
 112. Cruz MC, Santos PO, Barbosa AM Jr, de Melo DL, Alviano CS, Antonioli AR, Alviano DS, Trindade RC (2007) Antifungal activity of Brazilian medicinal plants involved in popular treatment of mycoses. *J Ethnopharmacol* 111(2):409–412
 113. Zhu F, Ma XH, Qin C, Tao L, Liu X, Shi Z, Zhang CL, Tan CY, Chen YZ, Jiang YY (2012) Drug discovery prospect from untapped species: indications from approved natural product drugs. *PLoS One* 7(7):e39782
 114. Gullo FP, Sardi JC, Santos VA, Sangalli-Leite F, Pitangui NS, Rossi SA, de Paula E Silva AC, Soares LA, Silva JF, Oliveira HC, Furlan M, Silva DH, Bolzani VS, Mendes-Giannini MJ, Fusco-Almeida AM (2012) Antifungal activity of maytenin and pristimerin. *Evid Based Complement Alternat Med* 2012:340787
 115. de Carvalho Tavares L, Johann S, Maria de Almeida Alves T, Guerra JC, Maria de Souza-Fagundes E, Cisalpino PS, Bortoluzzi AJ, Caramori GF, de Mattos Piccoli R, Braibante HTS, Braibante MEF, Pizzolatti MG (2011) Quinolonyl and quinolonyl N-oxide chalcones: synthesis, antifungal and cytotoxic activities. *Eur J Med Chem* 46(9):4448–4456
 116. Nondo RS, Mbwambo ZH, Kidukuli AW, Innocent EM, Mihale MJ, Erasto P, Mushi MJ (2011) Larvicidal, antimicrobial and brine shrimp activities of extracts from *Cissampelos mucronata* and *Tephrosia villosa* from coast region, Tanzania. *BMC Complement Altern Med* 11:33
 117. Rangkadilok N, Tongchusak S, Boonhok R, Chaiyaroj SC, Junyaprasert VB, Buajeeb W, Akanimane J, Raksasuk T, Suddhasthira T, Satayavivad J (2012) In vitro antifungal activities of longan (*Dimocarpus longan* Lour.) seed extract. *Fitoterapia* 83(3):545–553
 118. Tocci N, Simonetti G, D'Auria FD, Panella S, Palamara AT, Valletta A, Pasqua G (2011) Root cultures of *Hypericum perforatum* subsp. *angustifolium* elicited with chitosan and production of xanthone-rich extracts with antifungal activity. *Appl Microbiol Biotechnol* 91(4):977–987
 119. Clancy CJ, Nguyen MH (1998) The combination of amphotericin B and azithromycin as a potential new therapeutic approach to fusariosis. *J Antimicrob Chemother* 41(1):127–130
 120. Patterson TF, Kirkpatrick WR, White M, Hiemenz JW, Wingard JR, Dupont B, Rinaldi MG, Stevens DA, Graybill JR (2000) Invasive aspergillosis. Disease spectrum, treatment practices, and outcomes. I3 Aspergillus Study Group. *Medicine (Baltimore)* 79(4):250–260
 121. Odds FC (2003) Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. *J Antimicrob Chemother* 52(1):1
 122. Johnson MD, MacDougall C, Ostrosky-Zeichner L, Perfect JR, Rex JH (2004) Combination antifungal therapy. *Antimicrob Agents Chemother* 48(3):693–715
 123. Serena C, Fernández-Torres B, Pastor FJ, Trilles L, Lazéra MdosS, Noland N, Guarro J (2005) In vitro interactions of micafungin with other antifungal drugs against clinical isolates of four species of *Cryptococcus*. *Antimicrob Agents Chemother* 49(7):2994–2996
 124. Han Y, Lee JH (2005) Berberine synergy with amphotericin B against disseminated candidiasis in mice. *Biol Pharm Bull* 28(3):541–544
 125. Han Y (2007) Synergic effect of grape seed extract with amphotericin B against disseminated candidiasis due to *Candida albicans*. *Phytomedicine* 14(11):733–738
 126. Saag MS, Graybill RJ, Larsen RA, Pappas PG, Perfect JR, Powderly WG, Sobel JD, Dismukes WE (2000) Practice guidelines for the management of cryptococcal disease. *Infectious Diseases Society of America. Clin Infect Dis* 30(4):710–718

127. Schwarz P, Dromer F, Lortholary O, Dannaoui E (2003) In vitro interaction of flucytosine with conventional and new antifungals against *Cryptococcus neoformans* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 47(10):3361–3364
128. Leite FS (2010) Perfil fenotípico e de expressão de proteínas de *Cryptococcus neoformans* após tratamento com substâncias obtidas da planta *Pterogyne nitens*. Análises Clínicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Araraquara
129. Suzano FR (2012) Estudo da atividade antifúngica de extratos e frações purificadas das plantas *Serjania erecta* radlk e *Eclipta alba* em linhagens de *Cryptococcus neoformans*. Biotecnologia, Universidade de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto
130. Ahmad A, Khan A, Manzoor N (2012) Reversal of efflux mediated antifungal resistance underlies synergistic activity of two monoterpenes with fluconazole. *Eur J Pharm Sci* 48(1–2):80–86
131. Cabras T, Longhi R, Secundo F, Nocca G, Conti S, Polonelli L, Fanali C, Inzitari R, Petruzzelli R, Messana I, Castagnola M, Vitali A (2008) Structural and functional characterization of the porcine proline-rich antifungal peptide SP-B isolated from salivary gland granules. *J Pept Sci* 14(3):251–260
132. Gallis HA, Drew RH, Pickard WW (1990) Amphotericin B: 30 years of clinical experience. *Rev Infect Dis* 12(2):308–329
133. Clemons KV, Stevens DA (1998) Comparison of fungizone, Amphotec, AmBisome, and Abelcet for treatment of systemic murine cryptococcosis. *Antimicrob Agents Chemother* 42(4):899–902
134. Xu SF, Wang P, Liang ZX, Sun JP, Zhao XW, Li AM, Chen LA (2011) Investigation of inflammatory responses of pulmonary microvascular endothelial cells induced by lipopolysaccharide and mechanism. *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi* 34(11):816–820
135. Wang H, Xu K, Liu L, Tan JP, Chen Y, Li Y, Fan W, Wei Z, Sheng J, Yang YY, Li L (2010) The efficacy of self-assembled cationic antimicrobial peptide nanoparticles against *Cryptococcus neoformans* for the treatment of meningitis. *Biomaterials* 31(10):2874–2881
136. Yaguchi T, Takizawa K, Taguchi H, Tanaka R, Kubota T, Kubota Y, Kubota M, Fukushima K (2007) Antifungal activity of the novel adduct, GX-95, of silver with nanometer-scale particles to peptidic hydrolysates from collagen. *Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi* 48(2):97–100
137. Fuchs BB, Tegos GP, Hamblin MR, Mylonakis E (2007) Susceptibility of *Cryptococcus neoformans* to photodynamic inactivation is associated with cell wall integrity. *Antimicrob Agents Chemother* 51(8):2929–2936
138. Soares BM, Alves OA, Ferreira MV, Amorim JC, Sousa GR, Silveira LdeB, Prates RA, Avila TV, Baltazar LdeM, de Souza DdaG, Santos DA, Modolo LV, Cisalpino PS, Pinotti M (2011) *Cryptococcus gattii*: in vitro susceptibility to photodynamic inactivation. *Photochem Photobiol* 87(2):357–364
139. Rodrigues GB, Primo FL, Tedesco AC, Braga GU (2012) In vitro photodynamic inactivation of *Cryptococcus neoformans* melanized cells with chloroaluminum phthalocyanine nanoemulsion. *Photochem Photobiol* 88(2):440–447
140. Antachopoulos C, Walsh TJ (2012) Immunotherapy of *Cryptococcus* infections. *Clin Microbiol Infect* 18(2):126–133
141. Hardison SE, Herrera G, Young ML, Hole CR, Wozniak KL, Wormley FL Jr (2012) Protective immunity against pulmonary cryptococcosis is associated with STAT1-mediated classical macrophage activation. *J Immunol* 189(8):4060–4068
142. Kawakami K, Tohyama M, Xie Q, Saito A (1996) IL-12 protects mice against pulmonary and disseminated infection caused by *Cryptococcus neoformans*. *Clin Exp Immunol* 104(2):208–214
143. Clemons KV, Lutz JE, Stevens DA (2001) Efficacy of recombinant gamma interferon for treatment of systemic cryptococcosis in SCID mice. *Antimicrob Agents Chemother* 45(3):686–689
144. Decken K, Köhler G, Palmer-Lehmann K, Wunderlin A, Mattner F, Magram J, Gately MK, Alber G (1998) Interleukin-12 is essential for a protective Th1 response in mice infected with *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun* 66(10):4994–5000
145. Clemons KV, Brummer E, Stevens DA (1994) Cytokine treatment of central nervous system infection: efficacy of interleukin-12 alone and synergy with conventional antifungal therapy in experimental cryptococcosis. *Antimicrob Agents Chemother* 38(3):460–464
146. Jarvis JN, Meintjes G, Rebe K, Williams GN, Bicanic T, Williams A, Schutz C, Bekker LG, Wood R, Harrison TS (2012) Adjunctive interferon- γ immunotherapy for the treatment of HIV-associated cryptococcal meningitis: a randomized controlled trial. *AIDS* 26(9):1105–1113
147. Qureshi MH, Zhang T, Koguchi Y, Nakashima K, Okamura H, Kurimoto M, Kawakami K (1999) Combined effects of IL-12 and IL-18 on the clinical course and local cytokine production in murine pulmonary infection with *Cryptococcus neoformans*. *Eur J Immunol* 29(2):643–649
148. Zhang T, Kawakami K, Qureshi MH, Okamura H, Kurimoto M, Saito A (1997) Interleukin-12 (IL-12) and IL-18 synergistically induce the fungicidal activity of murine peritoneal exudate cells against *Cryptococcus neoformans* through production of gamma interferon by natural killer cells. *Infect Immun* 65(9):3594–3599
149. Khan AA, Jabeen M, Chauhan A, Owais M (2012) Vaccine potential of cytosolic proteins loaded fibrin microspheres of *Cryptococcus neoformans* in BALB/c mice. *J Drug Target* 20(5):453–466
150. Casadevall A (2006) The third age of antimicrobial therapy. *Clin Infect Dis* 42(10):1414–1416
151. Pahl J, Svoboda P, Jacobs F, Vandewoude K, van der Hoven B, Spronk P, Masterson G, Malbrain M, Aoun M, Garbino J, Takala J, Drgona L, Burnie J, Matthews R; Mycograb Invasive Candidiasis Study Group (2006) A randomized, blinded, multicenter trial of lipid-associated amphotericin B alone versus in combination with an antibody-based inhibitor of heat shock protein 90 in patients with invasive candidiasis. *Clin Infect Dis* 42(10):1404–1413
152. Tabora CP, Casadevall A (2001) Immunoglobulin M efficacy against *Cryptococcus neoformans*: mechanism, dose dependence, and prozone-like effects in passive protection experiments. *J Immunol* 166(3):2100–2107
153. Mukherjee J, Kozel TR, Casadevall A (1998) Monoclonal antibodies reveal additional epitopes of serotype D *Cryptococcus neoformans* capsular glucuronoxylomannan that elicit protective antibodies. *J Immunol* 161(7):3557–3568
154. Rosas AL, Nosanchuk JD, Casadevall A (2001) Passive immunization with melanin-binding monoclonal antibodies prolongs survival of mice with lethal *Cryptococcus neoformans* infection. *Infect Immun* 69(5):3410–3412
155. Mukherjee J, Scharff MD, Casadevall A (1992) Protective murine monoclonal antibodies to *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun* 60(11):4534–4541
156. Mukherjee J, Zuckier LS, Scharff MD, Casadevall A (1994) Therapeutic efficacy of monoclonal antibodies to *Cryptococcus neoformans* glucuronoxylomannan alone and in combination with amphotericin B. *Antimicrob Agents Chemother* 38(3):580–587
157. Mukherjee J, Feldmesser M, Scharff MD, Casadevall A (1995) Monoclonal antibodies to *Cryptococcus neoformans* glucuronoxylomannan enhance fluconazole efficacy. *Antimicrob Agents Chemother* 39(7):1398–1405
158. Larsen RA, Pappas PG, Perfect J, Aberg JA, Casadevall A, Cloud GA, James R, Filler S, Dismukes WE (2005) Phase I evaluation of the safety and pharmacokinetics of murine-derived anticryptococcal antibody 18B7 in subjects with treated cryptococcal meningitis. *Antimicrob Agents Chemother* 49(3):952–958

159. Jiang Z, Bryan RA, Morgenstem A, Bruchertseifer F, Casadevall A, Dadachova E (2012) Treatment of early and established *Cryptococcus neoformans* infection with radiolabeled antibodies in immunocompetent mice. *Antimicrob Agents Chemother* 56(1):552–554
160. Marongiu B, Piras A, Porcedda S, Falconieri D, Maxia A, Frau MA, Gonçalves MJ, Cavaleiro C, Salgueiro L (2012) Isolation of the volatile fraction from *Apium graveolens* L. (Apiaceae) by supercritical carbon dioxide extraction and hydrodistillation: chemical composition and antifungal activity. *Nat Prod Res* [Epub ahead of print]
161. Fukuyama N, Shibuya M, Orihara Y (2012) Antimicrobial polyacetyles from *Panax ginseng* hairy root culture. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 60(3):377–380
162. Lago JH, Souza ED, Mariane B, Pascon R, Vallim MA, Martins RC, Baroli AA, Carvalho BA, Soares MG, dos Santos RT, Sartorelli P (2011) Chemical and biological evaluation of essential oils from two species of Myrtaceae—*Eugenia uniflora* L. and *Plinia trunciflora* (O. Berg) Kausel. *Molecules* 16(12):9827–9837
163. Patel KD, Scarano FJ, Kondo M, Hurta RA, Neto CC (2011) Proanthocyanidin-rich extracts from cranberry fruit (*Vaccinium macrocarpon* Ait.) selectively inhibit the growth of human pathogenic fungi *Candida* spp. and *Cryptococcus neoformans*. *J Agric Food Chem* 59(24):12864–12873
164. Fukuyama N, Ino C, Suzuki Y, Kobayashi N, Hamamoto H, Sekimizu K, Orihara Y (2011) Antimicrobial sesquiterpenoids from *Laurus nobilis* L. *Nat Prod Res* 25(14):1295–1303
165. Funari CS, Gullo FP, Napolitano A, Carneiro RL, Mendes-Giannini MJ, Fusco-Almeida AM, Piacente S, Piza C, Silva DH (2012) Chemical and antifungal investigations of six *Lippia* species (Verbenaceae) from Brazil. *Food Chem* 135(3):2086–2094
166. Regasini LO, Pivatto M, Scorzoni L, Benaducci T, Fusco-Almeida AM, Mendes-Giannini MJS, Barreiro EJ, Silva DHS, da Silva Bolzani V (2010) Antimicrobial activity of *Pterogyne nitens* Tul., Fabaceae, against opportunistic fungi. *Rev Bras Farmacogn* 20(5):706–711

Research Article

Antifungal Activity of Maytenin and Pristimerin

Fernanda P. Gullo,¹ Janaina C. O. Sardi,¹ Vânia A. F. F. M. Santos,²
Fernanda Sangalli-Leite,¹ Nayla S. Pitangui,¹ Suélen A. Rossi,¹
Ana C. A. de Paula e Silva,¹ Luciana A. Soares,¹ Julhiany F. Silva,¹
Haroldo C. Oliveira,¹ Maysa Furlan,² Dulce H. S. Silva,² Vanderlan S. Bolzani,²
Maria José S. Mendes-Giannini,¹ and Ana Marisa Fusco-Almeida¹

¹Laboratory of Clinical Mycology, Department of Clinical Analysis, Faculty of Pharmaceutical Sciences, UNESP, Rua Expedicionários do Brasil 1621, 14801-902 Araraquara, SP, Brazil

²Institute of Chemistry, UNESP, Rua Professor Francisco Degni 55, 14800-900 Araraquara, SP, Brazil

Correspondence should be addressed to Ana Marisa Fusco-Almeida, ana.marisa@uol.com.br

Received 5 January 2012; Revised 17 February 2012; Accepted 23 March 2012

Academic Editor: Guillermo Schmeda-Hirschmann

Copyright © 2012 Fernanda P. Gullo et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Fungal infections in humans have increased alarmingly in recent years, particularly in immunocompromised individuals. Among the infections systemic candidiasis, aspergillosis, cryptococcosis, paracoccidioidomycosis, and histoplasmosis mortality are more prevalent and more severe in humans. The current high incidence of dermatophytosis is in humans, especially as the main etiologic agents *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton mentagrophytes*. Molecules pristimerin and maytenin obtained from the plant *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae) are known to show various pharmacological activities. This study aimed to evaluate the spectrum of antifungal activity of maytenin and pristimerin and their cytotoxicity in human keratinocytes (NOK cells of the oral mucosa). It was concluded that the best spectrum of antifungal activity has been shown to maytenin with MIC varying from 0.12 to 125 mg/L, although it is also active with pristimerin MIC ranging between 0.12 and 250 mg/L. Regarding the toxicity, both showed to have high IC₅₀. The SI showed high pristimerin against some species of fungi, but SI maytenin was above 1.0 for all fungi tested, showing a selective action of fungi. However, when comparing the two substances, maytenin also showed better results. The two molecules can be a possible prototype with a broad spectrum of action for the development of new antifungal agents.

1. Introduction

Fungal infections are mainly caused by opportunistic fungi and are usually associated with immunosuppression [1]. Over the past two decades, invasive fungal infections have emerged as a major threat to immunocompromised patients, since species of *Aspergillus*, *Candida*, *Cryptococcus*, and *Histoplasma* emerging pathogens such as *Fusarium* and *Trichophyton* can cause infection when defenses of host are broken [1]. Paracoccidioidomycosis is a fungal infection that is very important, which affects a large percentage of the rural population of Latin America [2].

There is now a great interest in the discovery of new molecules of natural origin for the treatment of various diseases [3]. Natural products have provided a wide variety of drugs and have become an alternative to large demand

for new antifungal drugs [4]. In Brazil, the use of medicinal plants in traditional medicine has increased considerably in recent years. The wide distribution of natural resources in Brazilian ecosystems and natural diversity of chemical components and provides the country with potential bioactive materials [5].

Maytenus ilicifolia (Celastraceae), popularly known as “*espinheira santa*,” has been used in traditional medicine since the mid-1920s [6]. The secondary metabolites, maytenin and pristimerin (Figure 1), are classified as quinonemethide triterpenoids and mainly isolated from the bark of the roots of mature *M. ilicifolia* plants [7]. Several studies have shown that maytenin exhibits strong antimicrobial activity against Gram-positive and Gram-negative organisms, but there are no studies detailing the effects of these substances on fungi [8].

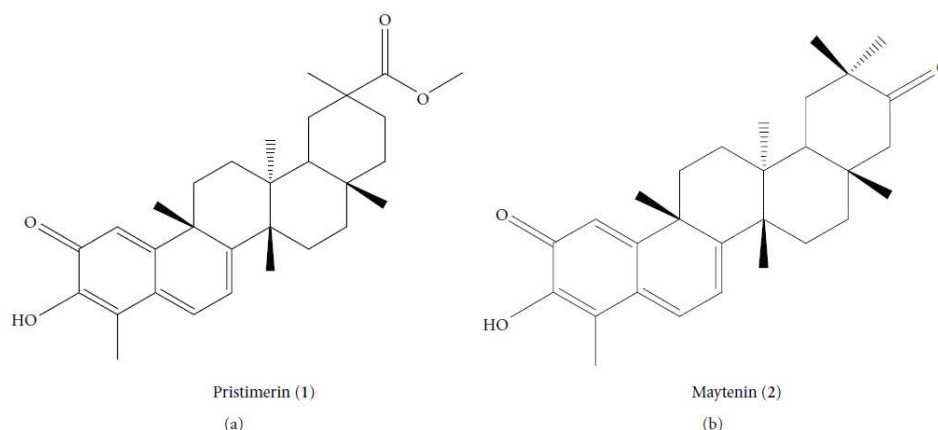


FIGURE 1: Structures of the isolated quinonemethide triterpenes from *M. ilicifolia*, pristimerin (1) and maytenin (2).

The need to discover new antifungal molecules and natural products is of great importance for the development of new therapeutic tools. This paper proposes the study of the potential antifungal potential of maytenin and pristimerin against fungi, an agent of important mycoses. The potential broad spectrum of these molecules was evaluated, and the cytotoxicity of these substances in cell lines was evaluated, suggesting possible prototypes of a broad spectrum of components for the treatment of mycoses.

2. Methods

2.1. Microorganisms. ATCC strains and clinical isolates belong to the mycology collection of the Laboratory of Clinical Mycology, Department of Clinical Analysis, Faculty of Pharmaceutical Sciences, UNESP, Araraquara, were used in the current study. The strains used were: *Candida albicans* ATCC 90028, *Candida krusei* ATCC 6258, *Candida parapsilosis* ATCC 22019, *Candida glabrata* ATCC 90030, *Candida tropicalis* ATCC 750, *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* ATCC 90012, *Histoplasma capsulatum* (G217B), *Aspergillus niger* ATCC 16404, *Aspergillus fumigatus* ATCC 7100, *Trichophyton interdigitalis* ATCC 40131. Clinical isolates from *Paracoccidioides brasiliensis* (18), *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton mentagrophytes* (102), *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* resistant to fluconazole (R30), two clinical isolates from *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* susceptible to fluconazole (S26 and S27), and *Cryptococcus gattii* (118) isolate from animals, resistant to fluconazole, and *Histoplasma capsulatum* (M238P) (lung bat) were also used.

2.2. Minimum Inhibitory Concentration (MIC). All microorganisms were tested for susceptibility to specific commercial drugs for the treatment of each gender. The test for yeast was carried out in accordance with the microdilution method described according to the M27-S3 of the CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) (2008), with

modifications. The filamentous fungi susceptibility testing was performed according to the M38-A2 of the CLSI (2008) [9] with modifications to determine the minimum inhibitory concentration (MIC).

Two pure substances extracted from *Maytenus ilicifolia*, maytenin and pristimerin, were prepared as described by Scorzoni et al. 2007 [10]. The antifungal drugs were diluted according to CLSI M27-S3 [9]. Inoculums were prepared in RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) with L-glutamine, without sodium bicarbonate, supplemented with 2% glucose, and buffered to a pH of 7.0 using 0.165 M MOPS, (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). The yeast suspension was adjusted to a final concentration of 1.0×10^4 CFU/mL in RPMI-1640 and for filamentous fungi, a suspension of microconidia was adjusted to 2.5 to 5.0×10^3 . In the 96-well plates, substances were added in serial dilutions, starting from a concentration of 250 mg/L to 0.48 mg/L. The plates were incubated in a shaker at 37°C/150 rpm to a specific time determined for each microorganism. The reading of MIC was performed by spectrophotometry at 490 nm and confirmed using Alamar Blue (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

2.3. Minimum Fungicide Concentration (MFC). A qualitative analysis of fungal viability was performed, by transferring a portion of the wells to a plate with Sabouraud (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) medium and incubated at 37°C during the time determined for each fungal agent. The MFC was determined as the lowest concentration of the extract that did not allow the growth of any fungal colony on the solid medium after the incubation period [11]. A visual reading was performed to confirm the death or growth inhibition provided by the antifungal substances, maytenin and pristimerin.

2.4. Cell Cytotoxicity Assay. The cytotoxicity of maytenin and pristimerin was assessed by MTT for cell lines NOK

TABLE 1: MIC values and quantitative analysis of fungal cellular viability of pure substances maytenin and pristimerin front of the yeasts and filamentous pathogenic strains causing the most mycoses and evaluation of cytotoxic activity in NOK cells and selectivity index from the ratio of the IC₅₀ and MFC.

	Maytenin MIC/MFC	Pristimerin MIC/MFC	Amphotericin B reference values MIC	Itraconazole reference values MIC	Maytenin IC ₅₀ (mg/L)/SI	Pristimerin IC ₅₀ (mg/L)/SI
<i>Candida albicans</i> ATCC 90028	62.50/62.50	250.00/250.00	0.50–2.00	—	265.7/4.25♦	*
<i>Candida krusei</i> ATCC 6258	15.62/62.50	7.81/62.50	0.25–2.00	0.12–0.50	78.33/1.25♦	24.25/0.38♦
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	15.62/31.25	125.00/125.00	0.25–1.00	0.06–0.25	78.33/2.50♦	*
<i>Candida tropicalis</i> ATCC 750	15.62/31.25	31.25/62.52	0.50–2.00	—	78.33/2.50♦	203.98/3.26♦
<i>Candida glabrata</i> ATCC 90030	31.25/31.25	125.00/125.00	0.25–1.00	—	203.98/6.52♦	*
<i>Cryptococcus neoformans</i> ATCC 90012	0.48/0.48	0.97/0.97	0.50	0.125	2.53/5.29♦	3.92/4.04♦
<i>Cryptococcus neoformans</i> R30	3.90/3.90	7.81/7.81	1.00	>32.00	22.18/5.68♦	24.25/3.10♦
<i>Cryptococcus neoformans</i> isolated 26	0.48/0.48	1.95/1.95	0.50	0.125	2.53/5.29♦	6.41/3.28♦
<i>Cryptococcus neoformans</i> isolated 27	0.48/0.48	3.90/3.90	0.50	0.125	2.53/5.29♦	20.10/5.15♦
<i>Cryptococcus gattii</i> 118	1.95/1.95	3.90/3.90	1.00	>32.00	9.84/5.05♦	20.10/5.15♦
<i>Paracoccidioides brasiliensis</i> Pb18	<0.12/-	<0.12/-	0.015–0.25	<0.0039	**	**
<i>Histoplasma capsulatum</i> ATCC 0G217B	0.97/0.97	0.48/0.48	0.06–0.25	0.25–2.00	3.70/3.81♦	6.43/13.40♦
<i>Histoplasma capsulatum</i> isolated M238P	0.48/0.48	0.48/0.48	0.06–0.25	0.25–2.00	2.53/5.29♦	6.43/13.40♦
<i>Aspergillus fumigatus</i> ATCC 7100	125/-	>250/-	0.12–2.0	0.12- > 16.00	*	*
<i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404	0.97/0.97	250/250	0.12–0.5	0.12–1.00	♦3.70/3.81	*
<i>Trichophyton rubrum</i> clinical isolated	1.95/1.95	250/250	—	0.03–4.00	♦9.84/5.05	*
<i>Trichophyton mentagrophytes</i> ATCC 40131	3.9/3.9	62.5/250	—	0.03–0.25	♦22.18/5.68	150.24/0.6♦
<i>Trichophyton mentagrophytes</i> clinical isolated 102	3.9/3.9	125/250	—	0.03–0.25	♦22.18/5.68	*

MIC: minimum inhibitory concentration; MFC: minimum fungicide concentration.

♦ IC₅₀/SI values in NOK cells.

* IC₅₀/SI not apply because the MIC and MFC values are above 62.5 mg/L.

** IC₅₀/SI not apply because the MIC and MFC values are below 0.12 mg/L.

IC₅₀: 50% inhibitory concentration. SI: selectivity index obtained from the relationship between the IC₅₀ (NOK) by MFC for each fungi.

(keratinocyte oral mucosa), obtained from the American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA). The cells were grown in own culture medium NOK (Keratinocytes—SFM, GIBCO), and maintained at 36.5°C. A concentration ranging from 2.5 to 5.0 × 10⁴ cells/mL was used for the formation of monolayer cells. The concentrations of pure substances were kept in contact with the cells for 24 hours. After the incubation period, the cells treated with the MTT reagent has an additional 5 mg/mL added, (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and the cells were incubated again for another 4 h. After the formation of formazan crystals, 100 μL of isopropanol was added to solubilize the precipitate and allow the reading of the result by changing the color of the medium

[12]. The absorbance of formazan was quantified using an ELISA reader (enzyme-linked immunosorbent assay) set at 560 nm. As a positive control test, hydrogen peroxide was used.

3. Results

3.1. *Minimum Inhibitory Concentration (MIC)*. Table 1 present the results of the antifungal activity of maytenin and pristimerin, isolated from *Maytenus ilicifolia*. Maytenin activity was classified as potent for both yeasts and for filamentous fungi, when compared to positive controls itraconazole and amphotericin B; since the MIC ranged

between 0.12 and 62.5 mg/L. Pristimerin previously showed a significant variation in the action potential. For yeasts, the pristimerin showed potent activity, with the exception of *C. glabrata* ATCC 90030 which showed moderate activity and *C. albicans* ATCC 90028, which presented low antifungal activity. For the filamentous fungi, pristimerin showed moderate activity, with the exception of *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 40131, which showed a MIC of 62.5 mg/L and was classified as having potent activity.

3.2. Minimum Fungicide Concentration (MFC). Minimum fungicide concentration was performed to confirm cell death in MIC through observation of no colony growth in a rich medium. The maytenin showed fungicide activity for most yeasts. No growth of *C. albicans* colonies was observed, and the death of yeast occurred in a higher dilution concentration (Table 1). For the filamentous fungi, MFC was confirmed by testing cell viability, which occurs in MIC fungal cell death (Table 1).

Pristimerin presented a greater difference between the MIC and MFC. Moreover, the difference between the MIC and the value of qualitative analysis of fungal viability was greater than the difference presented by maytenin (Table 1).

For the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* and the filamentous fungi *Aspergillus niger* and *fumigatus*, the qualitative test of fungal viability was flawed, since the growth of colonies cannot be observed on a solid medium.

3.3. Cell Cytotoxicity Assay. The cytotoxicity assay for the NOK cell line showed more than 80% of cell viability in MIC maytenin concentrations. The substance pristimerin showed cell viability above 80% in normal cells (Table 1).

4. Discussion

Plants have been used in medicine for a long period of time, since they are easy to obtain and apply various diseases [4, 13]. Regarding the search for new antifungal agents, the ideal must have a broad spectrum of fungicidal activity without causing toxicity to the host [14]. The treatment of fungal infections is not always effective because of resistance to drugs in addition to presenting high toxicity for human cells. For this reason, there is a continuing search for new drugs which are more potent antifungal, but safer, than existing drugs [15].

The present study showed that pristimerin and maytenin had potente action on the fungi studied (Table 1), but maytenin showed the best results. The exception was *Histoplasma capsulatum* isolated M238P and *Paracoccidioides brasiliensis* which showed MIC equal for both substances.

Alanís-Garza et al., 2007 [16] studied the anti-*Histoplasma* activity of extracts obtained from various plants and showed MICs between 16 and 125 mg/L. This study showed an MIC for ATCC strains of *H. capsulatum* 0.97 and less than 0.48 mg/L pristimerin and maytenin respectively, while for clinical isolate, the MIC for the two substances was less than a 0.48 mg/L. Compared with few literary data of natural products active against this fungal, pristimerin and

maytenin can be considered prototypes that are excellent anti-*Histoplasma*.

Few studies have searched for new drugs from natural products for *P. brasiliensis* [17, 18]. There are reports of the activity of anti-*Paracoccidioides* of *Piper regnellii* and "*Baccharis dracunulifolia*" 30 mg/L [17, 19]. The results expressed in this study were excellent for *P. brasiliensis*, MIC of 0.12 mg/L for both molecules at a concentration 65 times lower than the results of the studies mentioned above.

The systemic mycosis caused by yeasts *Cryptococcus* spp. has increased because of AIDS [20]. In the current results indicate that the molecules had an excellent MIC for the yeasts this genus, ranging from 0.48 to 3.9 mg/L for maytenin and 0.97 to 7.8 for pristimerin. Another study revealed the antifungal activity of extracts of *Maytenus undata* against *C. neoformans*, which showed MIC of 0.09 mg/L after 24 h, and 0.18 mg/L after 48 h [21]. The species *Candida* are classified as the fourth most common pathogen in hospitals and are associated with increased mortality of bloodstream infections due to these fungi having high resistance to existing antifungal [22]. For this yeast, the pristimerin showed potent activity, with the exception of *C. glabrata* ATCC 90030, which showed moderate activity, and *C. albicans* ATCC 90028, which obtained low antifungal activity. Maytenin showed moderate antifungal activity for this specie. For *C. albicans*, maytenin and pristimerin showed fungicide activity; however, the *Candida non-albicans* the result was fungistatic, except for *C. glabrata* in contact pristimerin.

Although dermatophyte infections are restricted to certain areas of the epidermis, they can be invasive and cause serious injury [23]. Due to the high incidence there is a great need to find new drugs which act on the dermatophytes. Maytenin showed potent activity with MIC ranging from 1.95 to 3.9 mg/L. For filamentous fungi, the pristimerin showed moderate activity, with the exception of *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 44131, which showed a MIC of 62.5 mg/L. Many studies have demonstrated the plant antifungal potential against these dermatophytes [23–25], as the study of Lau et al. 2010 [24], that evaluated extracts *Eucalypti Folium* and *Fructus Psoraleae Globuli*. Both the pure compounds effectively inhibit the growth of *T. mentagrophytes* and *T. rubrum* [25].

Invasive aspergillosis is an important cause of mortality in transplant patients [26]. Maytenin had better results against *Aspergillus niger* with an MIC value of 0.97 mg/L, whereas the MIC for *A. fumigatus* was 125 mg/L and pristimerin was similar for both 250 mg/L. Maytenin showed good fungicide activity for most filamentous fungi, while pristimerin showed high MIC (Table 1).

On the other hand, the cytotoxicity tests performed with NOK (keratinocytes oral mucosa) showed that the experimental substances are not cytotoxic to this cell examined in experiment (Table 1). Although most of the antifungal agents available on the market are of synthetic origin, natural products of the study received the attention of researchers, mainly, due to the occurrence of unwanted factors, such as the resistance of some strains the conventional antifungal agents—especially in immunocompromised individuals—and the presence of these toxic effects. Figueiredo et al. (1998)

found antimalarial activity of various substances, including the pristimerin but the cytotoxicity was only for the 17-(methoxycarbonyl)-28-nor-isoigueterin in adenocarcinoma cell line HT-29 [27].

With respect to selectivity index (SI), it is known that the higher the SI of a substance, the greater is its security. In our study we found that the maytenin substance had SI above 1.0 for all species tested, so we can demonstrate the safe use of this. Likewise, the pristimerin presented high SI against some fungal species, as described for *H. capsulatum* (SI 13.40). However, when comparing the two substances, maytenin still showed better results (Table 1).

5. Conclusion

The results of this study indicate the potential use of maytenin and pristimerin for the treatment of fungal infections, which showed a potent antifungal activity against the fungi studied. Therefore, the data obtained are promising. Although the medicinal plant "*Maytenus ilicifolia*" is consolidated in the treatment of gastritis and ulcers more pharmacological studies will be necessary to evaluate these molecules as antifungal prototypes.

Acknowledgments

The authors are grateful to the Fundação de Amparo Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) and the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico and Tecnológico (CNPq) for their financial support. V. Santos thanks CAPES and is also grateful to Pró-Reitoria de Pesquisa (PROPE/UNESP) for providing a research fellowship.

References

- [1] S. Shoham and S. M. Levitz, "The immune response to fungal infections," *British Journal of Haematology*, vol. 129, no. 5, pp. 569–582, 2005.
- [2] M. A. Shikanai-Yasuda, F. D. Q. Telles Filho, R. P. Mendes et al., "Guidelines in paracoccidioidomycosis," *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, vol. 39, no. 3, pp. 297–310, 2006.
- [3] H. Hostettman, *Strategy of the biological and chemical evaluation of plant extracts*, vol. 70, IUPAC, 1998.
- [4] J. C. O. Sardi, A. M. F. Almeida, and M. J. S. Mendes Giannini, "New antimicrobial therapies used against fungi present in subgingival sites—a brief review," *Archives of Oral Biology*, vol. 56, no. 10, pp. 951–959, 2011.
- [5] M. C. T. Duarte, G. M. Figueira, A. Sartoratto, V. L. G. Rehder, and C. Delarmelina, "Anti-Candida activity of Brazilian medicinal plants," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 97, no. 2, pp. 305–311, 2005.
- [6] R. Santos-Oliveira, S. Coulaud-Cunha, and W. Colaço, "Review of *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek, Celastraceae. Contribution to the studies of pharmacological properties," *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, vol. 19, no. 2B, pp. 650–659, 2009.
- [7] V. A. De Freitas Formenton Macedo Dos Santos, D. P. Dos Santos, I. Castro-Gamboa, M. V. B. Zanoni, and M. Furlan, "Evaluation of antioxidant capacity and synergistic associations of quinonemethide triterpenes and phenolic substances from *maytenus ilicifolia* (celastraceae)," *Molecules*, vol. 15, no. 10, pp. 6956–6973, 2010.
- [8] L. de León, M. R. López, and L. Moujir, "Antibacterial properties of zeylasterone, a triterpenoid isolated from *Maytenus lepharodes*, against *Staphylococcus aureus*," *Microbiological Research*, vol. 165, no. 8, pp. 617–626, 2010.
- [9] Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI), *Document M38-A2. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi*, Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI), Wayne, Pa, USA, 2nd edition, 2008.
- [10] L. Scorzoni, T. Benaducci, A. M. Fusco-Almeida, D. H. S. Silva, V. S. Bolzani, and M. J. S. Mendes-Giannini, "The use of standard methodology for determination of antifungal activity of natural products against medical yeasts *Candida* sp and *Cryptococcus* sp.," *Brazilian Journal Microbiological*, vol. 38, no. 3, pp. 391–397, 2007.
- [11] L. O. Regasini, M. Pivatto, L. Scorzoni et al., "Antimicrobial activity of *Pterogyne nitens* Tul., Fabaceae, against opportunistic fungi," *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, vol. 20, no. 5, pp. 706–711, 2010.
- [12] T. Mosmann, "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays," *Journal of Immunological Methods*, vol. 65, no. 1-2, pp. 55–63, 1983.
- [13] J. J. Rojas, V. J. Ochoa, S. A. Ocampo, and J. F. Muñoz, "Screening for antimicrobial activity of ten medicinal plants used in Colombian folkloric medicine: a possible alternative in the treatment of non-nosocomial infections," *BMC Complementary and Alternative Medicine*, vol. 6, article no. 2, 2006.
- [14] A. J. Carrillo-Muñoz, G. Giusiano, P. A. Ezkurra, and G. Quindós, "Antifungal agents: mode of action in yeast cells," *Revista Espanola de Quimioterapia*, vol. 19, no. 2, pp. 130–139, 2006.
- [15] R. Fenner, A. H. Betti, L. A. Mentz, and S. M. K. Rates, "Plants with potential antifungal activity employed in Brazilian folk medicine," *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 42, no. 3, pp. 369–394, 2006.
- [16] B. A. Alanís-Garza, G. M. González-González, R. Salazar-Aranda, N. Waksman de Torres, and V. M. Rivas-Galindo, "Screening of antifungal activity of plants from the northeast of Mexico," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 114, no. 3, pp. 468–471, 2007.
- [17] S. Johann, N. P. Sá, L. A. Lima et al., "Antifungal activity of schinol and a new biphenyl compound isolated from *Schinus terebinthifolius* against the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*," *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, vol. 9, article 30, 2010.
- [18] L. de Carvalho Tavares, S. Johann, T. Maria de Almeida Alves et al., "Quinolinylnyl and quinolinylnyl N-oxide chalcones: synthesis, antifungal and cytotoxic activities," *European Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 46, no. 9, pp. 4448–4456, 2011.
- [19] C. V. Martins, D. L. da Silva, A. T. Neres et al., "Curcumin as a promising antifungal of clinical interest," *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol. 63, no. 2, pp. 337–339, 2009.
- [20] Md. Saúde, "Dados e pesquisas em DST e AIDS," DST/AIDS CPNd editor. Brasília, Brasil, 2002.
- [21] T. A. Mokoka, L. J. McGaw, and J. N. Eloff, "Antifungal efficacy of ten selected South African plant species against *Cryptococcus neoformans*," *Pharmaceutical Biology*, vol. 48, no. 4, pp. 397–404, 2010.
- [22] T. Rossignol, B. Kelly, C. Dobson, and C. d'Enfert, "Endocytosis-mediated vacuolar accumulation of the human

- ApoE apolipoprotein-derived ApoEdpL-W antimicrobial peptide contributes to its antifungal activity in *Candida albicans*," *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 55, no. 10, pp. 4670–4681, 2011.
- [23] N. T. Peres, F. C. A. Maranhão, A. Rossi, and N. M. Martinez-Rossi, "Dermatophytes: host-pathogen interaction and antifungal resistance," *Anais Brasileiros de Dermatologia*, vol. 85, no. 5, pp. 657–667, 2010.
- [24] K. M. Lau, L. H. Fu, L. Cheng et al., "Two antifungal components isolated from fructus psoraleae and folium eucalypti globuli by bioassay-guided purification," *American Journal of Chinese Medicine*, vol. 38, no. 5, pp. 1005–1014, 2010.
- [25] C. Cavaleiro, M. J. Gonçalves, D. Serra et al., "Composition of a volatile extract of *Eryngium duriaei* subsp. *juresianum* (M. Lainz) M. Lainz, signalled by the antifungal activity," *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 54, no. 3, pp. 619–622, 2011.
- [26] M. C. Z. Novaretti, A. S. Ruiz, F. L. Dulley, P. E. Dorlhiac-Llacer, and D. A. F. Chamone, "Detection of *Aspergillus* sp in bone marrow transplant patients by PCR-nested technique," *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, vol. 30, no. 2, pp. 162–163, 2008.
- [27] J. N. Figueiredo, B. Rätz, and U. Séquin, "Novel quinone methides from *Salacia kraussii* with in vitro antimalarial activity," *Journal of Natural Products*, vol. 61, no. 6, pp. 718–723, 1998.