

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS – CAMPUS DE ARARAQUARA
FARMÁCIA-BIOQUÍMICA

VANESSA GONÇALVES WOLF

**TRIAGEM DE SUBSTÂNCIAS ANTIFÚNGICAS COM ATIVIDADE
INIBITÓRIA DE BOMBAS DE EFLUXO DE ISOLADOS RESISTENTES DE**
Cryptococcus sp

ARARAQUARA

2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS – CAMPUS DE ARARAQUARA
FARMÁCIA-BIOQUÍMICA

VANESSA GONÇALVES WOLF

**TRIAGEM DE SUBSTÂNCIAS ANTIFÚNGICAS COM ATIVIDADE
INIBITÓRIA DE BOMBAS DE EFLUXO DE ISOLADOS RESISTENTES DE**
Cryptococcus sp

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Graduação em
Farmácia-Bioquímica da Faculdade de
Ciências Farmacêuticas de Araraquara,
da Universidade Estadual Paulista para
obtenção do grau de Farmacêutica-
Bioquímica.

Orientadora: Ana Marisa Fusco Almeida

ARARAQUARA

2013

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus e à Maria Santíssima por terem estado comigo em todos os momentos. Sem a força que me foi dada do alto e as bênçãos derramadas em todas as áreas da minha vida, nada disso teria sido possível. Obrigada meu Senhor, por tudo!

À Profa Dr^a Ana Marisa Fusco Almeida, pela orientação neste trabalho de conclusão de curso. Muito obrigada por não medir esforços em me ajudar em tudo o que precisei durante estes anos, por me passar conhecimentos e por ter me permitido fazer parte da equipe do laboratório de micologia.

Agradeço especialmente aos meus pais, Donária e Donizete, por todo o apoio e sustento dado em todas as áreas da minha vida, sem vocês teria sido impossível conquistar tudo o que conquistei e tudo o que ainda irei conquistar. Obrigada por todo o amor e cuidado, por toda a força que sempre me passaram nos momentos mais difíceis desta graduação, obrigada por sempre acreditarem em mim e em meu potencial. Não seria a pessoa que sou hoje sem vocês em minha vida. Amo vocês!

Aos meus irmãos que tanto amo, Gustavo e Tiago, por todo o apoio e companheirismo que me passaram. Obrigada por tornarem cada fim de semana que passei em casa, mais completos e divertidos. Ficar longe de vocês durante esses cinco anos me fez perceber o quanto fazem falta em minha vida.

Ao meu namorado, Carlinhos, por todo amor, paciência, cuidado, força (e que força!) que me deu durante a etapa mais complicada de minha graduação. Obrigada por cada noite em que fiquei até tarde no laboratório e que mesmo cansado e com muitas coisas para fazer, você estava lá, me esperando sair, para muitas vezes apenas me levar para a casa. Muito obrigada por ter me dado seu ombro pra chorar tantas vezes e por não ter permitido que eu desistisse quando parecia não suportar mais. Obrigada por me mostrar que eu conseguiria e

consegui! Te conheci no último ano de curso, mas agradeço muito a Deus por ter me dado você. Tudo teria sido mais difícil se não estivesse ao meu lado. Obrigada por ser tão especial em minha vida!

Às minhas amigas, que considero como irmãs, Maria, Tarsila e Amanda, por cada uma, com seu jeitinho todo especial, ter ganhado um lugar em meu coração, do qual nunca mais vão sair! Vocês foram a minha família aqui em Araraquara e amenizaram a dor e a saudade de ficar longe de casa. Obrigada por cada momento que vivemos juntas, por cada risada, cada lágrima, cada ajuda, cada piada, cada almoço que fizemos juntas! Nada teria sido tão completo e divertido sem vocês.

Isabela e Marina, nós conseguimos! O fim que parecia tão distante chegou! Amigas, só nós sabemos o que nossa amizade significa, mas quero que saibam que vocês foram simplesmente maravilhosas durante todos esses anos de faculdade. Muito obrigada por tudo! Por estarem sempre ao meu lado e por terem me ajudado em tudo o que precisei em todos esses anos. Como costumávamos dizer, somos um trio e a dificuldade de uma é a dificuldade de todas! Saibam que sempre podem contar comigo para o que precisarem, amizade igual à nossa jamais se acabará independente do rumo que cada uma de nós tomarmos. Desejo todo o sucesso a cada uma de nós!

Agradeço a todos os membros da nossa família do Grupo de Oração Universitário e de maneira especial ao Franklin, Maiara, Maria, Kamila, Juliana, Heloísa, Silmar, Rodrigo, Claudia, Carol, Rafael, Thaís, Dani, por todas as orações, apoio e amizade dados durante todos esses anos. Quando me sentia fraca, era em nosso querido GOU que conseguia forças para continuar. Obrigada por terem me apresentado o sonho de construir uma civilização do amor e o desejo de lutar por um mundo melhor. Obrigada por terem permitido que eu fizesse parte dessa família que tanto amo!

Enfim, agradeço à família Micologia, à Prof^a Dr^a Ana Marisa e à Prof^a Dr^a Maria José por todo o conhecimento e orientação concedidos. À Rô, Haroldo, Panta, Lili, Carol mineira, Nayla, Fer Gullo, Fer Sangalli, Fer Campos, Jana, Jaque, Natália, Junya, Kaila, Cláudia, Luana, Regina, Maysa, Thamires, Juliana, Letícia e Warley por todo o carinho, apoio, amizade, conhecimento e ajuda concedidos durante todos esses anos. Agradeço de maneira especial à Sú, Carol Silva, Jú, Tati, Aline e Laranja, vocês foram demais! Muito obrigada por tudo o que me ensinaram, por toda a paciência, dedicação, cuidado e por toda a ajuda! Sú, você foi quem ficou responsável por isso tudo, né? Muito obrigada mesmo por sempre estar do meu lado e por estar sempre disponível e disposta a ajudar, te admiro muito e tenho certeza que além de tudo o que me ensinou e aquilo que aprendemos juntas, construímos uma amizade que sempre levarei em meu coração. Carol, a Sú decidiu viajar e sobrou pra você, né? Agradeço muito a você por tudo o que fez por mim. Teria ficado louca se você não tivesse me socorrido e me ajudado tantas vezes que precisei. Queimamos muitos neurônios juntas! Rsr. Jú, foi você quem me ensinou o básico do laboratório e que também me socorreu nos momentos das dúvidas mais profundas que encontrei. Obrigada por todo o apoio e conhecimento transmitido. Tati e Aline, muito obrigada por sempre estarem prontas a me ajudar! Meus cálculos estatísticos nunca teriam saído sem a ajuda de vocês. Laranja, Muito obrigada por toda a força, atenção e por ter sido tão prestativa em todos os momentos e por ter me ajudado sempre. Família micologia, amo vocês!

À Unesp e CnPQ (Pibiti), pela bolsa concedida.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	19
3 METODOLOGIA	20
3.1 MICRORGANISMO	20
3.2 TESTE DE SENSIBILIDADE	20
3.3 CONCENTRAÇÃO FUNGICIDA MÍNIMA	22
3.4 ESCOLHA DO DERIVADO DO ÁCIDO GÁLICO PARA A REALIZAÇÃO DO TESTE DE SINERGISMO E PARA A VERIFICAÇÃO DA AÇÃO NA EXPRESSÃO DOS GENES <i>Mdr1</i> E <i>Afr1</i>	22
3.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE SINÉRGICA ENTRE G16 E FLUCONAZOL	23
3.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA DOS GALATOS DE ALQUILA	25
3.7 EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL NA AUSÊNCIA DE GALATO	26
3.8 TRATAMENTO DOS ISOLADOS COM GALATO DE n-DODECILA (G16) E TACROLIMUS (FK506) E EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL	27
3.9 SÍNTESE DE cDNA FITA SIMPLES	28
3.10 PCR EM TEMPO REAL (REAL TIME PCR)	29
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
4.1 TESTE DE SENSIBILIDADE	30
4.2 TESTE DE SINERGISMO	31
4.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA DOS GALATOS DE ALQUILA	32
4.4 EXPRESSÃO DOS GENES <i>Mdr1</i> E <i>Afr1</i> ANTES E APÓS O CONTATO COM GALATO DE n-DODECILA E FK506	37
5 CONCLUSÃO	46
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47
ANEXO A	51
DATA E ASSINATURAS	52

RESUMO

A criptococose é uma micose sistêmica e oportunista que apresenta alta mortalidade, principalmente em pacientes HIV positivos. É causada pelas leveduras *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*. O número de antifúngicos disponíveis no mercado é limitado e muitos são ineficientes e altamente tóxicos, principalmente na terapêutica desta micose. Este fato, associado à emergência de cepas resistentes aos fármacos disponíveis, torna clara a necessidade de se descobrir novas moléculas antifúngicas. Dentre os principais mecanismos de resistência antifúngica aos azólicos está a superexpressão de genes codificadores de bombas de efluxo. Desta forma, este trabalho teve como finalidade analisar o nível de expressão dos genes *Mdr1* e *Afr1*, codificadores de bombas de efluxo, através de PCR em tempo real, em três isolados clínicos sequenciais de *Cryptococcus neoformans* (sensível, intermediário e resistente) e dois isolados de aves de *Cryptococcus gattii* (um sensível e outro resistente) classificados quanto à suscetibilidade ao fluconazol (*in vitro*) e pesquisar substâncias inibidoras destas bombas. Para tanto foram selecionadas moléculas derivadas do ácido gálico, modificadas por reações de esterificação diferenciando-se pelo tamanho da cadeia carbônica, que foram testadas quanto à atividade antifúngica (anti-*Cryptococcus* sp) e uma delas foi selecionada para verificação da atividade inibitória das bombas de efluxo relacionadas aos genes escolhidos. Foi observado que o gene *Afr1* estava mais expresso no isolado clínico resistente (Cn30) em comparação com isolado sensível (Cn26) de *C. neoformans*, proveniente do mesmo paciente, e em relação aos outros isolados, este gene não apresentou diferença na expressão. Quanto ao gene *Mdr1* não houve diferença na expressão das bombas em nenhum dos isolados sugerindo não estar associado à resistência ao fluconazol. Entretanto, quando foi testada a atividade inibitória do galato selecionado, G16 (galato de n-dodecila), sobre a expressão dos dois genes, *Mdr1* e *Afr1*, houve inibição significativa da expressão independentemente do diferencial de expressão destes genes, sugerindo que a ação desta molécula é independente deste fármaco, atividade que poderia evitar heteroresistência aos diversos fármacos antifúngicos. Resultados adicionais foram obtidos pela realização de testes de sensibilidade, onde os galatos de G11 a G17 (7 até 14 carbonos) foram classificados como potentes moléculas antifúngicas, principalmente G14, G16 e G17, que além de ótima atividade antifúngica, não se mostraram citotóxicos sobre as células epiteliais de pulmão A549 e MRC-5, mostrando a possível utilização destas substâncias como alternativas terapêuticas no tratamento da criptococose, principalmente nos casos de resistência aos azóis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Taxa de viabilidade celular em células epiteliais das linhagens A549 e MRC-5 após contato com galatos de alquila. A) Taxa de viabilidade celular de células epiteliais da linhagem MRC-5 após contato com galatos de alquila classificados de G1 à G17 em ampla faixa de concentração; B) Taxa de viabilidade celular de células epiteliais da linhagem A549 após contato com galatos de alquila classificados de G1 à G17 em ampla faixa de concentração; C) Taxa de viabilidade celular de células epiteliais da linhagem MRC-5 após contato com galato de n-dodecila (G16) em ampla faixa de concentração; D) Taxa de viabilidade celular de células epiteliais da linhagem A549 após contato com galato de n-dodecila (G16) em ampla faixa de concentração. C- = controle negativo; Controle de morte = controle positivo..... 34

Figura 2 - Valores de IC₅₀ (mg/L) determinados para galatos de alquila classificados de G1 à G17 em linhagens de células epiteliais de pulmão MRC-5 e A549. A) Valores de IC₅₀ (mg/L) para galatos de alquila classificados de G1 à G17 em linhagem de célula epitelial de pulmão MRC-5; B) Valores de IC₅₀ (mg/L) para galatos de alquila classificados de G1 à G17 em linhagem de célula epitelial de pulmão A549..... 35

Figura 3 - Quantificação relativa dos genes *Mdr1* e *Afr1* por PCR em tempo real. A) Expressão relativa do gene *Afr1* em isolados de *Cryptococcus neoformans*; B) Expressão relativa do gene *Afr1* em isolados de *Cryptococcus gattii*; C) Expressão relativa do gene *Mdr1* em isolados de *Cryptococcus neoformans*; D) Expressão relativa do gene *Mdr1* em isolados de *Cryptococcus gattii*. *Gadph* foi utilizado como gene de referência..... 38

Figura 4 - Expressão relativa do gene *Afr1* através de PCR em tempo real em isolados de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* após tratamento com galato de n-dodecila (G16), Tacrolimus (FK506) e com DMSO como controle. A) Expressão relativa do gene *Afr1* na cepa padrão de *Cryptococcus neoformans* ATCC 90012; B) Expressão relativa do gene *Afr1* em isolado de *Cryptococcus neoformans* sensível ao fluconazol (Cn26); C) Expressão relativa do gene *Afr1* em isolado de *Cryptococcus neoformans* com sensibilidade intermediária ao fluconazol (Cn27); D) Expressão relativa do gene *Afr1* em isolado de *Cryptococcus neoformans* resistente ao fluconazol *in vitro* (Cn30); E) Expressão relativa do gene *Afr1* em isolado de *Cryptococcus gattii* ATCC 56990; F) Expressão relativa do gene *Afr1* em isolado de *Cryptococcus gattii* resistente ao fluconazol *in vitro* (Cg118); G) Expressão relativa do gene *Afr1* em isolado de *Cryptococcus gattii* sensível ao fluconazol (CL). *Gadph* foi utilizado como gene de referência. G16 = isolado tratado com galato de n-dodecila; FK506 = isolado tratado com Tacrolimus; DMSO = isolado tratado com DMSO; (*) = diferença estatística em relação ao tratado com DMSO de $p < 0,05$; (**) = diferença estatística em relação ao tratado com DMSO de $p < 0,01$ 41

Figura 5 - Expressão relativa do gene *Mdr1* através de PCR em tempo real em isolados de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* após tratamento com galato de n-dodecila (G16), Tacrolimus (FK506) e com DMSO como controle. A) Expressão relativa do gene *Mdr1* na cepa padrão de *Cryptococcus neoformans* ATCC 90012; B) Expressão relativa do gene *Mdr1* em isolado de *Cryptococcus neoformans* sensível ao fluconazol (Cn26); C) Expressão relativa do gene *Mdr1* em isolado de *Cryptococcus neoformans* com sensibilidade intermediária ao fluconazol (Cn27); D) Expressão relativa do gene *Mdr1* em isolado de *Cryptococcus neoformans* resistente ao fluconazol *in vitro* (Cn30); E) Expressão relativa do

gene *Mdr1* em isolado de *Cryptococcus gattii* ATCC 56990; F) Expressão relativa do gene *Mdr1* em isolado de *Cryptococcus gattii* resistente ao fluconazol *in vitro* (Cg118); G) Expressão relativa do gene *Mdr1* em isolado de *Cryptococcus gattii* sensível ao fluconazol (CL). *Gadph* foi utilizado como gene de referência. G16 = isolado tratado com galato de n-dodecila; FK506 = isolado tratado com Tacrolimus; DMSO = isolado tratado com DMSO; (*) = diferença estatística em relação ao tratado com DMSO de $p < 0,05$; (**) = diferença estatística em relação ao tratado com DMSO de $p < 0,01$ 43

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Exemplo do esquema de combinação na placa de microdiluição com a concentração do G16 (em negrito) e do fluconazol (em itálico), para o teste do “tabuleiro em xadrez”. C-, controle negativo; C+, controle positivo..... 24

Quadro 2 - Valores de CIM e CFM em µg/mL para as moléculas de galato de alquila frente as cepas ATCCs 90012 de *C. neoformans* e 56990 de *C. gattii*, os isolados sequenciais de *C. neoformans* (26, 27 e 30) e dois isolados de psitacício de *C. gattii* (Cg118 e CL)..... 31

Quadro 3 - Valores de CIM em µg/mL para os fármacos sintéticos fluconazol e anfotericina B, frente as cepas ATCCs 90012 de *C. neoformans* e 56990 de *C. gattii*, os isolados sequenciais de *C. neoformans* (26, 27 e 30) e dois isolados ambientais de *C. gattii* (Cg118 e CL)..... 31

Quadro 4 - Valores do índice de concentração inibitória fracionada (ICIF) para a combinação de galato de n-dodecila e fluconazol frente a isolados de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*, e tipo de atividade obtida em cada caso..... 33

Quadro 5 - Valores do Índice de Seletividade (IS) encontrados para os galatos de alquila de G11 a G17, frente às células epiteliais de pulmão das linhagens MRC-5 e A549 para isolados de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*..... 37

Quadro 6 - Representação esquemática da quantidade de vezes em que foi diminuída a expressão dos genes *Afr1* e *Mdr1* em isolados de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus*

gattii após tratamento com galato de n-dodecila (G16) e Tacrolimus (FK506), usando tratamento com DMSO como controle. Análise de expressão feita através de PCR em tempo real..... 45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A549	Linhagem tumoral de células epiteliais de pulmão
ABC	ATP-Binding cassette
ANF-B	anfotericina B
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosina trifosfato
C+	Controle positivo
C-	Controle negativo
cDNA	DNA complementar
CFM	Concentração fungicida mínima
Cg	<i>Cryptococcus gatti</i>
CIF	Concentração inibitória fracionada
CIM	Concentração inibitória mínima
CL	Isolado de <i>Cryptococcus gatti</i>
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
Cn	<i>Cryptococcus neoformans</i>
DEPC	Dietil pirocarbonato
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxinucleotídeos trifosfato
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ácido etilenodiamino tetraacético
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
Fase log	Fase logarítmica
FK506	Tacrolimus
FLU	fluconazol
G1	Ácido gálico
G2	Galato de metila
G3	Galato de etila
G4	Galato de n-propila
G5	Galato de i-propila
G6	Galato de n-butila
G7	Galato de n-pentila

G8	Galato do ácido 3,4,5-triacetoxibenzóico
G9	Galato de i-butila
G10	Galato de n-hexila
G11	Galato de n-heptila
G12	Galato de n-octila
G14	Galato de n-decila
G15	Galato de n-undecila
G16	Galato de n-dodecila
G17	Galato de n-tetradecila
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
IC₅₀	Concentração que causa 50% de inibição do crescimento
ICIF	Índice de concentração inibitória fracionada
IS	Índice de seletividade
MOPS	Ácido 3-(N-morfino) propanosulfônico
MRC-5	Linhagem de células epiteliais de pulmão
mRNA	RNA mensageiro
MSF	Major Superfamily Facilitator
MTT	3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide
PBS	Tampão fosfato salino
PCR	Polymerase chain reaction
pH	Potencial hidrogeniônico
pmol	picomol
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Rotações por minuto
RT- PCR	Real time – polymerase chain reaction
TE	Tris-EDTA
Tris	2-amino-2-hidroximetilpropano
U	Unidades
UFC	Unidades formadoras de colônia
YEPD	Yeast extract-peptone-dextrose

1 INTRODUÇÃO

Fungos oportunistas são responsáveis por várias formas de doenças, que vão de infecções superficiais leves para infecções sistêmicas, que, na maioria dos casos, são de difícil tratamento (SANGLARD, et al., 2009).

A criptococose é uma doença grave que ocorre em indivíduos imunocompetentes e principalmente em pacientes imunocomprometidos. É uma enfermidade causada por espécies de leveduras encapsuladas do Phylum Basidiomiceto e também pode acometer diversas espécies de animais. O gênero *Cryptococcus* engloba 38 espécies, entre elas, *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*, os principais agentes etiológicos da criptococose, já as outras espécies raramente são descritas (KANTARCIOGLU, et al, 2008).

C. neoformans inicialmente foi dividido em três variedades e cinco sorotipos, de acordo com os antígenos polissacarídicos, sendo o sorotipo A pertencente à variedade *grubii*, o sorotipo D à variedade *neoformans*, e B e C à variedade *gattii* (FRANZOT et al., 1999; SORRELL, 2001). Entretanto com base em dados de tipagem, sequenciamento de nucleotídeos e análise filogenética, foi sugerida a reclassificação de *C. neoformans* var. *gattii* como uma nova espécie, *C. gattii* (KNOW-CHUNG et al., 2002). Portanto, atualmente, o complexo *Cryptococcus* inclui as leveduras basidiomicéticas *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* (sorotipo A), *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (sorotipo D) e *Cryptococcus gattii* (sototipos B e C), onde as variedades apresentam diferenças fenotípicas, genotípicas, bioquímicas, epidemiológicas e clínicas (SORREL, 2001; MORETTI et al., 2008; MA & MAY, 2009).

A terapia para a criptococose permanece subótima porque a infecção é difícil de erradicar com antifúngicos, e a resistência principalmente para alguns fármacos como fluconazol e voriconazol já foi documentada (LEE et al., 2010). O número limitado de antifúngicos no mercado associado aos crescentes casos de resistência (CANNON et al.,

2009; GAUSTAD, 2008; GOMEZ-LOPEZ et al., 2008; LEE et al., 2010; NORDOY e SILVA et al., 2008) tem chamado a atenção da comunidade científica quanto à necessidade de se caracterizar novos alvos e de se descobrir novos fármacos mais específicos e com menos efeitos colaterais (FOWLER, et al., 2011; GRIMALDI et al., 2010).

Os mecanismos de resistência aos azólicos mais comuns descritos em fungos, incluem o aumento da produção de transportadores de múltiplas drogas ou alterações na enzima alvo dos azóis, a lanosterol 14C desmetilase, devido a mutações no gene ERG11 e/ou a super expressão deste gene. (COWEN, et al. 2002; FAVRE, et al. 1999; MARICHAL, et al. 1999). Em *Cryptococcus* sp. pouco se sabe sobre os mecanismos moleculares responsáveis pela resistência aos azólicos. Trabalhos recentes demonstraram que a resistência aos azóis nesta espécie de levedura, também pode ser devido à heteroresistência, que é uma habilidade inata para produzir pequenas subpopulações clonais que podem, transitoriamente, adaptar-se a altas concentrações de fluconazol (VARMA e KWON-CHUNG, 2010; SIONOV et al., 2009, 2012).

Assim como outros eucariotos, dois tipos de proteínas envolvidas no efluxo de compostos são conhecidas em fungos, os transportadores da família ABC (ATP-Binding Cassette) e os transportadores MSF (Major Superfamily Facilitator). Em *Candida*, o primeiro mecanismo associado com a resistência aos fármacos azólicos é a indução de bombas de efluxo que levam a diminuição da concentração do fármaco dentro da célula fúngica. A superexpressão de bombas de efluxo codificadas por genes, seja MDR ou CDR tem sido associada com a resistência aos azóis em *C. albicans* (MDR1, CDR1, CDR2), *C. glabrata* (CgCDR1, CgCDR2), ou *C. dubliniensis* (CdMDR1, CdCDR1). A indução de CDR, genes codificadores de bomba de efluxo, tende a afetar todos os fármacos azólicos, enquanto as bombas de efluxo codificadas por genes MDR são geralmente seletivas para fluconazol (PFALLER, 2012). Em *Cryptococcus neoformans*, dois transportadores ABC tem sido

caracterizados até o momento. A superexpressão de *Mdr1* e *Afr1* parece estar envolvida nos mecanismos de resistência ao fluconazol nesta espécie. (Morschhäuser, 2010). Baseado nisto, despertou-se em nosso grupo o interesse em avaliar o nível de expressão destes genes em isolados de *Cryptococcus* sp sensíveis e resistentes ao fluconazol e assim determinar se este seria ou não um dos mecanismos de resistência utilizados por estes isolados.

A caracterização de novos alvos nos fungos e a modelagem de novos fármacos pode oferecer além de viabilidade socioeconômica, tecnológica e industrial, tratamento apropriado e eficiente baseado na melhor especificidade da atividade de novas moléculas, principalmente nos casos de emergência de cepas resistentes. De acordo com a Organização Mundial da Saúde, plantas medicinais seriam as melhores fontes para obtenção de uma imensa variedade de moléculas (AGARWAL et al., 2008; MARTINEZ-ROSSI et al., NASCIMENTO, et al., 2000). Esta alternativa pode beneficiar grande parte da população que utiliza as plantas como primeira opção de tratamento (SCORZONI et al., 2007). Estas se constituem, portanto, em uma ótima alternativa para busca de substâncias que podem ser usadas na formulação de novos antifúngicos (HOLETZ et al., 2002), principalmente para estabelecimento de tratamento eficiente em infecções por cepas resistentes.

Para a criptococose propriamente dita, tratamentos alternativos como o uso de produtos naturais e seus derivados são considerados uma excelente opção, considerando que o Brasil é o país com a maior diversidade vegetal do mundo e conta com mais de 55.000 espécies vegetais catalogadas de um total estimado entre 350.000 e 550.000 (SIMÕES et al., 2003). Assim sendo, dados sobre a atividade antimicrobiana de extratos vegetais, avaliada frente a *Cryptococcus* sp e outros microrganismos sensíveis e resistentes, bem como avaliar o possível efeito sinérgico da associação entre antimicrobianos e extratos vegetais, são relevantes, permitindo concluir que são necessários estudos mais detalhados sobre o uso terapêutico das plantas (GULLO et al., 2012).

Entre as substâncias naturais nas quais vem se pesquisando a atividade antimicrobiana, tem se destacado o ácido gálico (e seus derivados semissintéticos), uma vez que apresenta diversas atividades biológicas como antiinflamatório, antioxidante, antimutagênico, anticarcinogênico, antibacteriano, antiviral e analgésico (LOPES et al., 2011). O ácido gálico é um metabólito especial de ocorrência ampla no reino vegetal, ocorrendo em muitas plantas, como por exemplo, raízes de *Paeonia rockii* (PICERNO et al., 2011), frutos de *Syzygium cumini* (TOBAL et al., 2012), folhas, caules e raízes de variedades diferentes de *Labisa pumila* Benth (KARIMI, et al., 2011), *Alchornea glandulosa* (CALVO, et al., 2007), entre muitos outros. Alternativamente, o ácido gálico pode ser produzido por hidrólise microbiana de ácidos tânicos pela tanase (tannin-acylhydrolase), uma enzima induzível, secretada por microrganismos (INOUE, et al., 1995; PINTO, 2002; PINTO et al., 2001; POURRAT, et al., 1987) ou ainda através da hidrólise ácida de taninos, porém deve-se ter em mente que este método tem como desvantagens, o alto custo da produção e a baixa pureza (LOPES et al., 2011).

Vários estudos vem sendo desenvolvidos para verificar a atividade antimicrobiana do ácido gálico e seus derivados semissintéticos obtidos por síntese parcial sobre vários microrganismos. Em 2001, Kubo et al. (2001) testaram a atividade antimicrobiana dos galatos de propila, octila e dodecila contra 16 microrganismos. No geral, bactérias Gram-positivas e os fungos foram sensíveis, enquanto que as bactérias Gram-negativas foram mais resistentes aos galatos. Dentre estes galatos testados, o galato de octila exibiu atividade antifúngica contra *Saccharomyces cerevisiae*, *Zygosaccharomyces bailii*, *Candida albicans*, e *Aspergillus niger*.

Do mesmo modo, estudos mais recentes, mostraram a atividade antifúngica de uma série de 15 galatos atuando contra um painel representativo de fungos patogênicos oportunistas, os quais foram estudados no intuito de analisar a importância de considerar o

microrganismo testado, as hidroxilas fenólicas, a influência do comprimento da cadeia alifática e a hidrofobicidade destas substâncias (LEAL et al., 2009). Apesar destes estudos, pouco se sabe sobre sua ação em isolados de *Cryptococcus* sp. Baseado neste fato, este trabalho se propôs a avaliar a atividade antifúngica do ácido gálico e seus derivados sobre isolados sensíveis e resistentes de *Cryptococcus* sp.

Derivados do ácido gálico também vem sendo descritos como moléculas com atividade inibitória de bombas de efluxo, como por exemplo a proteína Pdr5p, envolvida na resistência de células tumorais aos fármacos anticâncer e em leveduras, na resistência a compostos antifúngicos (RANGEL et al., 2010). Entretanto, não existem estudos que analisam esse efeito inibitório a nível de expressão dos genes que codificam as proteínas com atividade de bombas de efluxo. Assim sendo, adicionalmente à verificação da atividade antifúngica destas moléculas, este trabalho também teve como objetivo avaliar a atividade inibitória das bombas de efluxo codificadas pelos genes *Mdr1* e *Afr1* em isolados de *Cryptococcus* sp à nível de expressão, pela molécula derivada do ácido gálico selecionada, o galato de n-dodecila (G16).

Diante deste quadro, o aumento no surgimento de cepas de *Cryptococcus* sp resistentes ao fluconazol é potencialmente problemático, pois existem poucas alternativas para o tratamento dessa micose sistêmica além da anfotericina B. Portanto, a investigação da resistência ao nível genético e molecular é fundamental para compreender os mecanismos de resistência envolvidos e assim pensar em novas estratégias terapêuticas mais eficientes, alvo de estudo deste trabalho.

2 OBJETIVOS

- Analisar a atividade antifúngica dos derivados do ácido gálico classificados de G1 a G17, frente a isolados clínicos e ambientais sensíveis e resistentes de *C. neoformans* e *C. gattii*, bem como determinar se apresentam ou não atividade citotóxica sobre linhagens de células epiteliais de pulmão;
- Avaliar o nível de expressão dos genes *Mdr1* e *Afr1*, codificadores de bombas de efluxo, através de quantificação relativa por PCR (*polimerase chain reaction*) em tempo real nos isolados clínicos e ambientais sensíveis e resistentes de *C. neoformans* e *C. gattii*, e prospectar moléculas de fontes naturais e sintéticas com atividade inibitória destas bombas.

3 METODOLOGIA

3.1 Microrganismo

Para a realização dos testes foram empregados 3 isolados clínicos de *C. neoformans* var. *grubii*, sendo um resistente (Cn30) ao fluconazol (*in vitro*), um com sensibilidade intermediária (Cn27) e outro sensível (Cn 26) ao fármaco, os quais foram recuperados de paciente HIV positivo com histórico de recidivas por falha terapêutica; e dois isolados de *C. gattii* recuperados de psitacídeos, onde um possui sensibilidade reduzida ao fluconazol (Cg 118) e outro sensível (CL) ao mesmo fármaco, *in vitro*. Como cepas padrões foram utilizadas a ATCC (*The American Type Culture Collection*) de *C. neoformans* 90012 e a cepa de *C. gattii* 56990, pertencentes à micoteca do Laboratório de Micologia Clínica do Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Araraquara e Instituto Adolfo Lutz, cedidos em colaboração.

3.2 Teste de sensibilidade

Os testes de sensibilidade foram realizados de acordo com o documento M27-A3 (2008) - Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para Determinação da Sensibilidade de Leveduras à Terapia Antifúngica: Norma aprovada - do CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) e com as alterações propostas por Rodríguez-Tudela (1996).

O teste foi realizado com o ácido gálico e seus derivados semissintéticos, gerados por síntese parcial (ésteres n-alquil), denominados da seguinte forma: G1= ácido gálico, G2= galato de metila, G3= galato de etila, G4= galato de n-propila, G5= galato de i-propila, G6= galato de n-butila, G7= galato de n-pentila, G8= galato do ácido 3,4,5-triacetoxibenzóico, G9= galato de i-butila, G10= galato de n-hexila, G11= galato de n-heptila, G12= galato de n-octila, G14= galato de n-decila, G15= galato de n-undecila, G16= galato de n-dodecila e G17= galato de n-tetradecila. Os galatos foram cedidos gentilmente por Luis Octávio

Regasini, Maicon S. Petrônio, Dulce Helena S. Silva e Vanderlan S. Bolzani do Instituto de Química da Unesp Araraquara. A partir das concentrações iniciais de cada galato (reconstituídos em DMSO) calculou-se qual o volume deveria ser pego de cada um para se obter na placa de 96 poços a concentração final de 500 µg/mL (no segundo poço de cada linha), diluídos em RPMI-1640 com L-glutamina sem bicarbonato de sódio e acrescido de 2% de glicose, tamponado com MOPS 0,165M, pH 7,0. A partir do primeiro poço realizaram-se diluições seriadas dos galatos, obtendo-se concentrações finais (após a adição de 100 µL de inoculo em 100 µL de galato em RPMI) que variaram de 250 µg/mL a 0,49 µg/mL sendo no total 10 diluições com a concentração sempre caindo pela metade entre um poço e outro. Para controle também se realizou o teste de sensibilidade com os fármacos antifúngicos sintéticos fluconazol (FLU) e anfotericina B (ANF-B), uma vez que os valores de CIM para estas moléculas já haviam sido determinados previamente. Para estes fármacos foram preparadas uma série de 10 diluições estoque (solução mãe) sendo que tais diluições apresentam a metade da concentração da anterior e a primeira 100 vezes a concentração final na placa de microdilição (a ANF-B foi diluída em DMSO e o FLU em água). A partir destas soluções mãe foram preparadas soluções de trabalho através de diluições 1:100 em meio RPMI. A concentração final na placa (após a adição do inoculo) para FLU foi de 64 µg/mL a 0,125 µg/mL e para ANF-B foi de 8 µg/mL a 0,015 µg/mL.

Para a preparação dos inóculos os isolados com perfil sensível e ATCC foram cultivados em ágar Sabouraud e incubados a temperatura ambiente durante 48 horas, enquanto que o isolado clínico intermediário (*Cn* 27), o resistente (*Cn* 30) e o isolado de *C. gattii* resistente (*Cg*118) foram cultivados em ágar Sabouraud acrescido de fluconazol em concentração de 16 µg/mL e 64 µg/mL, respectivamente, e incubados em temperatura ambiente por 48 horas. A partir destes repiques preparou-se inóculos em tampão PBS ajustados para uma concentração de 2,5 a 5 x 10⁶ células/mL. Na sequência a concentração

dos inóculos em RPMI foi ajustada para uma concentração final na placa de $5,0 \times 10^3$ à $2,5 \times 10^3$. Após 48 horas de incubação em agitação (150 rpm) e 35°C, foram realizadas leituras visuais, onde o ponto de leitura foi aquele em que ocorreu inibição total do crescimento, sendo o valor de CIM (Concentração Inibitória Mínima) a menor concentração que alcança esse valor.

3.3 Concentração Fungicida Mínima

Após a leitura dos valores de CIM realizada no teste descrito anteriormente (item 3.2.), uma amostra de cada um dos 96 poços da placa de microdiluição foi retirada e colocada cuidadosamente em ágar Sabouraud contido em placas grandes. Após 48 horas de incubação a 35°C, verificou-se o crescimento ou não de colônias nos locais em que foram inoculadas e comparadas com a leitura da microplaca. Desta forma, verificou-se qual a concentração em que não houve crescimento, sendo esta denominada de CFM (concentração fungicida mínima).

3.4 Escolha do derivado do ácido gálico para a realização do teste de sinergismo e para a verificação da ação na expressão dos genes *Mdr1* e *Afr1*

O galato de n-dodecila (G16) foi o derivado do ácido gálico selecionado para a avaliação da atividade sinérgica com o fluconazol e para a verificação da sua ação na expressão dos genes *Mdr1* e *Afr1*, por ter sido um dos derivados com melhor atividade antifúngica (verificada através do teste de sensibilidade) e por haver relatos na literatura sobre sua atividade inibitória em bombas de efluxo. (RANGEL et al., 2010). A expressão dos genes *Mdr1* e *Afr1* também foi verificada após o contato com o fármaco sintético Tacrolimus (FK506), uma vez que esta também tem ação inibitória sobre a atividade das bombas de efluxo.

3.5 Avaliação da atividade sinérgica entre G16 e fluconazol

O teste do “tabuleiro de xadrez” foi baseado no procedimento estabelecido pelo CLSI para microdiluição em caldo para teste de sensibilidade antifúngica (CLSI, 2008) e conforme descrito por Leite, 2010. O meio de cultura utilizado foi o RPMI-1640 com L-glutamina sem bicarbonato de sódio e acrescido de 2% de glicose, tamponado com MOPS 0,165M, pH 7,0. Na coluna 1, de A à D, foi adicionado 200 µL de RMPI como controle negativo, enquanto que, ainda na mesma coluna, de E à H, foi colocado 100 µL de RPMI juntamente com 100 µL de inóculo na concentração de 10^6 células/mL, como controle positivo. Na coluna 12, foi acrescentado G16 em diluição seriada, de A à H, o mesmo ocorrendo na linha H, de 2 à 11, com o fluconazol. As duas substâncias, para iniciar a combinação de ambas na placa, tinham concentrações de 4 vezes a valor da concentração final. Nas linhas de A à G, colunas de 2 à 11, acrescentou-se 50 µL do G16, em diluições seriadas (cada linha com uma diluição). Nas colunas 2 à 11, de A à G, foi adicionado 50 µL de fluconazol, também realizando diluições seriadas (cada coluna com uma diluição). Desse modo, em cada placa foi avaliado o isolado frente aos dois compostos isoladamente e em associação (LEITE, 2010). A disposição dos compostos e as respectivas concentrações finais na placa podem ser observadas no Quadro 1. Em cada poço (exceto no controle negativo) foi adicionado 100 µL de suspensão fúngica, preparada em RPMI, tendo a concentração final de $5,0 \cdot 10^2 - 2,5 \cdot 10^3$ UFC/mL. As placas foram incubadas à 35°C e 150 rpm e lidas visualmente após 48 horas. O resultado do teste confirmatório é a menor concentração de cada molécula, que inibiu completamente o crescimento da amostra.

Quadro1: Exemplo do esquema de combinação na placa de microdiluição com a concentração do G16 (em negrito) e do fluconazol (em itálico), para o teste do “tabuleiro em xadrez”. C-, controle negativo; C+, controle positivo.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	C-	64 4	32 4	16 4	8 4	4 4	2 4	1 4	0,5 4	0,25 4	0,125 4	4
B	C-	64 2	32 2	16 2	8 2	4 2	2 2	1 2	0,5 2	0,25 2	0,125 2	2
C	C-	64 1	32 1	16 1	8 1	4 1	2 1	1 1	0,5 1	0,25 1	0,125 1	1
D	C-	64 0,5	32 0,5	16 0,5	8 0,5	4 0,5	2 0,5	1 0,5	0,5 0,5	0,25 0,5	0,125 0,5	0,5
E	C+	64 0,25	32 0,25	16 0,25	8 0,25	4 0,25	2 0,25	1 0,25	0,5 0,25	0,25 0,25	0,125 0,25	0,25
F	C+	64 0,125	32 0,125	16 0,125	8 0,125	4 0,125	2 0,125	1 0,125	0,5 0,125	0,25 0,125	0,125 0,125	0,125
G	C+	64 0,063	32 0,063	16 0,063	8 0,063	4 0,063	2 0,063	1 0,063	0,5 0,063	0,25 0,063	0,125 0,063	0,063
H	C+	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,031

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

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

Composto 1c = CIM do composto 1 em combinação

CIM 1 = CIM do composto 1 isoladamente

Composto 2c = CIM do composto 2 em combinação

CIM 2 = CIM do composto 2 isoladamente (LEITE, 2010).

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

3.6 Avaliação da atividade citotóxica dos galatos de alquila.

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

A avaliação da viabilidade celular pelos métodos colorimétricos com sais tetrazólicos, como a reação com o sal de MTT, é definida pela redução do sal em derivado azul de formazana, o qual é um precipitado formado pela ação da enzima succinato desidrogenase, produto da respiração mitocondrial; desta forma, este método avalia de forma quantitativa a sobrevivência e proliferação celular, uma vez que a conversão do MTT em formazana ocorre somente em células vivas e a quantidade do precipitado é proporcional ao número de células vivas (DENIZOT e LANG, 1986; FERRARI, FORNASIERO et al., 1990; GERLIER e THOMASSET, 1986). O precipitado de formazana apresenta coloração azul e com adição de um solvente orgânico é possível sua solubilização (DENIZOT e LANG, 1986).

Os galatos foram avaliados nas concentrações de 62,5 a 0,002 mg/L e as soluções de trabalho foram preparadas a partir de soluções estoque e diluídas em meio específico para cada linhagem celular nas placas previamente preparadas com as células. Além disso, foi feito um controle negativo com células não tratadas, contendo apenas o meio de cultura; e um controle positivo, tratando as células com peróxido de hidrogênio. Inicialmente o meio de cultura foi retirado e foram adicionados 100 µL de cada diluição de cada galato por poço. As

placas foram incubadas a 37°C, 5% de CO₂ ao abrigo de luz por 24 horas. Na sequência as soluções foram retiradas e adicionados 10 µL da solução de MTT; então as placas foram incubadas novamente a 37°C por 4 horas, conforme descrito por Denizot et al., (1986) e Ferrari et al., (1990). Decorrido o tempo de incubação a solução de MTT foi retirada e foram adicionados 100 µL de isopropanol para diluir o precipitado formado nos poços onde as células encontravam-se vivas, e desta forma realizar a leitura pela alteração da cor do meio de amarelo para violeta.

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

As análises de citotoxicidade foram realizadas com os galatos classificados de G1 à G17 (descritos no item 3.2) em 3 experimentos independentes. Foi considerada a leitura obtida no controle negativo como um total de 100% de células vivas. A análise estatística foi realizada através do método ANOVA e complementada pelo teste de Bonferroni.

3.7 Extração de RNA total na ausência de galato

Para a extração de RNA total utilizou-se o método do Trizol. Inicialmente os microrganismos em fase log de crescimento foram colocados em meio YEPD e incubados a 37°C em agitação por 24 horas. Decorrido esse período, as células foram lavadas 3 vezes com PBS para a remoção do meio de cultura, sendo então transferidos cerca de 1,5 g de microrganismos para um tubo (tipo Falcon) contendo 3,5mL de Trizol e pérolas de vidro. A amostra foi agitada vigorosamente em vórtex por 15 minutos e após, repousadas em temperatura ambiente por 10 minutos e centrifugadas a 3000 rpm por 10 minutos. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo, adicionado de 0,2 mL de clorofórmio para cada 0,75mL de trizol recuperado, foi agitado vigorosamente e deixado em repouso por 10

minutos. Após o repouso, a amostra foi centrifugada a 3000 rpm por 15 minutos e a fase aquosa, transferida para um novo tubo. Adicionou-se o volume recuperado na etapa anterior de uma mistura de fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25: 24: 1), agitou-se gentilmente, repousou-se em temperatura ambiente por 10 minutos e realizou-se a centrifugação dos tubos a 3000 rpm por 15 minutos. A fase aquosa foi novamente transferida para um novo tubo e foram acrescentados 0,25 mL de isopropanol e 0,25mL de solução de citrato de sódio 0,4M e cloreto de sódio 0,8M para cada 0,75mL de trizol recuperado inicialmente, agitou-se gentilmente e foram deixadas em repouso por 10 minutos a temperatura ambiente. A amostra foi centrifugada a 3000 rpm por 30 minutos, o sobrenadante foi descartado e o precipitado, lavado com etanol a 75%. Nova centrifugação foi realizada a 3000 rpm por 5 minutos e o sobrenadante desprezado. O precipitado secou a temperatura ambiente e foi ressuspendido em água DEPC (Dietil Pirocarbonato) 0.01% e armazenado a -70 °C. Todas as amostras extraídas foram quantificadas em espectrofotômetro.

3.8 Tratamento dos isolados com galato de n-dodecila (G16) e Tacrolimus (FK506) e extração de RNA total.

Primeiramente os isolados foram crescidos em meio YEPD à 37°C e 150 rpm até a fase log de crescimento. Na sequência, as células foram lavadas 3 vezes com PBS estéril e 1,5 gramas de células foram transferidas para um tubo do tipo Falcon. Cada isolado foi submetido a 3 tratamentos diferentes, sendo eles: G16, FK506 e DMSO como controle. A concentração escolhida para o G16 foi de cerca de 500 vezes o CIM, baseado no fato de que a quantidade de células contidas em 1,5 gramas é muito maior do que a quantidade de células usadas para o teste de sensibilidade. A concentração usada de FK506 foi de 10 µM, baseado em trabalhos que mostram que esta concentração tem atividade inibidora de bombas de efluxo. (RANGEL et al., 2010). Todas as concentrações foram calculadas para esta concentração num volume

final de 5 mL em PBS. Como controle, foi utilizado DMSO em um volume final de 5 mL em PBS na mesma quantidade adicionada da solução mãe de G16 no teste, uma vez que tanto o G16, quanto o FK506 são solubilizados em DMSO, e desta forma se eliminaria a interferência deste solvente nos resultados. Os falcons contendo cada uma das situações para cada isolado foram colocados sob agitação (150 rpm), à 35°C, overnight. O tratamento feito com as substâncias seguiu a metodologia utilizada por Kelly, J. e Kavanagh, K., 2010, com modificações.

Após o período de incubação, as células foram lavadas 3 vezes com PBS estéril e realizou-se a extração do RNA total pelo método do Trizol, como descrito no item 3.7.

3.9 Síntese de cDNA fita simples

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

A síntese de cDNA fita simples foi realizada para todos os isolados citados conforme protocolo acima para quantificação de expressão de genes codificadores de bombas de efluxo em PCR Tempo Real.

3.10 PCR em Tempo Real (Real Time PCR)

Foram utilizados iniciadores específicos para os genes *Mdr1* de *Cryptococcus neoformans* (sense) – CGGTCGATTAACCACGTCTT, (antisense) – GCAGACGTCTCGGGAGTAAG; *Mdr1* de *Cryptococcus gattii* (sense) – TAACTCCCGAAACTGCTGCT, (antisense) – AAGCCAAGTCGCTAGGAACA; e *Afr1* de *Cryptococcus* sp (sense) – GAACAGCAGGACACTCACGA, (antisense) – GTTTCGGAACGTGTTGAGGT. As reações foram realizadas utilizando-se as quantidades necessárias de cDNA e de SYBR green ROX mixture (Applied Biosystems), e quantidades suficientes de cada primer de forma a se obter a concentração de 0,5µM ou 0,7µM de acordo com a concentração de primer determinada para cada cepa como sendo a menor concentração que gera máxima amplificação (realizou-se teste para a otimização dos primers para determinar-se essas concentrações – dados não mostrados), e adicionou-se à reação água DEPC estéril até atingir o volume de 20 µL. As reações foram realizadas com temperatura inicial de 50°C por 2 minutos, seguido por 10 minutos a 95°C. Depois, 40 ciclos de 95°C a 15 segundos, seguidos de anelamento e síntese a 60°C por um minuto. Em seguida, a análise da curva de *melting* foi realizada a partir de emissão de sinal correspondente a um único produto. As reações foram realizadas com o aparelho Applied Biosystems 7500 cyclor. Todos os dados foram analisados por 2-ΔCT. O gene *Gapdh* (*C. neoformans*: (sense) - 5'TTTCCCGCGACTTTTTGG, (antisense) - TAGCATCTGAGCCGACGCT; *C. gattii* (sense) - GGACCTCGTGCGCTTTATTC, (antisense) – TTCACGGCTGAGGATGGCG) foi utilizado como gene de referência.

A análise estatística foi realizada através da comparação dos dados pelo método ANOVA, complementado pelo teste de Tukey.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Teste de sensibilidade

O teste foi realizado com todos os galatos de alquila descritos no item 3.2, no entanto, os que apresentaram os melhores resultados foram G11, G12, G14, G15, G16 e G17. Os valores de CIM e CFM encontrados para estes galatos, bem como os obtidos para fluconazol e anfotericina B são mostrados nos quadros 2 e 3.

Quadro 2: Valores de CIM e MFC em $\mu\text{g/mL}$ para as moléculas de galato de alquila frente às cepas ATCCs 90012 de *C. neoformans* e 56990 de *C. gattii*, e os isolados sequenciais de *C. neoformans* (26, 27 e 30) e dois isolados de psitacédeo de *C. gattii* (Cg118 e CL).

Isolados	G11		G12		G14		G15		G16		G17	
	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM
<i>Cryptococcus neoformans</i> ATCC 90012	1,95	15,63	1,95	7,81	0,98	3,91	0,98	3,91	0,98	3,91	0,98	15,63
<i>Cryptococcus neoformans</i> 26 (sensível)	1,95	15,63	1,95	7,81	0,98	3,91	0,98	3,91	0,98	3,91	0,98	7,81
<i>Cryptococcus neoformans</i> 27 (intermediário)	1,95	15,63	1,95	7,81	0,98	3,91	1,95	3,91	0,98	3,91	1,95	7,81
<i>Cryptococcus neoformans</i> 30 (resistente <i>in vitro</i>)	0,49	0,49	0,49	1,95	0,49	0,49	0,49	0,49	0,49	1,95	0,49	0,98
<i>Cryptococcus gattii</i> ATCC 56990	0,98	15,63	0,98	7,81	0,98	1,95	0,49	3,91	0,98	3,91	0,49	3,91
<i>Cryptococcus gattii</i> 118 (resistente <i>in vitro</i>)	0,98	15,63	1,95	7,81	0,98	3,91	0,98	7,81	0,49	3,91	0,98	3,91
<i>Cryptococcus gattii</i> (CL-isolado de psitacédeo)	0,98	15,63	0,98	15,63	0,49	3,91	0,49	3,91	0,49	3,91	0,49	7,81

Quadro 3: Valores de CIM em $\mu\text{g/mL}$ para os fármacos sintéticos fluconazol e anfotericina B, frente as cepas ATCCs 90012 de *C. neoformans* e 56990 de *C. gattii*, e os isolados

sequenciais de *C. neoformans* (26, 27 e 30) e dois isolados ambientais de *C. gattii* (Cg118 e CL).

Isolados	FLU		ANF-B	
	CIM	CFM	CIM	CFM
<i>Cryptococcus neoformans</i> ATCC 90012	4,0	4,0	0,25	0,25
<i>Cryptococcus neoformans</i> 26 (sensível)	4,0	4,0	0,25	0,25
<i>Cryptococcus neoformans</i> 27 (intermediário)	16,0	16,0	0,25	0,25
<i>Cryptococcus neoformans</i> 30 (resistente <i>in vitro</i>)	64,0	64,0	0,25	0,25
<i>Cryptococcus gattii</i> ATCC 56990	4,0	4,0	0,50	0,50
<i>Cryptococcus gattii</i> 118 (resistente <i>in vitro</i>)	64,0	64,0	0,25	0,25
<i>Cryptococcus gattii</i> (CL-isolado de psitacádeo)	4,0	4,0	0,25	0,25

Os valores de CIM e CFM encontrados para os demais galatos testados encontram-se no anexo A.

Os resultados mostram que os galatos de alquila denominados de G11 a G17 apresentaram alta atividade antifúngica (os CIMs variaram entre 0,49 e 1,95 µg/mL) contra todas as cepas testadas, inclusive para aquelas que apresentam resistência *in vitro* para o fluconazol. Além disso, os valores de CIM encontrados para os galatos foram bem inferiores aos valores de CIM observados para fluconazol, o que indica maior atividade antifúngica destas moléculas. Estes resultados são promissores e mostram uma possível utilização destes galatos como uma alternativa terapêutica aos medicamentos sintéticos utilizados atualmente na terapia da Criptococose, principalmente nos casos de falha terapêutica devido ao desenvolvimento de resistência aos azóis.

4.2 Teste de sinergismo

O teste do “tabuleiro em xadrez” foi realizado para verificar a atividade combinatória entre o galato de n-dodecila (G16) e fluconazol frente aos isolados testados. Para a maioria das cepas o efeito obtido para a combinação foi aditivo, exceto pra o isolado resistente Cn30,

cuja combinação entre as substâncias foi indiferente. Os resultados do índice de concentração inibitória fracionada (ICIF), bem como o tipo de combinação para cada isolado, são mostrados no quadro 4.

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

ISOLADO	ICIF	ATIVIDADE
<i>Cryptococcus neoformans</i> ATCC 90012	1,00	Aditiva
<i>Cryptococcus neoformans</i> 26 (sensível)	0,75	Aditiva
<i>Cryptococcus neoformans</i> 27 (intermediário)	0,75	Aditiva
<i>Cryptococcus neoformans</i> 30 (resistente <i>in vitro</i>)	1,002	Indiferente
<i>Cryptococcus gattii</i> ATCC 56990	1,00	Aditiva
<i>Cryptococcus gattii</i> 118 (resistente <i>in vitro</i>)	0,625	Aditiva
<i>Cryptococcus gattii</i> (CL-isolado de psitacídeo)	0,75	Aditiva

Exceto para Cn30, a atividade resultante da combinação entre G16 e fluconazol foi aditiva, com redução dos valores de CIM para fluconazol. Isto mostra que o uso associado das duas substâncias seria vantajoso principalmente frente a cepas resistentes, como o Cg118, uma vez que os valores de CIM para fluconazol nesta cepa foi diminuído em 2 vezes. Estes resultados vem a colaborar com os resultados obtidos no teste de sensibilidade para o G16, mostrando o grande potencial de utilização desta molécula como antifúngico, quando usado isoladamente ou em associação com moléculas sintéticas, como o fluconazol.

4.3 Avaliação da atividade citotóxica dos galatos de alquila

Como citado no item 3.6, o teste de citotoxicidade foi realizado com duas linhagens de células epiteliais de pulmão, a A549 (linhagem tumoral) e a MRC-5 (linhagem normal). Os resultados obtidos são mostrados nas Figuras 1 e 2.

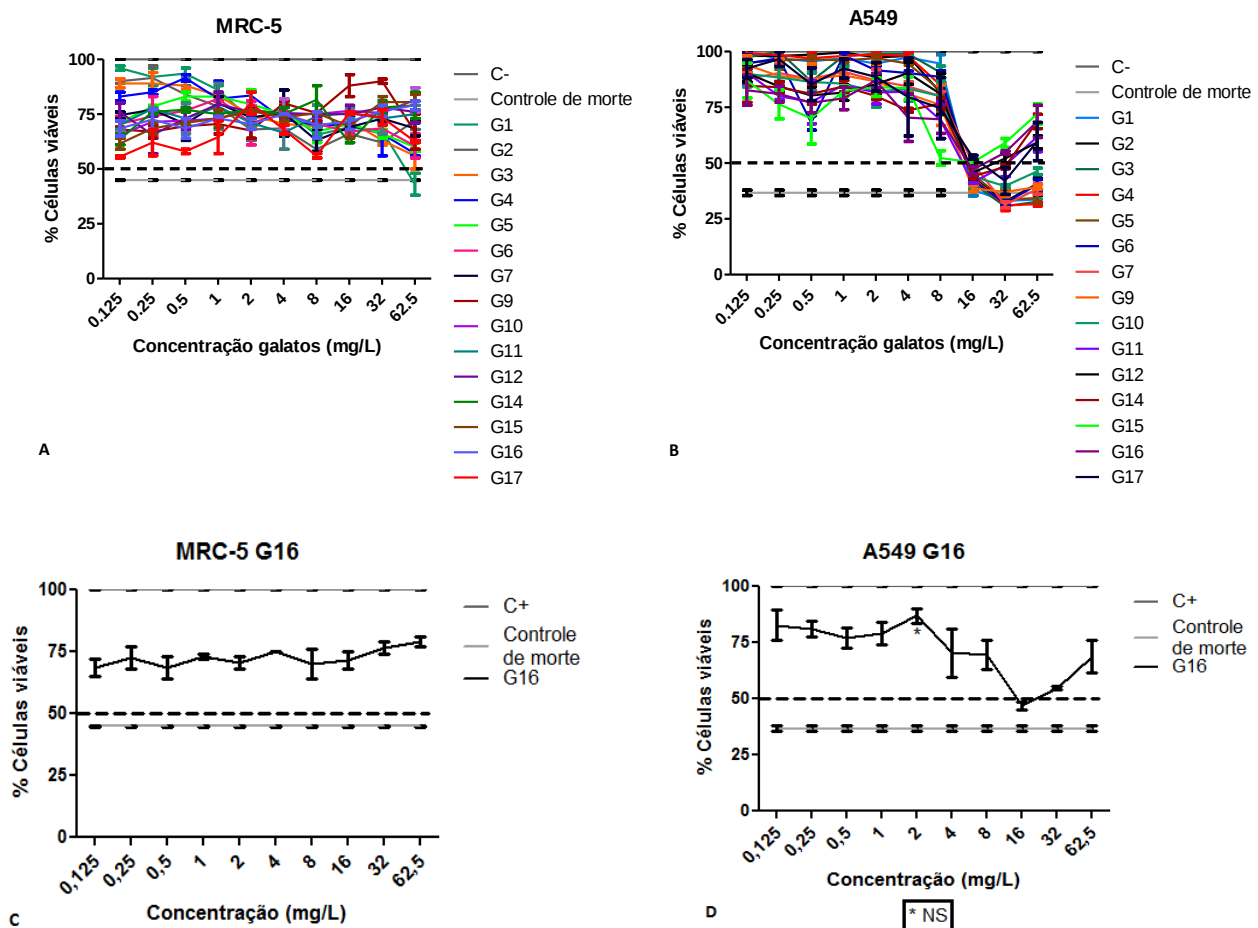


Figura 1: Taxa de viabilidade celular em células epiteliais das linhagens A549 e MRC-5 após contato com galatos de alquila. A) Taxa de viabilidade celular de células epiteliais da linhagem MRC-5 após contato com galatos de alquila classificados de G1 à G17 em ampla faixa de concentração; B) Taxa de viabilidade celular de células epiteliais da linhagem A549 após contato com galatos de alquila classificados de G1 à G17 em ampla faixa de concentração; C) Taxa de viabilidade celular de células epiteliais da linhagem MRC-5 após contato com galato de n-dodecila (G16) em ampla faixa de concentração; D) Taxa de viabilidade celular de células epiteliais da linhagem A549 após contato com galato de n-

dodecila (G16) em ampla faixa de concentração. C- = controle negativo; Controle de morte = controle positivo.

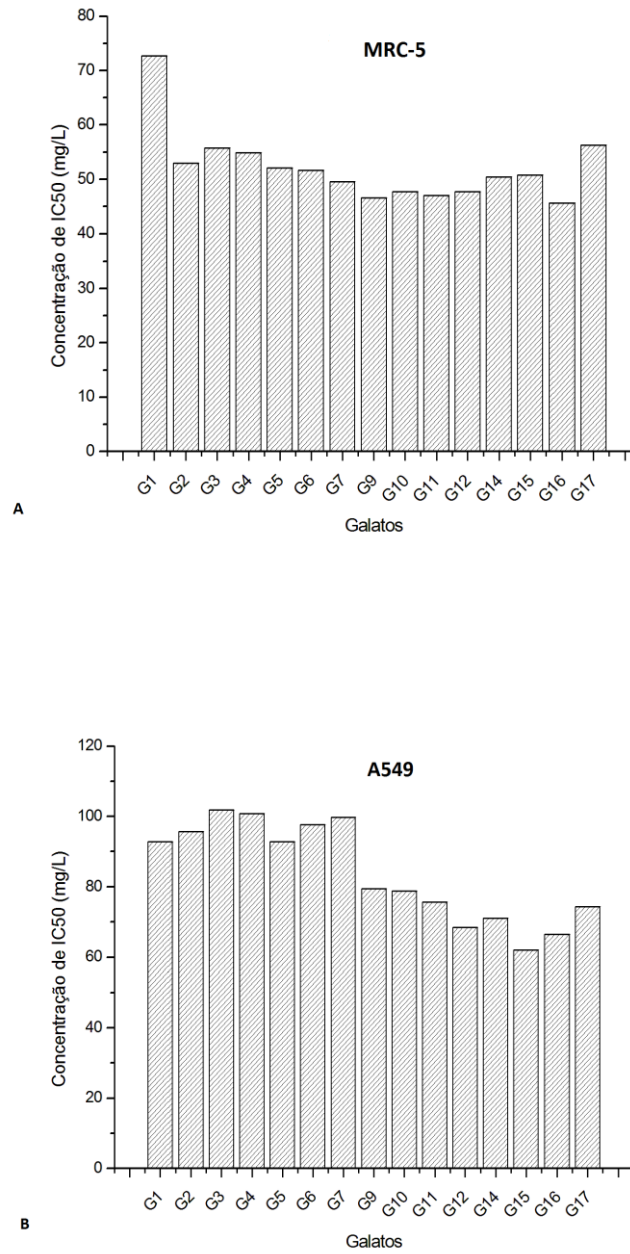


Figura 2: Valores de IC₅₀ (mg/L) determinados para galatos de alquila classificados de G1 à G17 em linhagens de células epiteliais de pulmão MRC-5 e A549. A) Valores de IC₅₀ (mg/L) para galatos de alquila classificados de G1 à G17 em linhagem de célula epitelial de pulmão MRC-5; B) Valores de IC₅₀ (mg/L) para galatos de alquila classificados de G1 à G17 em linhagem de célula epitelial de pulmão A549.

Na Figura 1, os gráficos A e B apresentam a porcentagem de células vivas das linhagens MRC-5 e A549, respectivamente, na faixa de concentração de 62,5 à 0,125 mg/L, para os galatos de alquila classificados de G1 à G17. No gráfico B, a faixa de concentração de 62,5 à 16 mg/L apresenta menor porcentagem de viabilidade celular na linhagem A549 quando comparada com a linhagem MRC-5, e apresentando a taxa de viabilidade celular semelhante ao controle de morte. A faixa de concentração de 8 à 0,125 mg/L, entretanto, mostrou alta taxa de viabilidade celular, apresentando diferença estatística significativa em relação ao controle de morte.

Para a linhagem de células MRC-5, entretanto, os valores da taxa de viabilidade celular para todas as concentrações testadas apresentaram diferença estatística significativa em relação ao controle de morte.

Os gráficos C e D na Figura 1 mostram isoladamente a taxa de viabilidade celular para o galato de n-dodecila (G16), galato este, selecionado para os demais testes.

A Figura 2 apresenta os valores de IC_{50} , em mg/L, determinada para os galatos de alquila (G1 à G17) frente às linhagens celulares MRC-5 e A549. A IC_{50} é definida como a concentração que causa 50% de inibição do crescimento celular e foi calculada a partir da fórmula: $IC_{50} = ((n\text{-alquil galato} \times 100\%)/C+) - 100\%$, onde C+ é a porcentagem de células viáveis no controle positivo (sem galato); e n-alquil galato é a porcentagem de células viáveis no teste com cada galato. Os gráficos A e B da figura 2, portanto, representam a as concentrações requeridas de cada galato para resultar em 50% de morte celular nas linhagens MRC-5 e A549, respectivamente. Através destes gráficos podemos perceber que para a linhagem MRC-5 os valores de IC_{50} para a maioria dos galatos variaram em torno de 50 mg/L. Para a linhagem A549, de G1 à G7 os valores de IC_{50} variaram em torno de 95 mg/L e de G9 à G17, em torno de 70 mg/L. Para os galatos de G11 à G17, para os quais observou-se melhor

atividade antifúngica, os valores de IC₅₀ para as duas linhagens encontram-se bem acima dos valores de CIM encontrados no teste de sensibilidade, o que dá indícios da segurança da utilização destas moléculas, entretanto, para se chegar à esta conclusão, é necessária a análise do índice de seletividade obtido para cada um destes galatos.

O índice de seletividade (IS), definido para cada substância em questão, é calculado a partir da razão da medida do IC₅₀ para cada linhagem celular, e a concentração inibitória mínima (CIM) determinada para a substância teste em questão ($IS = IC_{50} / CIM$), e é considerado significativo quando IS for maior do que 10, ou seja, para valores de IS maiores que 10, pode-se classificar a substância mais seletiva para o patógeno e menos tóxica para as células testadas, garantindo, desta forma, a segurança e a eficácia da molécula. Os valores de IS encontrados para os galatos de G11 à G17 (os que apresentaram os resultados mais significativos) estão apresentados no Quadro 5.

Quadro 5: Valores do Índice de Seletividade (IS) encontrados para os galatos de alquila de G11 à G17, frente às células epiteliais de pulmão das linhagens MRC-5 e A549 para isolados de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*.

Isolados	G11		G12		G14		G15		G16		G17	
	MRC-5	A549	MRC-5	A549	MRC-5	A549	MRC-5	A549	MRC-5	A549	MRC-5	A549
CnATCC	6	10	12	18	26	36	26	32	23	34	14	19
Cn26	6	10	12	18	51	72	52	63	47	68	7	10
Cn27	6	10	12	18	13	18	13	16	12	17	29	38
Cn30	24	39	24	35	51	72	52	63	47	68	115	152
CgATCC	3	5	6	9	51	72	26	32	23	34	7	7
Cg118	12	19	12	18	103	145	104	127	93	136	115	152
CL	6	10	24	35	26	36	26	32	23	34	29	38

A partir da análise dos valores de IS encontrados, podemos verificar que, dentre ao galatos de alquila que apresentaram melhores valores de CIM no teste de sensibilidade, os galatos G14, G15 e G16 foram os que tiveram melhores valores de índice de seletividade

frente às linhagens de células MRC-5 e A549, mostrando a segurança e a eficácia dessas moléculas para o uso proposto neste trabalho.

4.4 Expressão dos genes *Mdr1* e *Afr1* antes e após o contato com galato de n-dodecila e FK506.

A expressão dos genes *Mdr1* e *Afr1* foi analisada a partir da extração de RNA total, síntese de cDNA e amplificação em PCR em Tempo Real (Real Time PCR) como descrito nos itens 3.7, 3.8, 3.9 e 3.10. A expressão relativa dos dois genes, obtida para os isolados testados antes do contato com G16 e FK506, está representada na figura 3.

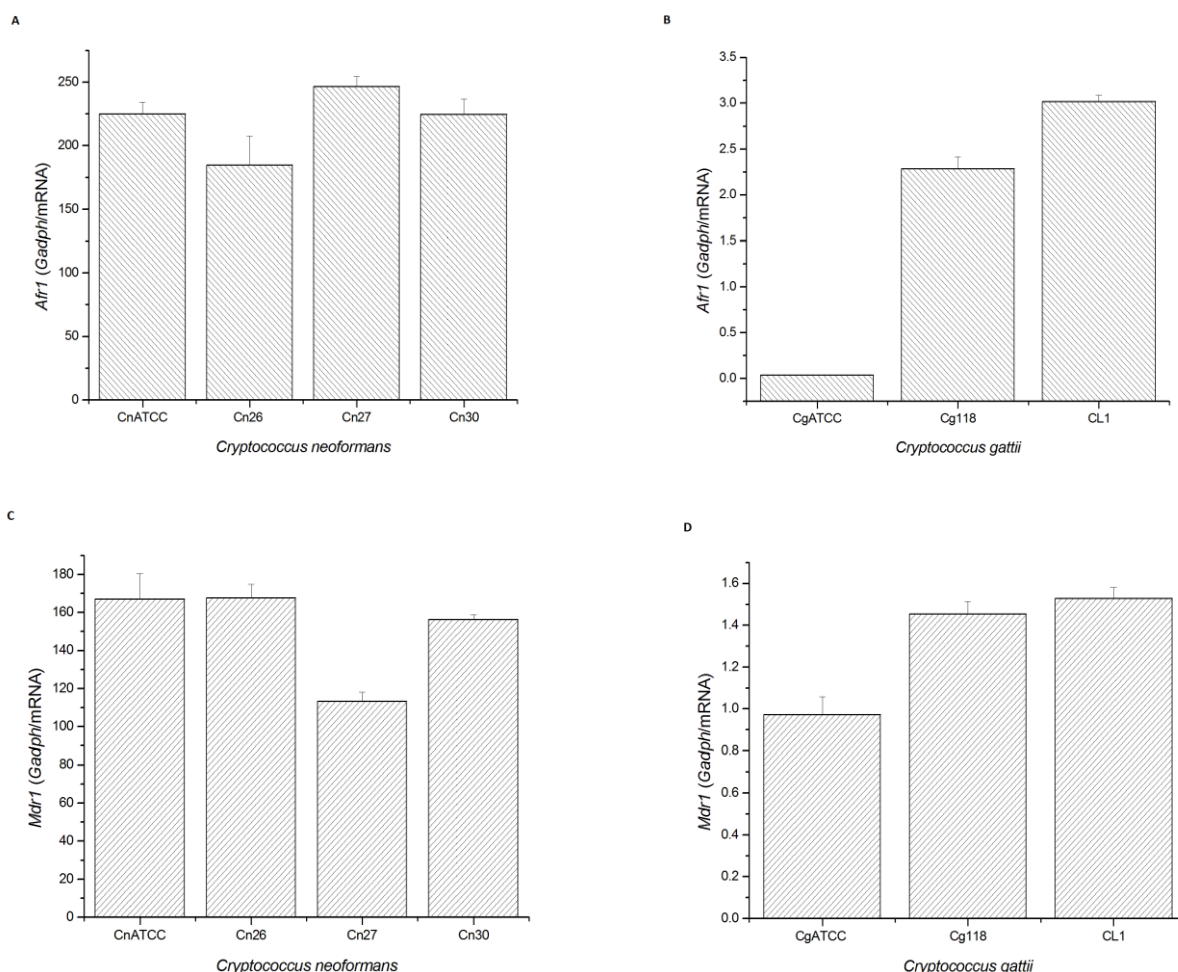


Figura 3: Quantificação relativa dos genes *Mdr1* e *Afr1* por PCR em tempo real. A) Expressão relativa do gene *Afr1* em isolados de *Cryptococcus neoformans*; B) Expressão

relativa do gene *Afr1* em isolados de *Cryptococcus gattii*; C) Expressão relativa do gene *Mdr1* em isolados de *Cryptococcus neoformans*; D) Expressão relativa do gene *Mdr1* em isolados de *Cryptococcus gattii*. *Gadph* foi utilizado como gene de referência.

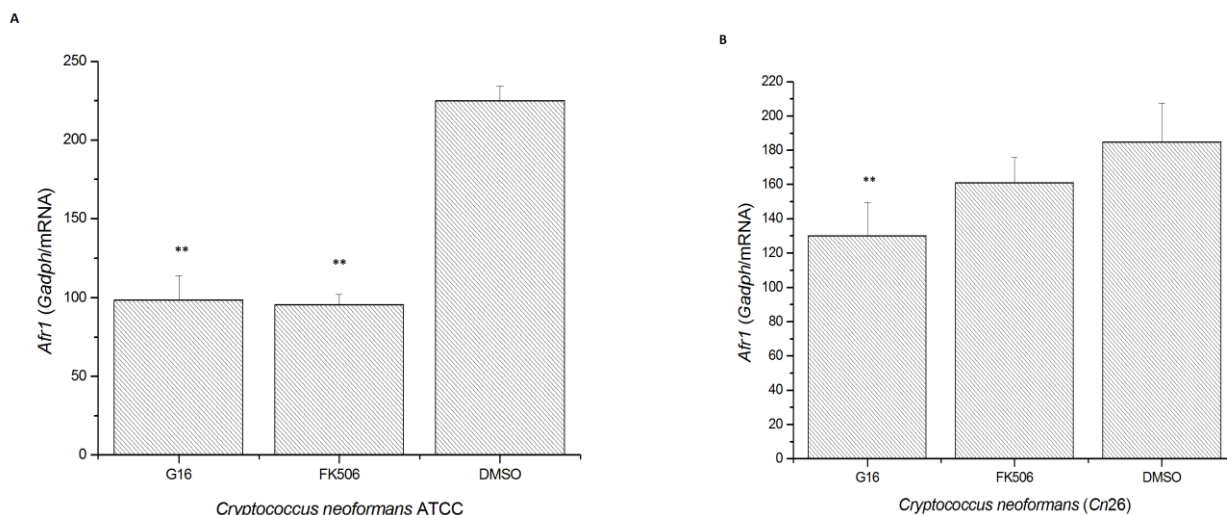
Todos os isolados de *Cryptococcus neoformans* estão expressando tanto o gene *Afr1* quanto o gene *Mdr1*. Com relação ao gene *Afr1*, comparando-se os três isolados sequenciais de *Cryptococcus neoformans*, podemos observar que o isolado com resistência intermediária ao fluconazol (*Cn27*) e o isolado resistente ao mesmo fármaco (*Cn30*) apresentam uma maior expressão do gene do que o isolado sensível (*Cn26*), com uma diferença estatística significativa ($p < 0,01$) em ambos os casos, sendo que o *Cn27* está expressando o gene *Afr1* em cerca de 1,3 vezes mais que o *Cn26* e o *Cn30* cerca de 1,2 vezes mais. Estes resultados mostram que a expressão aumentada desse gene codificador de bomba de efluxo pode estar envolvida na resistência ao fluconazol nestes isolados testados. Para o gene *Mdr1*, entretanto, não se observou diferença na expressão quando comparamos o isolado resistente de *Cryptococcus neoformans* (*Cn30*) com os sensíveis (*CnATCC* e *Cn26*). Houve diferença apenas na expressão do isolado de sensibilidade intermediária ao fluconazol (*Cn27*), no entanto sua expressão foi menor do que a do sensível (*Cn26*). Estes dados indicam que a resistência desenvolvida no isolado *Cn30* provavelmente não esteja relacionada com a expressão do gene *Mdr1*.

Para os isolados de *Cryptococcus gattii* os níveis de expressão dos dois genes foram bem inferiores aos níveis de expressão para *Cryptococcus neoformans*, entretanto, a expressão dos genes também está presente. Para os dois genes (*Afr1* e *Mdr1*) a expressão foi bem maior nos isolados de psitacídeos do que na cepa padrão ATCC de *Cryptococcus gattii*. Com relação ao gene *Afr1*, o isolado resistente (*Cg118*) está expressando cerca de 60 vezes mais e o sensível (CL) cerca de 80 vezes mais que o *CgATCC*. Embora exista essa grande diferença da

expressão dos isolados ambientais quando comparados com a cepa ATCC, ao compararmos *Cg118* com CL, podemos perceber que o isolado sensível está expressando o gene em cerca de 1,3 vezes mais que o resistente, o que nos dá indícios de que a resistência desenvolvida no *Cg118* não esteja associada com a expressão deste gene. Com relação ao gene *Mdr1*, os isolados de psitacídeos (*Cg118* e CL) estão expressando cerca de 1,5 vezes mais o gene do que a cepa padrão ATCC, porém, não houve diferença estatística entre a expressão do gene nos isolados *Cg118* e CL, mostrando que a resistência desenvolvida em *Cg118* também não está relacionada com a expressão de *Mdr1*.

Para o tratamento dos isolados com G16, FK506 e DMSO utilizou-se a metodologia descrita no item 3.8. Como já dito anteriormente, o tratamento com DMSO foi usado como controle, uma vez que tanto o G16 quanto o FK506 tem suas soluções mães e de trabalho preparadas em DMSO. Sendo assim, ao tratar os isolados com DMSO na mesma quantidade adicionada para as duas outras substâncias, já se elimina a interferência deste solvente. Assim sendo, para a análise da alteração da expressão dos genes nos isolados, comparamos os tratados com G16 ou FK506 com os tratados apenas com DMSO.

Os gráficos representando a expressão relativa dos genes *Mdr1* e *Afr1* após o tratamento estão representados nas figuras 4 e 5.



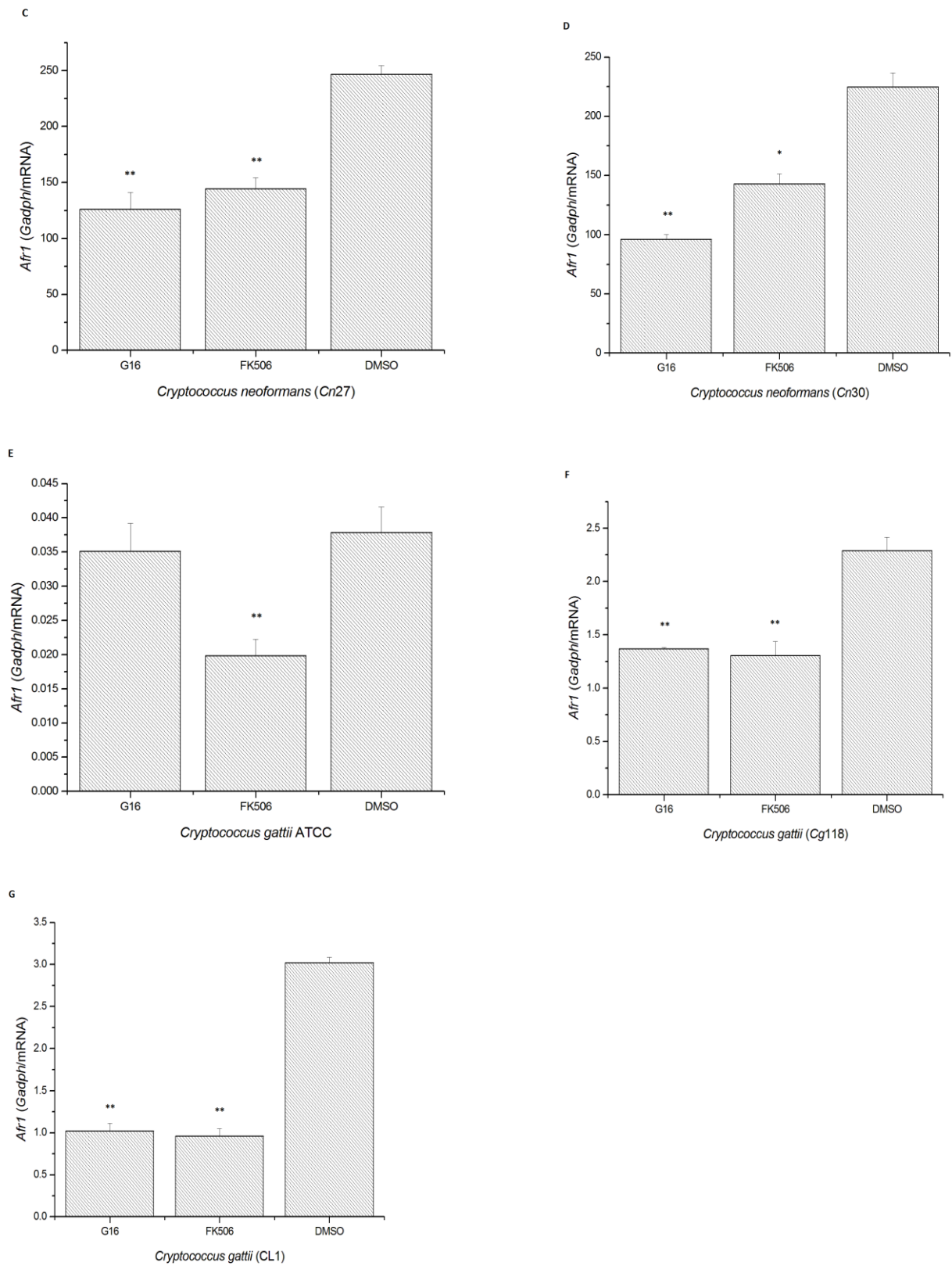
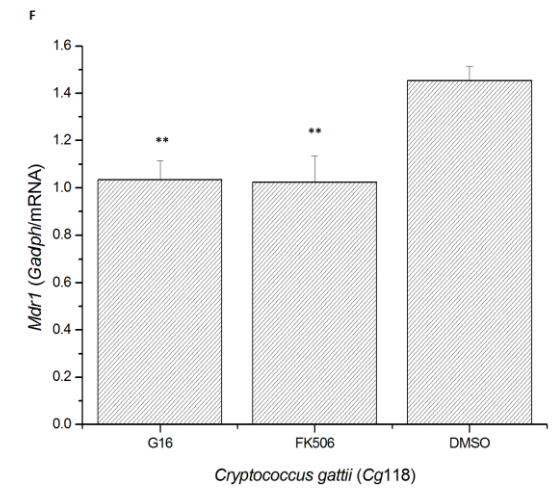
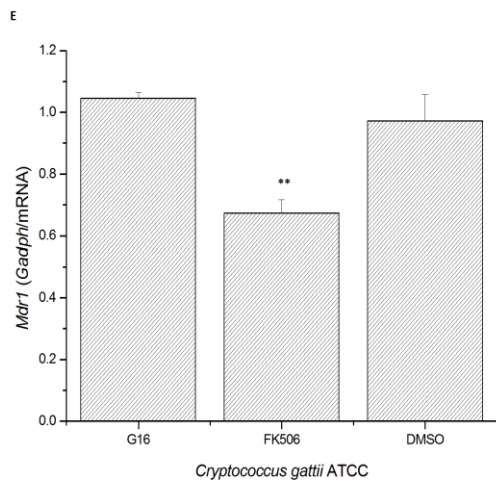
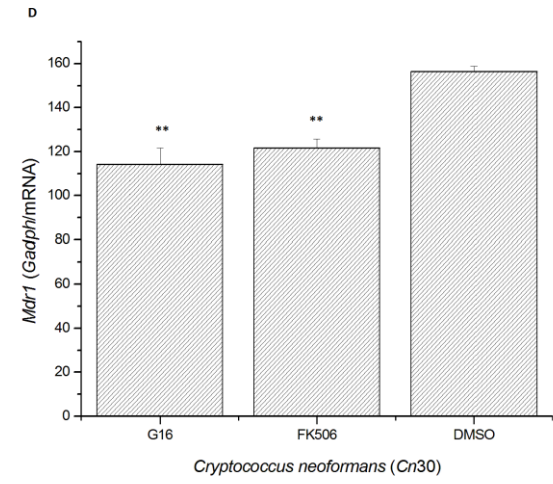
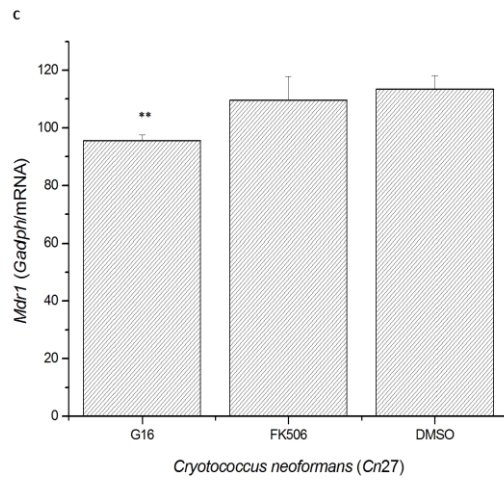
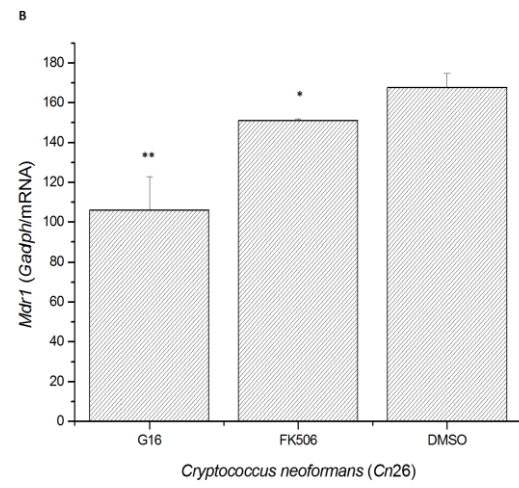
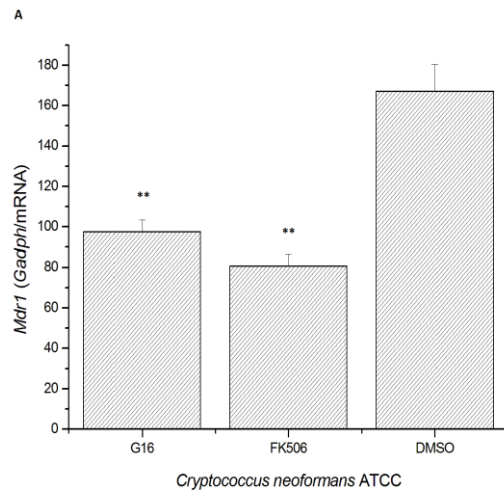


Figura 4: Expressão relativa do gene *Afr1* através de PCR em tempo real em isolados de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* após tratamento com galato de n-dodecila

(G16), Tacrolimus (FK506) e com DMSO como controle. A) Expressão relativa do gene *Afr1* na cepa padrão de *Cryptococcus neoformans* ATCC 90012; B) Expressão relativa do gene *Afr1* em isolado de *Cryptococcus neoformans* sensível ao fluconazol (Cn26); C) Expressão relativa do gene *Afr1* em isolado de *Cryptococcus neoformans* com sensibilidade intermediária ao fluconazol (Cn27); D) Expressão relativa do gene *Afr1* em isolado de *Cryptococcus neoformans* resistente ao fluconazol *in vitro* (Cn30); E) Expressão relativa do gene *Afr1* em isolado de *Cryptococcus gattii* ATCC 56990; F) Expressão relativa do gene *Afr1* em isolado de *Cryptococcus gattii* resistente ao fluconazol *in vitro* (Cg118); G) Expressão relativa do gene *Afr1* em isolado de *Cryptococcus gattii* sensível ao fluconazol (CL). *Gadph* foi utilizado como gene de referência. G16 = isolado tratado com galato de n-dodecila; FK506 = isolado tratado com Tacrolimus; DMSO = isolado tratado com DMSO; (*) = diferença estatística em relação ao tratado com DMSO de $p < 0,05$; (**) = diferença estatística em relação ao tratado com DMSO de $p < 0,01$.

Na maioria dos isolados testados houve a redução da expressão do gene *Afr1* tanto naqueles tratados com G16 quanto nos tratados com FK506, quando comparados com os tratados somente com DMSO, com exceção do isolado Cn26, cuja redução na expressão do gene foi observada somente no tratado com G16, e no CgATCC, no qual a redução da expressão do gene foi observada somente no tratado com o fármaco sintético FK506, mas não no tratado com G16. O número de vezes em que foi reduzida a expressão de *Afr1* nos isolados tratados está representado no quadro 6.



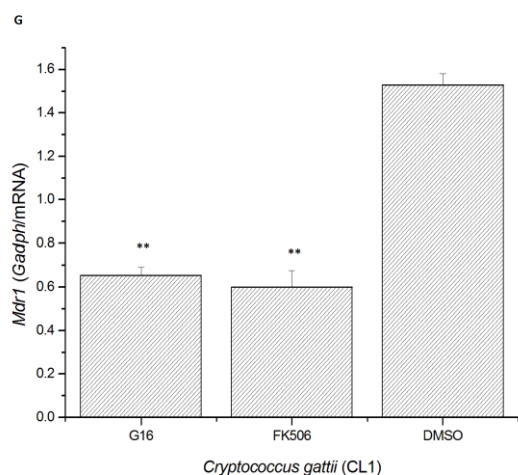


Figura 5: Expressão relativa do gene *Mdr1* através de PCR em tempo real em isolados de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* após tratamento com galato de n-dodecila (G16), Tacrolimus (FK506) e com DMSO como controle. A) Expressão relativa do gene *Mdr1* na cepa padrão de *Cryptococcus neoformans* ATCC 90012; B) Expressão relativa do gene *Mdr1* em isolado de *Cryptococcus neoformans* sensível ao fluconazol (Cn26); C) Expressão relativa do gene *Mdr1* em isolado de *Cryptococcus neoformans* com sensibilidade intermediária ao fluconazol (Cn27); D) Expressão relativa do gene *Mdr1* em isolado de *Cryptococcus neoformans* resistente ao fluconazol *in vitro* (Cn30); E) Expressão relativa do gene *Mdr1* em isolado de *Cryptococcus gattii* ATCC 56990; F) Expressão relativa do gene *Mdr1* em isolado de *Cryptococcus gattii* resistente ao fluconazol *in vitro* (Cg118); G) Expressão relativa do gene *Mdr1* em isolado de *Cryptococcus gattii* sensível ao fluconazol (CL). *Gadph* foi utilizado como gene de referência. G16 = isolado tratado com galato de n-dodecila; FK506 = isolado tratado com Tacrolimus; DMSO = isolado tratado com DMSO; (*) = diferença estatística em relação ao tratado com DMSO de $p < 0,05$; (**) = diferença estatística em relação ao tratado com DMSO de $p < 0,01$.

Para o gene *Mdr1* também houve redução da expressão tanto na presença de G16 quanto na presença de FK506 na maioria dos isolados, exceto para Cn27, no qual a expressão

do gene foi diminuída apenas no tratado com G16, e no *CgATCC*, cuja redução somente foi observada quando tratado com a droga sintética FK506. O número de vezes em que foi reduzida a expressão de *Mdr1* nos isolados tratados está representado no Quadro 6.

Quadro 6: Representação esquemática da quantidade de vezes em que foi diminuída a expressão dos genes *Afr1* e *Mdr1* em isolados de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* após tratamento com galato de n-dodecila (G16) e Tacrolimus (FK506), usando tratamento com DMSO como controle. Análise de expressão feita através de PCR em tempo real.

Isolados	<i>Afr1</i>		<i>Mdr1</i>	
	Tratado com G16	Tratado com FK506	Tratado com G16	Tratado com FK506
<i>CnATCC</i> 90012	Diminuição de 2,3 vezes	Diminuição de 2,3 vezes	Diminuição de 1,7 vezes	Diminuição de 2 vezes
<i>Cn26</i>	Diminuição de 1,5 vezes	Não houve alteração	Diminuição de 1,6 vezes	Diminuição de 1,1 vezes
<i>Cn27</i>	Diminuição de 2 vezes	Diminuição de 1,7 vezes	Diminuição de 1,2 vezes	Não houve alteração
<i>Cn30</i>	Diminuição de 2,3 vezes	Diminuição de 1,6 vezes	Diminuição de 1,4 vezes	Diminuição de 1,3 vezes
<i>CgATCC</i> 56990	Não houve alteração	Diminuição de 2 vezes	Não houve alteração	Diminuição de 1,4 vezes
<i>Cg118</i>	Diminuição de 1,7 vezes	Diminuição de 1,7 vezes	Diminuição de 1,4 vezes	Diminuição de 1,4 vezes
CL	Diminuição de 3 vezes	Diminuição de 3 vezes	Diminuição de 2,5 vezes	Diminuição de 2,5 vezes

A partir da análise destes resultados, podemos inferir que a expressão dos genes codificadores destas bombas de efluxo, nestes isolados, aparentemente não está envolvida com a resistência ao fluconazol, exceto para o gene *Afr1* em *Cryptococcus neoformans*, no qual houve diferença significativa na expressão do gene quando comparamos os isolados sensíveis e resistentes. Apesar disso, foi possível observar a inibição da expressão destes

genes codificadores de bombas de efluxo em presença do derivado do ácido gálico, galato de n-dodecila (G16), em nível próximo da inibição da expressão promovida pela droga sintética Tacrolimus (FK506), substância esta, já descrita como inibidora da atividade de bombas de efluxo.

5 CONCLUSÃO

Os galatos de alquila G11, G12, G14, G15, G16 e G17 apresentaram ótima atividade antifúngica contra as cepas testadas, em especial os galatos G14, G16 e G17, que além de ótima atividade antifúngica, e não se mostraram citotóxicos sobre as células epiteliais de pulmão A549 e MRC-5. Estes resultados são promissores, mostrando uma possível utilização destas substâncias como alternativas terapêuticas no tratamento da criptococose, principalmente nos casos de resistência aos azóis.

O galato de n-dodecila (G16), selecionado para os demais testes, além da ótima atividade antifúngica e dos bons valores de índice de seletividade encontrados no teste de citotoxicidade, também apresentou atividade aditiva no teste de sinergismo, quando utilizado em associação com fluconazol, reduzindo os valores de CIM para o mesmo, o que mostra a possível utilização da molécula não só isolada, como também associada com este fármaco.

Os resultados da PCR em tempo real mostraram que os isolados estão expressando genes codificadores de bombas de efluxo (*Mdr1* e *Afr1*), embora estes pareçam não estarem envolvidos na resistência ao fluconazol nos isolados *Cn30* e *Cg118*, exceto para o gene *Afr1* no qual houve diferença estatística significativa entre sua expressão na cepa sensível de *Cryptococcus neoformans* (*Cn26*) e na de sensibilidade intermediária (*Cn27*) e a resistente (*Cn30*). Adicionalmente, os resultados da PCR em tempo real também mostraram que o galato de n-dodecila, G16, foi capaz de inibir a expressão dos genes codificadores de bombas de efluxo, *Mdr1* e *Afr1*, independentemente destes genes não estarem envolvidos na resistência ao fluconazol, o que torna essa molécula promissora também para a utilização com finalidade de inibição da atividade de bombas de efluxo em células que utilizam o aumento da expressão desses genes como mecanismo de resistência.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGARWAL, A. K. et al. Genomic and genetic approaches for the identification of antifungal drug targets. **Infect Disord Drug Targets**, V. 8(1), p.2-15, 2008.
- CALVO, T. R. et al. Constituents and antiulcer effect of *Alchornea glandulosa*: activation of cell proliferation in gastric mucosa during the healing process. **Biol Pharm Bull**, v. 30, n. 3, p. 451-9, 2007.
- CANNON, R. D. et al. Efflux-mediated antifungal drug resistance. **Clin Microbiol Rev.**, v.22, p.291-321, 2009.
- CLANCY, C.J.; NGUYEN, M.H. Comparison of photometric method with standardized methods of antifungal susceptibility testing of yeasts. **J Clin Microbiol**; v.35, p. 2878-82, 1997.
- CLSI. Método de referência para testes de diluição em caldo para a determinação da sensibilidade a terapia antifúngica das leveduras: Norma aprovada. Documento M27-A3; 3ª ed., 2008.
- COWEN, L.E.; ANDERSON J.B.; KOHN, L.M. Evolution of drug resistance in *Candida albicans*. Annu. **Rev. Microbiol.**; v.56, p.139–165, 2002.
- DENIZOT, F.; LANG, R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. **J Immunol Methods**, v. 89, n. 2, p.271-7, 1986.
- FAVRE, B.; DIDMON, M.; RYDER, N.S. Multiple amino acid substitutions in lanosterol 14 α -demethylase contribute to azole resistance in *Candida albicans*. **Microbiology.**; v. 10, p.2715-25, 1999.
- FERRARI, M.; FORNASIERO, M.C.; ISETTA, A. M. MTT colorimetric assay for testing macrophage cytotoxic activity in vitro. **J Immunol Methods**, v. 131, n.2, p. 165-72, 1990.
- FOWLER, Z. L. et al. Development of non-natural flavanones as antimicrobial agents. **Plos One**, v.6, e25681, 2011.
- FRANZOT, S.P.; SALKIN, I.F.; CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*: separate varietal status for *Cryptococcus neoformans* serotype A isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v.37, p.838-40, 1999.
- GERLIER, D.; THOMASSET, N. Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation. **J Immunol Methods**, v. 94, n.1-2, p.57-63, 1986.
- GOMEZ-LOPEZ, A. et al. In vitro susceptibility of *Cryptococcus gattii* clinical isolates. **Clin Microbiol Infect.**, v.14, p.727-30, 2008
- GRIMALDI M. et al. Synthesis of new antifungal peptides selective against *Cryptococcus neoformans*. **Bioorg Med Chem.**, v.18, p.7985-90, 2010.

GULLO, F. P. et al. Antifungal activity of maytenin and pristimerin. **Evid Based Complement Alternat Med**, p.340787, 2012.

HOLETZ, F. B. et al. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, V.7, p.1027-31, 2002.

INOUE, M. et al. Selective induction of cell death in cancer cells by gallic acid. **Biol Pharm Bull**, v. 18, n. 11, p. 1526-30, 1995.

JOHNSON, M.D. et al. Combination antifungal therapy. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.48, p.693-715, 2004.

KANTARCIOGLU, A. S. et al. Susceptibility testing of *Cryptococcus diffluens* against amphotericin B, flucytosine, fluconazole, itraconazole, voriconazole and posaconazole. **Med Mycol.**, v. 1-8, 2008.

KARIMI, E.; JAAFAR, H. Z.; AHMAD, S. Phytochemical analysis and antimicrobial activities of methanolic extracts of leaf, stem and root from different varieties of *Labisa pumila* Benth. **Molecules**, v. 16, n. 6, p. 4438-50, 2011.

KELLY, J.; KAVANAGH, K. Proteomic analysis of proteins released from growth-arrested *Candida albicans* following exposure to caspofungin. **Med Mycol.**, v.48, p.598-605, 2010.

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

KUBO, I.; XIAO, P.; FUJITA, K. Antifungal activity of octyl gallate: structural criteria and mode of action. **Bioorg Med Chem Lett**, v. 11, n. 3, p. 347-50, 2001.

LEAL, P. C. et al. Relation between lipophilicity of alkyl gallates and antifungal activity against yeasts and filamentous fungi. **Bioorg Med Chem Lett**, v. 19, n. 6, p. 1793-6, 2009.

LEE M.K. et al. Species distribution and antifungal susceptibilities of yeast clinical isolates from three hospitals in Korea, 2001 to 2007. **Korean J Lab Med.**, v. 30, p. 364-72, 2010.

LEITE, F.S **Perfil fenotípico e de expressão de proteínas de *Cryptococcus neoformans* após tratamento com substâncias obtidas da planta *Pterogyne nitens***. 2010. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia). Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2010.

LOPES, F. C. et al. *Alchornea glandulosa* ethyl acetate fraction exhibits antiangiogenic activity: preliminary findings from in vitro assays using human umbilical vein endothelial cells. **J Med Food**, v. 14, n. 10, p. 1244-53, 2011.

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

MARICHAL, P. et al. Contribution of mutations in the cytochrome P450 14alpha-demethylase (Erg11p, Cyp51p) to azole resistance in *Candida albicans*. **Microbiology (United Kingdom)**; v.10, p.2701–2713, 1999.

MARTINEZ-ROSSI, N.M.; PERES, N.T.A.; ROSSI, A. Antifungal resistance mechanisms in dermatophytes. **Mycopathologia**, p.369-83,2008.

MORETTI, M.L.; RESENDE, M.R.; LAZÉRA, M.S.; COLOMBO, A.L.; SHIKANAI-YASUDA, M.A. Guidelines in cryptococcosis – 2008. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.41, p.524-44, 2008.

MORSCHHÄUSER, J. Regulation of multidrug resistance in pathogenic fungi. **Fungal Genetics and Biology**, v.47, p. 94-106, 2010.

NASCIMENTO, G.G.F. et al. Atividade de extratos vegetais e fitofármacos sobre bactérias resistentes a antibióticos. **Braz. J. Microbiol.**, v.31, p.247-256, 2000.

NORDOY, I.; GAUSTAD, P. Drug resistance and invasive fungal infections **Tidsskr Nor Laegeforen.**, v.128, p. 2607-11, 2008.

PFALLER, M.A. Antifungal drug resistance: mechanisms, epidemiology and consequences for treatment. **The American Journal of Medicine**, v.125, p. S3-S13, 2012.

PICERNO, P. et al. Screening of a polar extract of *Paeonia rockii*: composition and antioxidant and antifungal activities. **J Ethnopharmacol**, v. 138, n. 3, p. 705-12, 2011.

PINTO, A. C. E. A. **Produtos Naturais: Atualidade, Desafios e Perspectivas**. [s.n], p.45-51, 2002.

PINTO, G. A. S. et al. **Selection of tannase-producing *Aspergillus niger* strains.**, v.32, p. 24-26, 2001.

POURRAT, H. et al. **Production of gallic acid from *Rhus coriaria* L.**, v. 9, p. 731-734 , 1987.

RANGEL, L.P. et al. Inhibitory effects of gallic acid ester derivatives on *Saccharomyces cerevisiae* multidrug resistance protein Pdr5p. **FEMS Yeast Res.** v. 10, p. 244-251, 2010.

RODRÍGUEZ-TUDELA, J. L.; BERENGUER, J.; MARTÍNEZ-SUÁREZ, J.V.; SANCHEZ, R. Comparison of a Spectrophotometric Microdilution Method with RPMI–2% Glucose with the National Committee for Clinical Laboratory Standards Reference Macrodilution Method M27-P for In Vitro Susceptibility Testing of Amphotericin B, Flucytosine, and Fluconazole against *Candida albicans*. **Antimicrob. Agents Chemother.** v. 40, p. 1998-2003, 1996.

RODRIGUEZ-TUDELA, J.L. et al. III Curso hispano-argentino de Micología Médica – Determinación de la resistencia a los antifúngicos em el laboratorio. 2003.

SANGLARD, D.; COSTE, A.; FERRARI, S. Antifungal drug resistance mechanisms in fungal pathogens from the perspective of transcriptional gene regulation. **FEMS Yeast Res.** v. 9(7), p. 1029-50, 2009.

SCORZONI, L. Et al. 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.

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.

SIMÕES, C.M.O. et al. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5 ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS / Editora UFSC, 2003.

SIONOV E. et al. Identification of a *Cryptococcus neoformans* Cytochrome P450 Lanosterol 14_ Demethylase (Erg11) Residue Critical for Differential Susceptibility between Fluconazole/Voriconazole and Itraconazole/Posaconazole. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 56, p. 1162–1169, 2012.

SIONOV. E. et al. Heteroresistance to Fluconazole in *Cryptococcus neoformans* Is Intrinsic and Associated with Virulence. **Antimicrob Agents Chemother.**, v.53(7), p.2804-15, 2009.

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

TOBAL, T. M. et al. Evaluation of the use of *Syzygium cumini* fruit extract as an antioxidant additive in orange juice and its sensorial impact. **Int J Food Sci Nutr**, v. 63, n. 3, p. 273-7, 2012.

VARMA, A.; KWON-CHUNG, K.J. Heteroresistance of *Cryptococcus gattii* to fluconazole. **Antimicrob Agents Chemother.** 54(6). p. 2303-11, 2010.

ANEXO A – Valores de CIM e MFC em µg/mL para as moléculas de galato de alquila (G1 à G10) frente às cepas ATCCs 90012 de *C. neoformans* e 56990 de *C. gattii*, e os isolados sequenciais de *C. neoformans* (26, 27 e 30) e dois isolados de psitacéio de *C. gattii* (Cg118 eCL).

Cepas	G1		G2		G3		G4		G5		G6		G7		G9		G10	
	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM
<i>Cryptococcus neoformans</i> ATCC 90012	31,25	250	250	250	250	250	250	250	62,5	250	15,63	250	7,81	125	15,63	250	7,81	31,25
<i>Cryptococcus neoformans</i> 26 (sensível)	15,63	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250	15,63	31,25
<i>Cryptococcus neoformans</i> 27 (intermediário)	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250	15,63	62,5
<i>Cryptococcus neoformans</i> 30 (resistente <i>in vitro</i>)	15,63	15,63	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250	7,81	125	7,81	7,81	7,81	31,25
<i>Cryptococcus gattii</i> ATCC 56990	31,25	125	15,63	250	15,63	250	15,63	250	15,63	250	7,81	250	3,91	250	3,91	250	1,95	31,25
<i>Cryptococcus gattii</i> 118 (resistente <i>in vitro</i>)	15,63	15,63	7,81	31,25	15,63	31,25	15,63	31,25	15,63	31,25	7,81	31,25	15,63	125	31,25	62,5	7,81	31,25
<i>Cryptococcus gattii</i> (CL-isolado de psitacéio)	15,63	31,25	3,91	31,25	3,91	31,25	7,81	15,63	7,81	31,25	1,95	31,25	1,95	62,5	7,81	250	3,91	31,25

