

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**“Sensibilidade à antifungicos sintéticos e naturais
anti-*Cryptococcus neoformans* determinados
por Citometria de Fluxo”**

Orientadora: Profa. Dra. Maria José Soares Mendes Giannini

Aluna: Tatiane Benaducci

Araraquara

2009



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS



Tatiane Benaducci

**“Sensibilidade à antifungos sintéticos e naturais
anti- *Cryptococcus neoformans* determinados
por Citometria de Fluxo”**

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

Orientadora: Profa. Dra. Maria José Soares Mendes Giannini

Araraquara

2009

Ficha Catalográfica

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

T219s Benaducci, Tatiane
Sensibilidade à antifúngicos sintéticos e naturais anti-*Cryptococcus neoformans* determinados por citometria de fluxo. / Tatiane Benaducci. – Araraquara, 2009.
86 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia
Orientador: Maria José Soares Mendes Giannini

1.Cryptococcus sp. 2.Atividade antifúngica. 3.Citometria de fluxo.
4.Pterogyne nitens. I.Giannini, Maria José Soares Mendes, orient. II. Título.

CAPES: 40300005

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

Dedico este trabalho...

Ao meu pai, Pedro, o meu maior mestre desde o princípio, ídolo de todo o sempre, que se dedica a cada dia a me incentivar e almejar o meu crescimento e sucesso. À minha mãe, Maria Arlene, fundamental à minha vida, que está sempre ao meu lado, nunca deixando que nada me falte, que me apóia e me assegura em todas as circunstâncias. Às minhas irmãs, Daiane e Josiane, minhas melhores amigas, que são continuação de mim mesma. Uma continuação do meu ser, do meu viver e do meu existir... Amo muito todos vocês!

Agradeço...

Primeiramente a Deus, por ter guiado os meus caminhos até aqui, iluminado a minha mente e o meu ser, dando a chance de viver estes momentos maravilhosos e inesquecíveis de minha vida.

À Profa. Dra. Maria José Soares Mendes Giannini, pelo exemplo de liderança, perseverança e idealismo. Obrigado por exigir e cobrar sempre o melhor. Obrigado pela oportunidade de crescimento e por ter acreditado e confiado em mim desde o início deste projeto.

Aos meus pais que me deram a vida e me ensinaram a vivê-la com dignidade, que iluminaram meus caminhos obscuros com afeto e dedicação para que eu trilhasse sem medo e cheia de esperanças. A vocês, que se doaram inteiros e renunciaram aos seus sonhos, para que, muitas vezes, pudesse realizar os meus. A vocês, pais por natureza, por opção e amor, não bastaria dizer um simples obrigado. Procuro arduamente uma forma verbal de exprimir uma emoção ímpar. Uma emoção que jamais seria traduzida em palavras. O que conquistei até hoje não seria possível sem vocês. Muito obrigada. Amo vocês!

Às minhas irmãs, que me ajudaram a ser uma pessoa melhor, pelos exemplos de companheirismo, união e carinho. A vocês, páginas e páginas de elogios seriam insuficientes para expressar o que realmente eu sinto...

Muito obrigada!!!

Ao meu namorado, Charles, meu companheiro, minha amada paixão, que me conforta, me equilibra, me acalma, me alegra, me faz feliz, me motiva a viver... Pela sua ajuda, compreensão, amizade, sinceridade, por me tornar uma pessoa melhor, obrigada!

Aos meus amigos, meus verdadeiros amigos, que me incentivaram, ajudaram e tiveram paciência com meu jeito explosivo, porém carinhoso de ser.

A todos do laboratório de Micologia, que me ofereceram preciosas ajudas nos momentos de dificuldades e dúvidas. Pela paciência, compreensão e pelas animadas conversas que resultaram em ótima convivência no laboratório. Pela verdadeira amizade... União... Principalmente nos momentos tensos... Choramos, gritamos, cantamos, dançamos, rezamos, comemos, muito... Pelo valioso convívio, obrigada!

O QUE EU DESEJO A TODOS VOCÊS...

Desejo primeiro que vocês amem, E que amando, também sejam amados. E que se não forem, sejam breves em esquecer, e que esquecendo, não guardem mágoa. Desejo, pois, que não seja assim, mas se for, saibam ser sem desesperar.

Desejo também que tenham amigos, e que mesmo maus e inseqüentes, sejam corajosos e fiéis; e que, pelo menos num deles, vocês possam confiar sem duvidar porque a vida é assim.

Desejo ainda que vocês tenham inimigos. Nem muitos, nem poucos, mas na medida exata para que, algumas vezes, vocês se interpelem a respeito de suas próprias certezas. E que entre eles, haja pelo menos um que seja justo, para que vocês não se sintam demasiados.

Desejo depois que vocês sejam úteis, mas não insubstituíveis. E que nos maus momentos, quando não restar mais nada, essa utilidade seja suficiente para manter vocês de pé.

Desejo ainda que vocês sejam tolerantes, Não com os que erram pouco, porque isso é fácil, mas com os que erram muito e irremediavelmente, e que fazendo bom uso dessa tolerância, vocês sirvam de exemplo aos outros.

Desejo que vocês, sendo jovens, não amadureçam depressa demais, e que sendo maduro, não insista em rejuvenescer e que sendo velho, não se dediquem ao desespero porque cada idade tem o seu prazer e a sua dor e é preciso deixar que eles escorram por entre nós.

Desejo por sinal que vocês sejam tristes, não o ano todo, mas apenas um dia. Mas que nesse

dia descubra que o riso diário é bom e o riso habitual é insosso e o riso constante é insano.

Desejo que vocês descubram, com o máximo de urgência, acima e a respeito de tudo, que existem oprimidos, injustiçados e infelizes, e que estão à sua volta.

Desejo ainda que vocês afaguem um gato, alimentem um cuco e ouçam o João-de-Barro erguer triunfante o seu canto matinal porque, assim, vocês se sentirão bem por nada.

Desejo também que vocês plantem uma semente, por mais minúscula que seja, e acompanhem o seu crescimento, para que vocês saibam de quantas muitas vidas são feitas uma árvore.

Desejo, outrossim, que vocês tenham dinheiro, porque é preciso ser prático. E que pelo menos uma vez por ano coloquem um pouco dele na sua frente e digam "Isso é meu", só para que fique bem claro quem é o dono de quem.

Desejo também que nenhum de seus afetos morra, por ele e por vocês, mas que se morrer, vocês possam chorar sem se lamentar e sofrer sem se culparem.

Desejo por fim, que vocês sendo homens, tenham uma boa mulher, e que sendo mulheres, tenham um bom homem. E que se amem hoje, amanhã e nos dias seguintes, e quando estiverem exaustos e sorridentes, ainda haja amor para recomeçar. E se tudo isso acontecer, não tenho mais nada a desejar a vocês.

(<http://jfaff.br.tripod.com/jandaia.org/id.htm>)

O Filtro Solar

Mary Schimich, Chicago Tribune, 1º de junho de 1997. Traduzido por Pedro Bial.

Nunca deixem de usar filtro solar.

Se eu pudesse dar só uma dica sobre o futuro seria esta: use filtro solar. Os benefícios a longo prazo do uso de filtro solar estão provados e comprovados pela ciência. Já o resto de meus conselhos não tem outra base confiável além de minha própria experiência errante. Mas agora eu vou compartilhar esses conselhos com vocês...

Aproveite bem, o máximo que puder, o poder e a beleza da juventude. Ou então, esquece. Você nunca vai entender mesmo o poder e a beleza da juventude até que tenham se apagado. Mas pode crer, daqui a vinte anos, você vai evocar as suas fotos e perceber de um jeito que você nem desconfia hoje em dia quantas, tantas alternativas se escancaravam à sua frente. E como você realmente estava com "tudo em cima". Você não está gordo, ou gorda.

Não se preocupe com o futuro. Ou então se preocupe, se quiser, mas saiba que "pré-ocupação" é tão eficaz quanto mascar chiclete para tentar resolver uma equação de álgebra. As encrencas de verdade em sua vida tendem a vir de coisas que nunca passaram pela sua cabeça preocupada, que te pegam no ponto fraco às quatro da tarde de uma terça-feira modorrenta.

Todo dia enfrente pelo menos uma coisa que te meta medo de verdade.

Cante.

Não seja leviano com o coração dos outros, não ature gente de coração leviano.

Use fio dental.

Não perca tempo com inveja. Às vezes, se está por cima; às vezes, por baixo... A peleja é longa e, no fim, é só você contra você mesmo.

Não esqueça os elogios que receber, esqueça as ofensas. Se conseguir isso, me ensine.

Guardê as antigas cartas de amor. Jogue fora os extratos bancários velhos.

Estique-se.

Não se sinta culpado por não saber o que fazer da vida. As pessoas mais interessantes que conheço não sabiam aos 22 o que queriam fazer da vida. Alguns dos quarentões mais interessantes que conheço ainda não sabem.

Tome bastante cálcio. Seja cuidadoso com os joelhos: você vai sentir falta deles.

Talvez você case, talvez não. Talvez tenha filhos, talvez não. Talvez se divorcie aos 40, talvez dance ciranda em suas bodas de diamante. Faça o que fizer, não se auto-congratule demais e nem seja severo demais com você. As suas escolhas têm sempre metade das chances de dar certo. É assim para todo mundo.

Desfrute de seu corpo use-o de toda maneira que puder mesmo. Não tenha medo de seu corpo ou do que as outras pessoas possam achar dele. É o mais incrível instrumento que você jamais vai possuir.

Dance... Mesmo que não tenha onde, além de seu próprio quarto.

Leia as instruções, mesmo que não vá segui-las depois. Não leia revistas de beleza. Elas só vão fazer você se achar feio.

Dedique-se a conhecer os seus pais. É impossível prever quando eles terão ido embora, de vez. Seja legal com os seus irmãos. Eles são a melhor ponte com o seu passado e, possivelmente, quem vai sempre mesmo te apoiar no futuro.

Entenda que amigos vão e vêm. Mas nunca abra mão de uns poucos e bons. Esforce-se de verdade para diminuir as distâncias geográficas e destinos de vida, porque quanto mais velho você ficar, mais você vai precisar das pessoas que conheceu quando jovem.

More uma vez em Nova Iorque, mas vá embora antes de endurecer. More uma vez no Havaí, mas se mande antes de amolecer. Viaje.

Aceite certas verdades inescapáveis: os preços vão subir, os políticos vão saracotear, você também vai envelhecer. E quando isso acontecer, você vai fantasiar que quando era jovem os preços eram razoáveis, os políticos eram decentes e as crianças respeitavam os mais velhos.

Respeite os mais velhos.

Não espere que ninguém segure a sua barra. Talvez você arrume uma boa aposentadoria privada, talvez case com um bom partido, mas não esqueça que um dos dois pode, de repente, acabar.

Não mexa demais nos cabelos, senão quando você chegar aos 40, vai aparentar 85.

Cuidado com os conselhos que comprar, mas seja paciente com aqueles que os oferecem. Conselho é uma forma de nostalgia. Compartilhar conselhos é um jeito de pescar o passado do lixo, esfregá-lo, repintar as partes feias e reciclar tudo por mais do que vale.

Mas no filtro solar, acredite!

Sumário:

1. INTRODUÇÃO	19
2. JUSTIFICATIVA	32
3. OBJETIVOS	33
4. METODOLOGIA.....	34
4.1. Seleção dos isolados e condições de cultivo.....	34
4.2. Cepas de referência.....	34
4.3. Avaliação da atividade antifúngica.....	34
4.4. Preparo das substâncias vegetais	35
4.5. Concentração fungicida mínima (CFM)	35
4.6. Seleção dos extratos	35
4.7. Análise por Citômetro de Fluxo.....	35
4.8. Extração do DNA genômico de <i>C. neoformans</i>	36
4.9. PCR-RFLP: Gene URA5.....	37
5. RESULTADOS	38
5.1. Realização da tipagem molecular dos isolados de <i>Cryptococcus</i> sp por RFLP do gene URA5	38
5.1.1. Seleção dos isolados	38
5.1.2. PCR-RFLP do gene URA5.....	38
5.2. Padronização da metodologia de antifungigrama para anfotericina B por citometria de fluxo para <i>Cryptococcus</i> sp	42
5.3. Definição dos pontos finais de leitura de <i>Cryptococcus</i> sp para anfotericina B por citometria de fluxo.....	45
5.4. Realização do teste de citometria de fluxo para outras cepas de <i>Cryptococcus</i> sp	46
5.5. Avaliação da atividade antifúngica e seleção do extrato para contato com a levedura de gênero <i>Cryptococcus</i> e análise em citômetro de fluxo	48
6. Discussão.....	51
7. CONCLUSÕES	60
8. BIBLIOGRAFIA	61
Anexo	83

Lista de Figuras:

Figura 1: Perfis de PCR-RFLP de <i>C. neoformans</i> do Estado do Rio de Janeiro	39
Figura 2: Perfis de PCR-RFLP de <i>C. neoformans</i> da cidade de São José do Rio Preto	40
Figura 3: Prevalência dos tipos genéticos de <i>C. neoformans</i> do estado do Rio de Janeiro.....	41
Figura 4: Prevalência dos tipos genéticos de <i>C. neoformans</i> da cidade de São José do Rio Preto.....	42
Figura 5: Valores de porcentagem de células mortas versus metodologia empregada para obtenção de células mortas.	43
Figura 6: Valores de intensidade de células marcadas com PI (%) versus desoxicolato de sódio.....	44
Figura 7: Valores de intensidade de células marcadas com PI (%) versus tempo (min) para <i>C. neoformans</i> cepa ATCC 90012.....	45
Figura 8: Valores de intensidade de células marcadas com PI (%) versus concentração de Anfotericina B ($\mu\text{g/mL}$) após o contato com a cepa ATCC de <i>Cryptococcus neoformans</i>	46

Lista de Tabelas:

Tabela 1: (em anexo). Dados e resultados dos isolados de <i>Cryptococcus</i> sp do Estado do Rio de Janeiro avaliados quanto ao tipo molecular.....	83
Tabela 2: (em anexo). Dados e resultados dos isolados de <i>Cryptococcus</i> sp da cidade de São José do Rio Preto no Estado de São Paulo avaliados quanto ao tipo molecular.....	86
Tabela 3: Dados dos isolados de <i>Cryptococcus</i> sp da cidade de São José do Rio Preto no Estado de São Paulo e do estado do Rio de Janeiro avaliados quanto a concentração inibitória mínima por dois métodos, microdiluição e citometria de fluxo.	47
Tabela 4: Resultados dos testes de sensibilidade de extratos, frações e substâncias puras de plantas de diferentes famílias contra <i>Cryptococcus neoformans</i> distribuídos em porcentagem de CIM.....	48
Tabela 5: Resultados em porcentagem das substâncias puras relacionados aos valores de CIM das famílias Piperaceae, Rubiaceae, Euphorbiaceae, Flacourtiaceae e Leguminosae testados contra <i>Cryptococcus neoformans</i>	49
Tabela 6: Valores de concentração inibitória mínima (CIM) determinados segundo o CLSI, e por citometria de fluxo dos extratos puros 6, 7 e 8 da planta <i>Pterogyne nitens</i> e concentração fungicida mínima (CFM).....	50

Lista de Abreviaturas:

%	=	Porcentagem
µg	=	Micrograma
µL	=	Microlitro
°C	=	Graus Celsius
5-FC	=	5-flucitosina
AIDS	=	Síndrome da imunodeficiência adquirida
AFLP	=	Polimorfismo do Tamanho de Fragmentos Amplificados (Polimorfismo Amplified Fragment Length Polymorphism)
AMB	=	Anfotericina B
ATCC	=	<i>American type culture collection</i>
CF	=	Citometro de Fluxo
CFM	=	Concentração fungicida mínima
CIM	=	Concentração inibitória mínima
CLSI	=	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
DNA	=	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	=	Desoxirribonucleosídeo(s) trifosfato(s)
EDTA	=	Ácido etileno diamianino tetracético
EUCAST	=	European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing
FCZ	=	Fluconazol
g	=	Grama
HAART	=	Terapia antiretroviral de alta potência
HCl	=	Ácido clorídrico
HIV	=	Vírus da imunodeficiência humana
HO-Cl	=	Ácido hipocloroso
IFC	=	Intensidade de fluorescência celular
Kb	=	Quilobases
KCl	=	Cloreto de potássio
L	=	Litro
LCR	=	Líquido cefalorraquiano
mg	=	Miligrama
MgCl ₂	=	Cloreto de magnésio
mL	=	Mililitro

mM	=	Milimolar
MOPS	=	Ácido 3-(N-morfolino) propanosulfônico
mL	=	Mililitros
MPO	=	Enzima mioloperoxidase
mV	=	Milivolt
ng	=	Nanograma
(NH ₄) ₂ SO ₄	=	Sulfato de amônio
nm	=	Nanômetro
NaCl	=	Cloreto de sódio
pb	=	Pares de bases
PCR	=	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (= Reação em cadeia da polimerase)
pH	=	Potencial hidrogeniônico
PI	=	Iodeto de propídio
pmol	=	Picomol
RAPD	=	<i>Random Amplification of Polymorphic DNA</i> (= Polimorfismos de DNA amplificados aleatoriamente)
RFLP	=	<i>Restriction fragment length polymorphism</i> (= Polimorfismo do Tamanho do Fragmento de Restrição)
RJ	=	Rio de Janeiro
rpm	=	Rotações por minuto
SDD	=	Sensível dependente de dose
SIDA	=	Síndrome da imunodeficiência adquirida
SJRP	=	São José do Rio Preto
SNC	=	Sistema Nervoso Central
TBE	=	Tris-base - ácido bórico - EDTA
Tris	=	2-amino-2-hidroximetilpropano
UFC	=	Unidade formadora de colônia
var.	=	Variedade
YEPD	=	Extrato de levedura - peptona - dextrose

RESUMO

Cryptococcus neoformans é o patógeno fúngico mais comumente encontrado em infecções do sistema nervoso central, que desperta interesse devido a sua associação com os pacientes imunocomprometidos, em especial aqueles com AIDS. Embora haja ainda pouco relatados, isolados resistentes têm emergido nos últimos anos, e a disponibilidade de um método de sensibilidade rápido e reprodutível pode contribuir para a escolha do tratamento adequado. Os antifúngicos sintéticos possuem elevada toxicidade e sua disponibilidade na prática médica é relativamente pequena, algumas vezes ineficiente, o que reforça a demanda por novas alternativas terapêuticas. A busca por novos agentes antifúngicos a partir de plantas pode viabilizar o tratamento das principais micoses, diminuindo as reações adversas. Neste âmbito, pretendeu-se padronizar a citometria de fluxo para a determinação da sensibilidade de anfotericina B e de substâncias de fontes naturais, comparando-as com o micrométodo. A citometria de fluxo foi utilizada no presente estudo para testar a sensibilidade de *C. neoformans* baseada na ligação de iodeto de propídeo na célula fúngica. Para tanto, isolados clínicos foram selecionados para análise da sensibilidade em citometria de fluxo depois de realizada a tipagem molecular de 151 isolados de *Cryptococcus* spp. das regiões de São José do Rio Preto e Rio de Janeiro por RFLP do gene URA5, em que a prevalência segue igual ao quadro mundial, em que o tipo molecular VNI é o mais prevalente, bem como verificou-se que a infecção por uma nova cepa e/ou diferentes espécies pode ocorrer com relativa freqüência. Foram ainda testados 57 extratos brutos, 52 frações e 53 substâncias puras isoladas de plantas do Cerrado e Mata Atlântica contra a cepa ATCC 90012 de *C. neoformans*. Três substâncias puras sorbifolina, nitensosídeo B e isoquercitrina da planta *Pterogyne nitens* apresentaram CIM de 7,8µg/mL contra *C. neoformans*. Estes dados foram confirmados em citometria de fluxo, após padronização do método para anfotericina B, cujo ponto final de leitura correspondeu a 50% da intensidade de PI em relação aos controles, correspondendo ao valor de 2µg/mL para a cepa ATCC, valor este também obtido pelo micrométodo. As CIMs dos 14 isolados variaram de 0,5 a 2µg/mL pelo micrométodo, e de 0,0625 a 4 µg/mL por citometria. As substâncias puras foram eficientes antifúngicos contra *C.*

neoformans, uma vez que em baixas concentrações da planta o iodeto de propídio rapidamente penetrou na maioria das células da levedura, indicando que o efeito fungicida resultou principalmente de uma extensa lesão da membrana celular, garantindo futuras investigações para aplicações clínicas. Os dados foram analisados concomitantemente com o método M27A2 e os resultados foram consistentes. O novo método provou ser eficiente e viável para a análise de substâncias de origem vegetal com atividade antifúngica.

Abstract

Cryptococcus neoformans is a fungal pathogen most commonly found in infections of the central nervous system that arouses interest because of its association with immunocompromised patients, especially those with AIDS. Although have not been much reported, resistant isolates have emerged in recent years, and the availability of a method for rapid and reproducible susceptibility may contribute to the choice of treatment. The synthetic antifungal agents have high toxicity and its availability in medical practice is relatively small, sometimes inefficient, which reinforces the demand for new therapies. The search for new antifungal agents from natural products may facilitate the treatment of major fungal infections, reducing adverse reactions. In this context, we intended to standardize the flow cytometry to determine the susceptibility of amphotericin B and natural sources substances against *C. neoformans*, based on binding of propidium iodide (PI) in the fungal cell. For this, clinical isolates were selected for susceptibility analysis in flow cytometry after molecular typing of 151 *Cryptococcus* spp isolates from São José do Rio Preto and Rio de Janeiro by RFLP of the URA5 gene. The molecular type VNI is the most prevalent, as well as verified that infection by a new strain and / or different species can occur with relative frequency. We also tested 57 crude extracts, 52 fractions and 53 pure compounds isolated from plants of the Cerrado and the Atlantic forest against the *C. neoformans* ATCC 90012 strain. The pure substances sorbifolin, nitensoside B and isoquercitrin, from the plant *Pterogyne nitens*, presented MIC of 7.8µg/ml against *C. neoformans*, These data were confirmed by flow cytometry, after standardizing the method for amphotericin B, whose endpoint was 50% of the PI intensity, corresponding to the value of 2µg/mL for the ATCC strain, a value also obtained by the micromethod. The 14 isolates presented MICs ranged from 0.5 to 2µg/mL by the micromethod and from 0.0625 to 4µg/mL by flow cytometry. The pure substances were effective antifungal against *C. neoformans*, since at low concentrations of plant; the iodide rapidly penetrated the majority of yeast cells, indicating that the fungicidal effect resulted primarily from an extensive lesion of the membrane, ensuring future research to clinical applications. The data were analyzed concurrently with the M27A2 method and the results were consistent. The new method

proved to be efficient and viable for the analysis of substances of plant origin with antifungal activity.

1. INTRODUÇÃO

Avanços significativos na área da saúde têm propiciado a sobrevivência de muitos pacientes, mas por outro lado muitos destes tornaram-se altamente suscetíveis a infecções causadas por organismos como os fungos que eram considerados de baixa virulência ou até mesmo não patogênicos. O aumento na incidência destas infecções decorreu principalmente devido ao aparecimento de indivíduos imunodebilitados por várias causas, incluindo as patogênicas ou iatrogênicas (SEGAL et al., 2008; JARVIS et al., 2008). Isto se deve ao crescimento do uso de terapias imunossupressoras agressivas em uma ampla variedade de pacientes, incluindo aqueles com o vírus HIV, com neoplasias hematológicas, com doenças auto-imunes, transplantados ou com rejeição severa do enxerto contra o hospedeiro (PFALLER et al., 2008; GROLL et al., 2008; GARBER, et al., 2001). Apesar dos esforços mundiais e dos avanços promissores visando o controle da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), quer para a prevenção ou o tratamento, o número de indivíduos infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) tem crescido, bem como o número de mortes relacionadas com esta doença (ROSSIT et al, 2009). Por outro lado, associada a esta e outras doenças, a frequência das micoses tornou-se um importante problema de saúde pública, afetando grande parte da população mundial e como consequência, podendo ocorrer diminuição da qualidade e da expectativa de vida.

Cryptococcus neoformans é o patógeno fúngico mais comumente encontrado em infecções do sistema nervoso central (SNC), afetando hospedeiros imunocompetentes e principalmente imunocomprometidos, sobretudo paciente HIV positivo, sendo esse importante fator de risco da criptococose (THAKUR et al., 2008; DEL VALLE & PINA-OVIEDO, 2006). No mundo existem 33,2 milhões de pessoas com HIV, de acordo com Lin & Heitman em 2006, e, ocorreram 2,5 milhões de novas infecções em 2007. O número de pessoas que morreram em decorrência da AIDS este ano foi de 2,1 milhões, e, na América Latina, um terço dos HIV soropositivos está concentrado no Brasil, um país que espelha este aumento mundial (ROSSIT et al, 2009). De acordo com o Boletim Epidemiológico, de 1980 a junho de 2007, foram notificados 474.273 casos de AIDS no Brasil, sendo que 6% dos

pacientes tinham criptococose no momento do diagnóstico (MINISTÉRIO DA SAÚDE, Brasil, 2007). Devido a esse quadro, a criptococose é a segunda doença neurológica mais prevalente em pacientes brasileiros com AIDS (MARTINS et al, 2007; PAPPALARDO et al, 2007; SHEN et al., 2007; VIDOTTO et al, 2006). A criptococose continua a ser uma das principais causas da elevada taxa de mortalidade entre pacientes possuidores do vírus da imunodeficiência humana (HIV) apesar dos avanços feitos em tratamento antifúngico, controle da pressão intracraniana e terapia anti-retroviral (SAJADI et al., 2009). O índice de mortalidade de criptococose no SNC é de 15% a 30%, mesmo com o tratamento (CHARLIER et al, 2008). De acordo com Pappalardo, 2009, os dados do Instituto de Infectologia Emilio Ribas (IIER) mostram aumento de casos a partir de 2002. Os mais afetados referem-se a pacientes que não querem receber tratamento HAART (Terapia antiretroviral de alta potência), ou não aderem a essa terapêutica, ou no caso de falência do esquema antiretroviral (GONZALO et al., 2009).

O gênero *Cryptococcus* compreende espécies com presença de cápsula polissacarídica e metabolismo não fermentador, produtores de urease e assimiladores de inositol e D-glucuronato. Inclui-se pelo menos 38 espécies já identificadas dentro desse gênero, mas as únicas espécies de interesse médico como agentes da criptococose são *C. neoformans* e *C. gatti* (KWON-CHUNG et al., 2002; CASADEVALL e PERFECT, 1998; MITCHEL e PERFECT, 1995). *Cryptococcus* é separado em cinco sorotipos (A, B, C, D e AD) de acordo com diferenças na caracterização antigênica (CHERNIAK e SUNDSTROM, 1994; BHARTTACHARJEE et al., 1984; IKEDA et al., 1982). Os estudos de caracterização antigênica, iniciados por Benham em 1935, foram também de grande importância para o reconhecimento de diferentes sorotipos, tornando-se uma importante ferramenta em trabalhos epidemiológicos (RIBEIRO & NGAMSKULRUNGROJ, 2008; NISHIKAWA et al., 2003; KWON-CHUNG e BENNETT, 1984).

Cryptococcus neoformans atualmente é subdividido em duas variedades: variedade *neoformans* (sorotipo D) e, variedade *grubii* (sorotipo A). Vanbreuseghem e Takashio em 1970 propuseram o nome de mais uma variedade, *C. neoformans* var. *gattii* quando células alongadas atípicas foram observadas em líquido céfalo-raquidiano de um menino africano com meningite

(SORRELL, 2001). Mas, Boekhout et al., (2001), em estudos de genotipagem por AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), verificaram uma clara distinção entre as variedades *neoformans/grubii* e a *gattii* propondo a existência de duas espécies distintas: *C. neoformans* com as variedades *neoformans* e *grubii* e *Cryptococcus gattii* (sorotipos B e C) (KWON-CHUNG et al., 2002).

Análises epidemiológicas revelaram que a maioria dos pacientes são homens entre 30-39 anos e mais de 90% são HIV positivos. A prevalência no quadro mundial é do sorotipo A, seguido pelo sorotipo B (PERÉZ et al., 2008; NISHIKAWA et al., 2003). No Brasil, os dados estão de acordo com a literatura mundial, com exceção da região nordeste, que apresenta prevalência do sorotipo B (TRILLES et al., 2008; SANTOS et al., 2008; LEAL et al., 2008; MATSUMOTO et al., 2007; ABBEG et al., 2006; BARONI et al., 2006). *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (sorotipo D), que é predominante em climas temperados pode então ser encontrado com mais frequência em determinadas regiões do Brasil e do mundo (MATSUMOTO et al., 2007; VIDOTTO et al., 2006).

A epidemiologia da criptococose permanece mal compreendida, principalmente com relação à fonte de infecção e, aos casos de recorrência. Acredita-se que a maior parte destes episódios ocorre pela persistência do isolado infectante original, embora não se saiba que proporção pode ser causada por um novo isolado. Uma melhor compreensão destes casos beneficiaria as estratégias de prevenção da criptococose.

A tipagem molecular é potencialmente útil em esclarecer casos de recidivas por persistência da cepa ou reinfecção por uma nova cepa, demonstrando os graus de relação entre os isolados no início e em infecções posteriores de um mesmo paciente. Vários métodos de tipagem molecular vêm sendo utilizados em análise epidemiológica de *C. neoformans/gattii*, como por exemplo, cariotipagem, PCR-*fingerprinting*, RAPD, RFLP e AFLP (LEAL et al., 2008; FENG et al., 2008b; TRILLES et al., 2008; MATSUMOTO et al., 2007; DELGADO et al., 2005; BARRETO DE OLIVEIRA et al., 2004; IGREJA et al., 2004; CASALI et al., 2003; MEYER et al., 2003; TRILLES et al., 2003; BOEKHOUT et al., 2001; CALVO et al., 2001; GARCIA-HERMOSO et al., 1999; BOEKHOUT et al., 1997; BRANDT et al., 1996). As técnicas de PCR *fingerprinting* com iniciadores mini (M13) ou microsátelite (GACA)₄ específicos

e RFLP dos genes CAP1, GEF1 PLB1 e URA5 vem sendo utilizados em levantamentos globais, dividindo os isolados em oito tipos moleculares principais, denominados VNI e VNII (*C. neoformans* var. *grubii*, sorotipo A), VNIII (*C. neoformans*, sorotipo AD), VNIV (*C. neoformans* var. *neoformans*, sorotipo D) e VGI a VGIV (*C. gattii*, sorotipos B e C) (FENG et al., 2008a; FENG et al., 2008b; RIBEIRO & NGAMSKULRUNGROJ, 2008; MATSUMOTO et al., 2007; LATOUCHE et al., 2003; MEYER et al., 2003; MEYER et al., 1999). Vários estudos têm verificado uma predominância do tipo molecular VNI tanto em isolados ambientais quanto em clínicos (RIBEIRO & NGAMSKULRUNGROJ, 2008; MEYER et al., 2003; CASALI et al., 2003).

No Brasil, 124 isolados (105 clínicos e 19 ambientais) da região sul foram estudados quanto à morfologia, bioquímica, tipos moleculares e sorotipos. A maioria dos isolados clínicos e ambientais pertencia a *C. neoformans* var. *grubii* sorotipo A (89,5 e 52,6%, respectivamente) e foram classificados como mating type α (98,1 e 94,7%, respectivamente). A tipagem molecular com os iniciadores minissatélites M13 e microssatélite (GACA)₄ agrupou a maioria dos isolados no grupo VNI, concordando com dados anteriores em que foi estabelecido que a maioria dos isolados de *C. neoformans* pertencia a este grupo (CASALI et al., 2003). Ainda no sul, 38 isolados ambientais foram tipados pelas técnicas de PCR-fingerprinting (M13 e (GACA)₄) e cariotipagem eletroforética. Trinta e três dos 38 isolados foram identificados como VNI (*C. neoformans* var. *grubii*) e os cinco restantes como VGI (*C. gattii*) (ABEGG et al., 2006). Trilles et al., em 2008, verificaram os tipos moleculares por PCR-fingerprinting de 443 isolados brasileiros de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* para determinar sua distribuição geográfica no Brasil e suas condições subjacentes. O tipo molecular mais encontrado no Brasil foi VNI (64%), seguido por VGII (21%), VNII (5%), VGIII (4%), VGI e VNIV (3% cada), e VNIII (<1%).

A criptococose causada pelo tipo molecular VGII (sorotipo B) prevalece em imunocompetentes no Norte e Nordeste, revelando um padrão endêmico regional específico para este tipo molecular no Norte do Brasil. A presença de *Cryptococcus gattii* (VGII) no estado do Pará, norte do Brasil, foi relatada, assim como outros genótipos, em 56 isolados de *Cryptococcus* spp. (54 isolados de fluido espinhal cerebral e duas culturas de sangue) de 43 casos

diagnosticados entre 2003-2007. As seguintes espécies e genótipos foram identificados: *Cryptococcus neoformans* VNI (28/56, 50%), *Cryptococcus gattii* VGII (25/56, 44,64%) e *C. gattii* VGI (3/56, 5,26%) (SANTOS et al., 2008). O aparecimento de *Cryptococcus gattii* (sorotipos B e C), em regiões tropicais, subtropicais, bem como mais recentemente em temperadas e de climas secos, pode ter ocorrido devido às mudanças das condições climáticas ou de utilização dos solos e/ou susceptibilidade do hospedeiro. O longo prazo das alterações climáticas, tais como a significativa elevação da temperatura global nos últimos 100 anos, a influência dos padrões de doença entre as plantas e os animais podem criar nichos em climas diferentes dos habitáveis anteriormente por patógenos emergentes (DATTA et al., 2009).

A estrutura genética de *C. neoformans* é bastante complexa e o emprego de novos iniciadores, bem como, outras técnicas moleculares são importantes e necessárias para elucidar sua epidemiologia. A meningite criptocócica ainda é problemática em pacientes imunossuprimidos, principalmente em HIV positivos.

As infecções por leveduras têm-se destacado pelo aumento de casos (CAREY et al., 2008; PASQUALOTTO et al, 2006; SWOBODA et al, 2003). O tratamento dos pacientes com AIDS com a terapia antiretroviral provocou uma queda nas taxas de incidência de criptococose, no entanto, a doença pode se manifestar mesmo durante este tratamento e o prognóstico continua a ser desfavorável (DROMER et al., 2007; FRIEDMAN et al., 2005; DROMER et al., 2004). O prognóstico dessas infecções é limitado pela eficácia reduzida dos fármacos atualmente disponíveis, pelo desenvolvimento de resistência e também pela falta de testes diagnósticos rápidos e específicos (MÉAN et al, 2008; SHAO et al., 2007; SANGLARD, 2002; KONTOYIANNIS e LEWIS, 2002).

O crescimento dessas infecções tem gerado problemas não apenas ao diagnóstico, mas também na terapêutica. A disponibilidade de antifúngicos na prática médica é relativamente pequena, algumas vezes ineficiente e a maioria com certa toxicidade. Juntamente com o crescimento dessas infecções, o problema da resistência microbiana também sofreu um aumento acentuado (TING & WALKER, 2008; SCORZONI et al., 2007b; GIROIS et al., 2006).

Apesar do declínio da criptococose, a taxa de letalidade continua consideravelmente alta, em torno de 15 a 30% (CHARLIER et al., 2008;

JARVIS et al., 2008; DROMER et al., 2007) e a resistência do gênero *Cryptococcus* sp aos antifúngicos pode também ocorrer (PFALLER et al., 2008; PERFECT et al., 1999; ALLER et al., 2000; REX et al., 2001). O mercado farmacêutico possui um número limitado de fármacos antifúngicos, o que faz o tratamento contra infecções causadas por leveduras do gênero *Cryptococcus* ser ainda mais difícil. Dentre os cinco grupos de fármacos disponíveis (polienos, fluoropirimidinas, azóis, equinocandinas e alilaminas), a anfotericina B, pertencente à classe dos polienos, é a primeira escolha no tratamento dessa micose. Este polieno é usado em doses iniciais de ataque, como terapia primária, seguido de manutenção com fluconazol por tempos prolongados, podendo gerar cepas resistentes aos antifúngicos de uso clínico, o que é atualmente um problema de difícil solução, emergente nos últimos anos (SLOAN et al., 2008; DORNEANU et al., 2008; JARVIS et al., 2008; PFALLER et al., 2008). A anfotericina B pode ser administrada em associação com 5-flucitosina (5-FC), o que tem demonstrado uma diminuição de 30% de casos de falha na terapêutica quando comparado com outros tratamentos (DROMER et al., 2008). Mas esta possibilidade não existe no Brasil, pois a 5-FC não está mais disponível e por outro lado, tem-se encontrado principalmente no Rio de Janeiro, isolados resistentes a este antifúngico em percentual bastante acentuado (MATSUMOTO et al., 2007). Por outro lado, altas taxas de persistência e freqüentes recidivas da doença têm causado uma grande preocupação, uma vez que as classes de drogas antifúngicas disponíveis no mercado possuem sérias desvantagens, como o baixo espectro de ação, o custo elevado e a não seletividade ao fungo. Isso pode gerar sérios riscos ao hospedeiro, tornando-se tóxicas, ocasionando efeitos adversos como a hepatotoxicidade, nefrotoxicidade e fototoxicidade, além de muitas dessas drogas serem fungistáticas e não fungicidas (GUERRERO, et al., 2008; JOHNSON et al, 2008; SILVA et al., 2008; CHEN & SORRELL; 2007; REX et al., 2001; BECK-SAGUE e JARVIS 1993).

Anfotericina B age no ergosterol, principal esterol da membrana celular fúngica, causando um desequilíbrio osmótico, resultando em uma perda de sais e outros metabólitos, fundamentais para a sobrevivência da célula, levando a sua morte (CHEN & SORRELL; 2007; BAGINSKI et al., 2006; CARRILLO-MUÑOZ et al., 2006; ELLIS et al., 2002; TERRELL e HUGHES, 1992). Esta

substância está associada a vários efeitos tóxicos e requer administração intravenosa (KAJI et al., 2008; GOODWIN et al., 1995). Além disso, o ponto de corte para esta droga ainda não foi estabelecido, mas alguns estudos têm considerado o ponto de corte de 2µg/mL como o de isolados resistentes (PFALLER et al., 2005; NGUYEN e YU, 1998; LOZANO-CHIU et al., 1998). A resistência a anfotericina B pode ser mediada pelo aumento da atividade da catalase ou defeitos na biossíntese de ergosterol (PEMÁN et al., 2009). Pfaller et al. em 2005, analisaram 1811 isolados clínicos provenientes de cinco regiões globais no período de 1990 a 2004 e verificaram que menos de 1% dos isolados, foram resistentes a fluconazol (64µg/mL) e anfotericina B (2µg/mL). Johnson et al., em 2008, avaliaram 1763 isolados clínicos de pacientes em 28 países dos seis continentes e verificaram CIMs entre 0,125-2µg/mL em sua maioria. Quatro isolados excederam o CIM de 2µg/mL. Um quarto dos pacientes que excederam o CIM de 1µg/mL também foram resistentes a um ou mais triazólicos. Assim, poucos trabalhos têm demonstrado aumento de CIM e a maioria tem mostrado valores abaixo de 1µg/mL (PFALLER et al., 2006 e BRANDT et al., 2001). Neste último somente 0,6% dos isolados apresentaram MIC de 2µg/mL. Mais recentemente, Pappalardo, 2009, verificou que 41 isolados de *C. neoformans* foram sensíveis a AMB, com CIM variando de 0,25 a 1µg/mL.

A flucitosina inibe a síntese protéica fúngica, e também interfere na síntese do seu DNA; é limitada pela sua toxicidade na medula óssea e elevada taxa de mutação espontânea levando a resistência microbiana (PALUSZYNSKI et al., 2008; ANDES e OGTRÓ, 2000; BENNETT, 1977).

Os azóis são uma classe de antifúngicos que inibe a biossíntese do ergosterol que é o principal esterol presente na membrana da célula fúngica (LÓRÁND et al., 2007; VERMITSKY et al., 2006; BERG et al., 1998). O fluconazol é o representante mais utilizado para o tratamento de várias infecções fúngicas, por ser uma opção valiosa resultando em altos níveis sanguíneos, rápido equilíbrio sérico e boa penetração tecidual, além do custo-benefício ser bom, mas seu uso generalizado tem demonstrado uma resistência emergente entre os isolados de *C. neoformans* na Ásia-Pacífico, África/Oriente Médio, na América Latina e regiões próximas (KANTARCIOGLU et al., 2008; CARRILLO-MUÑOZ et al., 2008; BII et al., 2007; BICANIC et al.,

2006). Tumbarello e colaboradores em 1997 isolaram *Candida* spp de pacientes infectados pelo vírus HIV, e verificaram que 43% dos pacientes com candidíase oral foram resistentes ao fluconazol. Segundo a análise multivariada, o único fator de risco independente que influenciou o desenvolvimento dessa resistência foi que os pacientes tiveram mais de cinco episódios de candidíase oral em relação ao ano anterior e a terapêutica foi a mesma em todas as reincidências: fluconazol por 6 meses. Rautemaa et al., em 2008, também verificaram um decréscimo na sensibilidade do fluconazol em isolados clínicos de *Candida albicans* devido ao longo tempo no tratamento com os azólicos. A resistência de *C. neoformans* aos azóis foi inicialmente observada por Petermans et al. (1993), em que descreveram um caso de meningite por *C. neoformans* var. *gattii* em paciente com AIDS, procedente de área rural do Zâmbia, que apresentou resposta clínica e micológica baixa ao tratamento com fluconazol (FCZ). O fungo foi isolado do líquido cefalorraquiano (LCR) e resultou ser sensível a anfotericina-B (AMB) e resistente ao FCZ. A resistência ao FCZ foi comprovada por testes de difusão e diluição em caldo. Silva et al, em 2008, estudaram isolados de *Cryptococcus neoformans* de 35 pacientes do hospital da Universidade Federal do Triângulo Mineiro e verificaram que dois isolados eram resistentes a itraconazol e dois resistentes a AMB. Bii et al, 2007, estudaram 80 isolados clínicos de *Cryptococcus neoformans* e verificaram que 21% dos isolados eram resistentes a 5-FC. Apenas 23,8% dos isolados foram sensíveis ao fluconazol, 65% sensível dose-dependente (SDD) e 11.2% resistentes. Trabalhos realizados com espécies de leveduras têm mostrado que vários mecanismos podem estar envolvidos com tal resistência, incluindo a redução no acúmulo de antifúngicos azólicos por células fúngicas, associado com a expressão aumentada de genes que codificam proteínas de efluxo de drogas, superprodução de enzimas, a implementação de vias metabólicas alternativas e/ou alterações na molécula alvo (CANNON et al., 2009; ESPINEL-INGROFF, 2008; MONK et al., 2008; FERREIRA et al., 2005; GOLDMAN et al., 2004; WHITE et al., 1998; SANGULARD et al., 1997; MARICHAL et al., 1995).

Outros exemplos de substâncias pertencentes à classe dos azóis são itraconazol, voriconazol, posaconazol, isavuconazol, ravuconazol e albaconazol, mas nenhum deles oferece uma nova classe de antifúngicos, ou

um mecanismo diferente de ação, o que é necessário para melhorar o espectro de atividade; além de os últimos poderem causar interações medicamentosas com os outros azóis já existentes (ZONIOS e BENNETT, 2008; CHEN e SORRELL, 2007).

A sensibilidade aos antifúngicos pode ser determinada por métodos preconizados de referência, por metodologias não comerciais ou por testes comerciais. O número disponível destes testes, bem como o de laboratórios que implantaram esta metodologia tem crescido bastante, o que sem dúvida contribui para a seleção da melhor terapêutica baseada em dados de correlação clínico-laboratorial. A disponibilidade de métodos de referência recomendados pelo CLSI (*Clinical Laboratory Standards Institute*) e pelo EUCAST (*European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing*) foram iniciativas importantes para homogeneizar os procedimentos laboratoriais, aumentando a reprodutibilidade interlaboratorial (PFALLER et al., 2008; ALEXANDER et al., 2007; CHATURVEDI, 2004).

O CLSI desenvolveu o método de macrodiluição em caldo (M27A) para *Candida spp* e *Cryptococcus neoformans* constituindo-se no padrão-ouro para o desenvolvimento de outros métodos (CLSI, 1992). Posteriormente, o método de microdiluição em caldo foi preconizado e seus resultados foram bastante concordantes (CLSI-M27A2, 2002). Estes testes consomem tempo, exigem trabalho laboratorial intenso e, portanto não eliminam a necessidade de se procurar métodos mais simples e econômicos para os testes de rotina.

Por outro lado, há ainda vários fatores que podem influenciar nos seus resultados, como o fenômeno de *trailing*, a dificuldade de se detectar cepas resistentes a anfotericina B e o crescimento escasso de alguns microrganismos no meio proposto (PFALLER et al., 2008; JOHNSON, 2008; LIU et al., 2007; VALLE-SILVA et al., 2006; REX et al., 2001). Assim, têm-se estudado várias alternativas para minimizar esses problemas, como outros meios de cultura para anfotericina B, suplementação de glicose ao meio, determinação espectrofotométrica, incubação de 24 ou 48 horas com agitação, aumento do tamanho do inóculo (GOMEZ-LOPEZ et al., 2005; CHATURVEDI et al., 2004; ARTHINGTON-SKAGGS et al., 2002; EUCAST, 2002; TE DORSTHORST et al., 2002; CUENCA-ESTRELLA et al., 2001; REX et al., 2001; RODRÍGUEZ-TUDELA et al., 2000). Estes métodos denominados CLSI-like têm uma

correlação elevada com o do CLSI. O método M27A2 já incorporou algumas destas alterações e, além disso, a avaliação de novas drogas antifúngicas tem merecido estudos adicionais (ABE et al., 2008; PFALLER et al., 2008; PINA-VAZ et al., 2005; CHATURVEDI et al., 2004; CLSI, 2002). Pappalardo et al., 2009 empregaram curvas de morte no estudo da sensibilidade a anfotericina B e chamaram atenção da tolerância ao antifúngico e do uso de métodos de sensibilidade que não descrevem o crescimento adicional de *C. neoformans* em contato com a droga.

Citometria de fluxo (CF) foi descrita como um instrumento excelente para o estudo da sensibilidade de diferentes microrganismos, incluindo os fungos (PIETSCHMANN et al., 2008; SUNG & LEE, 2008; SUNG et al., 2008; WADHWA et al., 2008; RUDENSKY et al., 2005; CHATURVEDI et al., 2004; RAMANI et al., 2001; PINA-VAZ, et al., 2001). Estudos recentes têm mostrado que esta técnica pode superar algumas limitações dos métodos convencionais, não necessitando de longos períodos de incubação como na microdiluição. Esta metodologia permite a determinação da sensibilidade e pode fornecer informações adicionais a respeito dos mecanismos de ação e de resistência a drogas (CHATURVEDI et al., 2004; PINA-VAZ, et al. 2004, 2001 e 2000b).

Métodos adaptados para estudar a sensibilidade de antifúngicos, por citometria, indicam uma boa correspondência com o método preconizado inicialmente pelo CLSI. Os resultados revelaram que a correlação interlaboratorial entre a microdiluição em caldo (M27A2) e o método de citometria de fluxo foram essencialmente os mesmos. Entretanto, alguns isolados mostraram diferenças devido ao fenômeno do *trailing* sendo que o método de Citometria de fluxo foi de leitura mais fácil. Por ser um método mais rápido e sensível para determinação da sensibilidade, a citometria passa a ter grande vantagem em relação aos métodos anteriormente descritos. (CHATURVEDI, 2004; RAMANI et al., 2003, e 2001; LEE & KWAK, 1999; PEYRON et al., 1997; RAMANI et al., 1997; WENISCH, et al. 1997 e 2001; ORDONEZ e WEHMAN, 1995; GREEN, et al. 1994; PORE, 1994).

Muitos estudos têm relatado métodos de citometria de fluxo para obter resultados rápidos de sensibilidade para o gênero *Candida* e algumas leveduras (RUDENSKY et al., 2008 e 2005; ARIKAN et al., 2007; VALE-SILVA et al., 2006; PINA-VAZ et al., 2005, 2001 e 2000a; CHATURVEDI et al., 2004;

RAMANI et al., 2003, 2001 e 1997; KIRK et al., 1997; ORDONEZ e WEHMAN, 1995; GREEN et al., 1994; PORE et al., 1994 e 1997). Estes métodos avaliam os efeitos das alterações ocorridas na membrana do fungo, devido à ação dos compostos antifúngicos, bem como a mudança na atividade metabólica devido a danos na membrana, ou a absorção de corante vinculado ao DNA em células da levedura.

Durante as últimas duas décadas, a citometria de fluxo tem provado ser uma poderosa ferramenta de investigação, por exemplo, para estudar o efeito de diferentes compostos em microrganismos (DAVEY & KELL, 1996; LAERUM & FARSUND, 1981). Corantes fluorescentes foram utilizados para o estudo de células e interações medicamentosas (KIRK et al., 1997; GREEN et al., 1994). A medição das alterações na viabilidade da célula fúngica pode ser realizada com grande precisão usando várias sondas fluorescentes que têm afinidades específicas celulares (LIAO et al., 1999). Utilizando sondas diferentes, é possível apreciar as mudanças pré-letais, quer a partir de um metabólico ou do ponto de vista morfológico, o que pode predizer o padrão de suscetibilidade aos antifúngicos.

Um método de sensibilidade por citometria de fluxo foi desenvolvido inicialmente por Ramani e colaboradores em 1997 para *C. albicans*, com incubação de 2 h para anfotericina B e 4 h para fluconazol. Mudanças causadas na permeabilidade da membrana pelos agentes antifúngicos foram medidas por CF utilizando iodeto de propídio (PI), um fluorocromo que cora os ácidos nucléicos da célula lesada ou morta; sendo largamente excluído pela membrana celular intacta. Comparando as metodologias de citometria de fluxo e microdiluição em caldo (CLSI M27-A) concluíram que há uma boa correlação entre os métodos, propondo o uso da citometria de fluxo. Um ensaio adaptado para citometria, para estudar a sensibilidade de *Candida* spp. foi também proposto por Chaturvedi e colaboradores em 2004, mostrando uma boa correlação com o método do CLSI. Em 2005, Pina-Vaz e colaboradores padronizaram a metodologia para voriconazol, itraconazol e caspofungina contra *Candida* spp e *Cryptococcus neoformans* utilizando como sondas o PI e o FUN-1. Em conclusão, os pesquisadores provaram que a análise por FUN-1 e PI é uma excelente ferramenta para estudar a sensibilidade por citometria de fluxo para estes três fármacos.

Apesar de a indústria farmacêutica ter investido e lançado novos antifúngicos nas três últimas décadas, as formas de resistência a essas drogas por microrganismos têm aumentado (CANNON et al., 2009; GOMEZ-LOPEZ et al.; 2008; NORDOY e GAUSTAD, 2008; SILVA et al., 2008). Desta forma se faz necessário caracterizar novos alvos nos fungos e desenhar novas drogas podendo oferecer além de viabilidade sócio-econômica 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 et al., 2008; AGARWAL et al., 2008; ODDS et al., 2005). As plantas medicinais são conhecidas fontes naturais para o tratamento de várias doenças desde a antiguidade. Cerca de 20.000 espécies de plantas usadas para fins medicinais são relatados pela OMS (MAREGESI et al., 2008; GULLECE et al., 2006). De acordo com a Organização Mundial da Saúde, plantas medicinais seriam ótimas fontes para obtenção de uma imensa variedade de fármacos (CRUZ et al., 2007; NASCIMENTO, et al., 2000). A busca por novos agentes antifúngicos a partir de plantas pode viabilizar o tratamento das principais micoses, diminuindo as reações adversas. Algumas espécies vegetais podem apresentar componentes medicinais e algumas vezes com atividade antifúngica, podendo variar entre famílias e espécies. Acredita-se que esta alternativa, bem mais econômica, possa beneficiar grande parte da população mundial que usa plantas como primeiro recurso terapêutico, além de serem as melhores fontes para obtenção de uma variedade de novos fármacos (SCORZONI et al., 2007b; ROJAS et al., 2006; HOLETZ et al., 2002; NASCIMENTO et al., 2000).

A grande extensão territorial brasileira permite uma ampla biodiversidade por possuir diferentes tipos de clima e solo, o que favorece o desenvolvimento da exploração racional e sustentável de novos metabólitos de valor terapêutico. Determinadas áreas como a floresta Amazônica, Atlântica, o Cerrado brasileiro e a Caatinga são ricas em espécies que podem fornecer uma variedade de compostos naturais ativos para curar ou minimizar os efeitos de diversas doenças (E SILVA et al., 2009; HARVEY, 2007; ROLLINGER et al., 2006; BASSO et al., 2005). Estas têm contribuído significativamente para o fortalecimento da indústria farmacêutica, através do isolamento de substâncias bioativas, cuja complexidade de muitas estruturas químicas inviabilizaria

técnica e economicamente a síntese orgânica de tais substâncias (MAREGUESI et al., 2008; ROJAS et al., 2006; HOLETZ et al., 2002; MACIEL et al., 2002; YUNES et al., 2001).

Os testes para determinação da atividade antifúngica de produtos naturais, especialmente extratos de plantas apresentam muitos desafios. Na última década, foram relatadas várias propriedades biológicas, bem como os efeitos no mecanismo de ação de extratos ou óleos essenciais de plantas, anteriormente desconhecidas na sua grande maioria. Pina-Vaz e colaboradores, em 2004, estudando a atividade antifúngica de óleos de *Thymus* e de seus principais compostos isolados contra as espécies de *Candida*, determinaram as CIMs por microdiluição e utilizaram uma adaptação do emprego das técnicas de CF para determinar o seu mecanismo de ação. Pinto e colaboradores, em 2006, verificaram por citometria de fluxo que o óleo essencial de *Thymus pulegioides* age por lesão primária da membrana de *Candida* spp, *Aspergillus* spp e algumas espécies de dermatófitos. A integridade das células fúngicas foi analisada utilizando PI como marcador fluorescente. De acordo com os dados publicados, o potencial antifúngico de extratos ou óleos essenciais de plantas é promissores para a busca de compostos bioativos contra leveduras oportunistas, e por outro lado, procurar métodos mais adequados de determinação da sensibilidade aos antifúngicos.

2. JUSTIFICATIVA

Como se pode depreender do apresentado acima, há vários desafios a serem vencidos. A detecção de cepas resistentes a anfotericina B passou a ser um grande problema em micologia clínica, pois os métodos de referência não discriminam entre cepas sensíveis e resistentes. Assim, a procura por metodologia que possa diferenciá-las seria de grande valia. A metodologia por citometria de fluxo pode suprir esta necessidade e diferenciar os pontos de corte entre cepas sensível e resistente contra esse fármaco. Por outro lado, o uso de plantas medicinais é uma das ferramentas atuais para aumentarmos o repertório de compostos com possível atividade antifúngica. Assim, a determinação da concentração inibitória mínima de anfotericina B e de extratos de plantas por citometria de fluxo comparada com o método de referência é o objetivo deste estudo. Por outro lado, realizar a tipagem de isolados por métodos moleculares de alto poder discriminatório, a fim de correlacionar os perfis de sensibilidade com o tipo molecular.

3. OBJETIVOS

- Padronizar uma metodologia de antifungigrama para anfotericina B por citometria de fluxo para *Cryptococcus* sp;
- Realizar o estudo da atividade antifúngica de extratos e substâncias de plantas por meio de técnicas adaptadas e padronizadas pelo CLSI e por citometria de fluxo para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) para anfotericina B contra a levedura *Cryptococcus neoformans*;
- Realizar a tipagem molecular dos isolados de *Cryptococcus* sp por RFLP do gene URA5.

4. METODOLOGIA

4.1. Seleção dos isolados e condições de cultivo

Para a realização dos testes foram empregados 151 isolados de *C. neoformans*, sendo 105 do estado do Rio de Janeiro e 46 da cidade de São José do Rio Preto que foram previamente identificados no Laboratório Diagnóstico da América e na Faculdade Regional de Medicina de São José do Rio Preto, respectivamente. Todos os isolados foram reidentificados e selecionados os resistentes ou sensíveis dose-dependentes previamente testados quanto a sua sensibilidade segundo o método preconizado pelo CLSI de 2002 (MATSUMOTO et al., 2007; VIVALDINI, 2003), no laboratório da disciplina de Micologia Clínica do Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP Campus Araraquara-SP. As leveduras foram cultivadas em agar Sabouraud sem a adição de cloranfenicol, incubadas a temperatura ambiente por 48 horas.

4.2. Cepas de referência

Foram utilizadas neste trabalho, as seguintes cepas de referência: WM148 (VNI - sorotipo A), WM626 (VNII - sorotipo A), WM628 (VNIII - sorotipo AD), WM629 (VNIV - sorotipo D), WM179 (VGI - sorotipo B), WM178 (VGII - sorotipo B), WM161 (VGIII - sorotipo B), WM779 (VGIV - sorotipo C) (MEYER et al., 2003)

4.3. Avaliação da atividade antifúngica em plantas

Os testes de sensibilidade foram realizados de acordo com o documento M27-A2 (2002) do CLSI com adição de glicose (RODRIGUEZ-TUDELA et al., 1996 e 2000) e modificações para o teste com extratos (SCORZONI et AL., 2007a). O meio de cultura utilizado para a realização dos testes de sensibilidade e diluição das drogas sintéticas foi 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 dos inóculos foi ajustada em câmara de Neubauer até se obter uma concentração na ordem de $1,0 \times 10^6$ a $5,0 \times 10^6$ UFC/mL. Posteriormente, os inóculos foram diluídos 1:100, em meio RPMI 1640, para obtenção de uma concentração final da suspensão fúngica de

$1,0 \times 10^4$ a $5,0 \times 10^4$ UFC/mL. Foram utilizadas como padrões sintéticos duas drogas antifúngicas a anfotericina B e fluconazol como controle do teste. A faixa de concentração foi de 32 a $0,0625 \mu\text{g/mL}$ para fluconazol e de 16 a $0,0321 \mu\text{g/mL}$ para anfotericina B. Foram realizadas leituras visuais após 48 horas de incubação. Foi utilizada como controle dos testes uma cepa padrão ATCC 90012 de *C. neoformans*. A concentração inibitória mínima é considerada a menor em que se observou a inibição do crescimento fúngico. Os extratos que apresentaram uma CIM menor que $75 \mu\text{g/mL}$, a atividade antifúngica foi considerada forte, entre 75 a $150 \mu\text{g/mL}$ possuem atividade antifúngica moderada, entre 150 a $250 \mu\text{g/mL}$, fraca e maior que $250 \mu\text{g/mL}$ inativo (SCORZONI et al., 2007b).

4.4. Preparo das substâncias vegetais

Foram empregados 57 extratos brutos, 52 frações e 53 substâncias puras de fontes naturais isoladas do Cerrado e Mata Atlântica obtidas por meio do projeto Biota-FAPESP coordenado pela Profa. Dra. Vanderlan da Silva Bolzani e Bioprospecta-FAPESP coordenado pela Profa. Dra. Dulce Helena Siqueira Silva do Instituto de Química da UNESP-Araraquara. Estes foram diluídos assépticamente em 1mL de dimetilsulfóxido e solubilizados com o auxílio do vórtex. Foram realizados cálculos para determinação da quantidade de cada substância a ser aplicada, para que a concentração inicial na placa de microdiluição fosse $250 \mu\text{g/mL}$.

4.5. Concentração fungicida mínima (CFM)

Após o tempo de incubação, uma alíquota 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 , foi verificado o crescimento ou não de colônias e as respectivas concentrações.

4.6. Seleção dos extratos

Para a análise da sensibilidade por citometria de fluxo das leveduras foram selecionados extratos que apresentaram atividade antifúngica com CIM menor que $15,6 \mu\text{g/mL}$ para *C. neoformans*.

4.7. Análise por Citômetro de Fluxo

Para a análise foi necessário um cultivo de 48h de *C. neoformans* em agar Sabouraud, pelo qual foi preparado um inóculo 10^6 cel/mL em RPMI-1640 com L-glutamina sem bicarbonato de sódio e acrescido de 2% de glicose, tamponado com MOPS 0,165M, pH 7,0. Para a diluição da droga sintética foi utilizado o mesmo meio de cultura, conforme o documento M27A2 do CLSI, 2002. As células foram incubadas com cada agente antifúngico (inicialmente, com drogas sintéticas e posteriormente, com extratos vegetais) sob agitação (200rpm) a 35°C por 4h. Após o tratamento antifúngico, as células foram centrifugadas e lavadas três vezes em tampão HEPES suplementado com glicose a 2% (pH 7,2). Para a marcação com PI, as células foram suspensas em desoxicolato de sódio 0,125%, adicionando de 1µg de PI/mL (Iodeto de propídio, Sigma, St. Louis, MO) no escuro, por 10 minutos. O controle PI-positivo foi realizado com leveduras tratadas com etanol 70% por 1h em temperatura ambiente. Células não tratadas foram utilizadas como controle PI-negativas. Após a marcação, 10.000 células foram analisadas em cada amostra adquirida em BD FACSCanto e analisadas através do software FACSDIVA para aquisição de dados e análise. O volume de amostra foi de 100µl. Na aquisição das amostras dos dois grupos em estudo, utilizou-se um painel de duas cores: PE (Ficoeritrina) (585nm) e Per-CP para PI. Os parâmetros foram obtidos em função das células vivas e mortas. Baseado no controle de células vivas, um *gate* foi criado, excluindo possíveis agregados celulares e detritos.

4.8. Extração do DNA genômico de *C. neoformans*

As culturas para extração de DNA foram realizadas a partir de uma colônia semeada em ágar Sabouraud acrescido de 0,25g/L de cloranfenicol a 30°C durante 48 horas e em seguida em caldo YEPD acrescido de 2,9% de NaCl (10g/L de extrato de levedura, 20g/L de peptona, 20g/L de dextrose e 29g/L de NaCl) a 30°C por 16 horas ou *overnight* sob agitação constante (100rpm). As culturas foram transferidas para tubos de 50 mL e a extração foi realizada segundo MOLLER et al., 1992. A quantificação de DNA foi realizada em espectrofotômetro em comprimento de onda de 260nm. (SAMBROOK et al., 1989) e estocada a -20°C. A pureza foi determinada em espectrofotômetro em comprimento de onda de 260nm e 280nm e analisada por eletroforese em

gel de agarose a 1% em tampão TBE 1X (Tris-base 90mM, ácido bórico 90 mM, EDTA 2 mM pH 8,0) durante 1 hora e 30 minutos a 80 volts. O gel foi corado pelo brometo de etídio e observado em luz ultravioleta.

4.9. PCR-RFLP: Gene URA5

Foram utilizados os iniciadores para o gene URA 5: ura5f (5' ATGTCCTCCCAAGCCCTCGACTCCG 3') e ura5r (5'TTAAGACCTCTGAACACCGTACTC 3') (MEYER et al., 2003). As concentrações foram de 50 pmol de cada seqüência iniciadora e 25ng de DNA genômico num tubo contendo uma mistura de dNTP (0.2mM), tampão (2,0mM MgCl₂, 50mM KCl, 20mM(NH₄)₂SO₄, Tris-HCl 75mM pH 9,0) e DNA polimerase termoestável (Biotools). A quantidade final na reação de amplificação foi de 50µL sendo utilizada água Milli-Q estéril. A amplificação foi realizada através de um ciclo inicial com temperatura de desnaturação de 94°C/3minutos, seguido de 35 ciclos de 94°C/45segundos, 61°C/1 minuto, 72°C/2minuto e um ciclo final a 72°C/10 minutos, utilizando-se aparelho termociclador Perkin Elmer modelo GeneAmp PCR System 9700. O produto amplificado foi digerido com enzima de restrição Cfr13 e HhaI por 3 horas ou overnight e os produtos, separados por eletroforese em gel de agarose a 3% em tampão TBE 1x durante 5 horas e 30 minutos a 100 volts, corados com brometo de etídio e observados à luz ultravioleta.

5. RESULTADOS

5.1. Realização da tipagem molecular dos isolados de *Cryptococcus* sp por RFLP do gene URA5

5.1.1. Seleção dos isolados

Foram estudados 151 isolados de pacientes com doença associada ou não a AIDS, de dois Estados (105 do Rio de Janeiro e 46 da cidade de São José do Rio Preto, estado de São Paulo) que tiveram episódios de infecção durante o período de 1993 a 2001. Os dados dos isolados sobre gênero, espécie e variedade estão resumidos nas tabelas 1 e 2 (em anexo) e foram obtidos segundo MATSUMOTO et al., 2007 e VIVALDINI, 2003. De acordo com a tabela 1, 103 isolados de *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* e dois isolados de *Cryptococcus gattii* foram obtidos de 59 pacientes. Dos 105 casos do Rio de Janeiro, 80 deles tinham como doença base a AIDS, quatro o Lúpus eritematoso sistêmico, um caso de linfoma, um de transplante renal, e, 19 não tiveram relatado as doenças de base. De acordo com a tabela 2 foram obtidos 46 isolados de 18 pacientes da cidade de São José do Rio Preto, sendo 14 deles *Cryptococcus gattii* e 32 *Cryptococcus neoformans* e todos eram soro regentes (SR) para HIV.

5.1.2. PCR-RFLP do gene URA5

Os iniciadores *ura5f* (5' ATGTCCTCCCAAGCCCTCGACTCCG 3') e *ura5r* (5' TTAAGACCTCTGAACACCGTACTC 3') foram utilizados para amplificar o DNA genômico dos 151 isolados de *C. neoformans* dos Estados de São Paulo (São José do Rio Preto) e Rio de Janeiro. Os perfis de PCR-RFLP foram analisados de acordo com a presença ou ausência de bandas claras e definidas, por meio de imagens digitalizadas capturadas dos géis (Figuras 1 e 2).

Cepas padrões foram utilizadas para separar os isolados nos oito tipos moleculares previamente descritos (Figura 1A). O tipo molecular mais comum entre todos os isolados foi VNI 113/151(74,8%), seguidos por VNII 19/151(12,6%), VGII 16/151(10,6%), VGI 1/151 (<1% cada) e VNIII

2/151(1,32%), e VNIV; VGIII e VGIV não foram encontrados dentre os isolados testados.

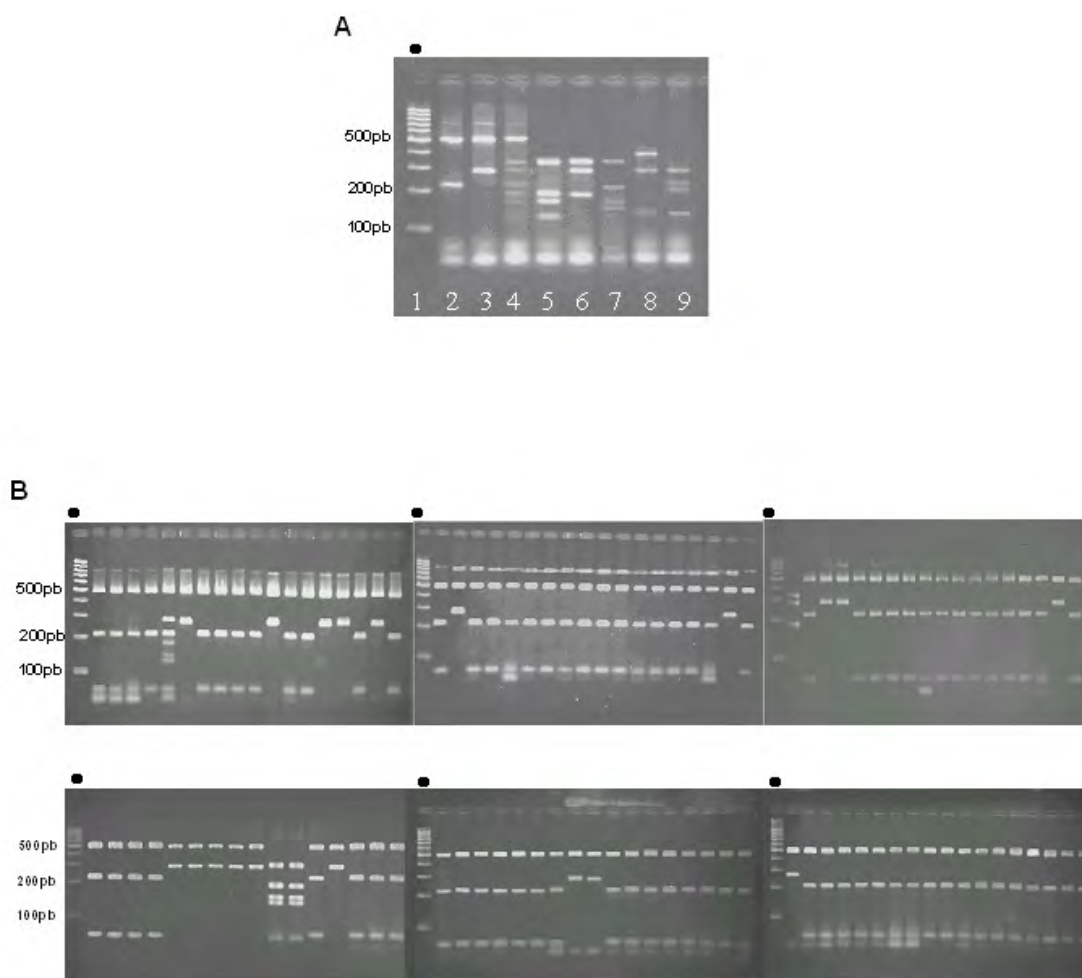


Figura 1: Perfis de PCR-RFLP de *C. neoformans* do Estado do Rio de Janeiro (gel a 3%). **A** – Gel representativo das cepas de referência de *C. neoformans* dos principais tipos moleculares. **1** – Marcador de tamanho molecular 100pb (Fermentas); **2** – WM148 (VNI – sorotipo A); **3** – WM626 (VNII – sorotipo A); **4** – WM628 (VNIII – sorotipo AD); **5** – WM629 (VNIV – sorotipo D); **6** – WM179 (VGI – sorotipo B); **7** - WM178 (VGII – sorotipo B); **8** - WM161 (VGIII – sorotipo B); **9** – WM779 (VGIV – sorotipo C).

B – Isolados de *C. neoformans* do Estado do Rio de Janeiro (ordem tabela 1).

● - Marcador de tamanho molecular 100pb (Fermentas).

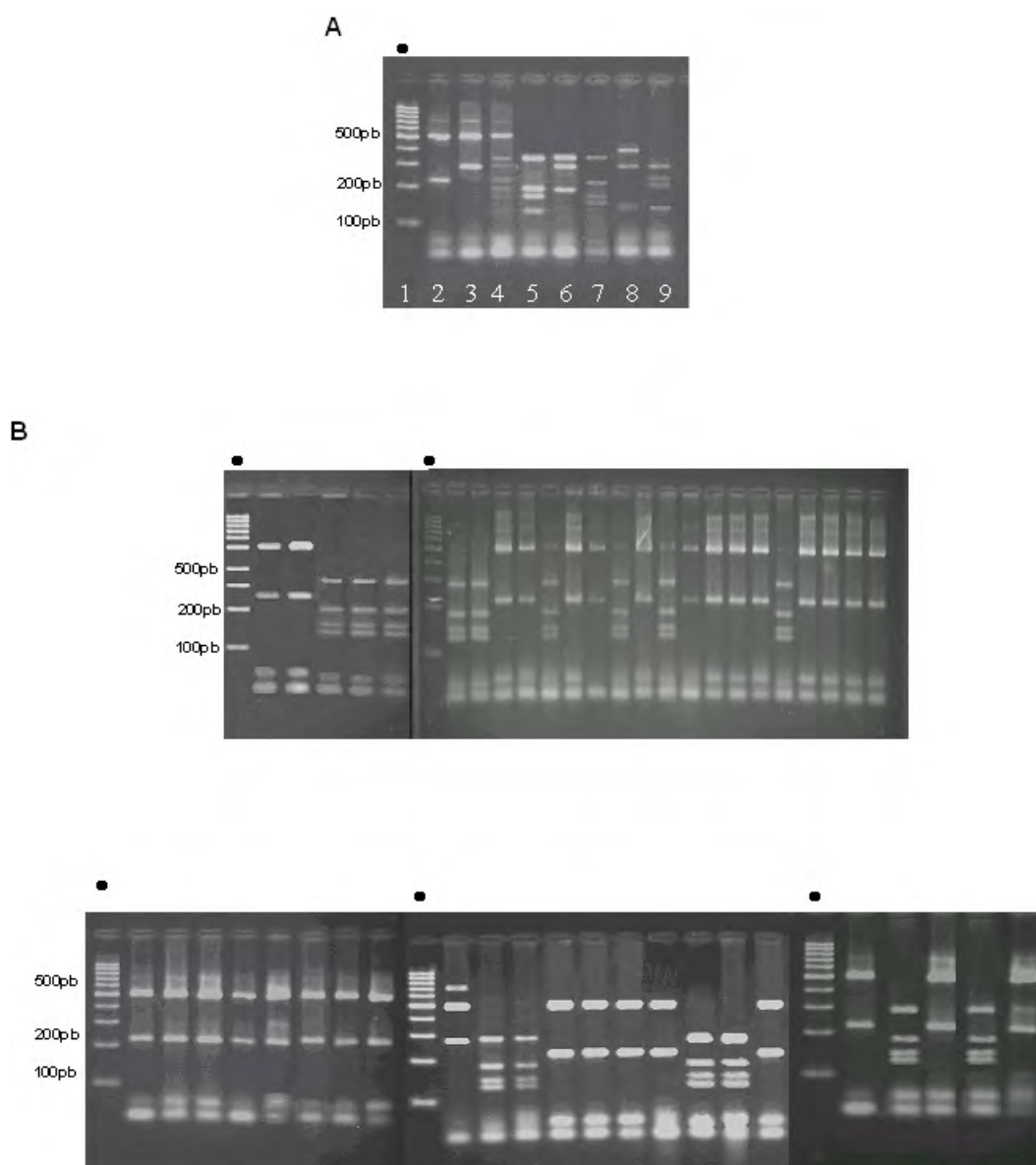


Figura 2: Perfis de PCR-RFLP de *C. neoformans* da cidade de São José do Rio Preto (gel a 3%). **A** – Gel representativo das cepas de referência de *C. neoformans* dos principais tipos moleculares. **1** – Marcador de tamanho molecular 100pb (Fermentas); **2** – WM148 (VNI – sorotipo A); **3** – WM626 (VNII – sorotipo A); **4** – WM628 (VNIII – sorotipo AD); **5** – WM629 (VNIV – sorotipo D); **6** – WM179 (VGI – sorotipo B); **7** - WM178 (VGII – sorotipo B); **8** - WM161 (VGIII – sorotipo B); **9** – WM779 (VGIV – sorotipo C).

B – Isolados de *C. neoformans* d da cidade de São José do Rio Preto (ordem = tabela 2).

● - Marcador de tamanho molecular 100pb (Fermentas).

O tipo molecular mais comum entre os isolados do estado do Rio de Janeiro foi VNI (77,1%), seguidos por VNII (18,1%), VNIII, VGII (1,9% cada) e VGI (1,0%). Os tipos moleculares VNIV, VGIII e VGIV não foram encontrados dentre os isolados testados, conforme a figura 3.

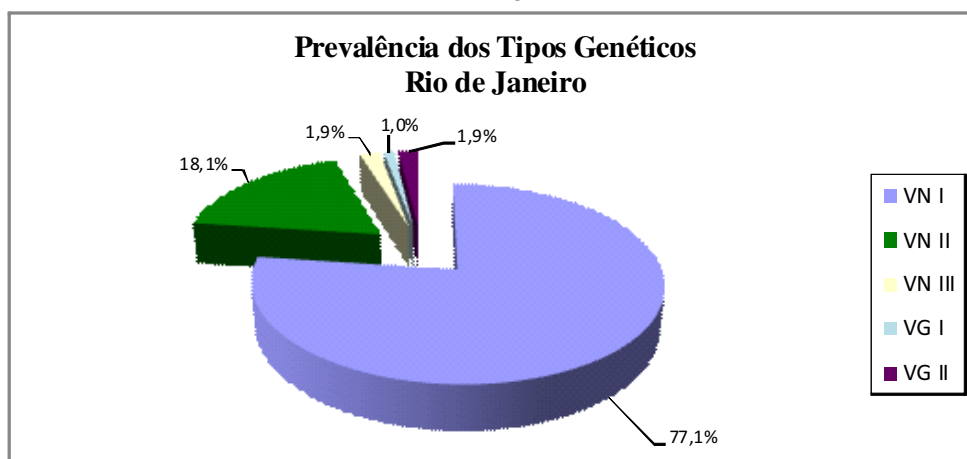


Figura 3: Prevalência dos tipos genéticos de *C. neoformans* do estado do Rio de Janeiro.

Foram analisados 59 pacientes do estado do Rio de Janeiro e 36 deles só foi possível ter um isolado, sendo 29 pacientes VNI (80,5%) e 07 VNII (19,5%); 12 pacientes com mais de um isolado em que predominou apenas o tipo VNI e em 11 pacientes havia mais de um, sendo 08 com dois tipos diferentes de *C. neoformans*, em que 07 albergavam VNI e VNII e 01 paciente VNI e VNIII; e três pacientes albergavam isolados de *C. neoformans* e *C. gattii*, sendo um paciente com os tipos VNI e VGI, um paciente VNI e VGII e um VNII e VGII.

O tipo molecular mais comum entre os 20 pacientes da cidade de São José do Rio Preto foi VNI (90%), seguido por VGII (10%) (fig.4). Os tipos moleculares VNII, VNIII, VNIV, VGI, VGIII e VGIV não foram encontrados dentre os isolados testados. Entre esses pacientes analisados, 10 deles só foram possíveis ter um isolado com o tipo VNI; 10 pacientes com mais de um isolado, sendo 08 pacientes VNI (80%) e 02 VGII (20%).

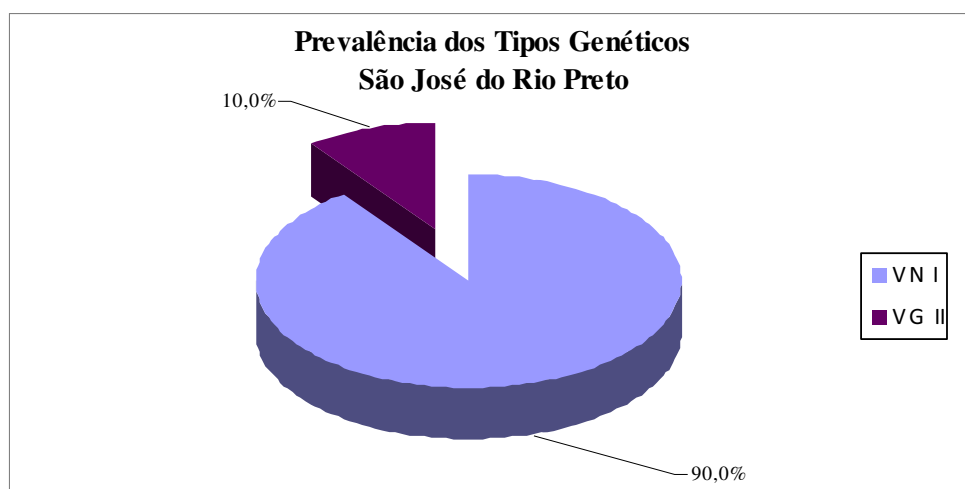


Figura 4: Prevalência dos tipos genéticos de *C. neoformans* da cidade de São José do Rio Preto.

5.2. Padronização da metodologia de antifungigrama para anfotericina B por citometria de fluxo para *Cryptococcus sp*

A padronização da metodologia foi iniciada pela determinação do tamanho do inóculo para o teste. Preliminarmente, foi feita uma suspensão de células com volume final de 1×10^4 UFC/mL em RPMI, para unificar os testes de citometria de fluxo e microdiluição, uma vez que a microdiluição já estava padronizada segundo o CLSI. Após a incubação com a droga (anfotericina B), e centrifugação, não se obteve um volume suficiente de células para a continuação dos testes. Em seguida foi realizado o teste com uma suspensão de células maior, com volume final de 1×10^6 UFC/mL em RPMI; obtendo então o volume necessário para o teste.

Foram feitos testes para determinar qual era a melhor metodologia para se obter a maior porcentagem de células mortas. Segundo a literatura, três eram as técnicas mais utilizadas; álcool 70% por 1 hora em temperatura ambiente, álcool absoluto por 20 minutos a -20°C e ferver as células por alguns minutos. As três metodologias poderiam ser facilmente aplicadas no teste, pois não foram significativamente diferentes segundo o teste ANOVA, com $p \leq 0,05$ conforme demonstra a figura 5. Assim, o teste foi realizado com álcool 70%, que foi escolhida como padrão.

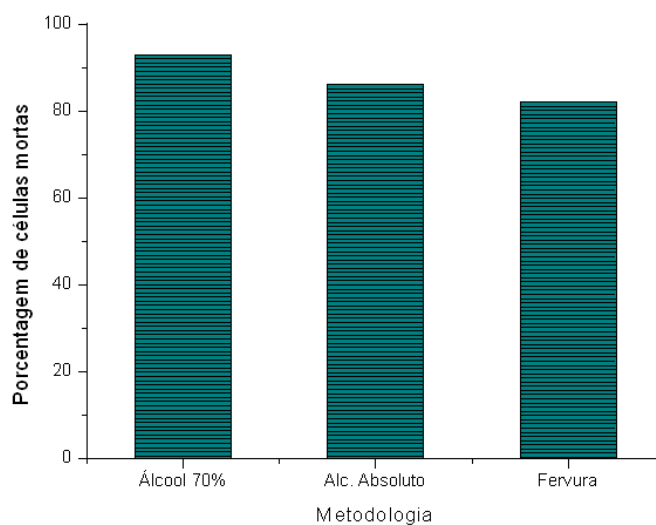


Figura 5: Valores de porcentagem de células mortas versus metodologia empregada para obtenção de células mortas. De acordo com o teste ANOVA, com $p \leq 0,05$, não houve diferença estatística entre as metodologias.

Segundo Ramani et al. (2001), acrescentando desoxicolato de sódio, um detergente, seria facilitado a difusão do PI (fluorocromo que identifica células mortas) para dentro da célula. Foi testada então, a eficácia do desoxicolato de sódio nos controles positivo e negativo. Verificou-se uma melhoria, uma vez que diminuiu a porcentagem de PI na célula no controle negativo e aumentou essa porcentagem no controle positivo, conforme observamos na figura 6.

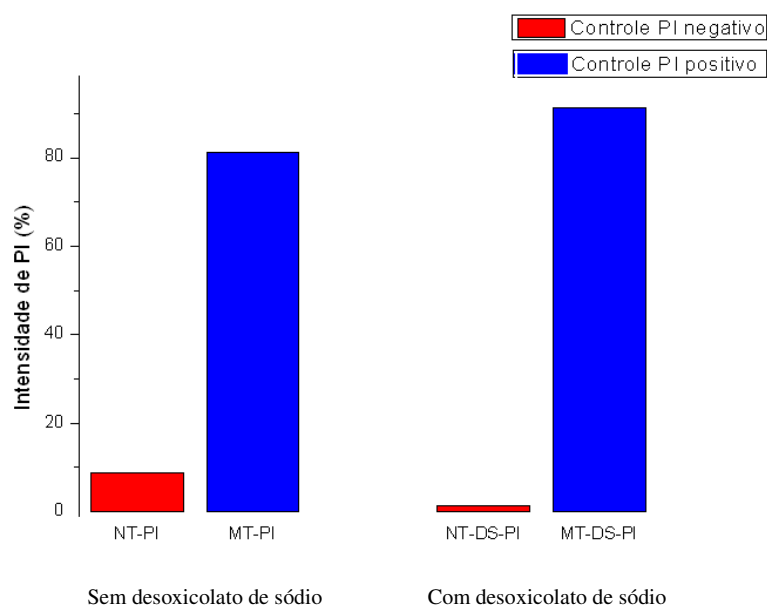


Figura 6: Valores de intensidade de células marcadas com PI (%) versus desoxicolato de sódio. NT-PI: Célula não tratada marcada com PI; MT-PI: Célula tratada e morta marcada com PI; NT-DS-PI: Célula não tratada com desoxicolato de sódio marcada com PI; MT-DS-PI: Célula tratada e morta com desoxicolato de sódio marcada com PI.

Os testes, no início, foram realizados apenas com os controles, positivo e negativo, das células marcadas com PI. O controle positivo foi feito com células tratadas com a anfotericina B e posteriormente com etanol 70%. O controle negativo foi feito com células não tratadas com a anfotericina B. Ambos foram então marcados com PI (1 μ g/mL) em diferentes tempos. A figura 7 mostra que o tempo de 10 minutos foi o mais adequado, uma vez que a distância entre os pontos das curvas de célula tratada e célula não tratada foram maiores.

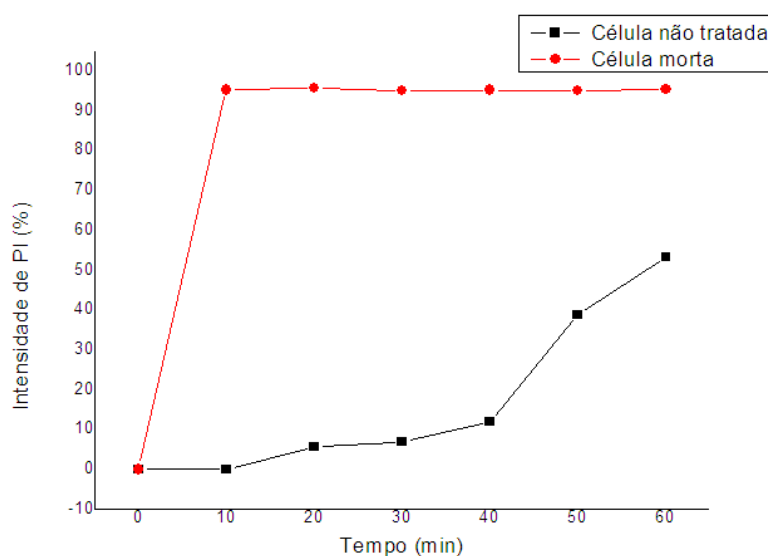


Figura 7: Valores de intensidade de células marcadas com PI (%) *versus* tempo (min) para *C. neoformans* cepa ATCC 90012

5.3. Definição dos pontos finais de leitura de *Cryptococcus* sp para anfotericina B por citometria de fluxo

A padronização do teste de microdiluição no citômetro de fluxo foi realizada a partir do contato da cepa ATCC 90012 com anfotericina B em RPMI nas concentrações variando de 0,0078 a 16 μ g/mL por 4h. As células foram marcadas com PI, um fluorocromo que identifica células mortas. Quando as células tratadas por 4h com concentrações crescentes do antifúngico foram analisadas, o dano na membrana celular foi notado pelo aumento da intensidade de fluorescência celular (IFC) que resultou de um aumento da absorção de PI. O aumento gradual na IFC marcadas com PI obtida com concentrações crescentes de anfotericina B é ilustrado na figura 8. O ponto final de leitura foi definido como a menor concentração da droga, que mostrou uma diminuição de 50% da intensidade de PI, em comparação com a intensidade de fluorescência das células marcadas com PI do controle PI-positivo (97%), correspondendo ao valor de 2 μ g/mL para a cepa ATCC, valor este também obtido pelo micrométodo. Os experimentos foram repetidos cinco vezes (dados não mostrados) e os resultados descritos acima foram obtidos pela média entre os ensaios. Como esperado, a maior IFC foi observada com 16 μ g/mL de anfotericina B.

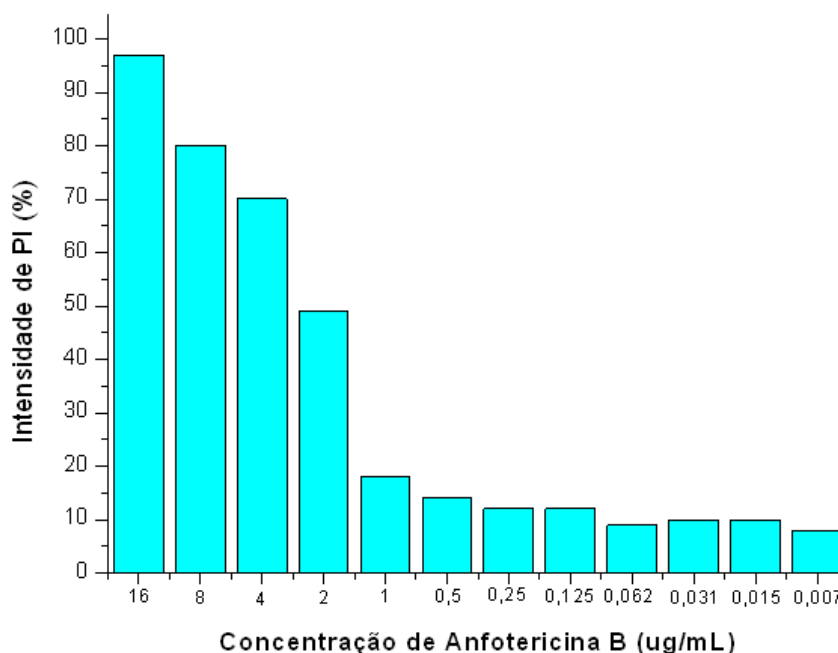


Figura 8: Valores de intensidade de células marcadas com PI (%) *versus* concentração de Anfotericina B (µg/mL) após o contato com a cepa ATCC de *Cryptococcus neoformans*

5.4. Realização do teste de citometria de fluxo para outras cepas de *Cryptococcus sp*

Foram selecionados 14 isolados de pacientes (sete isolados do Rio de Janeiro e sete de São José do Rio Preto) previamente tipados e que correspondiam aos tipos moleculares VNI, VNII e VGII, escolhidos aleatoriamente para o teste de microdiluição em citometria de fluxo conforme padronizado anteriormente. Os isolados e as CIMs estão demonstrados na tabela 3 e foram determinadas em dois momentos, previamente pelos métodos de microdiluição padronizado pelo CLSI, e posteriormente reavaliados em citometria de fluxo.

Tabela 3: Dados dos isolados de *Cryptococcus* sp da cidade de São José do Rio Preto no Estado de São Paulo e do estado do Rio de Janeiro avaliados quanto a concentração inibitória mínima por dois métodos, microdiluição e citometria de fluxo.

Isolados	Número da amostra	Número do paciente	Tipo Molecular	Origem	CIMs por microdiluição, segundo CLSI	CIMs por citometria de fluxo	Porcentagem de PI positivo
61-80326/97	43	25	VNI	RJ	0,5µg/mL	0,5µg/mL	62%
94-85872/99	46	27	VNI	RJ	2,0µg/mL	2,0µg/mL	73%
104-89030/00	54	31	VNI	RJ	1,0µg/mL	2,0µg/mL	77%
10-72546/96	6	5	VNII	RJ	1,0µg/mL	2,0µg/mL	71%
12-72938/96	49	29	VNI	RJ	1,0µg/mL	1,0µg/mL	60%
35-76782/97	7	1	VNI	RJ	0,0625µg/mL	0,0625µg/mL	86%
32-76596/96	8	1	VNI	RJ	0,125 µg/mL	0,125 µg/mL	88%
718/00	7	1	VGII	SJRP-SP	1,0µg/mL	2,0µg/mL	72%
1040/00	10	1	VGII	SJRP-SP	2,0µg/mL	2,0µg/mL	70%
1053/00	45	1	VGII	SJRP-SP	2,0µg/mL	4,0µg/mL	77%
1957/00	13	1	VGII	SJRP-SP	1,0µg/mL	1,0µg/mL	67%
1901/99	46	3	VNI	SJRP-SP	2,0µg/mL	2,0µg/mL	69%
1994/00	31	1	VNI	SJRP-SP	0,125µg/mL	0,125µg/mL	89%
1039/00	25	12	VNI	SJRP-SP	0,5µg/mL	0,5µg/mL	82%

Pelo micrometodo, as CIMs dos 14 isolados variaram de 0,0625 a 2µg/mL e por citometria de 0,0625 a 4 µg/mL. Os experimentos foram repetidos três vezes e os resultados descritos acima foram obtidos pela média entre os ensaios. Na maioria dos casos as CIMs foram as mesmas nas duas metodologias.

5.5. Avaliação da atividade antifúngica e seleção do extrato para contato com a levedura de gênero *Cryptococcus* e análise em citômetro de fluxo

Os extratos foram avaliados quanto a sua atividade antifúngica contra *C. neoformans*, cepa ATCC, pelo método de microdiluição segundo o CLSI, 2002 com modificações. Os extratos com os melhores valores de CIMs foram selecionados para análise por citômetro de fluxo. Foram testados 162 extratos, sendo 57 extratos brutos, 52 frações e 53 substâncias puras isoladas de plantas do Cerrado e Mata Atlântica. A faixa de concentração dos testes foi de 250 a 0,4µg/mL dos extratos e de 32 a 0,0625µg/mL para fluconazol e de 16 a 0,0321µg/mL para anfotericina B, que foram usados como controle.

Tabela 4: Resultados dos testes de sensibilidade de extratos, frações e substâncias puras de plantas de diferentes famílias contra *Cryptococcus neoformans* distribuídos em porcentagem de CIM.

CIM Extratos	% CIM* 3,9-15,6 µg/mL	% de CIM* 31,25-62,5µg/mL	% de CIM* 125-250µg/mL	% de Substâncias Sem Atividade ou >250µg/mL
Extrato Bruto (57)	12,3	14,0	26,3	47,4
Fração (52)	19,2	30,8	38,5	11,5
Substância Pura (53)	12,9	42,7	40,7	3,7

*CIM: concentração inibitória mínima

Na tabela 4 estão apresentados os resultados dos ensaios feitos com todas as famílias de plantas. Os resultados indicaram que 52,6%, 88,5% e 96,3% dos extratos brutos, frações e substâncias puras, respectivamente, apresentaram atividade contra *C. neoformans*. Os extratos que apresentaram CIM menor que 75µg/mL, a atividade antifúngica foi considerada forte. A melhor atividade encontrada, portanto foi com as substâncias puras, uma vez que 55,4% dessas substâncias puras apresentaram valores de CIMs menores que 75µg/mL.

Tabela 5: Resultados em porcentagem das substâncias puras relacionados aos valores de CIM das famílias Piperaceae, Rubiaceae, Euphorbiaceae, Flacourtiaceae e Leguminosae testados contra *Cryptococcus neoformans*.

Famílias \ CIM	% CIM* 3,9-15,6 µg/mL	% de CIM ¹ 31,25-62,5µg/mL	% de CIM ² 125-250µg/mL	% de Substâncias Sem Atividade ou >250µg/mL
Piperaceae (34)	5,9	67,7	26,4	-
Rubiaceae (8)	-	-	75	25
Euphorbiaceae (5)	-	-	100	-
Flacourtiaceae (3)	-	33,4	66,6	-
Fabaceae (3)	100	-	-	-

*CIM: concentração inibitória mínima

Na tabela 5 estão apresentados os resultados dos ensaios feitos apenas com as 54 substâncias puras das famílias Piperaceae, Rubiaceae, Euphorbiaceae, Flacourtiaceae e Fabaceae. Os extratos que apresentaram CIM menor que 75µg/mL foram as das famílias Piperaceae, Flacourtiaceae e Fabaceae com 73,6%, 33,4% e 100%, respectivamente. A planta selecionada para realizar o contato com a levedura e posterior análise em citometria de fluxo foi a *Pterogyne nitens* pertencente à família Fabaceae, pois foi a que mais se destacou em relação à atividade antifúngica, sendo considerado, de acordo com nossa classificação, extrato de atividade antifúngica potente para *C. neoformans*. Os resultados das CIMs e CFMs das substâncias puras selecionadas para o estudo foram determinados segundo o CLSI e também foi feito o teste por citometria de fluxo conforme tabela 6.

Tabela 6: Valores de concentração inibitória mínima (CIM) determinados segundo o CLSI, e por citometria de fluxo dos extratos puros 6, 7 e 8 da planta *Pterogyne nitens* e concentração fungicida mínima (CFM).

Planta	Substâncias	<i>Cryptococcus neoformans</i>		
		CIM* ($\mu\text{g/mL}$) pelo CLSI	CFM** ($\mu\text{g/mL}$)	CF*** ($\mu\text{g/mL}$)
<i>Pterogyne nitens</i> (Família Fabaceae)	6 (sorbifolina)	7,8	7,8	7,8
	7 (nitensosídeo B)	7,8	7,8	7,8
	8 (isoquercitrina)	7,8	62,5	7,8

*CIM concentração mínima inibitória; **CFM: concentração fungicida mínima;

***CF: Citometria de fluxo.

De acordo com esta tabela pode ser verificado que as três substâncias puras testadas pelas duas metodologias constataram mesma CIM, independente do teste aplicado.

6. Discussão

Estudos epidemiológicos são essenciais para o entendimento da biologia e da estrutura populacional de um microrganismo. Vários métodos de tipagem molecular vêm sendo utilizados em análise epidemiológica de *C. neoformans* (SANTOS et al., 2008; RIBEIRO & NGAMSKULRUNGROJ, 2008; FENG et al., 2008a; PÉREZ et al., 2008; SANCHÉZ et al., 2008). PCR-RFLP do gene URA5 vem sendo utilizado em levantamentos globais, dividindo os isolados em oito tipos moleculares principais, denominados VNI e VNII (*C. neoformans* var. *grubii*, sorotipo A), VNIII (*C. neoformans*, sorotipo AD), VNIV (*C. neoformans* var. *neoformans*, sorotipo D) e VGI a VGIV (*C. gattii*, sorotipos B e C) (FENG et al., 2008a).

A primeira parte de nosso estudo preocupou-se em verificar a prevalência dos principais tipos moleculares, por RFLP do gene URA5, de isolados de *C. neoformans* do estado do Rio de Janeiro e da cidade de São José do Rio Preto. Neste, 105 isolados foram analisados de 59 pacientes com doença associada ou não a AIDS no estado do Rio de Janeiro e 103 foram identificados como *C. neoformans* var. *grubii*, sorotipo A e apenas dois foram identificados como *C. gattii*, consistente com a literatura mundial e também com a nacional, de que *C. neoformans* var. *grubii*, sorotipo A é prevalente entre os pacientes imunossuprimidos, principalmente os HIV positivos (HUSTON & MODY, 2009; LEAL et al., 2008; MATSUMOTO et al., 2007; BARRETO de OLIVEIRA et al., 2004; CASALI et al., 2003; NISHIKAWA et al., 2003; CASADEVALL e PERFECT, 1998; MITCHELL e PERFECT, 1995). O mesmo ocorreu quando foram analisados 46 isolados obtidos de 20 pacientes na cidade de São José do Rio Preto, em que 32 isolados de 18 pacientes foram identificados como *C. neoformans* var. *grubii*, sorotipo A e 14 isolados de 02 pacientes foram identificados como *C. gattii*. O tipo molecular mais comum entre todos os isolados analisados foi VNI 113/151(74,8%), seguidos por VNII 19/151(12,6%), VGII 16/151(10,6%), VNIII 2/151(1,32%) e VGI 1/151(<1%). As técnicas baseadas no PCR vêm sendo uma ótima alternativa, mostrando-se, mais sensíveis, específicas e rápidas e sofrendo menos influência de fatores externos do que os métodos tradicionais baseados em aspectos fenotípicos (FENG et al., 2008b; LEAL et al., 2008; MATSUMOTO et al., 2007; D'SOUZA

et al., 2004; LENGELER et al., 2002; AOKI et al., 1999). Vários estudos têm verificado uma predominância do tipo molecular VNI tanto em isolados ambientais quanto em clínicos. Um estudo Iberoamericano realizado com cepas de nove países, incluindo o Brasil, mostrou prevalência do tipo VNI entre os 340 isolados tipados. Mais especificamente, 66 isolados do Brasil foram incluídos, sendo 44 da região sudeste, 11 da região sul e 11 da região nordeste, dentre estes, o tipo VNI foi predominante com 82,3% seguido do VGII (13,6%) e VNII (3,0%) (MEYER et al., 2003). Mais recentemente, Feng et al. (2008), analisaram 115 isolados clínicos de pacientes da China com criptococose e a prevalência também foi por *C. neoformans* var. *grubii* (tipo molecular VNI). Casali et al. (2003), em importante estudo na região sul do Brasil, investigaram 105 isolados clínicos e 19 ambientais e também verificaram predominância do VNI. Mais recentemente, em nosso laboratório, Matsumoto et al., 2007, analisaram 47 isolados clínicos do estado de São Paulo e verificaram que 45/47 (95,7%) dos isolados eram VNI e apenas 2/47 (4,3%) eram VNII.

O tipo molecular mais comum entre os isolados do estado do Rio de Janeiro foi VNI 81/105(77,1%), seguidos por VNII 19/105(18,1%), VNIII 2/105 (1,9%) e VGII 2/105 (1,9%) e finalmente por VGI (1,0%). Entre os 59 pacientes analisados do estado do Rio de Janeiro, 36 deles com apenas um isolado, 29 pacientes albergavam o tipo VNI (80,6%) e 07 VNII (19,4%). Doze pacientes do estado do Rio de Janeiro albergavam mais de um isolado em que predominou apenas o tipo VNI, sugerindo casos de recidivas por persistência da cepa. Onze pacientes tiveram mudança de tipo molecular (pacientes 04, 08, 09, 11, 20, 22, 24, 31, 35, 36 e 50), sendo 08 com dois tipos diferentes de *C. neoformans*, em que 07 albergavam VNI e VNII e 01 paciente VNI e VNIII; e três pacientes com tipos diferentes de *C. neoformans* e *C. gattii*, sendo um paciente com os tipos VNI e VGI, um paciente VNI e VGII e um VNII e VGII. Estes resultados sugerem que a infecção por uma nova cepa pode ocorrer com relativa frequência. A tipagem molecular é potencialmente útil em esclarecer casos de recidivas por persistência da cepa ou reinfecção por uma nova cepa, demonstrando os graus de relação entre os isolados no início e em infecções posteriores de um mesmo paciente.

Neste estudo foi verificado ainda que o tipo molecular mais comum entre os isolados da cidade de São José do Rio Preto foi VNI 32/46 (69,6%), seguido por VGII 14/46 (30,4%). Mas deve-se ressaltar que os 14 isolados VGII foram de apenas dois pacientes e são cepas seqüenciais. Portanto, analisando a tipagem molecular entre os pacientes da cidade de São José do Rio Preto, 90% (18/20) eram VNI e apenas 10% (2/20) eram VGII. Onze dos 20 pacientes analisados da cidade de São José do Rio Preto possuíam isolados seqüenciais. Destes, nenhum teve mudanças no perfil genético. Entre os 20 pacientes avaliados, 10 deles só foram possíveis ter um isolado com o tipo VNI, sugerindo casos de recidivas por persistência da cepa; e, 10 pacientes com mais de um isolado, sendo 08 pacientes VNI (80%) e 02 VGII (20%), que sugerem infecção por uma nova cepa.

Igreja e colaboradores em 2004 analisaram isolados de *Cryptococcus neoformans* de dois grupos de pacientes com AIDS e criptococose do Rio de Janeiro pelas técnicas de *PCR fingerprinting* e RAPD. Os resultados confirmaram que a infecção criptocócica persistente é causada por recaída, em vez de reinfecção, mas também mostram que, em casos excepcionais, os pacientes podem estar infectados com mais de uma cepa de *C. neoformans*. Mais recentemente, em nosso laboratório, Almeida et al., (2007) por cariotipagem e RAPD, verificaram 83 isolados seqüenciais, obtidos de 38 pacientes com criptococose e entre esses isolados constataram evidências de microevolução associados à diminuição da sensibilidade a antifúngicos e também de coinfeção por duas cepas diferentes. A identificação de pequenas mudanças no perfil genético é de grande importância, pois pode ser indicativo de microevolução, que por sua vez, pode traduzir em mudanças fenotípicas como, por exemplo, na virulência, na resistência a antifúngicos ou na alteração à resposta imune do hospedeiro (JAIN et al., 2005).

Embora a sensibilidade das espécies de *Cryptococcus* sp aos agentes antifúngicos atualmente disponíveis, ser prevista para as espécies conhecidas, alguns isolados, não necessariamente seguem esse padrão (BERNAL-MARTINEZ et al, 2009). O amplo uso de antifúngicos por longos períodos favorece o aparecimento de espécies resistentes. Assim, tem-se observado aumento nos casos de resistência aos fármacos por vários fungos patogênicos humanos (HOF, 2008; PFALLER et al., 2008).

Na seqüência deste estudo, procurou-se padronizar a metodologia de antifungigrama para anfotericina B por citometria de fluxo para *Cryptococcus* sp. Alguns dos isolados clínicos foram selecionados para análise por citometria de fluxo comparando os resultados com a CIM determinada por metodologia padrão, segundo documento M27-A2. Foram selecionados 14 isolados dos tipos moleculares VNI, VNII e VGII que apresentaram CIMs entre 0,0625 a 2µg/mL e aparentemente não houve relação entre o tipo molecular e a CIM. O método aplicado nas 14 cepas de *C. neoformans* mostrou dados significativamente semelhantes entre a citometria de fluxo e o micrométodo, e, de acordo com o teste ANOVA, com $p \leq 0,05$, não houve diferença estatística entre as metodologias.

Atualmente, o método de diluição em meio líquido é recomendado para ensaio com drogas antifúngicas para leveduras (M27-A2 do CLSI). Há vários fatores que podem influenciar na técnica de microdiluição e persistem ainda alguns problemas, como o fenômeno do *trailing* e a dificuldade de se detectar cepas resistentes a anfotericina B (PFALLER et al., 2008; JOHNSON, 2008; LIU et al., 2007; VALE-SILVA et al., 2006; REX et al., 2001). Assim, têm-se estudado várias alternativas para minimizar esses problemas. Existe uma necessidade de se detectar cepas resistentes a essa droga bem como se determinar o seu ponto de corte.

Algumas metodologias têm sido defendidas por serem mais confiáveis para estudos de sensibilidade com anfotericina B, tais como a citometria de fluxo. Nossas condições de cultura, regime de diluição, e incubação foram comparáveis aos recomendados pelo CLSI. Foi utilizada uma suspensão de células maior que o preconizado pelo CLSI no teste de microdiluição, com volume final de 1×10^6 UFC/mL em RPMI como é citado na literatura por Ramani et al., 1997 e 2001 e Pina-Vaz et al., 2005. Suspensões de células não tratadas com anfotericina B foram utilizadas como controles, positivo e negativo, e coradas com PI. As células do controle negativo foram mortas com álcool 70% por 1 hora em temperatura ambiente. As células não tratadas marcadas com PI apresentaram uma intensidade muito baixa de fluorescência e, em contrapartida, após o contato com o etanol, as células mostraram fluorescência vermelha intensa, conforme os resultados obtidos em Pina-Vaz et al., 2005.

No presente estudo, o desempenho do fluoróforo Iodeto de Propídio (PI) foi analisado por meio da avaliação da atividade *in vitro* de anfotericina B. A permeabilidade de PI para dentro da célula após um tempo curto de incubação (15 minutos), pode ser devido a lesões na membrana (PINA-VAZ et al., 2000a e b). Ramani e colaboradores em 2001 foram capazes de marcar com PI células tratadas com anfotericina B, com auxílio de um detergente de membrana, desoxicolato de sódio, que facilita a difusão do PI nas células. Neste estudo, foi utilizado este mesmo detergente para facilitar a entrada de PI nas células. O PI penetrando rapidamente nas células da levedura sugere que o efeito fungicida da anfotericina B foi devido à produção primária de lesões na membrana citoplasmática (DEREINSKI & STEVENS, 2003).

O método padronizado M27-A2 é considerado de referência e permite algumas modificações para melhorar o seu desempenho técnico. O CLSI desenvolveu um método reprodutível para testar a atividade antifúngica contra as leveduras (o M27-A3, M27-S3, M44 e M44-A - documentos S2) e fungos filamentosos (bolores, o M38-documento A2). Nestes documentos, nenhuma interpretação de *endpoint* foi definida para qualquer agente antifúngico contra *C. neoformans*. (PAPPALARDO et al., 2009; PFALLER et al., 2008, JOHNSON, 2008; LIU et al. 2007; VALLE-SILVA et al., 2006; CLSI-M27A2, 2002; REX et al., 2001). Os *breakpoints* para *Cryptococcus neoformans*, dermatófitos, *Malassezia* spp. contra qualquer agente antifúngico e para posaconazol e anfotericina B versus leveduras não estão disponíveis. A suplementação de glicose com uma concentração final de 20g/L no meio de ensaio pode simplificar a determinação do *endpoint*. Um método de referência é importante como base para fornecer um padrão a partir do qual outros métodos podem ser desenvolvidos, o que resultará também em um acordo interlaboratorial dentro de determinados limites. A análise em citometria de fluxo foi comparada com base nessa metodologia padrão. O método de microdiluição preconizado pelo CLSI utiliza microplacas para determinação da CIM após análise espectrofotométrica, em que se faz necessária uma incubação de 48 horas para *C. neoformans*. Este longo período de espera para demonstrar a sensibilidade antifúngica é necessário porque tal teste depende do crescimento do microrganismo ou a sua ausência, quando estes são incubados na presença do agente antifúngico. A técnica de citometria de fluxo fornece resultados

comparáveis com a metodologia do CLSI após um curto período de incubação, que para a anfotericina B foi de apenas quatro horas. Não foi observado o fenômeno de *trailing*, mostrando que esta abordagem pode melhorar o ponto final de leitura da AMB. Estes dados sugerem que a citometria de fluxo seria uma metodologia oportuna para se explorar em estudos com anfotericina B, no tratamento de infecções com *C. neoformans*.

Benincasa et al., em 2006, investigaram a atividade antifúngica *in vitro* de diferentes peptídeos de catelicidina por determinação de CIMs e por citometria de fluxo, entre outros. Todos os peptídeos mostraram atividade antifúngica potente contra 70 isolados clínicos de mais de 20 espécies de fungos patogênicos diferentes. O mecanismo pelo qual os peptídeos matam *C. neoformans* foi avaliado por citometria de fluxo investigando-se a integridade da membrana celular da levedura. Após incubação de 60 minutos com cada peptídeo a 1mM, a maioria das células tornou-se permeabilizada depois da marcação com o PI. Estes resultados indicam que apesar de os peptídeos possuírem diferentes características estruturais, afetam a membrana no fungo, aumentando a sua permeabilidade.

Os agentes antifúngicos tradicionais (anfotericina B, fluconazol, itraconazol) são limitados devido a um espectro de atividade inadequado, resistência medicamentosa ou toxicidade e há um grande interesse no desenvolvimento de novos agentes antifúngicos para o tratamento de infecções fúngicas causadas em populações de alto risco (DE SARRO et al., 2008). O pequeno número de classes de antifúngicos disponíveis tem estimulado a investigação de novas drogas de outras fontes, tais como de produtos naturais. As plantas medicinais constituem a base dos sistemas de cuidados de saúde em muitas sociedades. A valorização dos saberes e práticas associadas a esses recursos vegetais fazem parte de uma estratégia importante ligada à conservação da biodiversidade, a descoberta de novos medicamentos, bem como a melhoria da qualidade de vida das comunidades rurais pobres (ALVIANO & ALVIANO, 2009).

Um vasto repertório de substâncias químicas com diversas atividades biológicas é originado a partir da síntese de plantas. A enorme diversidade botânica brasileira facilita o desenvolvimento de novos medicamentos para o tratamento de doenças em seres humanos (E SILVA et al., 2009). Apesar da

grande biodiversidade do Cerrado e Mata Atlântica no Brasil, o potencial de espécies vegetais como fontes de novos medicamentos permanece inexplorado. Menos de 20% de todas as espécies vegetais a partir deste ambiente foram estudadas para a presença de substâncias biologicamente ativas (JOHANN et al., 2007). Nos últimos anos, as propriedades antimicrobianas de extratos de plantas são cada vez mais notificadas em diferentes partes do mundo (TAMILARASI et al., 2008; YAKUBU et al., 2008; ADEKUNLE & IKUMAPAYI, 2006; SONBOLI et al., 2006 e 2004). Os extratos vegetais têm potencial para atuarem em diferentes alvos diferindo daqueles utilizados pelos agentes antimicrobianos atualmente disponíveis, podendo apresentar atividade contra os microrganismos resistentes às drogas sintéticas (JOHANN et al., 2007).

Existem poucos exemplos da descoberta de substâncias bioativas da biodiversidade brasileira que têm servido como protótipos para o desenvolvimento de agentes fitoterápicos e produtos farmacêuticos no Brasil. Nos últimos anos, a interação entre universidades e empresas públicas principalmente no Brasil, bem como a legislação sobre patentes brasileiras foram insuficientes para a transformação de resultados das investigações no sentido de desenvolver produtos e patentes (E SILVA et al., 2009; GIORGETTI et al. 2007; MOREIRA et al. 2006). Porém, este quadro está se alterando, e atualmente há um grande interesse no desenvolvimento destes produtos.

A atividade antifúngica de extratos e de compostos extraídos de plantas pode ser detectada por vários métodos, entretanto eles não são igualmente sensíveis. A metodologia para a determinação da atividade antifúngica em compostos naturais é variável e cada grupo de pesquisa tem empregado diferentes tipos de testes. Técnicas de diluição seriada foram recomendadas para determinação da atividade antifúngica de produtos naturais (SCORZONI et al., 2007a; SCORZONI et al., 2007b; HADACEK e GREGER, 2000; PAULI & KUBECZKA, 1996). Os mais utilizados são bioautografia (COS et al., 2006), disco difusão (UNLÜ et al., 2009), difusão em ágar (PAULI, 2006; CORDELL e COLVARD, 2005; SOUZA et al., 2003; PASSOS et al., 2002) e diluição em meio líquido.

Na busca de novas fontes de substâncias antifúngicas, nosso grupo tem estudado atividade antifúngica de espécies de plantas originárias do Cerrado e

Mata Atlântica do Brasil. Dentre os extratos brutos, frações, e substâncias puras estudadas, 52,6%, 88,5% e 96,2%, respectivamente apresentaram atividade contra *C. neoformans*. A melhor atividade encontrada, ou seja, valores menores que 75µg/mL foram encontrados em substâncias puras da família Fabaceae. Fabaceae é uma das maiores famílias botânicas também conhecidas como Leguminosae (leguminosas), de ampla distribuição geográfica. A família Fabaceae (Leguminosae) é tradicionalmente dividida em três subfamílias: Caesalpinioideae, Faboideae e Mimosoideae, compreendendo cerca de 650 gêneros e 18000 espécies (OLIVEIRA, 1999). *Pterogyne nitens* (Fabaceae) é chamada popularmente no Brasil como "tipa", "viraró", "Cocal", "amendoineiro", "amendoim-bravo", de acordo com a região onde esta planta cresce. É o único membro do gênero *Pterogyne*, e distribuída principalmente no Brasil, Bolívia, Paraguai e Argentina. Sua madeira é também amplamente utilizada na construção civil e, são mínimos os relatos sobre utilizações medicinais para esta espécie (BURKART, 1952; LORENZI, 1998). Segundo a literatura foram isolados alcalóides guanidínicos e flavonas. Foi constatado que seus flavonóides apresentaram uma potente inibição para a enzima mieloperoxidase (MPO), presente em neutrófilos humanos, que desempenha um papel na infecção e inflamação, convertendo peróxido de hidrogênio e cloreto em ácido hipocloroso e água. A atividade excessiva da MPO e a produção de, especialmente HO-Cl, implicam em muitos processos inflamatórios (HEINECKE et al., 1993, WINTERBOURN et al., 2000, FERNANDES et al., 2008; REGASINI et al., 2008).

Dentre as plantas analisadas, três substâncias puras (sorbifolina, nitensosídeo B e isoquercitrina) da planta *Pterogyne nitens* foram selecionadas por apresentarem acentuada atividade antifúngica. As substâncias puras selecionadas apresentaram valores de CIM inferiores a 75,0µg/mL para *Cryptococcus neoformans*, sendo assim considerada uma atividade antifúngica forte (SCORZONI et al., 2007b). Os valores de CFM variaram de 7,8 a 62,5µg/mL. Nosso interesse voltou-se para esta espécie pelo fato de termos encontrado poucos relatos, na literatura, sobre o estudo da atividade antifúngica desta planta. Em nossas análises em citometria de fluxo foi observado que as substâncias puras sorbifolina, nitensosídeo B e isoquercitrina apresentaram 7,8µg/mL, 7,8µg/mL e 7,8µg/mL, respectivamente. Estes

resultados foram os mesmos obtidos pela técnica de microdiluição (método padrão), podendo sugerir que essas substâncias podem ter ação sobre a membrana da levedura, uma vez que o PI penetra apenas em células com danos de membrana para se ligar no ácido nucléico (VALE-SILVA & BUCHTA, 2006) e o novo método provou ser eficiente e viável para a análise de substâncias de origem vegetal com atividade antifúngica.

Na última década, foram relatadas várias propriedades biológicas, bem como os efeitos no mecanismo de ação de extratos ou óleos essenciais de plantas, anteriormente desconhecidas na sua grande maioria por citometria de fluxo (SUNG & LEE, 2008; PINA-VAZ et al., 2004). A citometria de fluxo está sendo utilizada para determinar as CIMs e tem evitado algumas limitações dos métodos convencionais e não necessita de longos períodos de incubação como na técnica de microdiluição; além de fornecer informações adicionais a respeito dos mecanismos de ação e de resistência a drogas. Pina-Vaz e colaboradores, em 2004, estudando a atividade antifúngica de óleos de *Thymus* e de seus principais compostos isolados contra as espécies de *Candida*, determinaram as CIMs por microdiluição e utilizaram uma adaptação do emprego das técnicas de CF para determinar o seu mecanismo de ação. Pinto e colaboradores, em 2006, verificaram por citometria de fluxo que o óleo essencial de *Thymus pulegioides* age por lesão primária da membrana de *Candida* spp, *Aspergillus* spp e algumas espécies de dermatófitos. A integridade das células fúngicas foi analisada utilizando PI como marcador fluorescente e, constataram que esse óleo é um potente agente antifúngico. De acordo com os dados descritos, o potencial antifúngico das substâncias puras da planta *Pterogyne nitens* são promissores para a busca de compostos bioativos contra a levedura *Cryptococcus* sp, bem como, faz-se necessário uma maior investigação dos possíveis alvos de ação dessas substâncias.

7. CONCLUSÕES

- O tipo molecular mais comum entre os isolados do estado do Rio de Janeiro foi VNI, seguidos por VNII, VNIII, VGII e VGI e entre os pacientes da cidade de São José do Rio Preto foi VNI, seguido por VGII.
- Infecção por uma nova cepa e/ou diferentes espécies pode ocorrer com relativa frequência.
- A citometria de fluxo é uma metodologia útil e sensível para a avaliação da concentração inibitória mínima em ensaios de triagem de atividade antifúngica.
- As CIMs determinadas por ambos os métodos, micrométodo e citometria de fluxo, foram similares.
- As três substâncias puras sorbifolina, nitensosídeo B e isoquercitrina apresentaram a mesma CIM em ambos os métodos e são alternativas promissoras para o seu uso em *Cryptococcus* spp.

8. BIBLIOGRAFIA

- ABE, M.; OGAWA, Z.; TANUMA, H.; YAMAZAKI, T.; KUME, H. Investigation of susceptibility testing methods for micafungin: comparison of two microdilution methods. **Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi.**, v.49, p.111-8, 2008.
- ABEGG, M. A.; CELLA, F. L.; FAGANELLO, J.; VALENTE, P.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN M. H. *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* isolated from the excreta of psittaciformes in a southern Brazilian zoological garden. **Mycopathologia**, v. 161, p. 83-91, 2006.
- ADEKUNLE, A. A.; IKUMAPAYI, A. M. Antifungal property and phytochemical screening of the crude extracts of *Funtumia elastica* and *Mallotus oppositifolius*. **West Indian Med J.**, v.55, p.219-23, 2006.
- AGARWAL, A. K.; XU, T.; JACOB, M. R.; FENG, Q.; LI, X. C.; WALKER, L. A.; CLARK, A. M. Genomic and genetic approaches for the identification of antifungal drug targets. **Infect Disord Drug Targets**, v. 8, p.2-15, 2008.
- ALEXANDER, B. D.; BYRNE, T. C.; SMITH, K. L.; HANSON, K. E.; ANSTROM, K. J.; PERFECT, J. R.; RELLER, L. B. Comparative evaluation of Etest and sensititre yeastone panels against the Clinical and Laboratory Standards Institute M27-A2 reference broth microdilution method for testing *Candida* susceptibility to seven antifungal agents. **J Clin Microbiol.**, v.45, p. 698-706, 2007.
- ALLER, A. I.; MARTIN-MAZUELOS, E.; LOZANO, F.; GOMEZ-MATEOS, J.; STEELE-MOORE, L.; HOLLOWAY, W. J.; GUTIERREZ, M. J.; RECIO, F. J.; ESPINEL-INGROFF, A. Correlation of fluconazole MICs with clinical outcome in cryptococcal infection. **Antimicrob Agents Chemother**,v.44, p.1544–1548, 2000.
- ALMEIDA, A. M. F.; MATSUMOTO, M. T.; BAEZA, L. C.; DE OLIVEIRA E SILVA, R. B.; KLEINER, A. A. P.; MELHEM, M. S. C.; MENDES GIANNINI, M. J. S. Molecular typing and antifungal susceptibility of clinical sequential isolates of *Cryptococcus neoformans* from Sao Paulo State, Brazil. **FEMS Yeast Res.**, v.7, p.152-64, 2007.
- ALVIANO, D. S.; ALVIANO, C. S. Plant extracts: search for new alternatives to treat microbial diseases. **Curr Pharm Biotechnol.**, v.10, p.106-21, 2009.

- ANDES, D.; VAN OGTRON, M. In vivo characterization of the pharmacodynamics of flucytosine in a neutropenic murine disseminated candidiasis model. **Antimicrob. Agents. Chemother.**, v. 44, p.938-942, 2000.
- AOKI, F. H.; IMAI, T.; TANAKA, R.; MIKAMI, Y.; TAGUCHI, H.; NISHIMURA, N. F.; NISHIMURA, K.; MIYAJI, M.; SCHREIBER, A. Z.; BRANCHINI, M. L. New PCR primer pairs specific for *Cryptococcus neoformans* serotype A or B prepared on the basis of random amplified polymorphic DNA fingerprint pattern analyses. **J. Clin. Microbiol.**, v. 37, p. 315-320, 1999.
- ARIKAN, S. Current status of antifungal susceptibility testing methods. **Med Mycol.**, v. 45, p.569-87, 2007.
- ARTHINGTON-SKAGGS, B. A.; LEE-YANG, W.; CIBLAK, M. A.; FRADE, J. P.; BRANDT, M. E.; HAJJEH, R. A.; HARRISON, L. H.; SOFAIR, A. N.; WARNOCK, D. W. Comparison of visual and spectrophotometric methods of broth microdilution MIC end point determination and evaluation of a sterol quantitation method for in vitro susceptibility testing of fluconazole and itraconazole against trailing and nontrailing *Candida* isolates. **Antimicrob. Agents Chemother**, v. 46, p. 2477-2481, 2002.
- BAGINSKI, M.; CZUB, J.; STERNAL, K. Interaction of amphotericin B and its selected derivatives with membranes: molecular modeling studies. **Chem Rec.**, v. 6(6), p. 320-32. Review, 2006.
- BARONI, F. DE A.; PAULA, C. R.; SILVA, E. G.; VIANI, F. C.; RIVERA, I. N.; OLIVEIRA, M. T.; GAMBALE, W. *Cryptococcus neoformans* strains isolated from church towers in Rio de Janeiro City, RJ, Brazil. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo.**, v.2, p.71-5, 2006.
- BARRETO de OLIVEIRA, M. T.; BOEKHOUT, T.; THEELEN, B.; HAGEN, F.; BARONI, F. A.; LAZERA, M. S.; LENGELER, K. B.; HEITMAN, J.; RIVERA, I. N.; PAULA, C. R. *Cryptococcus neoformans* Shows a Remarkable Genotypic Diversity in Brazil. **J. Clin. Microbiol.**, v.42, p.1356- 1359, 2004.
- BASSO, L. A.; SILVA, L. H. P.; FETT-NETO A. G.; JUNIOR W. F. A.; MOREIRA I. S.; PALMA M. S.; CALIXTO J. B.; FILHO S. A.; SANTOS R. R.; SOARES M. B. P.; SANTOS, D. S. The use of biodiversity as source of new chemical entities against defined molecular targets for treatment of malaria, tuberculosis, and T-cell mediated diseases. **Mem. Inst. Oswaldo. Cruz.**, v.100, p. 475-506, 2005.

- BECK-SAGUÉ, C.; JARVIS, W. R. Secular trends in the epidemiology of nosocomial fungal infections in the United States, 1980-1990. National Nosocomial Infections Surveillance System. **J Infect Dis.**, v.167, p. 1247-1251,1993.
- BENINCASA, M.; SCOCCHI, M.; PACOR, S.; TOSSI, A.; NOBILI, D.; BASAGLIA, G.; BUSETTI, M.; GENNARO, R. J. Fungicidal activity of five cathelicidin peptides against clinically isolated yeasts. **Antimicrob Chemother.**, v.58, p.950-9, 2006.
- BENNETT, J. E. Flucytosine. **Ann. Intern. Med.**, v.86, p.319-322, 1977.
- BERG, J.; CLANCY, C.J.; NGUYEN, M.H. The hidden danger of primary fluconazole prophylaxis in patients with acquired immunodeficiency syndrome. **Clin. Infect. Dis.**, v. 26, 186-187, 1998.
- BERNAL-MARTINEZ, L.; GOMEZ-LOPEZ, A.; CASTELLI, M. V.; MESA-ARANGO, A. C.; ZARAGOZA, O.; RODRIGUEZ-TUDELA, J. L.; CUENCA-ESTRELLA, M. Susceptibility profile of clinical isolates of non-*Cryptococcus neoformans*/non-*Cryptococcus gattii* *Cryptococcus* species and literature review. **Med Mycol.** 2009 Feb 23:1-7. [Epub ahead of print]
- BENHAM, R.W. Cryptococci-their identification by morphology and by serology. **J. Infect. Dis.**, v. 57, p. 255-274, 1935.
- BHARTTACHARJEE, A. K.; BENNETT, J. E.; GLAUDEMANS, C. P. J. Capsular polysaccharides of *Cryptococcus neoformans* . **Rev. Infect. Dis.**, v. 6, p. 619-624, 1984.
- BICANIC, T.; HARRISON, T.; NIEPIEKLO, A.; DYAKOPU, N.; MEINTJES, G. Symptomatic relapse of HIV-associated cryptococcal meningitis after initial fluconazole monotherapy: the role of fluconazole resistance and immune reconstitution. **Clin Infect Dis.**, v.43, p.1069-73, 2006.
- BII, C. C.; MAKIMURA, K.; ABE, S.; TAGUCHI, H.; MUGASIA, O. M.; REVATHI, G.; WAMAE, N. C.; KAMIYA, S. Antifungal drug susceptibility of *Cryptococcus neoformans* from clinical sources in Nairobi, Kenya. **Mycoses**, v.50, p.25-30, 2007.
- BOEKHOUT, T.; SCORZETTI, G. Differential killer toxin sensitivity patterns of varieties of *Cryptococcus neoformans*. **J. Med. Vet. Mycol.**, v. 35, p.147-149, 1997.

- BOEKHOUT, T.; THEELEN, B.; DIAZ, M.; FELL, J.W.; HOP, W. C. J.; ALBERTIN, E. C. A.; DROMER, F.; MEYER, W. Hibrid genotypes in pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans*. **Microbiology**, v. 147, p. 891-907, 2001.
- BRANDT, M. E.; HUTWAGENER, L. C.; KLUG, L. A. ; BAUGHMAN, W. S.; RIMLAND, D.; GRAVISS, E. D.; HAMILL, R. J.; THOMAS, C.; PAPPAS, P. G.; REINGOLD, A. L.; PINNER R. W. Molecular subtype distribution of *Cryptococcus neoformans* in four areas of the United States. **J. Clin. Microb.**, v.34, p. 912-917, 1996.
- BRANDT, M. E.; PFALLER, M. A.; HAJJEH, R. A.; HAMILL, R. J.; PAPPAS, P. G.; REINGOLD, A. L.; RIMLAND, D.; WARNOCK, D. W.; Cryptococcal Disease Active Surveillance Group. 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, p.3065-9, 2001.
- CALVO, B. M.; COLOMBO, A. L.; FISCHMAN, O.; SANTIAGO, A.; THOMPSON, L.; LAZERA, M.; TELLES, F.; FUKUSHIMA, K.; NISHIMURA, K.; TANAKA, R.; MYIAJY, M., MORETTI-BRANCHINI, L. Antifungal susceptibilities, varieties and electrophoretic karyotypes of clinical isolates of *Cryptococcus neoformans* from Brasil, Chile, and Venezuela. **J. Clin. Microbiol.**, v. 39, p. 2348-2350, 2001.
- CANNON, R. D.; LAMPING, E.; HOLMES, A. R.; NIIMI, K.; BARET, P. V.; KENIYA, M. V.; TANABE, K.; NIIMI, M.; GOFFEAU, A.; MONK, B. C. Efflux-mediated antifungal drug resistance. **Clin Microbiol Rev.**, v.22, p.291-321, 2009.
- CAREY JC, MARTINEZ L, BALKEN E, LEEN-MITCHELL M, ROBERTSON J. Determination of human teratogenicity by the astute clinician method: review of illustrative agents and a proposal of guidelines. **Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.**, v.85, p.63-8, 2008.
- CARRILLO-MUÑOZ, A. J.; GIUSIANO, G.; EZKURRA, P. A.; QUINDÓS, G. Antifungal agents: mode of action in yeast cells. **Rev Esp Quimioter.**, v.19, p.130-9, 2006.
- CARRILLO-MUÑOZ, A. J.; QUINDÓS, G; DEL VALLE, O.; SANTOS, P.; GIUSIANO, G.; EZKURR, A P. A.; ESTIVILL, M. D.; CASALS, J. B. Activity of caspofungin and voriconazole against clinical isolates of *Candida* and other

medically important yeasts by the CLSI M-44A disk diffusion method with Neo-Sensitabs tablets. **Chemotherapy.**, v.54, p.38-42, 2008.

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

CASALI, A. K.; GOULART, L.; SILVA, L. K. R.; RIBEIRO, A. M.; AMARAL, A. A.; ALVES, S. H.; SCHRANK, A.; MEYER, W.; VAINSTEIN, M. H. Molecular typing of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* isolates in the Brazilian state Rio Grande do Sul. **FEMS Yeast Research**, v. 3, p. 405-415, 2003.

CHARLIER, C.; NIELSEN, K.; DAOU, S.; BRIGITTE, M.; CHRETIEN, F.; DROMER, F. Evidence of a role for monocytes in dissemination and brain invasion by *Cryptococcus neoformans*. **Infect Immun.**, v.1, p.120-7, 2008.

CHATURVEDI, V.; RAMANI, R.; PFALLER, M. A. Collaborative study of the NCCLS and flow cytometry methods for antifungal susceptibility testing of *Candida albicans*. **J Clin Microbiol.**, v. 42, p. 2249-2251, 2004.

CHEN, S. C.; SORRELL, T. C. Antifungal agents. **Med J Aust.**, v. 187, p. 404-409, 2007.

CHERNIAK, R.; SUDSTROM, J.B. Polysaccharide antigens of the capsule of *Cryptococcus neoformans*. **Infect. Immun.**, v. 62, p. 1507-1512, 1994.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard M27-A. National Committee for Clinical Laboratory Standards 1997; Wayne, PA.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard M27-A2, 2nd ed. 2002. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.

CORDELL, G. A.; COLVARD, M. D. Some thoughts on the future of ethnopharmacology. **J. Ethnopharmacol.**, v. 100, p. 5-14, 2005.

COS, P.; VLIETINCK, A.J.; BERGHE, D.V.; MAES, L. Anti-infective potential of natural products: how to develop a stronger in vitro 'proof-of-concept'. **J. Ethnopharmacol.**, v. 106, p. 290-302, 2006.

CRUZ, M. C.; SANTOS, P. O.; BARBOSA, A. M. J. R.; DE MÉLO, D. L.; ALVIANO, C. S.; ANTONIOLLI, A. R.; ALVIANO, D. S.; TRINDADE, R. C.

Antifungal activity of Brazilian medicinal plants involved in popular treatment of mycoses. **J Ethnopharmacol.**, v.111, p.409-12, 2007.

CUENCA-ESTRELLA, M.; DÍAZ-GUERRA, T. M.; MELLADO, E.; RODRÍGUEZ-TUDELA, J. L. Influence of glucose supplementation and inoculum size on growth kinetics and antifungal susceptibility testing of *Candida* spp. **J Clin Microbiol.**, v.39, p.525-32, 2001.

DATTA, K.; BARTLETT, K. H.; MARR, K. A. *Cryptococcus gattii*: Emergence in Western North America: Exploitation of a Novel Ecological Niche. **Interdiscip Perspect Infect Dis.**, v.176532, 2009.

DAVEY, H. M. & KELL, D. B. Flow cytometry and cell sorting of heterogeneous microbial populations: the importance of single-cell analyses. **Microbiol Rev.**, v.60, p.641–96, 1996.

DE SARRO, A.; LA CAMERA, E.; FERA, M. T. New and investigational triazoleagents for the treatment of invasive fungal infections. **J Chemother.**, v.20, p.661-71, 2008.

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

DELGADO, A. C.; TAGUCHI, H.; MIKAMI, Y.; MYIAJY, M.; VILLARES, M. C.; MORETTI, M. L. Human cryptococcosis: relationship of environmental and clinical strains of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* from urban and rural areas. **Mycopathologia**, v. 159, p. 7-11, 2005.

DEREINSKI, S. C.; STEVENS, D. A. Caspofungin. **Clin. Infect. Dis.**, v.36, p.1445–1457, 2003.

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

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

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

DROMER, F.; BERNEDE-BAUDUIN, C.; GUILLEMOT, D.; LORTHOLARY, O.; French Cryptococcosis Study Group. Major role for amphotericin B-flucytosine combination in severe cryptococcosis **PLoS ONE**, v.3, 2008.

D' SOUZA, C. A.; HAGEN, F.; BOEKHOUT, T.; COX, G. M.; HEITMAN, J. Investigation of the basis of virulence in serotype A strains of *Cryptococcus neoformans* from apparently immunocompetent individuals. **Curr. Genet.**, v. 46, p. 92-102, 2004.

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

ELLIS, D. Amphotericin B: spectrum and resistance. **J Antimicrob Chemother**, v.49 Suppl 1, p.7-10. Review, 2002.

ESPINEL-INGROFF, A. Mechanisms of resistance to antifungal agents: Yeasts and filamentous fungi. **Expert. Opin. Pharmacother.**, v.9, p.175-1791. 2008.

EUROPEAN COMMITTEE ON ANTIBIOTIC SUSCEPTIBILITY. Method for determination of minimal inhibitory concentration (MIC) by broth dilution of fermentative yeasts. Discussion document E.Dis 7.1. Taufkirchen, Germany: European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases; 2002.

FENG, X.; YAO, Z.; REN, D.; LIAO, W.; WU, J. Genotype and mating type analysis of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* isolates from China that mainly originated from non-HIV-infected patients. **FEMS Yeast Res.**, v.8, p.930-8, 2008a.

FENG, X.; YAO, Z.; REN, D.; LIAO, W. Simultaneous identification of molecular and mating types within the *Cryptococcus* species complex by PCR-RFLP analysis. **J Med Microbiol.**, v.57, p.1481-90, 2008b.

FERNANDES, D. C.; REGASINI, L. O.; VELLOSA, J. C.; PAULETTI, P. M.; CASTRO-GAMBOA, I.; BOLZANI, V. S.; OLIVEIRA, O. M.; SILVA, D. H. Myeloperoxidase inhibitory and radical scavenging activities of flavones from *Pterogyne nitens*. **Chem Pharm Bull**, v.56, p.723-6, 2008.

FERREIRA, M. E.; COLOMBO, A. L.; PAULSEN, I.; REN, Q.; WORTMAN, J.; HUANG, J.; GOLDMAN, M.H.; GOLDMAN, G.H. The ergosterol biosynthesis pathway, transporter genes, and azole resistance in *Aspergillus fumigatus*. **Med Mycol.**, v. 43, p. 313-319, 2005.

- FRIEDMAN, G.D.; JEFFREY FESSEL, W.; UDALTSOVA, N.V.; HURLEY, L.B. Cryptococcosis: the 1981-2000 epidemic. **Mycoses**, v. 48, p. 122-125, 2005.
- GARBER, G. An overview of fungal infections. **Drugs**, v. 61, p.1-12, 2001.
- GARCIA-HERMOSO, D.; JANBON, G.; DROMER, F. Epidemiological evidence for dormant *Cryptococcus neoformans* infection. **J. Clin. Microbiol.**, v. 37, p. 3204-3209, 1999.
- GIORGETTI, M.; NEGRI, G.; RODRIGUES, E. Brazilian plants with possible action on the central nervous system - a study of historical sources from the 16th to 19th century. **J. Ethnopharmacol.**, v.109, p. 338-347, 2007.
- GIROIS, S. B.; CHAPUIS, F.; DECULLIER, E.; REVOL, B. G. Adverse effects of antifungal therapies in invasive fungal infections: review and meta-analysis. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis.**, v. 25, p. 138-49, 2006.
- GOLDMAN, G. H.; DA SILVA FERREIRA, M. E.; DOS REIS MARQUES E.; SAVOLDI, M.; PERLIN, D.; PARK, S.; GODOY MARTINEZ, P. C.; GOLDMAN, M. H.; COLOMBO, A. L. Evaluation of fluconazole resistance mechanisms in *Candida albicans* clinical isolates from HIV-infected patients in Brazil. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 50, p. 25-32, 2004.
- GOMEZ-LOPEZ, A.; ABERKANE, A.; PETRIKKOU, E.; MELLADO, E.; RODRIGUEZ-TUDELA, J. L.; CUENCA-ESTRELLA, M. Analysis of the influence of Tween concentration, inoculum size, assay medium, and reading time on susceptibility testing of *Aspergillus* spp. **J Clin Microbiol.**, v.43, p.1251-5, 2005.
- GOMEZ-LOPEZ, A.; ZARAGOZA, O.; DOS ANJOS MARTINS, M.; MELHEM M. C.; RODRIGUEZ-TUDELA, J. L.; CUENCA-ESTRELLA, M. In vitro susceptibility of *Cryptococcus gattii* clinical isolates. **Clin Microbiol Infect.**, v.14, p.727-30, 2008.
- GONZALO, T.; GARCÍA GOÑI, M.; MUÑOZ-FERNÁNDEZ, M. A. Socio-economic impact of antiretroviral treatment in HIV patients. An economic review of cost savings after introduction of HAART. **AIDS Rev.**, v.11, p.79-90, 2009. Review.
- GOODWIN, S. D.; CLEARY, J. D.; WALAWANDER, C. A.; TAYLOR, J. W.; GRASELA, T. H JR. Pretreatment regimens for adverse events related to infusion of amphotericin B. **Clin Infect Dis.**, v.20, p.755-761,1995.

- GREEN, L.; PETERSEN, B.; STEIMEL, L.; HAEBER, P.; CURRENT, W. Rapid determination of antifungal activity by flow cytometry. **J. Clin. Microbiol.**, v. 32, p. 1088-1091, 1994.
- GROLL, A. H.; MCNEIL GRIST, L. Current challenges in the diagnosis and management of invasive fungal infections: report from the 15th International Symposium on Infections in the Immunocompromised Host: Thessaloniki, Greece, 22-25 June 2008. **Int. J. Antimicrob Agents**, v.33, p.101-4, 2008.
- GUERRERO, A.; FRIES, B. C. Phenotypic switching in *Cryptococcus neoformans* contributes to virulence by changing the immunological host response. **Infect Immun.**, v.76, p.4322-31, 2008.
- GULLECE, A. A.; ASLAN, M.; SOKMEN, F.; SAHIN, A.; ADIGUZEL, G.; AGAR, G.; SOKMEN, A. Screening the antioxidant and antimicrobial properties of the lichens *Parmelia saxatilis*, *Platismatia glauca*, *Ramalina pollinaria*, *Ramalina polymorpha* and *Umbilicaria nylanderian*. **Phytomedicine**, v.13, p.515–21, 2006.
- HADACEK, F.; GREGER, H. Testing of antifungal natural products: methodologies, comparability of results and assay of choice. **Phytochem. Anal**, v.11; p. 137-147, 2000.
- HARVEY, A. L. Natural products as a screening resource. **Curr Opin Chem Biol.**, v.11, p.480-4, 2007.
- HEINECKE, J. W.; LI, W.; DAEHNKE, H. L.; GOLDSTEIN, J. A. Dityrosine, a specific marker of oxidation, is synthesized by the myeloperoxidase–hydrogen peroxide system of human neutrophils and macrophages, **J. Biol. Chem.**, v. 268, p.4069–4077, 1993.
- HOF, H. Developments in the epidemiology of invasive fungal infections - implications for the empiric and targeted antifungal therapy. **Mycoses**. v. 51, p. 1-6, 2008.
- HOLETZ, F. B.; PESSINI, G. L.; SANCHES, N. R.; CORTEZ, D. A.; NAKAMURA, C.V.; FILHO, B.P. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, v.7, p.1027-1031, 2002.
- HUSTON, S. M.; MODY, C. H. Cryptococcosis: an emerging respiratory mycosis. **Clin Chest Med.**, v.30, p.253-64, 2009.

- IGREJA, R. P.; LAZERA, M. S.; WANKE, B.; GALHARDO, M. C.; KIDD, S. E.; MEYER, W. Molecular Epidemiology of *Cryptococcus neoformans* isolates from AIDS patients of the Brazilian City, Rio de Janeiro. **Med. Mycol.**, v. 42, p. 229-238, 2004.
- IKEDA, R.; SHINODA, T.; FUKAZAWA, Y.; KAUFMAN, L. Antigenic characterization of *Cryptococcus neoformans* serotypes and its application to serotyping of clinical isolates. **J. Clin. Microbiol.**, v. 16, p. 22-29, 1982.
- JAIN, N.; WICKES, B.L.; KELLER, S.M.; FU, J.; CASADEVALL, A.; JAIN, P.; RAGAN, M.A.; BANERJEE, U.; FRIES, B.C. Molecular epidemiology of clinical *Cryptococcus neoformans* strains from India. **J. Clin. Microbiol.**, v. 43, p. 5733-5742, 2005.
- JARVIS, J.N.; DROMER, F.; HARRISON, T. S.; LORTHOLARY, O. Managing cryptococcosis in the immunocompromised host. **Curr Opin Infect Dis.**, v.21, p.596-603, 2008.
- JOHANN, S.; PIZZOLATTI, M. G.; DONNICI, C. L. et al. Antifungal properties of plants used in Brazilian traditional medicine against clinically relevant fungal pathogens. **Braz. J. Microbiol.**, v. 38, p.632-637, 2007.
- JOHNSON, E.; ESPINEL-INGROFF, A.; SZEKELY, A.; HOCKEY, H.; TROKE, P. Activity of voriconazole, itraconazole, fluconazole and amphotericin B in vitro against 1763 yeasts from 472 patients in the voriconazole phase III clinical studies. **Int J Antimicrob Agents.**, v.32, p.511-4, 2008.
- KAJI, Y.; YAMAMOTO, E.; HIRAOKA, T.; OSHIKA, T. Toxicities and pharmacokinetics of subconjunctival injection of liposomal amphotericin B. **Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.**, v.247, p.549-53, 2008.
- KANTARCIOGLU, A. S.; BOEKHOUT, T.; YUCEL, A.; ALTAS, K. Susceptibility testing of *Cryptococcus diffluens* against amphotericin B, flucytosine, fluconazole, itraconazole, voriconazole and posaconazole. **Med Mycol.**, v. 47, p.169-76, 2008.
- KIRK, S. M.; CALLISTER, S. M.; LIM, L. C. L.; SCHELL, R. F. Rapid susceptibility testing of *Candida albicans* by flow cytometry. **J Clin Microbiol.**, v.35, p.358-63, 1997.
- KWON-CHUNG, K.J.; BENNETT, J.E. Epidemiologic differences between the two varieties of *Cryptococcus neoformans*. **Am. J. Epidemiol.**, v. 120, p. 123-130, 1984.

- KWON-CHUNG, K. J.; BOEKHOUT, T.; FELL, J. W.; DIAZ, M. Proposal to conserve the name *Cryptococcus gattii* against *C. hondurianus* and *C. bacillisporus* (Basidiomycota, Hymenomycetes, Tremellomycetidae). **Taxonomy**, v. 51, p. 804–806, 2002.
- LAERUM, O. D. & FARSUND, T. Clinical application of flow cytometry: a review. **Cytometry**; v. 2, p.1–13, 1981.
- LATOUCHE, G. N.; HUYNH, M.; SORRELL, T. C.; MEYER, W. PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the phospholipase B gene (PLB1) for subtyping of *Cryptococcus neoformans* isolates. **App. Environ. Microbiol.**, v.69, p. 2080-2086, 2003.
- LEAL, A. L.; FAGANELLO, J.; FUENTEFRIA, A. M.; BOLDO, J. T.; BASSANESI, M. C.; VAINSTEIN, M. H. Epidemiological profile of cryptococcal meningitis patients in Rio Grande do Sul, Brazil. **Mycopathologia.**, v.2, p.71-5, 2008.
- LEE, W.; KWAK, Y. Antifungal susceptibility testing of *Candida* species by flow cytometry. **J. Korean Med. Sci.**, v. 14, p. 21–26, 1999.
- LENGELER, K.B.; FOX, D.S.; FRASER, J.A.; ALLEN, A.; FORRESTER, K.; DIETRICH, F.S.; HEITMAN, J. Mating-type locus of *Cryptococcus neoformans*: a step in the evolution of sex chromosomes. **Eukaryot. Cell.**, v. 1, p. 704-718, 2002.
- LIAO, R.; RENNIE, R.; TALBOT, J. A. Assessment of the effect of amphotericin B on the vitality of *Candida albicans*. **Antimicrob Agents Chemother.**, v.43, p. 1034–41, 1999.
- LIN, X AND HEITMAN, J. The Biology of the *Cryptococcus neoformans* Species Complex. **Annu Rev. Microbiol.**, v. 60, p. 69-105, 2006.
- LIU, M.; SEIDEL, V.; KATERERE, D. R.; GRAY, A. I. Colorimetric broth microdilution method for the antifungal screening of plant extracts against yeasts. **Methods**, v.42, p.325-9, 2007.
- LÓRÁND, T.; KOCSIS, B. Recent advances in antifungal agents. **Mini Rev Med Chem.**, v.7(9), p.900-11. Review, 2007.
- LORENZI, H. Árvores Brasileiras: Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas do Brasil, **Plantarum**, Nova Odessa, p. 162, 1998.
- LOZANO-CHIU, M.; PAETZNICK, V.L.; GHANNOUM, M.A.; REX, J.H. Detection of resistance to amphotericin B among *Cryptococcus neoformans*

- clinical isolates: performances of three different media assessed by using E-test and National Committee for Clinical Laboratory Standards M27-A methodologies. **J. Clin. Microbiol.**, v. 36, p. 2817–2822, 1998.
- MACIEL, A. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA, JR.; VALDI, R. F.; GRYNBERG, N. F.; ECHEVARRIA, A. Medicinal plants: the need for multidisciplinary scientific studies. **Quím. Nova.**, v.25, p.429-438, 2002.
- MAREGESI, S. M.; PIETERS, L.; NGASSAPA, O. D.; APERS, S.; VINGERHOETS, R.; COS, P.; BERGHE, D. A.; VLIETINCK, A. J. Screening of some Tanzanian medicinal plants from Bunda district for antibacterial, antifungal and antiviral activities. **J Ethnopharmacol.** v.119, p.58-66, 2008.
- MARICHAL, P.; VANDEN BOSSCHE, H. Mechanisms of resistance to azole antifungals. **Acta Biochim Pol.**, v.42, p. 509-16. Review, 1995.
- MARTINEZ-ROSSI, N. M.; PERES, N. T.; ROSSI, A. Antifungal resistance mechanisms in dermatophytes. **Mycopathologia.**, v.5-6, p.369-83, 2008.
- MARTINS, M. A.; PAPPALARDO, M. C.; MELHEM, M. S.; PEREIRA-CHIOCCOLA, V. L. Molecular diversity of serial *Cryptococcus neoformans* isolates from AIDS patients in the city of São Paulo, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz.**, v. 102, p. 777-84, 2007.
- MATSUMOTO, M.T.; FUSCO-ALMEIDA, A.M.; BAEZA, L.C.; MELHEM, M.S.C. & MENDES-GIANNINI, M.J.S. Genotyping, serotyping and determination of mating-type of *Cryptococcus neoformans* clinical isolates from São Paulo State, Brazil. **Revista Do Instituto De Medicina Tropical De São Paulo**, reg.45/06, 2007.
- MÉAN, M.; MARCHETTI, O.; CALANDRA, T. Bench-to-bedside review: *Candida* infections in the intensive care unit. **Crit Care.**, v.204, p.2008.
- MEYER, W.; MARSZEWSKA, K.; AMIRMOSTOFIAN, M.; IGREJA, R. P.; HARDTKE, C.; METHLING, K.; VIVIANI, M. A.; CHINDAMPORN, A.; SUKROONGREUNG, S.; JOHN, M. A.; ELLIS, D. H.; SORREL, T. C. Molecular typing of global isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* by polymerase chain reaction fingerprinting and randomly amplified polymorphic DNA – a pilot study to standardize techniques on which to base a detailed epidemiological survey. **Electrophoresis**, v. 20, p. 1790-1799, 1999.
- MEYER, W.; CASTAÑEDA, A.; JACKSON, S.; HUYNH, M.; CASTAÑEDA, E.; IBERO AMERICAN CRYPTOCOCCAL STUDY GROUP. Molecular Typing of

- IberoAmerican *Cryptococcus neoformans* isolates. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 9, p. 189-195, 2003.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL - BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO da Secretaria de Vigilância em Saúde - Programa Nacional de DST e Aids, 2007.
- MITCHELL, T. G.; PERFECT, J. Cryptococcosis in the era of Aids – 100 years after the discovery of *Cryptococcus neoformans*. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 8, p. 515-548, 1995.
- MÖLLER, E. M.; BAHNWEIG, G.; SANDERMANN, H.; GEIGER, H. H. A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies, and infected plant tissues. **Nucleic Acids Res.**, v.20, p.6115-6, 1992.
- MONK, B. C.; GOFFEAU, A. Outwitting multidrug resistance to antifungals. **Science**, v.321, p.367-9, 2008.
- MOREIRA, A. C. ; MÜLLER, A. C. A. ; PEREIRA, JR, N. ; ANTUNES, M. A. S. Harmaceutical patents on plant derived materials in Brazil: policy, law and statistics. **World. Patent. Inf.**, v. 28, p.34-42, 2006.
- NASCIMENTO, G. G. F.; LOCATELLI, J.; FREITAS, PAULO C. Atividade de extratos vegetais e fitofármacos sobre bactérias resistentes a antibióticos. **Braz. J. Microbiol.**, v. 31, p. 247-256, 2000.
- NGUYEN, M. H.; YU, C.Y. In vitro comparative efficacy of voriconazole and itraconazole against fluconazole-susceptible and -resistant *Cryptococcus neoformans* isolates. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 42, p. 471–472, 1998.
- NISHIKAWA, M.M.; LAZERA, M.S.; BARBOSA, G.G.; TRILLES, L.; BALASSIANO, B.R.; MACEDO, R.C.; BEZERRA, C.C.; PEREZ, M.A.; CARDARELLI, P.; WANKE, B. Serotyping of 467 *Cryptococcus neoformans* isolates from clinical and environmental sources in Brazil: analysis of host and regional patterns. **J. Clin. Microbiol.**, v. 41, p. 73-77, 2003.
- NORDOY, I.; GAUSTAD, P. Drug resistance and invasive fungal infections. **Tidsskr Nor Laegeforen.**,v.128, p.2607-11, 2008.
- ODDS, F. C. Genomics, molecular targets and the discovery of antifungal drugs. **Rev Iberoam Micol.**, v.22, p.229-372005, 2005.
- OLIVEIRA, D. M. T. Morfo-anatomia do embrião de leguminosas arbóreas nativas. **Rev. bras. Bot.**, v.22, n.3, 1999.

- ORDONEZ, J. V.; WEHMAN, N. M. Amphotericin B susceptibility of *Candida* species assessed by rapid flow cytometric membrane potential assay. **Cytometry**, v. 22, p. 154–157, 1995.
- PALUSZYNSKI, J. P.; KLASSEN, R.; MEINHARDT, F. Genetic prerequisites for additive or synergistic actions of 5-fluorocytosine and fluconazole in baker's yeast. **Microbiology**, v.154, p.3154-64, 2008.
- PAPPALARDO, M. C.; PASCHOAL, R. C.; MELHEM, M. S. AIDS-associated central nervous system cryptococcosis: a Brazilian case study. **AIDS**, v.14, p.1971-2, 2007.
- PAPPALARDO, M. C.; SZESZS, M. W.; MARTINS, M. A.; BACETI, L. B.; BONFIETTI, L. X.; PURISCO, S. U.; BAEZ, A. A.; MELHEM, M. S. Susceptibility of clinical isolates of *Cryptococcus neoformans* to amphotericin B using time-kill methodology. **Diagn Microbiol Infect Dis.**, v.64, p.146-51, 2009.
- PASQUALOTTO, A. C.; ROSA, D. D.; MEDEIROS, L. R.; SEVERO, L. C. Candidaemia and cancer: patients are not all the same. **BMC Infect Dis.**, v.16, p.6:50, 2006.
- PASSOS, X. S.; SANTOS, SDA. C.; FERRI, P. H.; FERNANDES, ODE F.; PAULA TDE. F.; GARCIA A. C.; SILVA, MDO. R. Antifungal activity of *Caryocar brasiliensis* (Caryocaraceae) against *Cryptococcus neoformans*. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 35, p. 623-627, 2002.
- PAULI, A.; KUBECZKA, K.H. Evaluation of inhibitory data of essential oil constituents obtained with different microbiological testing methods. In: FRANZ, C.; MATHE, A.; BUCHBAUER, G. (Ed). Essential oils: basic and applied research. **Carol Stream: Allured Pub. Corp.**, p.33-36, 1996.
- PAULI, A. Anticandidal low molecular compounds from higher plants with special reference to compounds from essential oils. **Med Res Rev.**, v.26, p.223-68, 2006.
- PEMÁN, J.; CANTÓN, E.; ESPINEL-INGROFF, A. Antifungal drug resistance mechanisms. **Expert Rev Anti Infect Ther.**, v.7, p.453-60, 2009.
- PÉREZ, C.; DOLANDE, M.; MOYA, M.; ROSELLÓ, A.; DE CAPRILES, C. R.; LANDAETA, M. E.; MATA-ESSAYAG, S. *Cryptococcus neoformans*, *Cryptococcus gattii*: serotypes in Venezuela. **Mycopathologia.**, v.3, p.149-53, 2008.

- PERFECT, J R; COX, G M. Drug resistance in *Cryptococcus neoformans*. **Drug Resist Update.**, v.2, p.259–269, 1999.
- PETERMANS, W.; BOBBAERS, H.; VERHAEGEN, J.; VANDEPITTE, J. Fluconazole-resistant *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* in an AIDS patient. **Acta Clin. Belg.**, v. 48, p. 405-409, 1993.
- PEYRON, F. A.; FAVEL, H.; GUIRAUD-DAURIAC, M.; EL MZIBRI, M.; CHASTIN, C.; DUMENIL, G.; REGLI, P. Evaluation of a flow cytofluorometric method for rapid determination of amphotericin B susceptibility of yeast isolates. **Antimicrob. Agents Chemother**, v. 41, p. 1537–1540, 1997.
- PFALLER, M.A.; MESSER, S.A.; BOYKEN, L.; RICE, C.; TENDOLKAR, S.; HOLLIS, R.J.; DOERN, G.V.; DIEKEMA, D.J. Global trends in the antifungal susceptibility of *Cryptococcus neoformans* (1990 to 2004). **J. Clin. Microbiol.**, v. 43, p. 2163-2167, 2005.
- PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J.; SHEEHAN, D. J. Interpretive breakpoints for fluconazole and *Candida* revisited: a blueprint for the future of antifungal susceptibility testing. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 19, p. 435-447. Review, 2006.
- PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J.; GIBBS, D. L.; NEWELL, V. A.; BIJIE, H.; DZIERZANOWSKA, D.; KLIMKO, N. N.; LETSCHER-BRU, V.; LISALOVA, M.; MUEHLETHALER, K.; RENNISON, C.; ZAIDI, M.; the Global Antifungal Surveillance Group. Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Study, 1997 to 2007: A 10.5-Year Analysis of Susceptibilities of Noncandidal Yeast Species to Fluconazole and Voriconazole Determined by CLSI Standardized Disk Diffusion Testing. **J Clin Microbiol.**, v.47, p.117-23, 2008.
- PIETSCHMANN, S.; HOFFMANN, K.; VOGET, M.; PISON, U. Synergistic effects of Miconazole and Polymyxin B on microbial pathogens. **Vet Res Commun.**, v. 33, p. 489-505, 2008.
- PINA-VAZ, C.; RODRIGUES, A. G.; SANSONETTY, F.; MARTINEZ-OLIVEIRA, J.; FONSECA, A. F.; MARDH, P. A. Antifungal activity of local anesthetics against *Candida* species. **Infect. Dis. Obstet. Gynecol.**, v. 8, p. 124-137, 2000a.
- PINA-VAZ, C.; SANSONETTY, F.; RODRIGUES, A. G.; MARTINEZ-DE-OLIVEIRA, J.; FONSECA, A. F.; MARDH, P. A. Antifungal activity of ibuprofen

alone and in combination with fluconazole against *Candida* species. **J. Med. Microbiol.**, v.49, p.831–840, 2000b.

PINA-VAZ, C.; SANSONETTY, F.; RODRIGUES, A. G.; COSTA-OLIVEIRA, S.; MARTINEZ-OLIVEIRA, J.; FONSECA, A. F. Susceptibility to fluconazole of *Candida* clinical isolates by FUN-1 staining with flow cytometry and epifluorescence microscopy. **J. Med. Microbiol.**, v. 50, p. 375-382, 2001.

PINA-VAZ, C.; GONÇALVES, R. A.; PINTO, E. Antifungal activity of *Thymus* oils and their major compounds. **J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol**, v. 18, p. 73–78, 2004.

PINA-VAZ, C.; RODRIGUES, A. G.; COSTA-OLIVEIRA, S.; ESPINEL-INGROFF, A. Comparason of two probes for testing susceptibilities of pathogenic yeasts to voriconazol, itraconazol and caspofungin by flow cytometry. **J. Clin. Microbiol.**, v. 43, p. 4674-4679, 2005.

PINTO, E.; PINA-VAZ, C.; SALGUEIRO, L.; GONÇALVES, M. J.; COSTA-DE-OLIVEIRA, S.; CAVALEIRO, C.; PALMEIRA, A.; RODRIGUES, A.; MARTINEZ-DE-OLIVEIRA, J. Antifungal activity of the essential oil of *Thymus pulegioides* on *Candida*, *Aspergillus* and dermatophyte species. **J Med Microbiol.**, v.55, p.1367-73, 2006.

PORE, R. S. Antibiotic susceptibility testing by flow cytometry. **J. Antimicrob. Chemother**, v. 34, p. 613–627, 1994.

PORE, R. S. Antibiotic susceptibility testing of *Candida albicans* by flow **Curr. Microbiol.**,v.20, p.323–8, 1997.

RAMANI, R.; RAMANI, A.; WONG, S. J. Rapid flow cytometric susceptibility testing of *Candida albicans*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 35, p. 2320–2324, 1997.

RAMANI, R., AND CHATUVERDI, V. Flow cytometry antifungal susceptibility testing of pathogenic yeasts other than *Candida albicans* and comparison with the NCCLS broth dilution test. **Antimicrob. Agents Chemother**, v. 44, p. 2752-2758, 2001.

RAMANI, R.; GANGWAR, M.; CHATURVEDI, V. Flow cytometry antifungal susceptibility testing of *Aspergillus fumigatus* and comparison of mode of action of voriconazole vis-à-vis amphotericin B and itraconazole. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 47, p.3627-9, 2003.

RAUTEMAA, R.; RICHARDSON, M.; PFALLER, M. A.; PERHEENTUPA, J.; SAXÉN, H. Activity of amphotericin B, anidulafungin, caspofungin, micafungin,

posaconazole, and voriconazole against *Candida albicans* with decreased susceptibility to fluconazole from APECED patients on long-term azole treatment of chronic mucocutaneous candidiasis. **Diagn Microbiol Infect Dis.**, v. 62, p. 182-5, 2008.

REGASINI, L. O.; VELLOSA, J. C.; SILVA, D. H.; FURLAN, M.; DE OLIVEIRA O. M.; KHALIL, N. M.; BRUNETTI, I. L.; YOUNG, M. C.; BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V. S. Flavonols from *Pterogyne nitens* and their evaluation as myeloperoxidase inhibitors. **Phytochemistry**, v. 69(8), p. 1739-44, 2008.

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

RIBEIRO, M. A.; NGAMSKULRUNGROJ, P. Molecular characterization of environmental *Cryptococcus neoformans* isolated in Vitoria, ES, Brazil. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v.50, p.315-20, 2008.

RODRIGUEZ-TUDELA, J. L.; BERENQUER, J.; MARTINEZ-SUAREZ, J. V.; SANCHEZ R. Comparison of a spectrophotometric microdilution method with RPMI-2% glucose with the National Committee for Clinical Laboratory Standards reference macrodilution method M27-P for in vitro susceptibility testing of amphotericin B, flucytosine, and fluconazole against *Candida albicans*. **Antimicrob. Agents. Chemother.**, v. 40, p.1998-2003, 1996.

RODRÍGUEZ-TUDELA, J. L.; MARTÍN-DÍEZ, F.; CUENCA-ESTRELLA, M.; RODERO, L.; CARPINTERO, Y.; GORGOJO, B. Influence of shaking on antifungal susceptibility testing of *Cryptococcus neoformans*: a comparison of the NCCLS standard M27A medium, buffered yeast nitrogen base, and RPMI-2% glucose. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 44, p.400-4, 2000.

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

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

- ROSSIT, A. R.; GONÇALVES, A. C.; FRANCO, C.; MACHADO, R. L. Etiological agents of diarrhea in patients infected by the human immunodeficiency virus-1: a review. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v.51, p.59-65, 2009.
- RUDENSKY, B.; BROIDIE, E.; YINNON, A. M.; WEITZMAN, T.; PAZ, E.; KELLER, N.; RAVEH, D. Rapid flow-cytometric susceptibility testing of *Candida* species. **J Antimicrob Chemother**, v. 55, p.106-9, 2005.
- RUDENSKY, B.; BROIDE, E.; BERKO, N.; WIENER-WELL, Y.; YINNON, A. M.; RAVEH, D. Direct fluconazole susceptibility testing of positive *Candida* blood cultures by flow cytometry. **Mycoses**, v. 51, p.200-4, 2008.
- SAJADI, M. M.; RODDY, K. M.; CHAN-TACK, K. M.; FORREST, G. N. Risk factors for mortality from primary cryptococcosis in patients with HIV. **Postgrad Med.**, v.121, p.107-13, 2009.
- SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. 999p.
- SÁNCHEZ, A.; ESCANDÓN, P.; CASTAÑEDA, E. In vitro determination of virulence factors activity associated with several *Cryptococcus neoformans* clinical isolates. **Rev Iberoam Micol.**, v.25, p.145-9, 2008.
- SANGLARD, D.; ISCHER, F.; MONOD, M.; BILLE, J. Cloning of *Candida albicans* genes conferring resistance to azole antifungal agents: characterization of CDR2, a new multidrug ABC transporter gene. **Microbiology.**, v.143, p.405-16, 1997.
- SANGLARD, D.; ODDS, F. C. Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. **Lancet Infect. Dis.**, v. 2, p. 73-85, 2002.
- SANTOS, W. R.; MEYER, W.; WANKE, B.; COSTA, S. P.; TRILLES, L.; NASCIMENTO, J. L.; MEDEIROS, R.; MORALES, B. P.; BEZERRA, C DE C; DE MACÊDO, R. C.; FERREIRA, S. O.; BARBOSA, G. G.; PEREZ, M. A.; NISHIKAWA, M. M.; LAZÉRA, M DOS S. Primary endemic *Cryptococcosis gattii* by molecular type VGII in the state of Pará, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz.**, v. 103, p. 813-8, 2008.
- SCORZONI, L.; BENADUCCI, T.; FUSCO-ALMEIDA, A. M.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V.; MENDES-GIANNINI, M. J. S. Comparative study of disk diffusion and microdilution methods for evaluation of antifungal activity of natural

compounds against medical yeasts *Candida spp* and *Cryptococcus sp*, **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 28, p. 25 - 34, 2007a.

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

SEGAL, B. H.; HERBRECHT, R.; STEVENS, D. A.; OSTROSKY-ZEICHNER, L.; SOBEL, J.; VISCOLI, C.; WALSH, T. J.; MAERTENS, J.; PATTERSON, T. F.; PERFECT, J. R.; DUPONT, B.; WINGARD, J. R.; CALANDRA, T.; KAUFFMAN, C. A.; GRAYBILL, J. R.; BADEN, L. R.; PAPPAS, P. G.; BENNETT, J. E.; KONTOYIANNIS, D. P.; CORDONNIER, C.; VIVIANI, M. A.; BILLE, J.; ALMYROUDIS, N. G.; WHEAT, L. J.; GRANINGER, W.; BOW, E. J.; HOLLAND, S. M.; KULLBERG, B. J.; DISMUKES, W. E.; DE PAUW, B. E. Defining Responses to Therapy and Study Outcomes in Clinical Trials of Invasive Fungal Diseases: Mycoses Study Group and European Organization for Research and Treatment of Cancer Consensus Criteria. **Clin Infect Dis.**, v. 47, p. 674-83, 2008.

SHAO PL, HUANG LM, HSUEH PR. Recent advances and challenges in the treatment of invasive fungal infections. **Int J Antimicrob Agents.**, v.30, p.487-95, 2007.

SHEN, Y. Z.; QI, T. K.; MA, J. X.; JIANG, X. Y.; WANG, J. R.; XU, Q. N.; HUANG, Q.; LIU, X. N.; SUN, H. Q.; LU, H. Z. Invasive fungal infections among inpatients with acquired immune deficiency syndrome at a Chinese university hospital. **Mycoses.**, v.50, p.475-80, 2007.

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

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

- SONBOLI, A.; FAKHARI, A.; KANANI, M. R.; YOUSEFZADI, M. Antimicrobial activity, essential oil composition and micromorphology of trichomes of *Satureja laxiflora* C. Koch from Iran. **Z Naturforsch.**, v.59, p.777-81, 2004.
- SONBOLI, A.; BABAKHANI, B.; MEHRABIAN, A. R. Antimicrobial activity of six constituents of essential oil from *Salvia*. **Naturforsch.**, v.61, p.160-4, 2006.
- SORRELL, T.C. *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*, **Med. Mycol.**, v. 39, p. 155-168, 2001.
- SOUZA, L. K.; DE OLIVEIRA, C. M.; FERRI, P. H.; DE OLIVEIRA JUNIOR, J. G.; DE SOUZA JUNIOR, A. H.; FERNANDES ODE, F.; SILVA Mdo, R. Antimicrobial activity of *Hyptis ovalifolia* towards dermatophytes. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, v. 98, p. 963-965, 2003.
- SUNG, W. S.; LEE, D. G. In vitro candidacidal action of Korean red ginseng saponins against *Candida albicans*. **Biol Pharm Bull.**, v.31, p.139-42, 2008.
- SUNG, W. S.; LEE, J.; LEE, D. G. Fungicidal effect of piscidin on *Candida albicans*: pore formation in lipid vesicles and activity in fungal membranes. **Biol Pharm Bull.**, v. 31, p.1906-10, 2008.
- SWOBODA, S. M.; MERZ, W. G.; LIPSETTA, P. A. Candidemia: the impact of antifungal prophylaxis in a surgical intensive care unit. **Surg Infect (Larchmt)**, v.4, p.345-54, 2003.
- TAMILARASI, S.; NANTHAKUMAR, K.; KARTHIKEYAN, K.; LAKSHMANAPERUMALSAMY, P. Diversity of root associated microorganisms of selected medicinal plants and influence of rhizomicroorganisms on the antimicrobial property of *Coriandrum sativum*. **J Environ Biol.**, v.29, p.127-34, 2008.
- TE DORSTHORST, D. T.; VERWEIJ, P. E.; MELETIADIS, J.; BERGERVOET, M.; PUNT, N. C.; MEIS, J. F.; MOUTON, J. W. In vitro interaction of flucytosine combined with amphotericin B or fluconazole against thirty-five yeast isolates determined by both the fractional inhibitory concentration index and the response surface approach. **Antimicrob Agents Chemother.**, v.46, p.2982-9, 2002.
- TERRELL, C. L.; HUGHES, C. E. Antifungal agents used for deep-seated mycotic infections. **Mayo. Clin. Proc.**, v. 67, p.69-91, 1992.
- THAKUR, R.; SARMA, S.; KUSHWAHA, S. Prevalence of HIV-associated cryptococcal meningitis and utility of microbiological determinants for its

- diagnosis in a tertiary care center. **Indian J Pathol Microbiol.**, v.2, p.212-4, 2008.
- TING, P. C.; WALKER, S. S. New agents to treat life-threatening fungal infections. **Curr Top Med Chem.**; v.8, p.592-602. Review, 2008
- TRILLES, L.; LAZERA, M.; WANKE, B.; THEELEN, B.; BOEKHOUT, T. Genetic characterization of environmental isolates of the *Cryptococcus neoformans* species complex from Brazil. **Med. Mycol.**, v. 41, p. 383-390, 2003.
- TRILLES, L.; LAZÉRA, M DOS S; WANKE, B.; OLIVEIRA, R. V.; BARBOSA, G. G.; NISHIKAWA, M. M.; MORALES, B. P.; MEYER, W. Regional pattern of the molecular types of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz.**, v. 103, p. 455-62, 2008.
- TUMBARELLO, M.; TACCONELLI, E.; CALDAROLA, G.; MORACE, G.; CAUDA, R.; ORTONA, L. Fluconazole resistant oral candidiasis in HIV-infected patients. **Oral Dis.**, v.1, p.110-2, 1997.
- UNLÜ, M.; VARDAR-UNLÜ, G.; VURAL, N.; DÖNMEZ, E.; OZBAŞ, Z. Y. Chemical composition, antibacterial and antifungal activity of the essential oil of *Thymbra spicata* from Turkey. **Nat Prod Res.**, v.23, p.572-9, 2009.
- VALE-SILVA, L. A. & BUTCHA, V. Antifungal susceptibility testing by flow cytometry: is it the future?. **Mycosis**, v. 49, p. 261-273, 2006.
- VANBREUSEGHEM, R.; TAKASHIO, M. An atypical strain of *Cryptococcus neoformans* (San Felice) Vuillemin 1894. II. *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* var. nov. **Ann Soc Belges Med Trop Parasitol Mycol.**, v.6, p.695-702, 1970.
- VIDOTTO, V.; ITO-KUWA, S.; NAKAMURA, K.; AOKI, S.; MELHEM, M.; FUKUSHIMA, K.; BOLLO, E. Extracellular enzymatic activities in *Cryptococcus neoformans* strains isolated from AIDS patients in different countries. **Rev Iberoam Micol.**, v.4, p.216-20, 2006.
- VIVALDINI, S. M. **Tipagem molecular de isolados sequenciais de *Cryptococcus neoformans* de pacientes da região de São José do Rio Preto e correlação com sensibilidade à drogas antifúngicas.** 2003. 110f. Dissertação (Mestrado em Análises Clínicas) Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Araraquara, 2003.
- WADHWA, A; KAUR, R.; BHALLA, P. Profile of central nervous system disease in HIV/AIDS patients with special reference to cryptococcal infections. **Neurologist.**, v.14, p.247-51, 2008.

WENISCH, C.; LINNAU, K. F.; PARSchALK, B.; ZEDTWITZ-LIEBENSTEIN, K.; GEORGOPOULOS, A. Rapid susceptibility testing of fungi by flow cytometry using vital staining. **J. Clin. Microbiol.**, v. 35, p. 5–10, 1997.

WENISCH, C.; MOORE, C. B.; KRAUSE, R.; PRESTERL, E.; PICHNA, P.; DENNING, D. W. Antifungal susceptibility testing of fluconazole by flow cytometry correlates with clinical outcome. **J Clin Microbiol.**, v. 39, p. 2458-62, 2001.

WHITE, T. C.; KIEREN, A. M.; BOWDEN, R. A. Clinical, cellular, and molecular factor that contribute to antifungal drug resistance. **Clin. Microbiol. Reviews**, v. 11, p. 382-402, 1998.

WINTERBOURN, C. C.; VISSERS, M. C.; KETTLE, A. J. Myeloperoxidase, **Curr. Opin. Hematol.**, v.7, p.53–58, 2000.

YAKUBU, M. T.; AKANJI, M. A.; OLADIJI, A. T.; ADESOKAN, A. A. Androgenic potentials of aqueous extract of *Massularia acuminata* (G. Don) Bullock ex Hoyl. stem in male Wistar rats. **J Ethnopharmacol.**, v.118, p.508-13, 2008.

YUNES, R. A.; PEDROSA, R. C.; CECHINEL, V. F. Pharmaceutics and phytotherapics: the need for development of the industry of phytopharmaceutics and phytotherapics in Brazil. **Quím. Nova.**, v.24, p.147-152, 2001.

ZONIOS, D. I.; BENNETT, J. E. Update on azole antifungals. **Semin Respir Crit Care Med.**, v. 29, p.198-210. Review, 2008.

Anexo

Tabela 1: Dados e resultados dos isolados de *Cryptococcus* sp do Estado do Rio de Janeiro avaliados quanto ao tipo molecular.

Número de amostras	Paciente	Número do Isolado	Ano	Doença Base	Gênero/Espécie	Variedade	Tipo Molecular
1	1	102-88968	00	SIDA	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	VNI
2	2	21-74142	96	****	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	VNI
3	3	75-82036	98	SIDA	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	VNI
4	4	6-72352	95	SIDA	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	VNI
5	4	2-72220	95	SIDA	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	VNIII
6	5	10-72546	96	SIDA	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	VNII
7	6	35-76782	97	SIDA	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	VNI
8	7	32-76596	96	SIDA	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	VNI
9	8	43-77280	97	SIDA	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	VNI
10	8	44-77362	97	SIDA	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	VNI
11	8	45-77440	97	SIDA	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	VNII
12	8	47-77516	97	SIDA	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	VNI
13	9	90-85290	99	SIDA	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	VNI
14	9	93-85694	99	SIDA	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	VNII
15	9	101-88530	99	SIDA	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	VNII
16	9	111-90424	00	SIDA	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	VNI
17	9	112-90486	00	SIDA	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	VNII
18	10	31-76466	96	SIDA	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	VNI
19	11	67-81444	98	LES	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	VNI
20	11	71-81678	98	LES	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	VNII
21	11	74-81792	98	LES	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	VNI
22	12	51-78390	97	SIDA	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	VNI
23	13	33-76708	96	SIDA	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	VNI
24	13	34-76798	97	SIDA	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	VNI
25	13	36-76804	97	SIDA	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	VNI
26	14	41-77108	97	SIDA	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	VNI
27	14	42-77138	97	SIDA	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	VNI
28	15	96-85998	99	****	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	VNI
29	15	97-86000	99	****	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	VNI
30	16	37-76884	97	****	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	VNI
31	17	89-84434	99	TR	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	VNI
32	18	87-84136	98	SIDA	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	VNI

33	19	88-84142	98	SIDA	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	VNI
34	20	53-78906	97	SIDA	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	VNI
35	20	70-81582	98	SIDA	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	VNII
36	21	69-81564	98	****	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	VNI
37	22	63-80806	98	SIDA	<i>C. gattii</i>	<i>grubii</i>	VGI
38	22	64-80884	98	SIDA	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	VNI
39	23	3-72306	95	****	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	VNII
40	24	72-81768	98	****	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	VNII
41	24	73-81770	98	****	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	VNI
42	25	60-80256	97	****	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	VNI
43	25	61-80326	97	****	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	VNI
44	25	62-80342	97	****	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	VNI
45	26	110-90008	00	****	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	VNI
46	27	94-85872	99	SIDA	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	VNI
47	27	95-85978	99	SIDA	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	VNI
48	28	22-74540	96	Linfoma	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	VNI
49	29	12-72938	96	SIDA	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	VNI
50	30	52-78898	97	SIDA	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	VNI
51	30	54-78916	97	SIDA	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	VNI
52	30	55-79328	97	SIDA	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	VNI
53	31	103-89028	00	SIDA	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	VNII
54	31	104-89030	00	SIDA	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	VNI
55	31	105-89078	00	SIDA	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	VNI
56	31	106-89110	00	SIDA	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	VNI
57	31	107-89114	00	SIDA	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	VNI
58	32	68-81556	98	SIDA	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	VNI
59	33	17-73254	96	SIDA	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	VNII
60	34	20-74140	96	SIDA	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	VNII
61	35	4-72338	95	SIDA	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	VNII
62	35	7-72444	95	SIDA	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	VNII
63	35	8-72450	95	SIDA	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	VNII
64	35	9-72458	95	SIDA	<i>C. gatti</i>	-	VGII
65	36	98-86012	99	SIDA	<i>C. gatti</i>	-	VGII
66	36	99-86222	99	SIDA	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	VNI
67	37	29-75300	96	****	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	VNII
68	38	25-75164	96	****	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	VNI
69	39	79-82990	98	LES	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	VNI
70	40	11-72802	96	SIDA	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	VNI
71	41	80-83520	98	SIDA	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	VNI

72	41	81-83532	98	SIDA	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	VNI
73	41	82-83588A	98	SIDA	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	VNI
74	41	83-83588B	98	SIDA	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	VNI
75	41	84-83636	98	SIDA	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	VNI
76	41	85-83688	98	SIDA	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	VNI
77	41	86-83690	98	SIDA	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	VNI
78	42	100-86696	99	****	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	VNII
79	43	5-72346	95	****	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	VNII
80	44	19-73704	96	****	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	VNI
81	45	49-78248	97	SIDA	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	VNI
82	45	50-78308	97	SIDA	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	VNI
83	47	108-89462	00	SIDA	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	VNI
84	48	91-85344	99	SIDA	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	VNI
85	48	92-85418	99	SIDA	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	VNI
86	49	48-77520	97	SIDA	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	VNI
87	50	76-82096	98	SIDA	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	VNI
88	50	77-82120	98	SIDA	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	VNII
89	50	78-82670	98	SIDA	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	VNI
90	51	24-74964	96	****	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	VNI
91	52	109-89714	00	SIDA	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	VNI
92	53	26-75238	96	SIDA	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	VNI
93	53	27-75252	96	SIDA	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	VNI
94	53	28-75258	96	SIDA	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	VNI
95	53	30-75366	96	SIDA	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	VNI
96	54	16-73248	96	SIDA	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	VNI
97	54	23-74636	96	SIDA	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	VNI
98	55	18-73644	96	SIDA	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	VNI
99	56	15-73130	96	SIDA	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	VNI
100	57	14-73074	96	SIDA	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	VNI
101	58	1-72094	95	SIDA	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	VNI
102	58	38-76978	97	SIDA	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	VNI
103	58	46-77472	97	SIDA	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	VNI
104	59	13-72958	96	SIDA	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	VNI
105	60	65-80924	98	****	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	VNI

**** Não relatado

LES: Lúpus eritematoso sistêmico

TR: Transplante Renal

Tabela 2: Dados e resultados dos isolados de *Cryptococcus* sp da cidade de São José do Rio Preto no Estado de São Paulo avaliados quanto ao tipo molecular.

Número da amostra	Paciente	Sexo	HIV	Amostra/Ano	Gênero/ Espécie	Variedade	Tipo Molecular
1	1	F	SR	2037	<i>C. neoformans</i>	<i>neoformans</i>	VNI
2	2	F	SR	1973	<i>C. neoformans</i>	<i>neoformans</i>	VNI
3	3	M	SR	282	<i>C. gattii</i>	-	VGII
4	3	M	SR	248	<i>C. gattii</i>	-	VGII
5	3	M	SR	2110	<i>C. gattii</i>	-	VGII
6	3	M	SR	2084	<i>C. gattii</i>	-	VGII
7	3	M	SR	718	<i>C. gattii</i>	-	VGII
8	4	M	SR	1780	<i>C. neoformans</i>	<i>neoformans</i>	VNI
9	5	M	SR	1635	<i>C. neoformans</i>	<i>neoformans</i>	VNI
10	3	F	SR	1040	<i>C. gattii</i>	-	VGII
11	5	M	SR	1705	<i>C. neoformans</i>	<i>neoformans</i>	VNI
12	14	M	SR	455	<i>C. neoformans</i>	<i>neoformans</i>	VNI
13	3	M	SR	1957	<i>C. gattii</i>	-	VGII
14	6	F	SR	1042	<i>C. neoformans</i>	<i>neoformans</i>	VNI
15	3	M	SR	2128	<i>C. gattii</i>	-	VGII
16	5	M	SR	1683	<i>C. neoformans</i>	<i>neoformans</i>	VNI
17	16	F	SR	1720	<i>C. neoformans</i>	<i>neoformans</i>	VNI
18	7	M	SR	536	<i>C. neoformans</i>	<i>neoformans</i>	VNI
19	7	M	SR	634	<i>C. neoformans</i>	<i>neoformans</i>	VNI
20	8	M	SR	2144	<i>C. gattii</i>	-	VGII
21	7	M	SR	925	<i>C. neoformans</i>	<i>neoformans</i>	VNI
22	9	M	SR	774	<i>C. neoformans</i>	<i>neoformans</i>	VNI
23	10	M	SR	1887	<i>C. neoformans</i>	<i>neoformans</i>	VNI
24	11	M	SR	2026	<i>C. neoformans</i>	<i>neoformans</i>	VNI
25	12	M	SR	1039	<i>C. neoformans</i>	<i>neoformans</i>	VNI
26	12	M	SR	913	<i>C. neoformans</i>	<i>neoformans</i>	VNI
27	12	M	SR	1052	<i>C. neoformans</i>	<i>neoformans</i>	VNI
28	13	M	SR	757	<i>C. neoformans</i>	<i>neoformans</i>	VNI
29	14	M	SR	481	<i>C. neoformans</i>	<i>neoformans</i>	VNI
30	3	M	SR	2125	<i>C. gattii</i>	-	VGII
31	1	F	SR	1994	<i>C. neoformans</i>	<i>neoformans</i>	VNI
32	19	M	SR	1182	<i>C. neoformans</i>	<i>neoformans</i>	VNI
33	15	M	SR	769	<i>C. neoformans</i>	<i>neoformans</i>	VNI

34	3	M	SR	1953	<i>C. gattii</i>	-	VGII
35	3	M	SR	308	<i>C. gattii</i>	-	VGII
36	16	M	SR	804	<i>C. neoformans</i>	<i>neoformans</i>	VNI
37	9	M	SR	774	<i>C. neoformans</i>	<i>neoformans</i>	VNI
38	17	M	SR	994	<i>C. neoformans</i>	<i>neoformans</i>	VNI
39	3	M	SR	1986	<i>C. gattii</i>	-	VGII
40	3	M	SR	266	<i>C. gattii</i>	-	VGII
41	18	M	SR	1497	<i>C. neoformans</i>	<i>neoformans</i>	VNI
42	6	F	SR	1923	<i>C. neoformans</i>	<i>neoformans</i>	VNI
43	8	M	SR	2171	<i>C. neoformans</i>	<i>neoformans</i>	VGII
44	16	F	SR	1639	<i>C. neoformans</i>	<i>neoformans</i>	VNI
45	3	M	SR	1053	<i>C. neoformans</i>	<i>neoformans</i>	VGII
46	20	M	SR	1901	<i>C. neoformans</i>	<i>neoformans</i>	VNI

SR: Soro reagente