

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

Suélen Andreia Rossi

**“CARACTERIZAÇÃO DO GENE ERG11 ENVOLVIDO NA
RESISTÊNCIA DE *Cryptococcus neoformans* E *Cryptococcus gattii* ÀS
DROGAS AZÓLICAS E IDENTIFICAÇÃO DE NOVOS ALVOS A PARTIR DE
PRODUTOS NATURAIS”**

Araraquara

2011

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

Suélen Andreia Rossi

**“CARACTERIZAÇÃO DO GENE ERG11 ENVOLVIDO NA
RESISTÊNCIA DE *Cryptococcus neoformans* E *Cryptococcus gattii* ÀS
DROGAS AZÓLICAS E IDENTIFICAÇÃO DE NOVOS ALVOS A PARTIR DE
PRODUTOS NATURAIS”**

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

ORIENTADORA: Profa. Dra. Ana Marisa Fusco Almeida

CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. Maria José Soares Mendes Giannini

Araraquara

2011

Ficha Catalográfica

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

R833c Rossi, Suélen Andreia
Caracterização do gene ERG11 envolvido na resistência de
Cryptococcus neoformans e *Cryptococcus gattii* às drogas azólicas e
identificação de novos alvos à partir de produtos naturais / Suélen Andréia
Rossi. – Araraquara, 2011
105 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: Ana Marisa Fusco Almeida
Co-orientadora: Maria José Soares Mendes Giannini

I. *Cryptococcus* SP. 2. Resistência. 3. ERG11. 4. *Maitenus* sp. 5.
Maitenina. 6. *Pristimerina*. I. Almeida, Ana Marisa Fusco, orient. II.
Giannini, Maria José Soares Mendes. III. Título.

CAPES: 40300005

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

*"O que vale na vida não é o ponto de partida e sim a caminhada.
Caminhando e semeando, no fim, terás o que colher."
(Cora Coralina)*

Dedicatória

Dedico a Deus, primeiramente, pela saúde, amparo e proteção em todos os momentos da minha vida e principalmente durante a realização deste trabalho. Sem Ele nada disso seria possível.

Aos meus pais Luiz e Cleuza, e ao meu querido e amado irmão Luiz Henrique, por toda atenção, amor, compreensão, paciência e principalmente, pelos ensinamentos que me foram dados. Tenho orgulho de ter uma família tão dedicada e carinhosa. Vocês são à base da minha vida. Nem milhões de palavras poderiam exemplificar o meu amor e a minha gratidão.

Ao meu namorado Estevam pelo amor, paciência e total apoio nessa caminhada para realização desse sonho. Obrigada pelo incentivo e ajuda nos momentos mais difíceis. Te amo !!

Dedico também à minha orientadora Profa. Dra. Ana Marisa Fusco Almeida pela contribuição, apoio, disponibilidade e principalmente pela confiança depositada. Muito obrigada por todo aprendizado e orientação.

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

Em especial, dedico este trabalho também ao Marcelo Teruyuki Matsumoto e ao Haroldo César de Oliveira. Vocês foram fundamentais em todo trabalho. Principalmente pela paciência, amizade e dedicação. Eu aprendi muito com vocês. Vocês são incríveis !!! Muito obrigada por tudo !!!

Agradecimentos

Agradeço à banca de qualificação e defesa: Prof. Dr. Cleslei Fernando Zaneli, Profa. Dra. Maysa Furlan e Profa. Dra. Márcia Melhem pela contribuição e pelo tempo despendido.

Ao Instituto de Química UNESP, em especial a Profa. Dra. Maysa Furlan e a Dra. Vânia Aparecida de Freitas Formenton Macedo dos Santos, pela contribuição direta e essencial para o desenvolvimento desse estudo.

Ao CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico e a Pró-Reitoria de pesquisa da UNESP (PROPe) pela colaboração financeira despendida para a realização deste trabalho.

Ao Laboratório de Micologia, um lugar onde tudo pode acontecer. Nesse laboratório conheci pessoas incríveis, que com certeza ficarão guardadas no meu coração por toda a vida. Nesse grande lugar, tive a satisfação de compartilhar os meus dias, minhas preocupações, minhas frustrações e principalmente minhas alegrias com todos. Agradeço imensamente a Rosângela (Rô), que além de ser uma grande profissional é uma pessoa maravilhosa, engraçadíssima e muito franca. (Brava, muito brava...rsrs) Tenho certeza, que para todos da micologia, ela é como se fosse uma “segunda mãe”, uma grande amiga para todas as horas; à Julhiany pela amizade, sugestões, conhecimentos, idéias e ajuda. (Se não fosse por ela meus gráficos não ficariam tão bons....rsrsrs);

à **Fer Sangalli** por toda tranquilidade, companheirismo e por toda atenção em esclarecer minhas dúvidas. Sem contar que ela arrasa com um microfone na mão; à **Liliana** por todos os conselhos, conversas e momentos de descontração, seja em dias santos ou não; ao **Marcelo** pela atenção, paciência e pela disposição em me ensinar, além do principal, por ser um grande amigo; ao **Haroldo**, bom o Haroldo eu deixo pra depois; à **Panta** (Xiiii Marquinho !!!) pela companhia, não só ao lado do “nucão”, mas por estar sempre comigo, me incentivando e alegrando a todos com seus sonhos incríveis; à **Carol Tattoo** por sua disposição e alegria (hi hi hi e fufufufu); à **Tati** pela sinceridade, amizade e companheirismo em todos os momentos; à **Aline** pelas sugestões, orações e por me deixar conhecer e conviver um pouco com a Raquel; à **Luciana** pela dedicação em superar suas dificuldades e pelas fotos maravilhosas tiradas no Chile; à **Danielle** pelos abraços; à **Fer Gulló** pela ajuda na reta final desse trabalho; à **Nayla** e a **Thais** pelas companhias e conversas divertidíssimas; aos estagiários, **Warley** (Puff) e **Patrícia** (laranja) pela dedicação em aprender e ajudar. Obrigada também à **Jaque** por todo o auxílio e pelo exemplo de fé e força como pessoa; ao **Sr. Torres** pelo entusiasmo e experiência; ao **Valter** por toda ajuda dentro e fora da micologia. (Se não fosse por ele não teríamos churrasco depois da defesa...rsrs); À nova geração da micologia, **Janaina**, **Natália** e **Gabi**. Enfim, agradeço a todos, porque todos participaram desse trabalho, seja direta ou indiretamente.

Finalmente agradeço ao **Haroldo** por tudo, e quando falo tudo, é por todos os momentos que passamos juntos desde a faculdade. Obrigada pela sua amizade, compreensão, ajuda, conselhos,

paciência, disposição, e principalmente por estar comigo em todas as horas, sejam elas boas ou ruins. Pelas cervejas que bebemos, pelas risadas, pelas viagens que fizemos. Buenos Aires ficou melhor e, com certeza, muito mais divertida com você. Espero que nossa amizade se solidifique cada vez mais.

*Aos agregados da Micologia: **Rosemira, Bel da Cito, Marisinha da Imuno, Eliana e Tírene.** Obrigada pela contribuição, convivência e principalmente pelas boas risadas.*

*Ao pessoal da Pós-Graduação: **Cláudia, Sônia, Laura, Ângela e Márcia,** pelo apoio técnico para a realização deste trabalho e a todos os professores e funcionários desta instituição.*

*Aos **meus pais, Luiz e Cleuza,** meus maiores exemplos e incentivadores. De vocês recebi o dom mais precioso do universo: a vida. Revestiram minha existência de amor, carinho e dedicação. Abriram a porta do meu futuro, iluminando meu caminho com a luz mais brilhante que puderam encontrar: o estudo. Trabalharam dobrado, sacrificaram seus sonhos em favor dos meus, não foram apenas pais, mas amigos e companheiros. Vocês, mais do que ninguém, fazem parte disso. Muito obrigada !!!*

*Ao meu irmão **Luiz Henrique,** meu grande amigo, obrigada pela paciência, amor e por todo respeito. Sei que mesmo tendo nossas diferenças, poderei contar com você em todos os momentos da minha vida. Você é um “garoto de ouro”, um príncipe.*

*Ao meu namorado **Estevam**, obrigada pela compreensão, por me apoiar e me incentivar. Obrigada por estar sempre ao meu lado me ajudando e torcendo pelos meus resultados.*

*Aos meus grandes amigos, **Fernanda Polverari**, **Gutão**, **Ju Bassi**, **Renata de Aquino (Dañada)**, **Du Ferrarezi (Todinho)**, **Sabrina**, **Glauber**, **Dani Fernandes**, **Talita**, **Érica**, **Sandra Mara** (Obrigada por me fazer acreditar que era possível), **Sandra Luísa** e por todos que passaram pela minha vida deixando saudades e grandes ensinamentos.*

*E não menos que especial, agradeço ao **Gu**, por nos acolher tão bem nos momentos de descontração e por ser nosso terapeuta de todas as horas.*

Muito obrigada !!!

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas

Lista de figuras

Lista de tabelas

Resumo

Abstract

1. INTRODUÇÃO	22
2. JUSTIFICATIVA	40
3. OBJETIVOS	42
3.1. Objetivos gerais	42
3.1. Objetivos específicos	
4. MATERIAIS E MÉTODOS	43
4.1. Seleção e Cultivo de isolados de <i>C. neoformans</i> e <i>C. gattii</i>	43
4.2. Teste de sensibilidade dos isolados frente às drogas sintéticas	43
4.3. Extração do DNA genômico de <i>Cryptococcus</i> sp.	45
4.4. Obtenção dos genes ERG11	45
4.5. Purificação dos fragmentos das sequências dos genes amplificados	46
4.6. Sequenciamento	46
4.7. Montagem dos fragmentos e análise do gene <i>ERG11</i>	47
4.8. Tradução e análise comparativa das sequências de aminoácidos	47
4.9. Análise e localização da mutação da proteína ERG11	47
4.10. Preparo das substâncias vegetais	48
4.10.1. Avaliação da atividade antifúngica	48
4.10.2. Concentração Fungicida Mínima	49
4.10.3. Avaliação da atividade citotóxica das substâncias escolhidas	49

5. RESULTADOS	51
5.1. Determinação da CIM dos isolados selecionados	51
5.2. Amplificação do gene ERG11	51
5.3. Comparação das sequências nucleotídicas do gene ERG11 dos isolados de <i>C. neoformans</i> var <i>grubii</i>	55
5.4. Tradução e análise da sequência peptídica do isolado 30 (resistente) do gene ERG11.	61
5.5. Comparação das sequências nucleotídicas do gene ERG11 de <i>C. gattii</i>	64
5.6. Avaliação da atividade antifúngica	66
5.7. Ensaio de citotoxicidade pelo método MTT	67
6. DISCUSSÃO	70
7. CONCLUSÕES	80
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81

LISTA DE ABREVIATURAS

% Porcentagem

µg Micrograma

µL Microlitro

µm Micrômetro

°C Graus Celsius

5-FC 5- fluocitosina

ABC ATP-Binding Cassette

AIDS Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

AMB Anfotericina B

ATCC American Type Culture Collection

CASPO Caspofungina

CFM Concentração fungicida mínima

CIM Concentração inibitória mínima

CLSI Clinical and Laboratory Standards Institute

DNA Ácido desoxirribonucléico

DTT Dithiothreitol

EDTA ácido etilenodiamino tetra-acético

EtOH Etanol

Fase log Fase logarítmica

FCZ Fluconazol

HIV Vírus da imunodeficiência humana

ITZ Itraconazol

M Molaridade

MF2.5 Pristimerina

mg Miligrama

MJ2 Maitenina

mL Mililitro

mM Milimolar

mm³ Milímetro cúbico

MM Massa molecular

MOPS Ácido 3-(N-morfino) propanosulfônico

MSF Major Superfamily Facilitator

mRNA RNA mensageiro

MTT 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide

nm nanômetros

OMS Organização Mundial da Saúde

pb Pares de bases

PBS Tampão salina fosfato

pH Potencial hidrogeniônico

R Resistente

RAPD *Random Amplified Polimorphic DNA*

RFLP *Restriction fragment length polymorphism*

rpm Rotações por minuto

SNC Sistema Nervoso Central

S Sensível

I Intermediário

TARV terapêutica antirretroviral efetiva

Tris 2-amino-2-hidroximetilpropano

UFC Unidades formadoras de colônia

V Volts

VORICO Voriconazol

var. Variedade

YEPD Yeast Extract Peptone Dextrose

Lista de figuras

- FIGURA 1.** Regiões funcionais da CnCYP51 contendo as porções de interação com as drogas azólicas fluconazol, posaconazol, itraconazol, ravuroconazol, voriconazol e albaconazol, e a demonstração do local onde se liga o grupamento Heme nessa proteína. As cores indicam os seguintes locais: verde P1; roxo, P2; azul, P3 e vermelho, P4. Tanto a frente (A) como no verso (B) dos sítios ativos são exibidos (SHENG et al., 2009). 35
- FIGURA 2** Estrutura molecular da Maitenina (MJ2) e da Pristimerina (MF2.5) 38
- FIGURA 3.** Produtos da amplificação dos isolados ATCC e clínicos 26, 27 e 30 de *C. neoformans* var. *grubii* obtidos pelo par de primer **H-G** do gene ERG11 (835pb), utilizando como padrão de massa molecular fragmentos de 100 pb com faixa de 100 a 1000bp. 52
- FIGURA 4.** Produtos da amplificação do isolado ATCC, isolados clínicos 26, 27 e 30 de *C. neoformans* var. *grubii* obtidos pelos pares de primers A-K, B-J e F-I do gene ERG11, utilizando como padrão de massa molecular fragmentos de 100 pb com faixa de 100 a 1000bp. 53
- FIGURA 5.** Produtos da amplificação obtidos a partir das sequências iniciadoras para obtenção dos fragmentos S1-AS4 (2460), S1-AS2 (1212pb) e S3- AS4 (1248pb) do gene ERG11 de *C. gattii*, utilizando como padrão de massa molecular fragmentos de 1Kb com faixa de 250 a 10000bp. 55
- FIGURA 6.** Alinhamento das sequências nucleotídicas dos isolados 26 (sensível), 27 (I) e a cepa ATCC 90012 com a sequência de referência do gene *ERG11* de *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* (AY265353) obtida no banco de dados, demonstrando que para esses isolados não 58

foi encontrado nenhuma mutação.

FIGURA 7. Alinhamento das sequências nucleotídicas dos isolados 26 (sensível) e 30 (resistente) com a sequência de referência do gene *ERG11* de *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* (AY265353) obtida no banco de dados demonstrando que para esse isolado houve duas mutações e uma variação (destaque em rosa). Uma delas foi silenciosa (destaque em verde) e a outra significativa (destaque em amarelo). Essa última levou a troca de um aminoácido. 61

FIGURA 8. Alinhamento das sequências de aminoácidos do isolado 26 (sensível) e 30 (resistente) com a sequência de referência da proteína do gene *ERG11* de *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* (AY265353) obtida no banco de dados, demonstrando que somente uma mutação no gene foi significativa para troca do aminoácido P (prolina) por L (leucina) na posição 479 (P479L) (Destaque em vermelho). 62

FIGURA 9. Alinhamento das sequências da proteína *ERG11* lanosterol 14C desmetilase de *Candida albicans* (GenBank acesso CAA31658.1), *Saccharomyces cerevisiae* (BROAD acesso SCRG_04712), *Apergillus fumigatus* (GenBank acesso AAK73659.1), a sequência de *C. neoformans* (GenBank acesso AY265353) com o isolado 30 (resistente) para verificação das regiões conservadas. Baseado no modelo descrito por Sheng et al., 2009, tem-se em destaque na cor rosa as α -helix, e em azul as β -sheet. O destaque amarelo refere-se ao grupamento heme da proteína mostrado por Revankar et al., 2004. Aminoácidos na cor amarela referem-se aos sítios de interação com fluconazol, também baseado no modelo descrito por Sheng et al., 2009. 63

FIGURA 10. Alinhamento das sequências nucleotídicas do isolado de psitacédeo de *C. gattii* com a sequência de referência do gene *ERG11* de *Cryptococcus gattii* (CNBG 0512.2) obtida no banco de dados. 66

FIGURA 11. Gráfico representativo do efeito citotóxico da substância pura, Maitenina (MJ2), avaliado pelo método MTT com faixa de concentração de 125 a 0,24 µg/mL. (*) $p < 0,05 = C_p$ (10 µg/mL). 67

FIGURA 12. Gráfico representativo do efeito citotóxico da substância pura, Pristimerina (MF 2.5), avaliado pelo método MTT com faixa de concentração de 125 a 0,24 µg/mL. (*) $p < 0,05 = C_p$ (10 µg/mL). 68

FIGURA 13. Representação da comparação do efeito citotóxico das substâncias puras, Pristimerina (MF 2.5) e Maitenina (MF 2.5), avaliado pelo método MTT com faixa de concentração de 125 a 0,24 µg/mL. 69

Lista de Tabelas

TABELA 1. Valores de CIM em $\mu\text{g/mL}$ das drogas sintéticas contra a cepa ATCC 90012 de *C. neoformans*, isolado do Psitacídeo de *C. gattii*, dos isolados clínicos sequenciais de *C. neoformans* (26, 27 e 30) e cepa de referência ATCC 22019 de *Candida parapsilosis*. 51

TABELA 2. Valores de CIM e CFM em $\mu\text{g/mL}$ para as substâncias Maitenina (MJ2) e Pristimerina (MF 2.5) contra a cepa ATCC 90012, isolado ambiental *C. gattii* e os isolados sequenciais de *C. neoformans* (26, 27 e 30). 66

Lista de Quadros

- QUADRO 1.** Valores de CIM como pontos de corte para o método de microdiluição em caldo, segundo documento M27S3 preconizado pelo CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) para espécies de *Candida*. 44
- QUADRO 2.** Localização dos *primers* na sequência do gene *ERG11* no isolado de *C. neoformans* var. *grubii* de referência (AY265353). *Primer A (sense)*: amarelo; *Primer K (antisense)*: verde; *Primer B (antisense)*: rosa; *Primer J (sense)*: azul escuro; *Primer F (sense)*: violeta; *Primer I (antisense)*: cinza; *Primer H (sense)*: vermelho; *Primer G (antisense)*: turquesa. **ATG**: *start códon*; **TGA**: *stop códon*. 54

RESUMO

Nas últimas décadas, evidenciou-se aumento considerável de micoses de caráter invasivo e de difícil tratamento. A criptococose vem representando significativa causa de mortalidade, principalmente em indivíduos HIV positivos. É enfermidade causada por espécies de leveduras encapsuladas, *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*, ambas as espécies constituindo-se nos agentes fúngicos mais frequentes a comprometer o sistema nervoso central (SNC). A disponibilidade de antifúngicos para a criptococose no mercado, atualmente é limitado, visto que em alguns casos, muitos deles são ineficientes e tóxicos. Além disso, adiciona-se também a diminuição de cepas sensíveis aos antifúngicos atuais, sendo um importante fator de complicação no tratamento dessas infecções. Neste estudo o gene ERG11 que codifica a proteína Lanosterol 14 C Desmetilase, alvo de fluconazol, de isolados clínicos seriados de *C. neoformans* recuperados de um paciente e um isolado de psitacídeo de *C. gattii*, que apresentaram valores de CIM elevadas (Concentração Inibitória Mínima) para o fluconazol, foi analisado. Para atingir este objetivo, os isolados clínicos sequenciais 26, 27 e 30 de um paciente do Rio de Janeiro, *C. neoformans* ATCC 90012 e o isolado do psitacídeo de *C. gattii* foram selecionados. O isolado *C. gattii* e os isolados 26, 27 e 30 de *C. neoformans*, caracterizados como sensível, intermediário e resistente *in vitro* a fluconazol, respectivamente, foram selecionados para análise de pontos de mutação na sequência do gene ERG11 através do sequenciamento dos produtos amplificados utilizando primers desenhados a partir da sequência do gene. A sequência do gene ERG11 do isolado 30 (resistente) apresentou um ponto de mutação e duas variações na sequência nucleotídica. A primeira, quando alinhada e comparada com a sequência do isolado 26 (sensível) e do gene de referência foi significativa e as outras duas variações foram silenciosas. Quando a sequência foi traduzida para proteína lanosterol 14C desmetilase, identificamos que a mutação levou à troca de um aminoácido (P479L) o que possivelmente alterou a estrutura da proteína podendo inviabilizar parcialmente o encaixe aos azóis. Também foi analisado a sequência do gene ERG11 do isolado *C. gattii* e de acordo com a literatura este gene ainda não foi elucidado para dados estruturais da proteína. A atividade antifúngica de substâncias da planta *Maitenus sp*, a Maitenina (MJ2) e a Pristimerina (MF2.5), também foi avaliada frente a cepa *C. neoformans* ATCC 90012, aos três isolados clínicos de *C. neoformans* (26S, 27 I e 30R) e ao isolado de *C. gattii*. Os resultados deste ensaio foram significativos para atividade antifúngica contra todos os isolados selecionados, incluindo o resistente, demonstrando que essas substâncias isoladas podem ser promissoras para o desenvolvimento de novas drogas antifúngicas.

ABSTRACT

In the last decades, there was a considerable increase in invasive fungal infections of difficult treatment. Cryptococcosis has represented a significant cause of morbidity and mortality, especially among HIV positive individuals. It is a disease caused by encapsulated yeasts species, *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*, both species becoming the most common fungal agents to compromise the central nervous system (CNS). The availability of commercial antifungals is currently restricted and many of them are ineffective and toxic. In addition, there was the emergence of resistant strains to the current antifungals and this is an important complicating factor in treating these infections. In this study, the ERG11 gene that encodes the protein alpha Lanosterol 14-demethylase, target of fluconazole of serial clinical isolates of *C. neoformans* recovered from a patient and an isolate of *C. gattii* of a parrot, which showed higher MIC values (Minimum Inhibitory Concentration) for fluconazole was analyzed. To achieve this goal, the sequential clinical isolates 26, 27 and 30 of a patient from Rio de Janeiro, *C. neoformans* ATCC 90012 and the isolate of *C. gattii* of the parrot were selected. Isolates 26, 27 and 30 susceptible (S), intermediate (I) and resistant (R) *in vitro*, respectively, and the isolation of *C. gattii* were selected for analysis of mutation points in the ERG11 gene sequence by sequencing of amplified products using primers designed from the sequence of the gene. The ERG11 gene sequence of isolate 30 (resistant) showed a mutation point and two variations in the nucleotide sequence. The first, when aligned and compared with the sequence of isolate 26 (susceptible) and the reference gene was significant and the other two changes were silent. When the sequence was translated into Lanosterol 14-alpha demethylase protein, we found that the mutation led to an amino acid exchange (P479L) which probably altered the protein structure and may partially cripple the fit to azoles. We also analyzed the ERG11 gene sequence of *C. gattii* isolate and according to the literature, this gene has not yet been elucidated for structural data of this protein. The antifungal activity of substances of the *Maitenus* sp plant, the maitenin (MJ2) and pristimerin (MF2.5), was also tested against *C. neoformans* ATCC 90012 strain, against three clinical isolates of *C. neoformans* (26S, 27 I and 30R) and against the *C. gattii* isolate. The results of this test were significant for the antifungal activity against *C. neoformans* isolates, including the resistant, demonstrating that these isolated compounds may be promising for the development of new antifungal drugs.

1. Introdução

Nas últimas décadas, a área médica teve avanços significativos, propiciando 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. Evidenciou-se um aumento considerável de micoses de caráter invasivo, representando uma significativa causa de morbidade e mortalidade, principalmente, em indivíduos imunossuprimidos, os quais são mais suscetíveis a desenvolver estas infecções, podendo levar muitas vezes ao óbito ou ao menos uma importante causa de redução na qualidade de vida desses pacientes. (MASCHMEYER & HAAS, 2008; SABLE et al., 2008; SEGAL et al., 2008; JARVIS et al., 2008, LASS-FLORL, 2008, ESPINEL-INGROFF, 2009).

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). 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, adiciona-se o surgimento da resistência microbiana (GIROIS et al., 2006, LASS-FLORL et al., 2009).

Embora a terapêutica das micoses também tenha evoluído, melhorando não só sua eficácia e espectro de ação, mas também sua tolerabilidade, manejo e tempo de tratamento, o desenvolvimento de resistência aos antifúngicos tem sido um importante fator de complicação no tratamento das infecções fúngicas, sobretudo em pacientes imunocomprometidos. (LUMBRERAS; LIZASOAIN; AGUADO, 2003; CHAPMAN; SULLIVAN; CLEARY; 2008).

A incidência das infecções fúngicas causadas por linhagens resistentes vem aumentando e assim cresce também a urgência no desenvolvimento de terapias mais efetivas para o tratamento destas doenças. A descoberta de novos alvos exclusivos dos fungos e o entendimento dos mecanismos

moleculares de resistência são etapas fundamentais neste processo (PERLIN et al., 1997; BAIXENCH et al., 2007).

A resistência microbiana deve-se a mutações que ocorrem naturalmente nas células, e a droga apenas age como agente seletivo daquelas mais resistentes de uma população. Assim, os isolados que apresentam mutações estáveis ligadas à resistência irão predominar e persistir, mesmo na ausência da pressão seletiva da droga (WHITE et al., 1998).

Dentre os mecanismos de resistência utilizados pelos fungos é importante ressaltar a superprodução de enzimas, a implementação de vias metabólicas alternativas e a produção de bombas de efluxo que expulsam o medicamento da célula fúngica (WHITE et al., 1998 FERREIRA et al., 2005; GOLDMAN et al., 2004; SANGLARD et al., 2009).

Criptococose é doença grave que ocorre em indivíduos imunocompetentes e principalmente em pacientes imunocomprometidos. É 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., 2007).

Cryptococcus neoformans é o patógeno fúngico mais comumente encontrado em infecções do sistema nervoso central (SNC), é de distribuição universal, isolado do solo, principalmente solos contaminados com excreta de aves, pombos em particular, além de madeira em decomposição, frutos, vegetais e ocos de árvores, afetando hospedeiros principalmente imunocomprometidos, sobretudo paciente HIV positivo, sendo esses importantes fatores de risco da criptococose (THAKUR et al., 2008; LINDENBERG, et al., 2008; MCCARTHY, et al., 2008).

De acordo com o relatório do UNAIDS de 2009, no mundo existem 33,4 milhões de pessoas com HIV, e ocorreram 2,6 milhões de novas infecções nesse mesmo ano. Estima-se que tenha havido cerca de dois milhões de óbitos devido a doenças relacionadas à AIDS em todo o mundo em 2008.

A criptococose é a segunda doença neurológica mais prevalente em pacientes brasileiros com AIDS (VIDOTTO et al., 2006 MARTINS et al., 2007;

PAPPALARDO et al., 2007). O índice de mortalidade de criptococose no SNC é de 15% a 30%, mesmo com o tratamento (CHARLIER et al., 2008).

Mesmo na atualidade, com a disponibilidade da terapêutica antirretroviral efetiva (TARV) para pacientes infectados pelo HIV, casos de criptococose são frequentes e apresentam alto índice de letalidade. A doença pode se manifestar mesmo durante este tratamento e o prognóstico continua a ser desfavorável (CHUCK et al. 1989; DROMER et al., 2007; FRIEDMAN et al., 2005; DROMER et al., 2004; LINDENBERG et al. 2008; MCCARTHY et al. 2008;).

C. gattii apresenta epidemiologia e ecologia distintas do *C. neoformans*, pois não tem distribuição universal e é praticamente restrito às regiões tropicais e subtropicais do Brasil, África, Austrália e sul da Califórnia. No entanto, a descrição do surto de Vancouver Island (Canadá) sugere que *C. gattii* esteja se adaptando aos ambientes de clima temperado (KIDD et al., 2004). Laboratorialmente, distingue-se do *C. neoformans* com base no sorotipo capsular, pois *C. gattii* pertence aos sorotipos B e C, enquanto *C. neoformans* pertence aos sorotipos A e D. De forma semelhante ao *C. neoformans*, *C. gattii* provoca principalmente doenças pulmonar e meníngea, mas, distintamente daquele, tende a provocar mais criptococoma do que doença difusa e a incidir mais em pacientes imunocompetentes. (PAPPAS et al., 2001; PERFECT, et al., 2002). Esta espécie é frequentemente encontrada em eucaliptos, principalmente *Eucalyptus camaldulensis* e *Eucalyptus tereticornis*, mas também tem sido isolada de outras espécies de árvores no Brasil, como *Moquilea tomentosa* (oiti), *Cassia grandis* (cássia gigante, cássia-rosa) *Mangira indica* (mangueira), entre outras, incluindo o *E. camaldulensis* na cidade de São Paulo. (LAZÉRA et al., 1998, 2000; MONTENEGRO et al., 2000; GRANADOS & CASTAÑEDA, 2005; DIXIT et al., 2009).

Essas leveduras apresentam cápsula polissacarídica, que é o principal determinante da virulência, metabolismo não fermentador, são produtores de urease e assimiladores de inositol e D-glucuronato. (MITCHEL e PERFECT, 1995; CASADEVALL e PERFECT, 1998; KWON-CHUNG et al., 2002). A cápsula polissacarídica é importante para a sobrevivência do microrganismo no ambiente e no hospedeiro e é considerado um importante fator de virulência com capacidade imunossupressora e antifagocítica. A cápsula é constituída

pelos polissacarídeos glucuronoxilomanana (90%), galactoxilomanana (7%) e manoproteína (3%) (MITCHELL & PERFECT, 1995; CASADEVALL & PERFECT, 1998; CASALI et al., 2001; NISHIKAWA et al., 2003; MOYRAND et al., 2002; LEVITZ & SPECHT, 2006, ZARAGOZA et al., 2009). Acredita-se que a cápsula de *C. neoformans* o protege contra estresse ambiental, como, por exemplo, a desidratação, e também é considerada essencial para a virulência da levedura. (CASADEVALL & PERFECT, 1998; ZARAGOZA et al., 2003).

Baseando-se nos antígenos polissacarídicos da cápsula (KWON-CHUNG et al., 1982; FRIES, et al., 1999), *C. neoformans* foi dividido inicialmente em três variedades e cinco sorotipos, sendo o sorotipo A pertencente à variedade *grubii* (FRANZOT et al., 1999), o sorotipo D à variedade *neoformans*, e B e C à variedade *gattii* (FRANZOT et al., 1999; SORRELL, 2001). Sob essa classificação, a designação correta para o sorotipo AD ainda não foi definida (LENGELER et al., 2001), entretanto alguns autores o consideram um híbrido (BOEKHOUT et al., 2001). Com base em dados de tipagem, sequenciamento de nucleotídeos e análise filogenética, foi sugerida a reclassificação de *C. neoformans* var. *gattii* como uma nova espécie, *C. gattii* (BOEKHOUT et al., 2001; KNOW-CHUNG et al., 2002). Portanto, atualmente, o complexo *Cryptococcus* inclui as leveduras basidiomicéticas *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* (sorotipo A), *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (sorotipo D) e *Cryptococcus gattii* (sototipos B e C), onde as variedades apresentam diferenças fenotípicas, genotípicas, bioquímicas, epidemiológicas e clínicas (SORREL, 2001; CASALI et al., 2001; LIN & HEITMAN, 2006; ALMEIDA et al., 2007; MATSUMOTO et al., 2007; MORETTI et al., 2008; MA & MAY, 2009).

Análises epidemiológicas revelaram que a maioria dos pacientes é constituída por 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., 2007). 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). O sorotipo D é predominante em regiões temperadas e é encontrado com maior frequência em determinadas regiões do Brasil e do mundo (VIDOTTO et al., 2006; MATSUMOTO et al., 2007)

Em estudos epidemiológicos, as técnicas de PCR *fingerprint* com iniciadores mini (M13) ou microssatélite (GACA₄) específicos e RFLP, utilizando os genes PLB1 (fosfolipase) e URA5 (orotidine pirofosforilase) foram fundamentais para dividir isolados, de vários continentes, em oito tipos moleculares principais denominados: VNI e VNII (de *C. neoformans* var. *grubii* sorotipo A), VNIII (de *C. neoformans* sorotipo AD), VNIV (*C. neoformans* variedade *neoformans* sorotipo D) e VGI, VGII, VGIII e VGIV (*C. gattii* sorotipos B e C). A tipagem molecular com esses iniciadores (minissatélites M13 e microssatélite (GACA₄) agrupou a maioria dos isolados no grupo VNI, concordando com dados anteriores em que foi estabelecido que a maioria dos isolados de *C. neoformans* pertencem a este grupo (VELEGRAKI, et al., 2001; CASALI et al., 2003; MEYER, et al., 1999, 2003; LATOUCHE, et al., 2003).

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

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 (KONTOYIANNIS e LEWIS, 2002; SHAO et al., 2007; SANGLARD, 2002; MÉAN et al, 2008).

Como nas demais infecções fúngicas sistêmicas, se aceita a via inalatória como a porta de entrada da infecção pelo *Cryptococcus* a partir de fonte de contágio ambiental. Basidiósporos, que são partículas de pequeno tamanho, facilmente aerossolizáveis e mais resistentes à dessecação do que as células leveduriformes constituem-se nas prováveis partículas infectantes. O processo infeccioso pulmonar permaneceria latente por períodos variáveis de tempo até que um desequilíbrio na relação agente-hospedeiro permitisse a reativação da infecção e a disseminação e instalação da doença clinicamente manifestada, principalmente de localização pulmonar e do sistema nervoso central (SNC), uma vez que este último apresenta concentrações ótimas de tiamina, carboidratos, minerais e nutrientes assimiláveis pelo fungo, assim como a presença de precursores de melanina. (GARCIA-HERMOSO, et al. 1999; LIFSON et al., 2006). Após a instalação do fungo nos pulmões, ele pode ser eliminado pelo sistema imune ou desenvolver a criptococose pulmonar (infecção primária), variando desde formas assintomáticas até quadros de pneumonia com febre, tosse, dor no peito, perda de peso (CHAYAKULKEEREE & PERFECT, 2006). No espaço alveolar, os macrófagos fazem a linha primária de defesa. Estas células são essenciais na defesa do hospedeiro contra *C. neoformans* (MANSOUR & LEVITZ, 2002; SHAO, et al, 2005;). A partir do pulmão, pode ocorrer disseminação, através da via

hematogênica, para o sistema nervoso central (SNC), sítio pelo qual a levedura apresenta tropismo e onde acarreta quadros de meningite, encefalite ou meningoencefalite, podendo levar o paciente a óbito se não for realizado tratamento adequado (KWON-CHUNG & BENNETT, 1992; IDNURM et al., 2005).

O mecanismo pelo qual *C. neoformans* invade o sistema nervoso central é fundamental para a compreensão da patogênese da criptococose, que geralmente se apresenta como meningoencefalite. Há evidências de invasão direta das células endoteliais e/ou também após a ingestão de macrófagos. Mais recentemente também foi descrito mecanismo de invasão direta do cérebro via capilares e envolve deformação celular. Assim, o neurotropismo notável de *C. neoformans* pode ter mais de um mecanismo (SHI et al., 2010).

O tratamento disponível para criptococose ainda é sub-ótimo, utilizando-se anfotericina B (AMB), com doses iniciais de ataque seguido de manutenção com fluconazol (FCZ), podendo gerar isolados resistentes, emergentes nos últimos anos principalmente nos casos de falha terapêutica (SLOAN et al., 2008; DORNEANU et al., 2008; JARVIS et al., 2008; PFALLER et al., 2008, MORSCHHAUSER, 2009). Recentemente, a anfotericina B também está sendo administrada associada com a 5- fluocitosina (5-FC), o que tem demonstrado uma diminuição de 30% de casos de falha na terapêutica quando comparado com outros tratamentos (DROMER et al., 2008), porém esta possibilidade não existe no Brasil, pois a 5-FC não está mais disponível.

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

A ocorrência de isolados de *C. neoformans* com resistência primária ou secundária a anfotericina B são relativamente raros e relacionados geralmente com alteração na composição do ergosterol que é o principal esterol presente na membrana dos fungos (KELLY et al., 1994; JOSEPH-HORNE et al., 1996; RODRIGUES-TUDELA, 1997).

A resistência à anfotericina B pode ser mediada pelo aumento da atividade 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 para AMB em sua maioria. Quatro isolados excederam o MIC de 2µg/mL. Um quarto dos pacientes que excederam a CIM (concentração inibitória mínima) de 1µg/mL também foram resistentes a um ou mais triazólicos. Assim, poucos trabalhos têm demonstrado aumento de CIM. A maioria tem mostrado valores abaixo de 1µg/ml (BRANDT et al., 2001 e PFALLER et al., 2006). Neste último somente 0,6% dos isolados apresentaram CIM 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 droga 5-fluorocitosina pertence à classe de fármacos análogos da pirimidina, que interfere na síntese de DNA por inibir timidilato sintetase, e na síntese protéica por se incorporar ao RNA. Bennet et al., (1979) em estudo multicêntrico, compararam os tratamentos, utilizando-se anfotericina B em monoterapia e com esta associada a 5-fluorocitosina. Quando as duas drogas foram utilizadas em associação, 67% dos pacientes apresentaram cura ou melhora do quadro, contra 41% dos pacientes tratados apenas com anfotericina-B. Além disso, nefrotoxicidade menor foi observada, bem como número menor de recaídas no grupo que recebeu 5-fluorocitosina associada.

O surgimento de derivados azólicos com biodisponibilidade alta e toxicidade baixa, como fluconazol e também itraconazol, abriu perspectivas a novos esquemas terapêuticos, sendo usados para fins profiláticos, em esquemas de manutenção da terapia e em uso combinado a anfotericina B. Os

azóis são drogas fungistáticas e agem inibindo a enzima P-450 da via biossintética do ergosterol, a lanosterol 14C desmetilase, codificada pelo gene ERG11, interrompendo ou levando a produção insuficiente do ergosterol que é o principal esterol da membrana da célula fúngica levando a formação de membranas defeituosas. O uso abusivo dos derivados azólicos tem levado segundo alguns pesquisadores, ao aparecimento de isolados multirresistentes (GRAYBILL et al., 1998). Pfaller et al., 2005, avaliaram a atividade in vitro do itraconazol em 1615 isolados de *C. neoformans* e a droga foi ativa em apenas 80% dos isolados.

Espécies de *Mucor* são intrinsecamente resistentes aos azóis, *Candida krusei* e *Aspergillus fumigatus* apresentam resistência primária somente a fluconazol e cetoconazol, sendo normalmente sensíveis a itraconazol e voriconazol (WHITE 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 (BICANIC et al., 2006; KANTARCIOGLU et al., 2008; CARRILLO-MUÑOZ et al., 2008; BII et al., 2007).

Os mecanismos mais comuns de resistência a azólicos em patógenos fúngicos têm sido estudados, mas pouco se sabe sobre os mecanismos moleculares responsáveis pela resistência aos azólicos em *Cryptococcus*, exceto para o caso de uma mutação no ERG11 relatado na cepa isolada de um paciente com AIDS que apresentou meningoencefalite criptocócica recidivante (RODERO et al., 2003). Estudos recentes demonstraram que a resistência aos azóis nesta espécie de levedura, também pode ser devido à heteroresistência, que é um mecanismo pelo qual a resistência pode ser induzida ou revertida numa parcela de uma população. Heteroresistência de *C. neoformans* parece envolver aneuploidias cromossômicas e, portanto, o número de cópias de genes de resistência a drogas, incluindo ERG11 é aumentada. Este

mecanismo pode, portanto, resultar numa elevada transcrição do ERG11(SIONOV et al., 2009; VARMA & KWON-CHUNG, 2010)

Vários estudos relacionados à resistência adquirida têm sido realizados em leveduras como *Candida albicans*, onde esta sofre seleção em resposta à exposição ao antifúngico. Isolados recuperados de pacientes com candidíase orofaríngea, por consequência da infecção por HIV, que haviam sido tratados múltiplas vezes, principalmente com azóis, apresentaram aquisição de resistência em isolados seriados (REX et al., 1995). Trabalhos com *C. albicans* têm mostrado que a redução no acúmulo de antifúngicos azólicos pelas células destes organismos pode estar associada à expressão aumentada de genes que codificam proteínas de efluxo de drogas (SANGLARD et al., 1997). Assim como outros eucariotos, dois tipos de proteínas envolvidas no efluxo de compostos são conhecidos em fungos, os transportadores da família ABC (ATP-Binding Cassette) e os transportadores MSF (Major Superfamily Facilitator). A super expressão dos genes Cdr1 e Cdr2, genes homólogos aos transportadores ABC em *C. albicans*, são responsáveis pela resistência em alguns isolados clínicos recuperados de pacientes com longas terapias antifúngicas. (SANGLARD, et al., 2009)

Em outras espécies de *Candida*, genes homólogos funcionais estão sendo descritos e associados com a resistência aos medicamentos em diversos estudos. Em *C. glabrata*, a expressão dos genes transportadores ABC, CgCDR1 e CgCDR2, também conhecido como PDH1e CgSNQ2 desempenham um papel dominante na resistência aos azólicos (SANGLARD et al., 1999, 2002; BENNETT et al, 2004; VERMITSKY & EDLIND, 2004; MIYAZAKI et al, 2006; TORELLI et al., 2008). Um ou mais destes genes são comumente super expressos em isolados clínicos resistentes aos azóis. Outros transportadores ABC de *Candida dubliniensis* (CdCDR1 e CdCDR2), *Candida krusei* (ABC1 e 2), *C. tropicalis* (homologo CDR1) e de *C. neoformans* (CnAFR1,) foram reportados em isolados resistentes. (MORAN et al., 1998; BARCHIESI et al., 2000; KATIYAR & EDLIND, 2001; POSTERARO et al., 2003; PINJON et al., 2005; SANGLARD et al. 2009).

Os transportadores MSF (Major Superfamily Facilitator) é a segunda classe de transportadores envolvidos na resistência antifúngica. Isolados clínicos de *C. albicans* se mostram mais resistentes a drogas como, o

fluconazol, 4-NQO cerulenina e brefeldin, quando há super expressão do gene MDR1, em contraste com a super expressão de genes CDRs, pois a resistência devido a MDR1 parece ser específica ao fluconazol, não estando associada à resistência cruzada a outros azóis. (SANGLARD et al., 1995, 1996, 1997). No entanto, homólogos de MDR1 em *C. dubliniensis* e *C. tropicalis*, nomeados CdMDR1 e CtMDR1 são, respectivamente, super expressos em cepas resistentes aos azóis (BARCHIESI et al., 2000; WIRSCHING et al., 2001).

Em *C. glabrata*, o homólogo MDR1 é o CgFLR1, que está intimamente relacionado com FLR1 em *Saccharomyces cerevisiae* (Chen et al., 2007). FLR1 está sob o controle do fator de transcrição Yap1 e é capaz de conferir resistência ao fluconazol (ALARCO et al., 1997). Embora CgFLR1 possa mediar resistência ao fluconazol quando expresso em *S. cerevisiae*, o significado da CgFLR1 na resistência aos azólicos em *C. glabrata* ainda não foi demonstrado, provavelmente, mascarado pela grande maioria de isolados resistentes aos azóis pela regulação dos transportadores ABC (SANGLARD et al., 1999). Em *Aspergillus fumigatus*, *in vitro*, isolados resistentes ao itraconazol mostram um significativo nível de expressão dos transportadores MFS AfuMDR3 (NASCIMENTO et al., 2003).

Um segundo gene que codifica o transportador MFS FLU1, não está associado, somente à resistência ao fluconazol, mas também a cicloheximida, em *C. albicans*. O rompimento do FLU1 nessas leveduras demonstrou apenas um ligeiro efeito na susceptibilidade ao fluconazol, mas a ruptura do FLU1 em um mutante com deleção nos genes CDR2, CDR1 e MDR1, resultou em suscetibilidade aumentada a vários derivados azólicos, demonstrando que FLU1 pode mediar resistência aos azólicos em *C. albicans*. (CALABRESE et al., 2000; SANGLARD, et al. 2009).

O desenvolvimento da resistência em fungos patogênicos, causada por alterações na enzima alvo e pela super expressão de genes, é conhecido para duas classes de antifúngicos, azóis e candinas. A resistência mediada por alterações no ERG11/CYP51 (alvo dos azóis) tem sido amplamente documentada envolvendo mutações pontuais e/ou super expressão desses genes. A super expressão do gene ERG11 tem sido frequentemente associada à resistência aos azóis em *C. albicans* (SANGLARD et al., 1995; MARICHAL et

al., 1997; WHITE, 1997; PEREA et al., 2001) e em um único isolado de *C. tropicalis* (VANDEPUTTE et al., 2005). Esse mecanismo de resistência envolve um efeito de dosagem do gene, no qual o aumento do número de moléculas ERG11 impede a saturação pelos azóis. Em *A. fumigatus* a resistência ao itraconazol em isolados clínicos está associada à ocorrência de substituições de aminoácidos na CYP51A, gene ortólogo funcional ao ERG11 nesta espécie de fungo. Curiosamente, mutações na posição G54 contribuíram apenas para resistência ao itraconazol e não para resistência ao voriconazol (DIAZ-GUERRA et al., 2003; MANN et al., 2003). Em contraste, a mutação na posição M220 conferiu resistência ao itraconazol e a CIMs elevados ao voriconazol ou posaconazol (GARCIA-EFFRON et al., 2008).

White em 1997 encontrou uma substituição (R467K) num estudo com 17 isolados de *C. albicans* da orofaringe de um paciente infectado pelo HIV. A substituição desse aminoácido foi relatada somente em cepas resistentes ao fluconazol, sendo ausente nas cepas sensíveis ao mesmo fármaco.

Dados sobre a resistência de *C. neoformans* aos azóis, decorre desde a década de 1990 e 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).

Silva et al, em 2008, estudaram isolados de *Cryptococcus neoformans* de 35 pacientes do hospital da Universidade Federal do Triângulo Mineiro e verificou 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 (I) 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 (MARICHAL et al., 1995; SANGLARD et al., 1997; WHITE et al., 1998;

GOLDMAN et al., 2004; FERREIRA et al., 2005; ESPINEL-INGROFF, 2008; MONK et al., 2008; CANNON et al., 2009).

Em estudos realizados em nosso laboratório (ALMEIDA et al, 2007), foi verificado que isolados sequenciais *C. neoformans* de pacientes com histórico de possíveis falhas terapêuticas adquiriam perfis de sensibilidade reduzidos aos antifúngicos. Adicionalmente, por meio de tipagem molecular por técnica de Cariótipagem e RAPD, observou-se que estes podiam manter seus perfis moleculares inalterados ou poderiam variar para uma possível microevolução. Em dados posteriores, em um estudo complementar, Fusco-Almeida (2005), verificou que a sequência do gene ERG11 de isolados resistentes de *C. neoformans* apresentava possíveis pontos de mutações, capazes de causar alterações significativas na proteína lanosterol 14C desmetilase, alvo da molécula ativa de Fluconazol. Essas alterações estavam possivelmente relacionadas ao encaixe estrutural da proteína por mudança de posicionamento de uma hélice próxima ao domínio principal. Outro dado destas mutações estava relacionado à diminuição da afinidade por substituição de aminoácidos em motivos importantes na interação entre os domínios da proteína com a porção ativa do fluconazol (dados não publicados).

Em estudo realizado por Sheng et al, 2009 a proteína alvo dos azóis a lanosterol 14C desmetilase de *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*, foi pela primeira vez analisada quanto à estrutura tridimensional e a localização de domínios de interação com as moléculas das drogas azólicas (fluconazol, posaconazol, itraconazol, ravuroconazol, voriconazol e albaconazol). Quatro regiões funcionais importantes para modelar novos encaixes estratégicos de drogas, contendo as quatro porções de interação foram identificadas (figura 1) e a localização dos aminoácidos que interagem com as porções ativas das drogas azólicas foram primeiramente descritas. Os sítios ativos encontrados na estrutura secundária de CYP51(ERG11) de *C. neoformans* var *grubii* foram similares aos descritos em *Aspergillus fumigatus* e *Candida albicans* (GOLLAPUDY et al., 2004; SHENG et al., 2004) o que possibilitou as localizações.

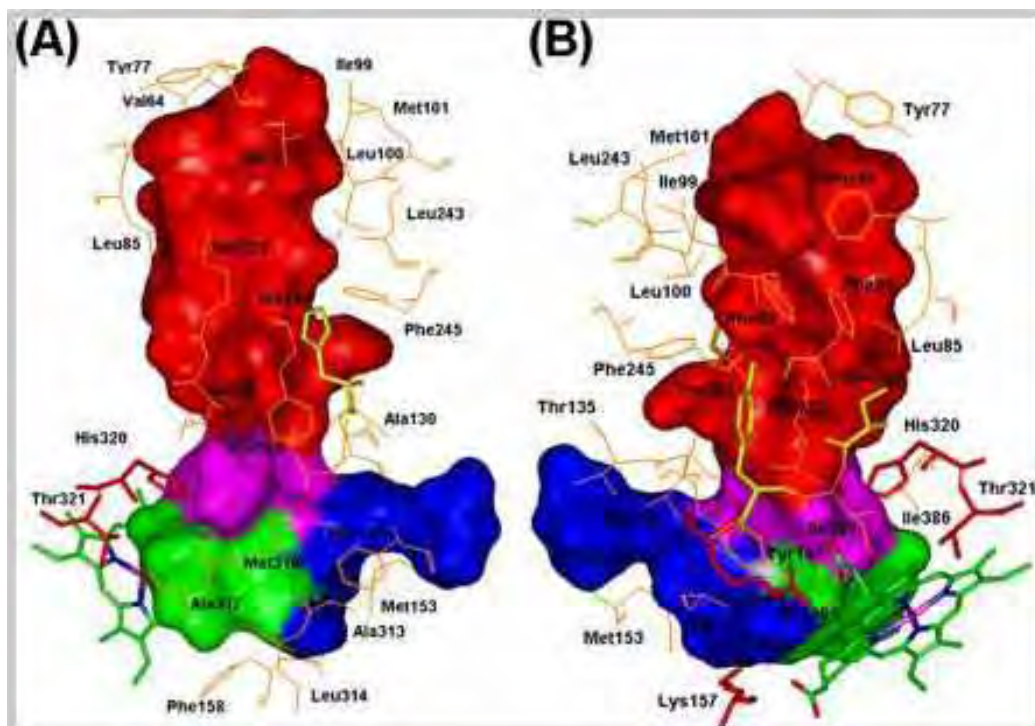


FIGURA 1. Regiões funcionais da CnCYP51 contendo as porções de interação com as drogas azólicas fluconazol, posaconazol, itraconazol, ravuroconazol, voriconazol e albaconazol, e a demonstração do local onde se liga o grupamento Heme nessa proteína. As cores indicam os seguintes locais: verde P1; roxo, P2; azul, P3 e vermelho, P4. Tanto a frente (A) como no verso (B) dos sítios ativos são exibidos (SHENG et al., 2009).

Com base neste estudo, é possível discutir se mutações pontuais em isolados resistentes de *C. neoformans* são decorrentes de alterações significativas na estrutura conformacional desta proteína. Adicionalmente com estes dados novas modelagens de drogas poderão ser desenvolvidas.

A caracterização de novos alvos nos fungos e a modelagem de novas drogas pode oferecer além de viabilidade sócio-econômica, tecnológica e industrial, tratamento apropriado e eficiente baseado na melhor especificidade da atividade de novas moléculas, principalmente nos casos de emergência de cepas resistentes. De acordo com a Organização Mundial da Saúde, plantas medicinais seriam as melhores fontes para obtenção de uma imensa variedade de drogas (NASCIMENTO, et al., 2000; MARTINEZ-ROSSI et al., 2008; AGARWAL et al., 2008). Um antifúngico ideal deve ter atividade fungicida de

amplo espectro e não causar toxicidade ao hospedeiro (CARRILLO-MUÑOZ et al, 2006).

O entendimento individualizado das interações que ocorrem entre as moléculas ativas dos fármacos e as modificações ocorridas nestas enzimas alvos, em isolados resistentes pode ser úteis como modelos para prospecção de moléculas bioativas com atividade antifúngica, possibilitando a modelagem para adaptação e encaixe destas.

As plantas são boas opções para obtenção de uma grande variedade de fármacos (NASCIMENTO, et al., 2000; ROJAS et al., 2006; CRUZ et al., 2007;). Esta alternativa pode beneficiar grande parte da população que utiliza as plantas como primeira opção de tratamento (SCORZONI et al., 2007). As plantas são usadas na medicina desde longa data, sendo extensivamente empregadas na medicina popular por representarem uma alternativa econômica, de fácil obtenção e aplicabilidade para diversas patologias (ROJAS et al., 2006). Cerca de 20.000 espécies de plantas são usadas para fins medicinais são relatados pela OMS (Organização Mundial da Saúde) (MAREGESI et al, 2008;. GULLECE et al, 2006). Estas se constituem, portanto em uma ótima alternativa para busca de substâncias que podem ser usadas na formulação de novos antifúngicos (HOLETZ et al., 2002). O Brasil é um país de ampla extensão territorial e grande biodiversidade, possuindo diferentes tipos de clima e solo, favorecendo o desenvolvimento de diferentes tipos de espécies, as quais podem curar ou minimizar efeitos de doenças como as micoses, malária, tuberculose, etc. (HARVEY, 2007; ROLLINGER et al., 2006; BASSO et al., 2005). Assim, as pesquisas com base na atividade terapêutica das plantas foram intensificadas nos últimos anos (BARRET, 2002). Em busca de novas fontes de substâncias antifúngicas, o nosso grupo tem estudado a atividade antifúngica de espécies de plantas do Cerrado e da Mata Atlântica do Brasil. Entre os extratos, frações e compostos puros estudados, 52,6%, 88,5% e 96,2%, respectivamente, apresentaram atividade contra *C. neoformans*.

Em estudo realizado por Braga et al. (2007), com as plantas *Bixa orellanastram*, *Ocimum gratissimum* e *Syzygium cumini*, verificaram atividade contra *C. neoformans* apresentando concentração inibitória mínima com valor de 0,078 mg/mL. Outro estudo focado na verificação da atividade antifúngica de plantas foi realizado por Cruz et al. (2007), mostrando que as espécies

Ziziphus joazeiro e *Caesalpineia pyramidalis* também apresentaram atividade significativa contra *C. neoformans*. Em estudo realizado por Lee et al. (2009), foi encontrada atividade contra *C. neoformans* com concentração mínima inibitória (CIM) de 0.545, 2.18 e 2.18 mg/mL respectivamente com as plantas *Pinus densiflora*, *Cryptomeria japonica*, e *Chamaecyparis obtusa*. Outro estudo, também realizado por Lee (2009) et al, focado na verificação da atividade antifúngica de plantas, mostrou que as espécies *Abies holophylla* e *Abies koreana* apresentaram atividade significativa contra *C. neoformans*, com de CIM >2.2 e 1.1 mg/mL. Sangalli-Leite em 2010 relatou que extratos da planta *Pterogyne nitens*, espécie pertencente à família Fabaceae, a qual possui a substância ativa pedalitina, possui atividade antifúngica significativa contra os isolados de *C. neoformans* incluindo para isolados resistentes.

Maytenus ilicifolia (Celastraceae), planta selecionada neste estudo, é uma planta nativa da floresta atlântica amplamente utilizado em medicina tradicional com atividade anti-inflamatória, analgésica e antiulcerogênica (VILEGAS, et al. 1999; JORGE, et al. 2004). É conhecida popularmente como “espinheira-santa”, “cancerosa”, “cancorosa-de-sete-espinhos” e “maiteno”, dentre outros nomes (LORENZI & MATOS, 2002; BRANDÃO et al., 2006). É uma árvore pequena que atinge cerca de 2 a 3 metros de altura. Suas folhas são inteiriças e apresentam espinhos nas bordas, enquanto que as flores, axilares, apresentam coloração amarelo-esverdeada. A planta produz frutos pequenos e vermelhos. A propagação da planta se dá por meio de sementes e o cultivo dá bons resultados em regiões de clima ameno.

No contexto brasileiro, onde seu crescimento é nativo a espécie *M. ilicifolia* é largamente utilizada na medicina popular (Mossi et al., 2004). O uso medicinal dessa planta é datado da década de 20 desde quando se tem algum registro escrito de sua utilização (CUNHA et al., 2003).

Segundo Carlini & Frochtengarten (1988), os primeiros estudos de eficácia terapêutica da *M. ilicifolia* foram realizados por Aluizio França, professor da Faculdade de Medicina do Paraná, em 1922 que usou a *M. ilicifolia* em pacientes portadores de úlcera gástrica e relatou o sucesso do tratamento. Também há estudos que afirmam que a *M. ilicifolia*, apresenta atividades antineoplásica e antimicrobiana (PEREIRA et al., 1992; MING et al., 1998).

Investigações anteriores demonstraram a ocorrência de vários metabólitos secundários nessa espécie, (VILEGAS, et al. 1999; LEITE, et al. 2001;) incluindo triterpenos quinonametídicos (BUFFA-FILHO, et al. 2002) e alcalóides de piridina sesquiterpeno (CORSINO, et al. 1998a; CORSINO, et al. 1998b;) com um amplo espectro de atividades.

Dos Santos, et al. em 2010 descreveram as associações sinérgicas de dois metabólitos secundários, triterpenóides quinonametídicos, identificados como Maitenina (1) e Pristimerina (2) (Figura 2), previamente isoladas de cascas das raízes de mudas e de plantas adultas de *Maytenus ilicifolia*. Suas propriedades antioxidantes também foram monitoradas por voltametria cíclica e cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à detecção eletroquímica.

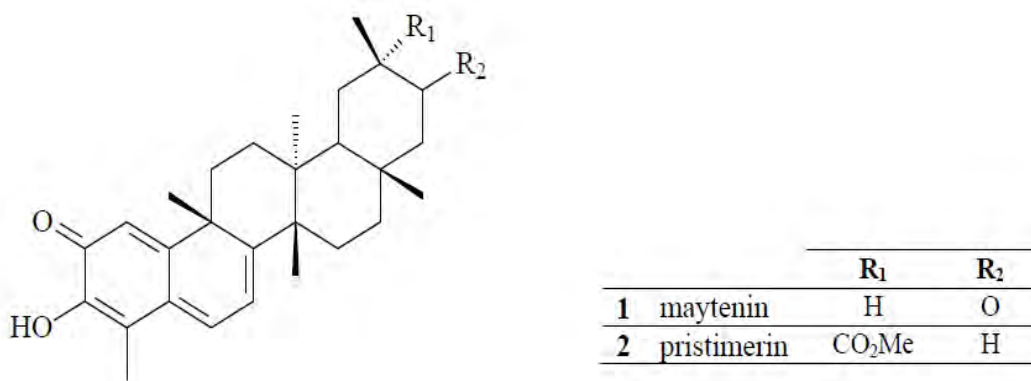


FIGURA 2. Estrutura molecular da Maitenina (MJ2) e da Pristimerina (MF2.5)

A análise por HPLC-DAD dos extratos obtidos de *Maytenus ilicifolia*, indicaram a presença desses triterpenos quinonametídicos e/ou compostos fenólicos, como os metabólitos constituintes principais. A análise quantitativa dos extratos mostrou que a Pristimerina é o principal componente de ambos os extratos analisados. Os triterpenos quinonametídicos (1) e (2), bem como os flavonóides acumulados nas cascas das raízes de *M. ilicifolia*, foram avaliados por HPLC-ED e voltametria cíclica. Os resultados indicaram que a ocorrência das duas classes de compostos pode influenciar o potencial antioxidante dos respectivos extratos.

Assim, no presente trabalho pretendeu-se analisar o gene *ERG11* em isolados clínicos sequências de *C. neoformans* e *C. gattii*, e caracterizar possíveis alterações na sequência desse gene relacionadas às possíveis

mutações. Com estes dados pretende-se elucidar os mecanismos moleculares de resistência aos azóis e utilizar estes isolados resistentes na prospecção de moléculas ativas de fontes vegetais com atividade antifúngica. Neste sentido, através de futuros estudos de modelagens dos alvos dos azóis novas moléculas poderão ser desenhadas para o desenvolvimento de novos fármacos.

2. Justificativa

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

Apesar de existirem no mercado fármacos para o tratamento dessas infecções, existem problemas quanto ao espectro de ação, os custos e os efeitos adversos como a hepatotoxicidade, nefrotoxicidade e fototoxicidade, além da resistência a algumas drogas.

Em se tratando deste agente, os estudos que abordam os mecanismos moleculares de resistência aos azóis e a investigação de novos alvos ainda são incipientes.

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 (GOMEZ-LOPEZ et al.; 2008; NORDOY e GAUSTAD, 2008; SILVA et al., 2008; CANNON et al., 2009). As plantas medicinais são conhecidas fontes naturais para o tratamento de várias doenças desde a antiguidade. 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 (NASCIMENTO et al., 2000; HOLETZ et al., 2002; ROJAS et al., 2006; SCORZONI et al., 2007b). 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).

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 (PINA-VAZ et al., 2004; SUNG & LEE, 2008). Neste contexto, pretende-se utilizar isolados resistentes que apresentam alterações moleculares estruturais ou de afinidade química na enzima alvo lanosterol 14C desmetilase, através da análise do gene ERG11 relacionado à resistência ao fluconazol na prospecção de substâncias ativas de fontes vegetais com atividade antifúngica.

3. Objetivos

Caracterização dos mecanismos de resistência dos isolados clínicos de *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* e do isolado de *C. gattii* de animal que evoluíram para resistência a fluconazol através da análise das mutações pontuais e quantificação da expressão do gene ERG11. Análise da atividade antifúngica das substâncias Maitenina e Pristimerina obtidas da planta *Maytenus* sp. frente aos isolados sensível e resistentes de *C. neoformans* var. *grubii* e *C. gattii* para obtenção de protótipos antifúngicos.

3.1. Objetivos específicos

1. Analisar as sequências do gene ERG11 de isolados clínicos sequenciais sensíveis e resistentes *in vitro* de *C. gattii* e *C. neoformans*.

2. Caracterizar a proteína alvo *ERG11* de fluconazol traduzida a partir do sequenciamento e analisar as modificações na interação com as porções ativas de fluconazol.

3. Analisar a atividade antifúngica das substâncias Maitenina e Pristimerina obtidas da planta *Maytenus* sp. frente aos isolados sensível e resistente com alterações no gene ERG 11 de *C. neoformans* e *C. gattii* com e sem alterações nos genes previamente caracterizados.

4. Analisar a citotoxicidade das substâncias antifúngicas de origem vegetal.

4. Materiais e Métodos

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

Para a realização das análises dos genes foram selecionados os isolados clínicos sequenciais de *C. neoformans* var. *grubii* recuperados de paciente HIV positivo com histórico de recidivas por falha terapêutica com evolução para resistência ao fluconazol, isolado de animal resistente de *C. gattii* recuperado de um psitacédeo (RASO, et al. 2004) e cepa 90012 ATCC (*The American Type Culture Collection*), pertencente à micoteca do Laboratório de Micologia Clínica do Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Araraquara e Instituto Adolfo Lutz, cedidos em colaboração. Os isolados de *C. neoformans* foram recuperados de um paciente que apresentou vários episódios de infecção em diferentes períodos e foram caracterizados por tipagem molecular e sensibilidade aos antifúngicos da terapêutica usual. Adicionalmente, estes foram analisados por técnica de RAPD *Random Amplified Polimorphic DNA* e apresentaram perfis genéticos idênticos (ALMEIDA, 2005).

Os isolados com perfil sensível e ATCC foram cultivados em ágar Sabouraud sem a adição de cloranfenicol e incubadas a temperatura ambiente durante 48 horas, enquanto que o isolado clínico intermediário (I), o resistente e o isolado de *C. gattii* foram cultivados em ágar Sabouraud sem cloranfenicol acrescido de fluconazol em concentração de 16 µg/mL e 64 µg/mL, respectivamente, e incubados a 30°C por 48 horas.

4.2. Teste de sensibilidade dos isolados frente às drogas sintéticas.

Todos os isolados foram previamente testados quanto a sua sensibilidade às drogas sintéticas fluconazol, itraconazol e anfotericina B, (ALMEIDA, et al., 2007; MATSUMOTO, et al., 2007;) segundo o método preconizado pelo CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) documento M27-A2. Para a comprovação da evolução da resistência e determinação da CIM após estocagem dos isolados o teste acima foi refeito com a adição das drogas caspofungina e voriconazol, seguindo o documento M27-A2 e M27-S3 que utiliza suplemento para interpretação dos pontos de corte das drogas caspofungina e voriconazol.

Para a diluição das drogas sintéticas utilizou-se o meio de cultura 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 em RPMI foi ajustada até a concentração final na placa de $5,0 \times 10^2$ à $2,5 \times 10^3$. A faixa de concentração das drogas utilizadas foram de 128 a 0,125 $\mu\text{g/mL}$ para fluconazol, 32 a 0,0625 $\mu\text{g/mL}$ para itraconazol, 32 a 0,0625 $\mu\text{g/mL}$ para caspofungina, 16 a 0,0321 $\mu\text{g/mL}$ para voriconazol e de 16 a 0,0321 $\mu\text{g/mL}$ para anfotericina B. Foram realizadas leituras visuais após 48 horas de incubação em agitação, onde o ponto de leitura para anfotericina B foi aquele em que ocorreu inibição total do crescimento e o valor de CIM para essa droga é a menor concentração que alcança esse valor. Para os azóis, a leitura foi realizada na menor concentração que resulta em redução da turvação em 50%. A interpretação dos resultados foi realizada conforme os pontos referência (*breakpoints*) constantes no documento M27-S3 de 2008 para *Candida sp.*, pois para *C.neoformans* ainda não há pontos de corte validados. Para as drogas fluconazol e caspofungina utilizamos como referência de leitura para obtenção da CIM crescimento de 50% e para anfotericina B consideramos CIM em 100% de inibição (Quadro 1) A cepa ATCC 90012 de *Cryptococcus neoformans* e a cepa ATCC 22019 de *Candida parapsilosis* também foram utilizadas como controles dos testes.

	(S) Suscetível	(I) Suscetível dose dependente	(I) Intermediário	(R) Resistente	(NS) Não suscetível
Anidulafungina	≤ 2				>2
Caspofungina	≤ 2				>2
Fluconazol	≤ 8	16-32		≥ 64	
5-Fluocitosina	≤ 4		8-16	≥ 32	
Itraconazol	$\leq 0,125$	0,25-0,5		≥ 1	
Micafungina	≤ 2				>2
Voriconazol	≤ 1	2		≥ 4	

QUADRO 1. Valores de CIM como pontos de corte para o método de microdiluição em caldo, segundo documento M27S3 preconizado pelo CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) para espécies de *Candida*.

4.3. Extração do DNA genômico de *Cryptococcus sp.*

As culturas para extração de DNA foram realizadas a partir de uma colônia semeada em ágar Sabouraud sem adição de cloranfenicol a 30°C durante 48 horas e em seguida em caldo YEPD (yeast extract peptone destrose) 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), incubados 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, a razão das leituras foi avaliada para verificação da qualidade do DNA e este foi analisado 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 com GelRed™ Kit Uniscience e observado em luz ultravioleta.

4.4. Obtenção dos genes ERG11.

Os *primers* para amplificação do gene ERG 11 de *C. neoformans A* (sense) – TCGTCGAACCATCTTTTCG, **K** (antisense) - TGAGATGCTC ATGCAGCAGA, **B** (antisense) – GGTCATGAAGTCATAGACG, **J** (sense) - TCCATTTCTAGCACGCTC, **F** (sense) - CATCCTTATGGGTCTGAAG, **I** (antisense) - GCGAAGCATAACTGACGA, **H** (sense) – TAGCACGAACACGACATG e **G** (antisense) - ACCATCTTCACCTATGTTGT, foram gentilmente cedidos pela Dra. Laura Rodero do Departamento de Micologia, Instituto Nacional de Enfermidades Infecciosas, ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán”, Buenos Aires, Argentina. Os *primers* para *C. gattii* (BROAD Institute acesso número CNBG 0512.2) foram desenhados através do programa Vector (Invitrogen). As sequências geradas de *C. neoformans* foram divididas em quatro pares de iniciadores e dois pares para *C. gattii*, Primer S1 – TATTTTCCTCGTCGAACCAT, Primer AS2 – GGAGGTTTTCAATCATGTCA, Primer S3 – CCCTTCCCAGTTACAGGAGA e Primer AS4 - TGGTCCAATGAGATCGTCTA.

As reações da PCR (polimerase chain reaction) foram realizadas com volume final de 50 μ L, as concentrações empregadas foram 2,0 μ L de cada *primer* (1 μ M), 5,0 μ L de tampão 10X (Tris-SO₄ 600mM pH 8,9, (NH₄)₂SO₄ 180mM), 1,0 μ L de uma mistura de dNTPs (10mM), 2,0 μ L de sulfato de magnésio (50mM), 0,2 μ L Taq Hi-Fi (Invitrogen), 100ng de DNA genômico e água milli-Q estéril tratada com DEPC 0,01% para volume final de 50 μ L. A amplificação do gene de *C. neoformans* e *C. gattii* foi realizada através de um ciclo inicial com temperatura de desnaturação de 94°C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos de 94°C por 30 segundos, 51°C por 45 segundos, 72°C por 2 minutos, e 1 ciclo final a 72°C por 10 minutos, para os *primers* A-K, B-J, F-I, S1, AS2, S3 e AS4. Para os *primers* H-G foi realizado um ciclo inicial com temperatura de desnaturação de 94°C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos de 94°C por 30 segundos, 56°C por 45 segundos, 72°C por 2 minutos, e 1 ciclo final a 72°C por 10 minutos, utilizando-se aparelho termociclador Perkin Elmer modelo 9700.

4.5. Purificação dos fragmentos das sequências dos genes amplificados.

Os fragmentos amplificados foram purificados através do Kit *QIAquick PCR Purification* (Quiagen-USA), seguindo as recomendações do fabricante. Posteriormente, o produto purificado será avaliado por eletroforese em gel de agarose 1.5% a 120 v e quantificado por espectrofotometria em DO=260nm.

4.6. Sequenciamento

Os fragmentos de DNA dos genes ERG11 foram sequenciados pelo método de Sanger (1977) utilizando o sequenciador automático Applied Biosystems 3130 automatic analyser pertencente ao laboratório de Biologia Molecular e Celular de Microrganismos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara - UNESP. As reações foram realizadas com o kit DYeterminator V3.1 cycle sequencing kit (Applied Biosystems), seguindo os protocolos recomendados pelo fabricante, utilizando os oligonucleotídeos em pares, separadamente, onde se utilizará ciclos adequados. A purificação das amostras foi realizada através do kit de purificação BigDye XTerminator® Purification (Applied Biosystems), seguindo os dados do fabricante, para

obtenção de sequências mais confiáveis. Todos os isolados foram sequenciados em triplicata.

4.7. Montagem dos fragmentos e análise do gene *ERG11*.

A montagem dos fragmentos e análise das sequências dos genes foram realizadas utilizando os programas BioEdit Sequence Alignment Editor (versão 7) e o programa ClustalW (www.ebi.ac.uk/clustalw/).

A homologia das sequências dos isolados foi verificada com base no gene depositado no banco de dados GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) com o número de acesso AY265353 para *C. neoformans*. Para análise da sequência de *C. gattii* foi utilizado o gene de referência R265 depositado no BROAD Institute com o código de acesso CNBG_0513. 2 (<http://www.broadinstitute.org>).

Todas as sequências foram confirmadas no banco de dados *GenBank* utilizando o programa tBLASTx no servidor NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST).

4.8. Tradução e análise comparativa das sequências de aminoácidos.

A tradução das sequências e o alinhamento dos aminoácidos foram realizados utilizando os programas ClustalW e o BioEdit Sequence Alignment Editor (versão 7). Através da sequência nucleotídica da proteína lanosterol 14C desmetilase de referência, obtida do banco no *GenBank* acesso (AY265353) para *C. neoformans* var. *grubii* e no BROAD Institute acesso (CNBG_0513. 2) para *C. gattii*, a homologia das sequências em estudo foi realizada, a fim de verificar as mutações ocorridas em pontos relevantes das proteínas depositadas.

4.9. Análise e localização da mutação na proteína *ERG11*.

A sequência da proteína *ERG11* lanosterol 14C desmetilase do isolado 30 (resistente) também foi alinhado utilizando os programas ClustalW e o BioEdit Sequence Alignment Editor (versão 7) com as sequências do mesmo gene de outros fungos como *Candida albicans* (GenBank acesso CAA31658.1), *Saccharomyces cerevisiae* (BROAD acesso SCRG_04712), *Apergillus*

fumigatus (GenBank acesso AAK73659.1) e a sequência de *C. neoformans* var *grubii* (GenBank acesso AY265353). Com base na localização das regiões funcionais importantes da CYP51(ERG11) de *C. neoformans* var *grubii* obtidas por Sheng et al., 2009 e dos sítios de interação com azóis, foi possível verificar a localização da mutação na proteína. Também foi localizado o local que o grupamento Heme se liga conforme descrito Revankar et al. em 2004.

4.10. Preparo das substâncias vegetais.

As substâncias puras foram obtidas através do projeto Biota-FAPESP e Bioprospecta-FAPESP, coordenados pela Profa. Dra. Vanderlan da Silva Bolzani e Profa. Dra. Dulce Helena Siqueira Silva, respectivamente, do Instituto de Química da UNESP–Araraquara e foram disponibilizadas pela Profa. Dra. Maysa Furlan em colaboração. As moléculas purificadas Maitenina (MJ2) e Pristimerina (MF2.5) foram obtidas a partir da espécie *Maytenus* sp., que foram selecionadas para este estudo por apresentar boa atividade biológica contra *C. neoformans*.

As substâncias puras vegetais foram diluídas assepticamente em quantidades adequadas de dimetilsulfóxido e solubilizados com o auxílio do vórtex. Foram realizados cálculos para que a faixa de concentração para que a avaliação da atividade antifúngica fosse iniciada em 250 a 0,4µg/mL.

4.10.1. Avaliação da atividade antifúngica.

Os testes de sensibilidade foram realizados em triplicata e de acordo com o documento M27-A2 (2002) do CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) com adição de glicose (RODRIGUEZ-TUDELA et al., 1996) e modificações para o teste com as substâncias puras de fontes vegetais (Maitenina e Pristimerina), (SCORZONI et AL., 2007). 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 do inóculo final na placa foi de $5,0 \times 10^2$ à $2,5 \times 10^3$. 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 µg/mL para fluconazol e de 16 a 0,0321µg/mL para anfotericina B. Foram

realizadas leituras visuais após 48 horas de incubação. A cepa ATCC 90012 de *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* também foi utilizada como controle dos testes. A concentração inibitória mínima foi considerada a menor em que se observou a inibição total do crescimento fúngico. As substâncias puras que apresentaram CIM menor que 75 µg/mL, a atividade antifúngica foi considerada forte, entre 75 a 150 µg/mL possuem atividade antifúngica moderada, entre 150 a 250 µg/mL, fraca e maior que 250 µg/mL inativo (SCORZONI et al., 2007).

4.10.2. Concentração Fungicida Mínima

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

4.10.3. Avaliação da atividade citotóxica das substâncias escolhidas.

O método MTT, utilizado para a avaliação da citotoxicidade, tem como princípio a determinação da habilidade de células vivas em reduzirem o sal de 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT, Sigma), formando cristais insolúveis de formazana de coloração violeta. As substâncias escolhidas para o ensaio foram a Maitenina (MJ2) e a Pristimirina (MF2.5), utilizando a linhagem celular A549 (Pneumócito humano tipo II).

Procurando avaliar a potencial dose-resposta para a citotoxicidade, a faixa de concentração das substâncias testadas foi de 125 a 0,24 µg/mL. Inicialmente as células foram tratadas por 24 horas com as substâncias puras, seguido de recuperação pós-tratamento de mais 24 horas, no qual foi removido o tratamento e colocado meio fresco. Cada ensaio foi acompanhado de um controle positivo (doxorrubicina 10 µg/mL) e controle negativo (células não-tratadas). Posteriormente o meio de cultura livre de soro fetal bovino foi removido e as células foram incubadas com 10 µL de MTT a 37 °C, ao abrigo da luz, até a observação da presença dos cristais violetas de formazana, 100 µL de álcool isopropílico absoluto foi adicionado a cada poço e a leitura espectrofotométrica da absorbância, em comprimento de onda de 540 nm, foi

realizada em leitor de microplacas ELISA (BioRad modelo 3550). Os testes foram feitos em triplicata e o resultado foi obtido em porcentagem de células viáveis, calculada através da equação abaixo:

$$\text{células viáveis \%} = \frac{\text{média do teste X100}}{\text{média do controle negativo}}$$

A análise estatística foi realizada através da comparação dos dados pelo método ANOVA, complementado pelo teste de Tukey com nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$).

5. Resultados

5.1. Determinação da CIM dos isolados selecionados

Foram realizados testes para verificação da CIM com drogas sintéticas para demonstrar o desenvolvimento da resistência dos isolados clínicos sequenciais de *C. neoformans* var. *grubii*. O isolado 26 foi considerado sensível (S); 27 intermediário (I) e 30, resistente (R) *in vitro*. O isolado de *C. gattii* do Psitacídeo foi considerado resistente (R). Para o controle da metodologia (M27A2 2002) foi utilizada a cepa ATCC 22019 de *Candida parapsilosis* e para interpretação dos pontos de corte o documento M27S3 (2008) (Tabela 1).

TABELA 1. Valores de CIM em µg/mL das drogas sintéticas contra a cepa ATCC 90012 de *C. neoformans*, isolado do Psitacídeo de *C. gattii*, dos isolados clínicos sequenciais de *C. neoformans* (26, 27 e 30) e cepa de referência ATCC 22019 de *Candida parapsilosis*.

Isolados	CIM µg/mL				
	FCZ	ITZ	CASPO	VORICO	AMB
ATCC 90012	4,0	0,125	32,0	1,0	0,5
<i>C. neoformans</i> 26	2,0	0,125	32,0	2,0	0,5
<i>C. neoformans</i> 27	16,0	0,125	32,0	8,0	0,5
<i>C. neoformans</i> 30	>64,0	>32,0	>32,0	>8,0	1,0
<i>C. gattii</i>	>64,0	>32,0	>32,0	>8,0	1,0
ATCC 22019	1,0	0,125	4,0	0,5	0,5

FCZ: Fluconazol; ITZ: Itraconazol; CASPO: Caspofungina; VORICO: Voriconazol; AMB: Anfotericina B.

5.2. Amplificação do gene ERG11

Os fragmentos de 700, 702, 920 e 835 pares de bases foram amplificados pelos pares de iniciadores A-K, B-J, F-I e H-G respectivamente para os isolados ATCC e clínicos de *C. neoformans* var. *grubii*. Nas figuras 3 e 4 estão representados os fragmentos amplificados do gene ERG11 dos isolados clínicos e da cepa ATCC de *C. neoformans* var. *grubii*. No quadro 2 estão localizados os primers que foram desenhados a partir da cepa de referência AF225914.1 de *C. neoformans* var. *neoformans* (GenBank) na

sequência completa do gene ERG 11 da cepa de referência AY265353 de *C. neoformans* var. *grubii*, mostrando que os primers foram capazes de amplificar o gene completo dos isolados da variedade *grubii*.

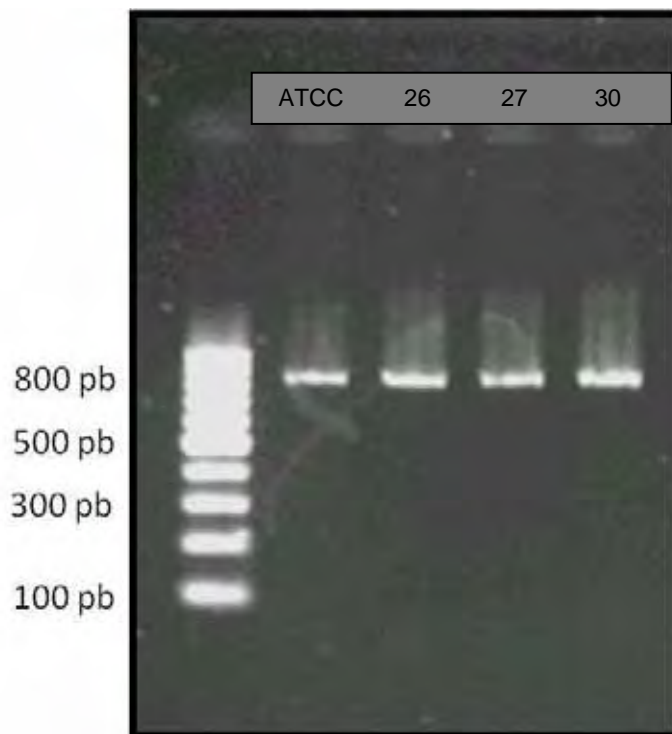


FIGURA 3. Produtos da amplificação dos isolados ATCC e clínicos 26, 27 e 30 de *C. neoformans* var. *grubii* obtidos pelo par de primer **H-G** do gene ERG11 (835pb), utilizando como padrão de massa molecular fragmentos de 100 pb com faixa de 100 a 1000bp.

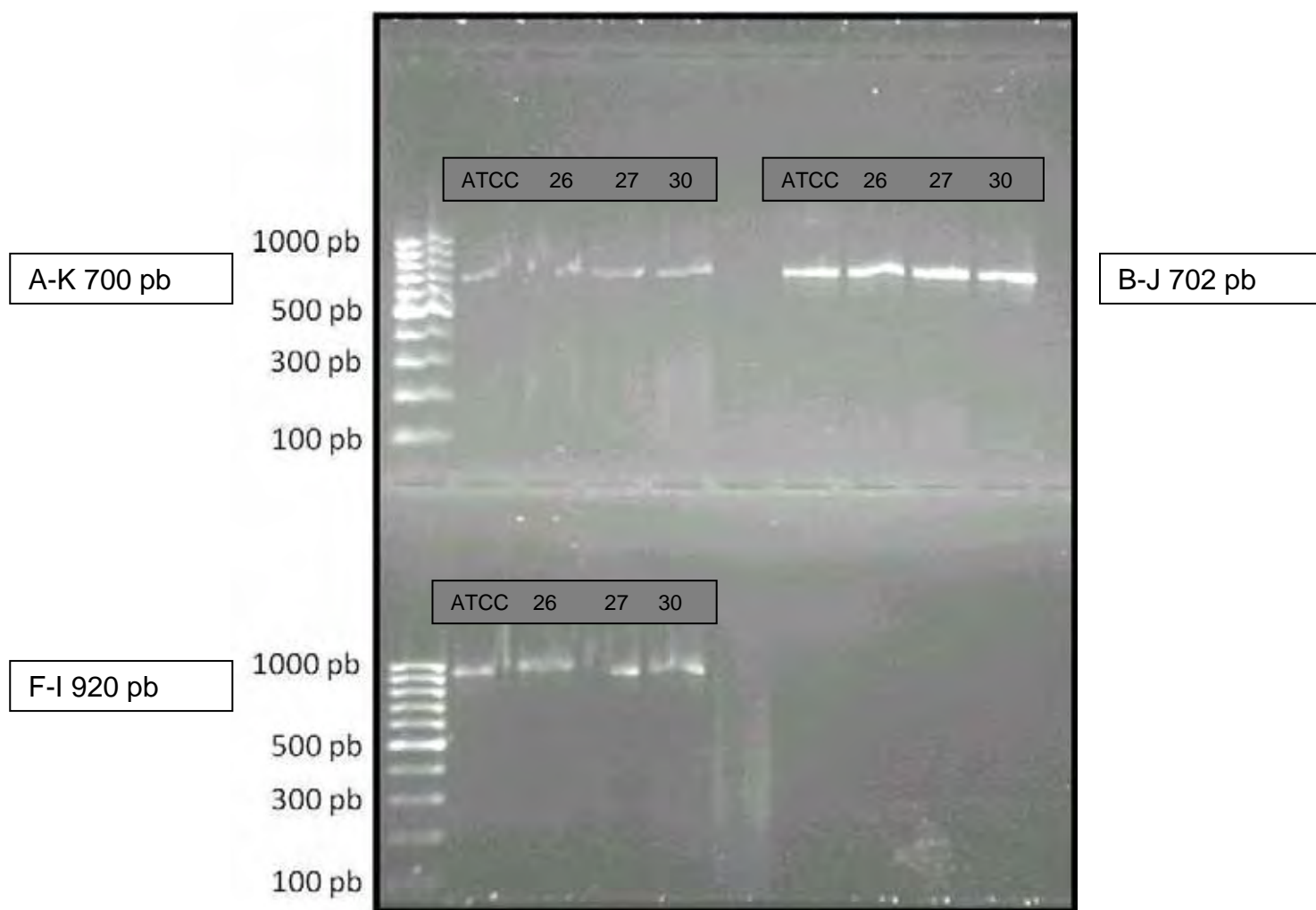


FIGURA 4. Produtos da amplificação do isolado ATCC, isolados clínicos 26, 27 e 30 de *C. neoformans* var. *grubii* obtidos pelos pares de primers **A-K**, **B-J** e **F-I** do gene ERG11, utilizando como padrão de massa molecular fragmentos de 100 pb com faixa de 100 a 1000bp

>gi|30314337|gb|AY265353.1| *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*
lanosterol 14 alpha-demethylase (ERG11) gene, complete cds

```

1   tcgtcgaacc atctttcgtg tctttcacat ttatctatth catctttcca ttcctctttt
61  accccttcca tcacatccag ccatgtcggc aatcatcccc caggtccagc aactgctggg
121 acaagtggcc caatttatcc caccgtgggt cgctgccctc cccacctccg tgaaagtctg
181 gatcgctgtc atcggtattc ccgctctcgt catttgcttg aacgttttcc agcagcttgt
241 atgtgttaca ttcttgggct ttagctccgt ttcccatgct caatagattc ccaagctgat
301 cacaagctct ctgacgcggt ataatatccg ccgcagtgtc ttctctgtag aaaagatctt
361 cctcctgttg tctttcacta cattccatgg tttggctcag ccgcttatta tggggaagat
421 ccctacaaat tctgtttcga atgccgtgac aaatacggag atttattcac tttcatcctt
481 atgggtcga gggttaccgt cgcgcttga ccaaagggtg acaacctttc tttgggtgga
541 aagattttctc aagtctctgc cgaggaagca tacactgtaa gcttatgtgc ttcactgatt
601 taagatggct tacttactgt cgcttggtag cacttgacta ctcccgtctt tggcaagggt
661 gttgtttacg attgccctaa tgagatgctc atgcagcaga agaagtttgt aagttaatac
721 cactcgcagc ttgattcgca agctcattat ttacagatc aagtcgggtc ttactaccga
781 gtccttccag tcttatcccc ctatgattac cagcgaatgc gaagatttct tcaccaaga

```

```

841 agtcggaatt tctccccaga agccttctgc cactctcgac ctctcaaat ccatgtccga
901 gctcatcatt cttactgctt ctcgtactct ccaggggaag gaagtctgtg aatctcttaa
961 tggctcagttc gccaaagtact acgaggatct cgacggcggg tttactcccc tcaactttat
1021gttccccaac ttgcccttcc ccagttacaa gaggcgagat gaggctcaga aggctatgag
1081cgactttttac ttgaagatca tggagaacag gagaaagggg gaaagcgacg tgagttgatt
1141tcaaattggt gaagaagaca cgctcgattt gagtagcacg aacacgacat gattgaaaac
1201ctccagagct gcaagtaccg aaacgggtgc cctctctctg atcgtgacat tgcccacatc
1261atgattgctc ttcttatggc tggccagcac acttctctctg ctacttcttc ttggactctt
1321ctccatcttg ctgaccgacc ggacgttgtg tacgttttcc agataacttt gaatgacgaa
1381gcataactga cgaagaatgta gagaggctct ttaccaggag cagaaacaaa agctcggtaa
1441ccctgacggt actttccgag actacaagta cgaggacctt aaggagttgc ccatcatgga
1501ctctatcatc cgagagactc tccgcatggg acgtcattcc gacttgattt tttcgatac
1561ttactgaaca caaccatttc tagcacgctc ccatccagta agctccgaac ttcgccttct
1621ttcataaatt gtactaatat gtaatagctc gatctaccga aaagtccttt ccgatatccc
1681cgtccctccc agtctttctg cccctctga gaacggccaa tacatcatcc ccaaggcca
1741ctacatcatg gctgcccctg gcgtttctca aatggacctt cgtatctggc aagacgcca
1801agtctggaac cctgcccgat ggcacgatga aaagggattt gccgcccgtg ccatggctca
1861atacagcaag gccgagcaag tcgattatgg ttttggttct gttagcaagg gtaccgaatc
1921tccttaccag ccattcgggt ccggcaggca cagatgtgtt ggcaacaat ttgcgtacac
1981tcaactttca accatcttca cctatgttgc gaggaatttc actttgaagc ttgctgttcc
2041caagttccct gaaaccaatt accgtgtaag tcttcgtgtt ccaatctatc actggatgga
2101tgttttgctg atctccactc gtgtagacca tgattgtcca acccaacaac ctttggtta
2161ctttcaccct tcgaaatgcc gaggtcaaat aggagcgtg aagtgtacgc atatatcgaa
2221actagatggt gcgagtttta gtatgaattg aaagaggtca tgaagtcata gacg

```

QUADRO 2. Localização dos *primers* na sequência do gene *ERG11* no isolado de *C. neoformans* var. *grubii* de referência (AY265353). *Primer A* (*sense*): amarelo; *Primer K* (*antisense*): verde; *Primer B* (*antisense*): rosa; *Primer J* (*sense*): azul escuro; *Primer F* (*sense*): violeta; *Primer I* (*antisense*): cinza; *Primer H* (*sense*): vermelho; *Primer G* (*antisense*): turquesa. **ATG:** *start códon*; **TGA:** *stop códon*.

Os fragmentos de 1212 e 1248 pb do gene *ERG11* foram amplificados pelos iniciadores S1-AS2 e S3-AS4 (“sense – non sense”), do isolado de *C. gattii* resistente, recuperado do psitacídeo com CIM >64 µg/mL para fluconazol.

O fragmento obtido pela amplificação dos primers S1-AS4, os quais representavam o início e o final da sequência do gene *ERG11* de *C. gattii*, não foram adequadamente sequenciados por se tratar de massa molecular de 2460pb, portanto foi necessário utilizar os dois pares S1-AS2 e S3-AS4 para a realização do sequenciamento (figura 5).

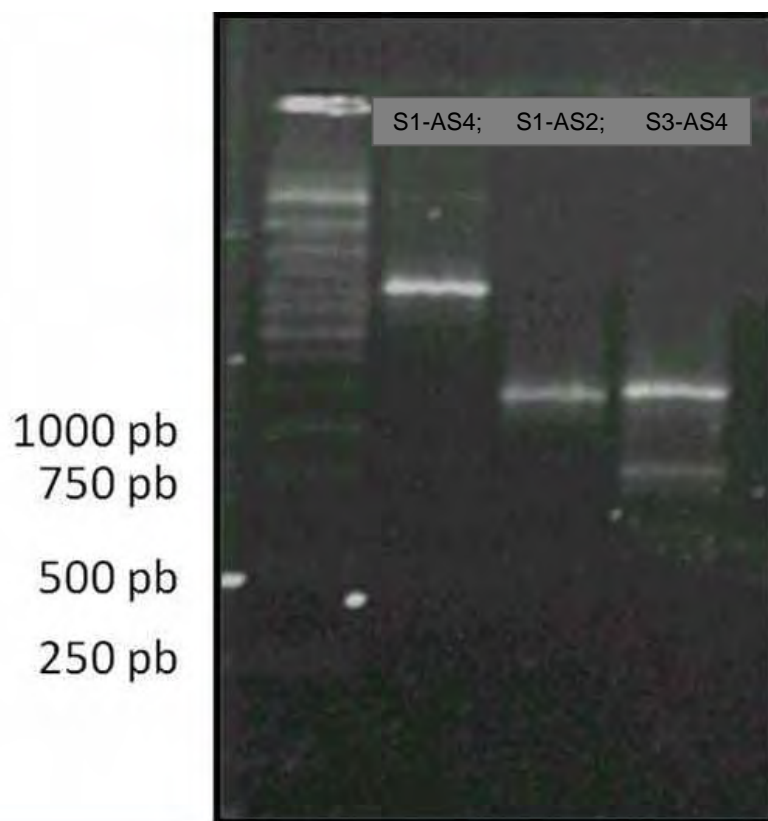


FIGURA 5. Produtos da amplificação obtidos a partir das sequências iniciadoras para obtenção dos fragmentos S1-AS4 (2460), S1-AS2 (1212pb) e S3- AS4 (1248pb) do gene *ERG11* de *C. gattii*, utilizando como padrão de massa molecular fragmentos de 1Kb com faixa de 250 a 10000bp.

5.3. Comparação das sequências nucleotídicas do gene *ERG11* dos isolados de *C. neoformans var grubii*.

A análise da sequência nucleotídica dos isolados clínicos 26 (sensível), 27 (I) e da cepa ATCC 90012 foi realizada através do alinhamento das três sequências com o gene de referência *ERG11* depositado no *GenBank* (AY265353) pelo programa ClustalW2. Essa análise não revelou nenhum tipo de mutação nos genes, somente uma variação nas sequências 26, 27 e ATCC, conforme demonstrado na figura 6.

O alinhamento do gene de referência de *C. neoformans var grubii*, do isolado 26 (sensível) e do isolado 30 (resistente) revelou dois pontos de mutação. As mutações encontradas foram duas substituições de nucleotídeos no isolado resistente. A primeira substituição foi do nucleotídeo A (adenina) para G (guanida) na posição 831 no isolado 30; a segunda substituição foi do

nucleotídeo C (citosina) para T (timina) na posição 1436 no isolado 30. Variação na sequência nucleotídica ocorreu na posição 1374 com uma base A (adenina) para G (guanina) nos isolados 26 e 30 em comparação à sequência do gene ERG11 (AY265353) da cepa de referência (figura 7). Essa análise foi realizada após a retirada dos íntrons seguindo a sequência cDNA de *C. neoformans var grubii*.

```

26          ATGTCGGCAATCATCCCCAGGTCCAGCAACTGCTGGGACAAGTGGCCCAATTTATCCCA 60
27          ATGTCGGCAATCATCCCCAGGTCCAGCAACTGCTGGGACAAGTGGCCCAATTTATCCCA 60
ATCC       ATGTCGGCAATCATCCCCAGGTCCAGCAACTGCTGGGACAAGTGGCCCAATTTATCCCA 60
ref        ATGTCGGCAATCATCCCCAGGTCCAGCAACTGCTGGGACAAGTGGCCCAATTTATCCCA 60
          *****

26          CCGTGGTTCGCTGCCCTCCCCACCTCCGTGAAAGTCGTGATCGCTGTCATCGGTATTCCC 120
27          CCGTGGTTCGCTGCCCTCCCCACCTCCGTGAAAGTCGTGATCGCTGTCATCGGTATTCCC 120
ATCC       CCGTGGTTCGCTGCCCTCCCCACCTCCGTGAAAGTCGTGATCGCTGTCATCGGTATTCCC 120
ref        CCGTGGTTCGCTGCCCTCCCCACCTCCGTGAAAGTCGTGATCGCTGTCATCGGTATTCCC 120
          *****

26          GCTCTCGTCATTTGCTTGAACGTTTTCCAGCAGCTTTGTCTTCCCTCGTAGAAAAGATCTT 180
27          GCTCTCGTCATTTGCTTGAACGTTTTCCAGCAGCTTTGTCTTCCCTCGTAGAAAAGATCTT 180
ATCC       GCTCTCGTCATTTGCTTGAACGTTTTCCAGCAGCTTTGTCTTCCCTCGTAGAAAAGATCTT 180
ref        GCTCTCGTCATTTGCTTGAACGTTTTCCAGCAGCTTTGTCTTCCCTCGTAGAAAAGATCTT 180
          *****

26          CCTCCTGTTGTCTTTCACTACATTCCATGGTTTGGCTCAGCCGCTTATTATGGTGAAGAT 240
27          CCTCCTGTTGTCTTTCACTACATTCCATGGTTTGGCTCAGCCGCTTATTATGGTGAAGAT 240
ATCC       CCTCCTGTTGTCTTTCACTACATTCCATGGTTTGGCTCAGCCGCTTATTATGGTGAAGAT 240
ref        CCTCCTGTTGTCTTTCACTACATTCCATGGTTTGGCTCAGCCGCTTATTATGGTGAAGAT 240
          *****

26          CCCTACAAATTCCGTGTTGCAATGCCGTGACAAATACGGAGATTTATTCACCTTTCATCCTT 300
27          CCCTACAAATTCCGTGTTGCAATGCCGTGACAAATACGGAGATTTATTCACCTTTCATCCTT 300
ATCC       CCCTACAAATTCCGTGTTGCAATGCCGTGACAAATACGGAGATTTATTCACCTTTCATCCTT 300
ref        CCCTACAAATTCCGTGTTGCAATGCCGTGACAAATACGGAGATTTATTCACCTTTCATCCTT 300
          *****

26          ATGGGTCGAAGGGTTACCGTCGCGCTTGGACCAAAGGGTAACAACCTTTCTTTGGGTGGA 360
27          ATGGGTCGAAGGGTTACCGTCGCGCTTGGACCAAAGGGTAACAACCTTTCTTTGGGTGGA 360
ATCC       ATGGGTCGAAGGGTTACCGTCGCGCTTGGACCAAAGGGTAACAACCTTTCTTTGGGTGGA 360
ref        ATGGGTCGAAGGGTTACCGTCGCGCTTGGACCAAAGGGTAACAACCTTTCTTTGGGTGGA 360
          *****

26          AAGATTTCTCAAGTCTCTGCCGAGGAAGCATACTCACTTGACTACTCCCGTCTTTGGC 420
27          AAGATTTCTCAAGTCTCTGCCGAGGAAGCATACTCACTTGACTACTCCCGTCTTTGGC 420
ATCC       AAGATTTCTCAAGTCTCTGCCGAGGAAGCATACTCACTTGACTACTCCCGTCTTTGGC 420
ref        AAGATTTCTCAAGTCTCTGCCGAGGAAGCATACTCACTTGACTACTCCCGTCTTTGGC 420
          *****

26          AAGGGTGTTGTTTACGATTGCCCTAATGAGATGCTCATGCAGCAGAAGAAGTTTATCAAG 480
27          AAGGGTGTTGTTTACGATTGCCCTAATGAGATGCTCATGCAGCAGAAGAAGTTTATCAAG 480
ATCC       AAGGGTGTTGTTTACGATTGCCCTAATGAGATGCTCATGCAGCAGAAGAAGTTTATCAAG 480
ref        AAGGGTGTTGTTTACGATTGCCCTAATGAGATGCTCATGCAGCAGAAGAAGTTTATCAAG 480
          *****

26          TCCGGTCTTACTACCGAGTCCCTTCAGTCTTATCCCCCTATGATTACCAGCGAATGCGAA 540
27          TCCGGTCTTACTACCGAGTCCCTTCAGTCTTATCCCCCTATGATTACCAGCGAATGCGAA 540
ATCC       TCCGGTCTTACTACCGAGTCCCTTCAGTCTTATCCCCCTATGATTACCAGCGAATGCGAA 540
ref        TCCGGTCTTACTACCGAGTCCCTTCAGTCTTATCCCCCTATGATTACCAGCGAATGCGAA 540
          *****

```

26 GATTTCCTTCACCAAAGAAGTCGGAATTTCTCCCCAGAAGCCTTCTGCCACTCTCGACCTC 600
 27 GATTTCCTTCACCAAAGAAGTCGGAATTTCTCCCCAGAAGCCTTCTGCCACTCTCGACCTC 600
 ATCC GATTTCCTTCACCAAAGAAGTCGGAATTTCTCCCCAGAAGCCTTCTGCCACTCTCGACCTC 600
 ref GATTTCCTTCACCAAAGAAGTCGGAATTTCTCCCCAGAAGCCTTCTGCCACTCTCGACCTC 600

26 CTCAAATCCATGTCCGAGCTCATCATTTCTTACTGCGTCTCGTACTCTCCAGGGGAAGGAA 660
 27 CTCAAATCCATGTCCGAGCTCATCATTTCTTACTGCGTCTCGTACTCTCCAGGGGAAGGAA 660
 ATCC CTCAAATCCATGTCCGAGCTCATCATTTCTTACTGCGTCTCGTACTCTCCAGGGGAAGGAA 660
 ref CTCAAATCCATGTCCGAGCTCATCATTTCTTACTGCGTCTCGTACTCTCCAGGGGAAGGAA 660

26 GTTCGTGAATCTCTTAATGGTCAGTTCGCCAAGTACTACGAGGATCTCGACGGCGGTTTT 720
 27 GTTCGTGAATCTCTTAATGGTCAGTTCGCCAAGTACTACGAGGATCTCGACGGCGGTTTT 720
 ATCC GTTCGTGAATCTCTTAATGGTCAGTTCGCCAAGTACTACGAGGATCTCGACGGCGGTTTT 720
 ref GTTCGTGAATCTCTTAATGGTCAGTTCGCCAAGTACTACGAGGATCTCGACGGCGGTTTT 720

26 ACTCCCCTCAACTTTATGTTCCCCAACTTGCCCCCTTCCAGTTACAAGAGGCGGAGATGAG 780
 27 ACTCCCCTCAACTTTATGTTCCCCAACTTGCCCCCTTCCAGTTACAAGAGGCGGAGATGAG 780
 ATCC ACTCCCCTCAACTTTATGTTCCCCAACTTGCCCCCTTCCAGTTACAAGAGGCGGAGATGAG 780
 ref ACTCCCCTCAACTTTATGTTCCCCAACTTGCCCCCTTCCAGTTACAAGAGGCGGAGATGAG 780

26 GCTCAGAAGGCTATGAGCGACTTTTACTTGAAGATCATGGAGAACAGGAGAAAGGGTGAA 840
 27 GCTCAGAAGGCTATGAGCGACTTTTACTTGAAGATCATGGAGAACAGGAGAAAGGGTGAA 840
 ATCC GCTCAGAAGGCTATGAGCGACTTTTACTTGAAGATCATGGAGAACAGGAGAAAGGGTGAA 840
 ref GCTCAGAAGGCTATGAGCGACTTTTACTTGAAGATCATGGAGAACAGGAGAAAGGGTGAA 840

26 AGCGACCACGAACACGACATGATTGAAAACCTCCAGAGCTGCAAGTACCGAAACGGTGTC 900
 27 AGCGACCACGAACACGACATGATTGAAAACCTCCAGAGCTGCAAGTACCGAAACGGTGTC 900
 ATCC AGCGACCACGAACACGACATGATTGAAAACCTCCAGAGCTGCAAGTACCGAAACGGTGTC 900
 ref AGCGACCACGAACACGACATGATTGAAAACCTCCAGAGCTGCAAGTACCGAAACGGTGTC 900

26 CCTCTCTGATCGTGACATTGCCACATCATGATTGCTCTTCTTATGGCTGGCCAGCAC 960
 27 CCTCTCTGATCGTGACATTGCCACATCATGATTGCTCTTCTTATGGCTGGCCAGCAC 960
 ATCC CCTCTCTGATCGTGACATTGCCACATCATGATTGCTCTTCTTATGGCTGGCCAGCAC 960
 ref CCTCTCTGATCGTGACATTGCCACATCATGATTGCTCTTCTTATGGCTGGCCAGCAC 960

26 ACTTCCTCTGCTACTTCTTCTTGGACTCTTCTCCATCTTGCTGACCGACCGGACGTTGTA 1020
 27 ACTTCCTCTGCTACTTCTTCTTGGACTCTTCTCCATCTTGCTGACCGACCGGACGTTGTA 1020
 ATCC ACTTCCTCTGCTACTTCTTCTTGGACTCTTCTCCATCTTGCTGACCGACCGGACGTTGTA 1020
 ref ACTTCCTCTGCTACTTCTTCTTGGACTCTTCTCCATCTTGCTGACCGACCGGACGTTGTA 1020

26 GAGGCTCTTTACCAGGAGCAGAAACAAAAGCTCGGTAACCCTGACGGTACTTTCCGAGAC 1080
 27 GAGGCTCTTTACCAGGAGCAGAAACAAAAGCTCGGTAACCCTGACGGTACTTTCCGAGAC 1080
 ATCC GAGGCTCTTTACCAGGAGCAGAAACAAAAGCTCGGTAACCCTGACGGTACTTTCCGAGAC 1080
 ref GAGGCTCTTTACCAGGAGCAGAAACAAAAGCTCGGTAACCCTGACGGTACTTTCCGAGAC 1080

26 TACAAGTACGAGGACCTTAAGGAGTTGCCATCATGGACTCTATCATCCGAGAGACTCTC 1140
 27 TACAAGTACGAGGACCTTAAGGAGTTGCCATCATGGACTCTATCATCCGAGAGACTCTC 1140
 ATCC TACAAGTACGAGGACCTTAAGGAGTTGCCATCATGGACTCTATCATCCGAGAGACTCTC 1140
 ref TACAAGTACGAGGACCTTAAGGAGTTGCCATCATGGACTCTATCATCCGAGAGACTCTC 1140

26 CGCATGCACGCTCCCATCCACTCGATCTACCGAAAAGTCCTTTCCGATATCCCCGTCCCT 1200
 27 CGCATGCACGCTCCCATCCACTCGATCTACCGAAAAGTCCTTTCCGATATCCCCGTCCCT 1200
 ATCC CGCATGCACGCTCCCATCCACTCGATCTACCGAAAAGTCCTTTCCGATATCCCCGTCCCT 1200
 ref CGCATGCACGCTCCCATCCACTCGATCTACCGAAAAGTCCTTTCCGATATCCCCGTCCCT 1200

26 CCCAGTCTTTCTGCCCTCTGAGAACGGCCAATACATCATCCCCAAGGGCCACTACATC 1260
 27 CCCAGTCTTTCTGCCCTCTGAGAACGGCCAATACATCATCCCCAAGGGCCACTACATC 1260

```

ATCC      CCCAGTCTTTCTGCCCCCTCTGAGAACGGCCAATACATCATCCCCAAGGGCCACTACATC 1260
ref      CCCAGTCTTTCTGCCCCCTCTGAGAACGGCCAATACATCATCCCCAAGGGCCACTACATC 1260
          *****

26      ATGGCTGCCCCCTGGCGTTTCTCAAATGGACCCTCGTATCTGGCAAGACGCCAAAGTCTGG 1320
27      ATGGCTGCCCCCTGGCGTTTCTCAAATGGACCCTCGTATCTGGCAAGACGCCAAAGTCTGG 1320
ATCC     ATGGCTGCCCCCTGGCGTTTCTCAAATGGACCCTCGTATCTGGCAAGACGCCAAAGTCTGG 1320
ref      ATGGCTGCCCCCTGGCGTTTCTCAAATGGACCCTCGTATCTGGCAAGACGCCAAAGTCTGG 1320
          *****

26      AACCTGCCCCGATGGCACGATGAAAAGGGATTGCGCCCGCTGCCATGGCTCAGTACAGC 1380
27      AACCTGCCCCGATGGCACGATGAAAAGGGATTGCGCCCGCTGCCATGGCTCAGTACAGC 1380
ATCC     AACCTGCCCCGATGGCACGATGAAAAGGGATTGCGCCCGCTGCCATGGCTCAGTACAGC 1380
ref      AACCTGCCCCGATGGCACGATGAAAAGGGATTGCGCCCGCTGCCATGGCTCAGTACAGC 1380
          *****

26      AAGCCGAGCAAGTCGATTATGGTTTGGTTCTGTAGCAAGGGTACCGAATCTCCTTAC 1440
27      AAGCCGAGCAAGTCGATTATGGTTTGGTTCTGTAGCAAGGGTACCGAATCTCCTTAC 1440
ATCC     AAGCCGAGCAAGTCGATTATGGTTTGGTTCTGTAGCAAGGGTACCGAATCTCCTTAC 1440
ref      AAGCCGAGCAAGTCGATTATGGTTTGGTTCTGTAGCAAGGGTACCGAATCTCCTTAC 1440
          *****

26      CAGCCATTCGGTGCCGGCAGGCACAGATGTGTTGGCGAACAATTTGCGTACACTCAACTT 1500
27      CAGCCATTCGGTGCCGGCAGGCACAGATGTGTTGGCGAACAATTTGCGTACACTCAACTT 1500
ATCC     CAGCCATTCGGTGCCGGCAGGCACAGATGTGTTGGCGAACAATTTGCGTACACTCAACTT 1500
ref      CAGCCATTCGGTGCCGGCAGGCACAGATGTGTTGGCGAACAATTTGCGTACACTCAACTT 1500
          *****

26      TCAACCATCTTCACCTATGTTGTGAGGAATTTCACTTTGAAGCTTGCTGTTCCCAAGTTC 1560
27      TCAACCATCTTCACCTATGTTGTGAGGAATTTCACTTTGAAGCTTGCTGTTCCCAAGTTC 1560
ATCC     TCAACCATCTTCACCTATGTTGTGAGGAATTTCACTTTGAAGCTTGCTGTTCCCAAGTTC 1560
ref      TCAACCATCTTCACCTATGTTGTGAGGAATTTCACTTTGAAGCTTGCTGTTCCCAAGTTC 1560
          *****

26      CCTGAAACCAATTACCGTACCATGATTTGTCCAACCCAACAACCCCTTTGGTTACTTTTACC 1620
27      CCTGAAACCAATTACCGTACCATGATTTGTCCAACCCAACAACCCCTTTGGTTACTTTTACC 1620
ATCC     CCTGAAACCAATTACCGTACCATGATTTGTCCAACCCAACAACCCCTTTGGTTACTTTTACC 1620
ref      CCTGAAACCAATTACCGTACCATGATTTGTCCAACCCAACAACCCCTTTGGTTACTTTTACC 1620
          *****

26      CTTCGAAATGCCGAGGTCAAATAG 1644
27      CTTCGAAATGCCGAGGTCAAATAG 1644
ATCC     CTTCGAAATGCCGAGGTCAAATAG 1644
ref      CTTCGAAATGCCGAGGTCAAATAG 1644
          *****

```

FIGURA 6. Alinhamento das sequências nucleotídicas dos isolados 26 (sensível), 27 (I) e a cepa ATCC 90012 com a sequência de referência do gene *ERG11* de *Cryptococcus neoformans var grubii* (AY265353) obtida no banco de dados, demonstrando que para esses isolados não foi encontrado nenhuma mutação.

CLUSTAL 2.0.12 multiple sequence alignment

```

26      ATGTCGGCAATCATCCCCAGGTCCAGCAACTGCTGGGACAAGTGGCCCAATTTATCCCA 60
ref     ATGTCGGCAATCATCCCCAGGTCCAGCAACTGCTGGGACAAGTGGCCCAATTTATCCCA 60
30      ATGTCGGCAATCATCCCCAGGTCCAGCAACTGCTGGGACAAGTGGCCCAATTTATCCCA 60
          *****

26      CCGTGGTTCGCTGCCCTCCCACCTCCGTGAAAGTCGTGATCGCTGTCATCGGTATTCCC 120

```

```

ref      CCGTGGTTCGCTGCCCTCCCCACCTCCGTGAAAGTCGTGATCGCTGTCATCGGTATTCCC 120
30      CCGTGGTTCGCTGCCCTCCCCACCTCCGTGAAAGTCGTGATCGCTGTCATCGGTATTCCC 120
      *****

26      GCTCTCGTCATTTGCTTGAACGTTTTCCAGCAGCTTTGTCTTCCCTCGTAGAAAAGATCTT 180
ref      GCTCTCGTCATTTGCTTGAACGTTTTCCAGCAGCTTTGTCTTCCCTCGTAGAAAAGATCTT 180
30      GCTCTCGTCATTTGCTTGAACGTTTTCCAGCAGCTTTGTCTTCCCTCGTAGAAAAGATCTT 180
      *****

26      CCTCCTGTTGTCTTTCACTACATTCCATGGTTTGGCTCAGCCGCTTATTATGGTGAAGAT 240
ref      CCTCCTGTTGTCTTTCACTACATTCCATGGTTTGGCTCAGCCGCTTATTATGGTGAAGAT 240
30      CCTCCTGTTGTCTTTCACTACATTCCATGGTTTGGCTCAGCCGCTTATTATGGTGAAGAT 240
      *****

26      CCCTACAAATTCCTGTTTGAATGCCGTGACAAATACGGAGATTTATTCACCTTTCATCCTT 300
ref      CCCTACAAATTCCTGTTTGAATGCCGTGACAAATACGGAGATTTATTCACCTTTCATCCTT 300
30      CCCTACAAATTCCTGTTTGAATGCCGTGACAAATACGGAGATTTATTCACCTTTCATCCTT 300
      *****

26      ATGGGTGCGAAGGGTTACCGTCGCGCTTGGACCAAAGGGTAACAACCTTTCTTTGGGTGGA 360
ref      ATGGGTGCGAAGGGTTACCGTCGCGCTTGGACCAAAGGGTAACAACCTTTCTTTGGGTGGA 360
30      ATGGGTGCGAAGGGTTACCGTCGCGCTTGGACCAAAGGGTAACAACCTTTCTTTGGGTGGA 360
      *****

26      AAGATTTCTCAAGTCTCTGCCGAGGAAGCATACTCACTTGACTACTCCCGTCTTTGGC 420
ref      AAGATTTCTCAAGTCTCTGCCGAGGAAGCATACTCACTTGACTACTCCCGTCTTTGGC 420
30      AAGATTTCTCAAGTCTCTGCCGAGGAAGCATACTCACTTGACTACTCCCGTCTTTGGC 420
      *****

26      AAGGGTGTTGTTTACGATTGCCCTAATGAGATGCTCATGCAGCAGAAGAAGTTTATCAAG 480
ref      AAGGGTGTTGTTTACGATTGCCCTAATGAGATGCTCATGCAGCAGAAGAAGTTTATCAAG 480
30      AAGGGTGTTGTTTACGATTGCCCTAATGAGATGCTCATGCAGCAGAAGAAGTTTATCAAG 480
      *****

26      TCCGGTCTTACTACCGAGTCCCTTTCAGTCTTATCCCCCTATGATTACCAGCGAATGCGAA 540
ref      TCCGGTCTTACTACCGAGTCCCTTTCAGTCTTATCCCCCTATGATTACCAGCGAATGCGAA 540
30      TCCGGTCTTACTACCGAGTCCCTTTCAGTCTTATCCCCCTATGATTACCAGCGAATGCGAA 540
      *****

26      GATTTCTTCACCAAAGAAGTCGGAATTTCTCCCCAGAAGCCTTCTGCCACTCTCGACCTC 600
ref      GATTTCTTCACCAAAGAAGTCGGAATTTCTCCCCAGAAGCCTTCTGCCACTCTCGACCTC 600
30      GATTTCTTCACCAAAGAAGTCGGAATTTCTCCCCAGAAGCCTTCTGCCACTCTCGACCTC 600
      *****

26      CTCAAATCCATGTCCGAGCTCATCATTTACTGCGTCTCGTACTCTCCAGGGGAAGGAA 660
ref      CTCAAATCCATGTCCGAGCTCATCATTTACTGCGTCTCGTACTCTCCAGGGGAAGGAA 660
30      CTCAAATCCATGTCCGAGCTCATCATTTACTGCGTCTCGTACTCTCCAGGGGAAGGAA 660
      *****

26      GTTCGTGAATCTCTTAATGGTCAGTTCGCCAAGTACTACGAGGATCTCGACGCGGTTTT 720
ref      GTTCGTGAATCTCTTAATGGTCAGTTCGCCAAGTACTACGAGGATCTCGACGCGGTTTT 720
30      GTTCGTGAATCTCTTAATGGTCAGTTCGCCAAGTACTACGAGGATCTCGACGCGGTTTT 720
      *****

26      ACTCCCCTCAACTTTATGTTCCCCAACTTGCCCCCTTCCAGTTACAAGAGGCGAGATGAG 780
ref      ACTCCCCTCAACTTTATGTTCCCCAACTTGCCCCCTTCCAGTTACAAGAGGCGAGATGAG 780
30      ACTCCCCTCAACTTTATGTTCCCCAACTTGCCCCCTTCCAGTTACAAGAGGCGAGATGAG 780
      *****

26      GCTCAGAAGGCTATGAGCGACTTTTACTTGAAGATCATGGAGAACAGGAGAAAGGGTGAA 840
ref      GCTCAGAAGGCTATGAGCGACTTTTACTTGAAGATCATGGAGAACAGGAGAAAGGGTGAA 840
30      GCTCAGAAGGCTATGAGCGACTTTTACTTGAAGATCATGGAGAACAGGAGAAAGGGTGAA 840
      *****

26      AGCGACCACGAACACGACATGATTGAAAACCTCCAGAGCTGCAAGTACCGAAACGGTGTC 900
ref      AGCGACCACGAACACGACATGATTGAAAACCTCCAGAGCTGCAAGTACCGAAACGGTGTC 900
30      AGCGACCACGAACACGACATGATTGAAAACCTCCAGAGCTGCAAGTACCGAAACGGTGTC 900
      *****

```

26 CCTCTCTCTGATCGTGACATTGCCACATCATGATTGCTCTTCTTATGGCTGGCCAGCAC 960
ref CCTCTCTCTGATCGTGACATTGCCACATCATGATTGCTCTTCTTATGGCTGGCCAGCAC 960
30 CCTCTCTCTGATCGTGACATTGCCACATCATGATTGCTCTTCTTATGGCTGGCCAGCAC 960

26 ACTTCTCTGCTACTTCTTCTTGGACTCTTCTCCATCTTGCTGACCGACCGGACGTTGTA 1020
ref ACTTCTCTGCTACTTCTTCTTGGACTCTTCTCCATCTTGCTGACCGACCGGACGTTGTA 1020
30 ACTTCTCTGCTACTTCTTCTTGGACTCTTCTCCATCTTGCTGACCGACCGGACGTTGTA 1020

26 GAGGCTCTTTACCAGGAGCAGAAACAAAAGCTCGGTAACCCTGACGGTACTTTCCGAGAC 1080
ref GAGGCTCTTTACCAGGAGCAGAAACAAAAGCTCGGTAACCCTGACGGTACTTTCCGAGAC 1080
30 GAGGCTCTTTACCAGGAGCAGAAACAAAAGCTCGGTAACCCTGACGGTACTTTCCGAGAC 1080

26 TACAAGTACGAGGACCTTAAGGAGTTGCCATCATGGACTCTATCATCCGAGAGACTCTC 1140
ref TACAAGTACGAGGACCTTAAGGAGTTGCCATCATGGACTCTATCATCCGAGAGACTCTC 1140
30 TACAAGTACGAGGACCTTAAGGAGTTGCCATCATGGACTCTATCATCCGAGAGACTCTC 1140

26 CGCATGCACGCTCCCATCCACTCGATCTACCGAAAAGTCCTTTCCGATATCCCCGTCCT 1200
ref CGCATGCACGCTCCCATCCACTCGATCTACCGAAAAGTCCTTTCCGATATCCCCGTCCT 1200
30 CGCATGCACGCTCCCATCCACTCGATCTACCGAAAAGTCCTTTCCGATATCCCCGTCCT 1200

26 CCCAGTCTTTCTGCCCCCTCTGAGAACGGCCAATACATCATCCCCAAGGGCCACTACATC 1260
ref CCCAGTCTTTCTGCCCCCTCTGAGAACGGCCAATACATCATCCCCAAGGGCCACTACATC 1260
30 CCCAGTCTTTCTGCCCCCTCTGAGAACGGCCAATACATCATCCCCAAGGGCCACTACATC 1260

26 ATGGCTGCCCCCTGGCGTTTCTCAAATGGACCCTCGTATCTGGCAAGACGCCAAAGTCTGG 1320
ref ATGGCTGCCCCCTGGCGTTTCTCAAATGGACCCTCGTATCTGGCAAGACGCCAAAGTCTGG 1320
30 ATGGCTGCCCCCTGGCGTTTCTCAAATGGACCCTCGTATCTGGCAAGACGCCAAAGTCTGG 1320

26 AACCTGCCCCGATGGCAGGATGAAAAGGGATTGCGCCGCTGCCATGGCTCAGTACAGC 1380
ref **AACCTGCCCCGATGGCAGGATGAAAAGGGATTGCGCCGCTGCCATGGCTCAGTACAGC** 1380
30 AACCTGCCCCGATGGCAGGATGAAAAGGGATTGCGCCGCTGCCATGGCTCAGTACAGC 1380

26 **AAGCCGAGCAAGTCGATTATGGTTTTGGTTCTGTTAGCAAGGGTACCGAATCTCTTAC** 1440
ref AAGCCGAGCAAGTCGATTATGGTTTTGGTTCTGTTAGCAAGGGTACCGAATCTCTTAC 1440
30 **AAGCCGAGCAAGTCGATTATGGTTTTGGTTCTGTTAGCAAGGGTACCGAATCTCTTAC** 1440

26 CAGCCATTCGGTGCCGGCAGGCACAGATGTGTTGGCGAACAAATTTGCGTACACTCAACTT 1500
ref CAGCCATTCGGTGCCGGCAGGCACAGATGTGTTGGCGAACAAATTTGCGTACACTCAACTT 1500
30 CAGCCATTCGGTGCCGGCAGGCACAGATGTGTTGGCGAACAAATTTGCGTACACTCAACTT 1500

26 TCAACCATCTTCACCTATGTTGTGAGGAATTTCACTTTGAAGCTTGCTGTTCCCAAGTTC 1560
ref TCAACCATCTTCACCTATGTTGTGAGGAATTTCACTTTGAAGCTTGCTGTTCCCAAGTTC 1560
30 TCAACCATCTTCACCTATGTTGTGAGGAATTTCACTTTGAAGCTTGCTGTTCCCAAGTTC 1560

26 CCTGAAACCAATTACCGTACCATGATTGTCCAACCCAACAACCCTTTGGTTACTTTCCACC 1620
ref CCTGAAACCAATTACCGTACCATGATTGTCCAACCCAACAACCCTTTGGTTACTTTCCACC 1620
30 CCTGAAACCAATTACCGTACCATGATTGTCCAACCCAACAACCCTTTGGTTACTTTCCACC 1620

26 CTTCGAAATGCCGAGGTCAAATAG 1644
ref CTTCGAAATGCCGAGGTCAAATAG 1644
30 CTTCGAAATGCCGAGGTCAAATAG 1644

FIGURA 7. Alinhamento das sequências nucleotídicas dos isolados 26 (sensível) e 30 (resistente) com a sequência de referência do gene *ERG11* de *Cryptococcus neoformans* var *grubii* (AY265353) obtida no banco de dados demonstrando que para esse isolado houve duas mutações e uma variação (destaque em rosa). Uma delas foi silenciosa (destaque em verde) e a outra significativa (destaque em amarelo). Essa última levou a troca de um aminoácido.

5.4. Tradução e análise da sequência peptídica do isolado 30 (resistente) do gene *ERG11*.

A análise da sequência peptídica do isolado clínico 30 (resistente) foi realizada através do alinhamento da sequência do isolado 26 e da proteína de referência do gene *ERG11* depositado no *GenBank* (AY265353) pelo programa Clustalw2, demonstrando a troca de um aminoácido, Prolina por Leucina na posição 479 (P479L). Esta troca de aminoácido foi devido à substituição do nucleotídeo C (citosina) para T (timina) na posição 1436 no isolado 30 (Figura 8).

CLUSTAL 2.0.12 multiple sequence alignment

```

ref          MSAIIPQVQQLLGQVAQFIPPWFAALPTSVKVVIAVIGIPALVICLNVFQQLCLPRRKDL 60
26           MSAIIPQVQQLLGQVAQFIPPWFAALPTSVKVVIAVIGIPALVICLNVFQQLCLPRRKDL 60
30           MSAIIPQVQQLLGQVAQFIPPWFAALPTSVKVVIAVIGIPALVICLNVFQQLCLPRRKDL 60
*****

ref          PPVVFHYIPWFGSAAYYGEDPYKFLFECRDKYGDLFTFILMGRRTVALGPKGNLNLGG 120
26           PPVVFHYIPWFGSAAYYGEDPYKFLFECRDKYGDLFTFILMGRRTVALGPKGNLNLGG 120
30           PPVVFHYIPWFGSAAYYGEDPYKFLFECRDKYGDLFTFILMGRRTVALGPKGNLNLGG 120
*****

ref          KISQVSAEEAYTHLTPVFGKGVVYDCPNEMLMQKKFIKSGLTTESLQSYPPIITSECE 180
26           KISQVSAEEAYTHLTPVFGKGVVYDCPNEMLMQKKFIKSGLTTESLQSYPPIITSECE 180
30           KISQVSAEEAYTHLTPVFGKGVVYDCPNEMLMQKKFIKSGLTTESLQSYPPIITSECE 180
*****

ref          DFFTKEVGISPQKPSATLDLLKSMSELIILTASRTLQKKEVRESLNGQFAKYEDLDGGF 240
26           DFFTKEVGISPQKPSATLDLLKSMSELIILTASRTLQKKEVRESLNGQFAKYEDLDGGF 240
30           DFFTKEVGISPQKPSATLDLLKSMSELIILTASRTLQKKEVRESLNGQFAKYEDLDGGF 240
*****

ref          TPLNFMFPNLPLPSYKRRDEAQKAMSDFYLKIMENRRKGESDHEHDMIENLQSKYRNGV 300
26           TPLNFMFPNLPLPSYKRRDEAQKAMSDFYLKIMENRRKGESDHEHDMIENLQSKYRNGV 300
30           TPLNFMFPNLPLPSYKRRDEAQKAMSDFYLKIMENRRKGESDHEHDMIENLQSKYRNGV 300
*****

ref          PLSDRDIAHIMIALLMAGQHTSSATSSWTLLHLADRDPDVEALYQEYQKQKLGNDPDTFRD 360
26           PLSDRDIAHIMIALLMAGQHTSSATSSWTLLHLADRDPDVEALYQEYQKQKLGNDPDTFRD 360
30           PLSDRDIAHIMIALLMAGQHTSSATSSWTLLHLADRDPDVEALYQEYQKQKLGNDPDTFRD 360
*****

```

```

ref          YKYEDLKELPIMDSI IRETLMHAPIHSIYRKVLS DIPVPPSL SAPSENGQYI I PKGHYI 420
26          YKYEDLKELPIMDSI IRETLMHAPIHSIYRKVLS DIPVPPSL SAPSENGQYI I PKGHYI 420
30          YKYEDLKELPIMDSI IRETLMHAPIHSIYRKVLS DIPVPPSL SAPSENGQYI I PKGHYI 420
          *****

ref          MAAPGVSQMDPRIWQDAKVWNP ARWHDEKGF AAAAMAQYSKAEQVDYGF GSVSKGTESFY 480
26          MAAPGVSQMDPRIWQDAKVWNP ARWHDEKGF AAAAMAQYSKAEQVDYGF GSVSKGTESFY 480
30          MAAPGVSQMDPRIWQDAKVWNP ARWHDEKGF AAAAMAQYSKAEQVDYGF GSVSKGTESFY 480
          *****

ref          QPFGAGRHRVCVGEQFAYTQLSTIFTYVVRNF T LKLA VPKFPETNYRTMIVQPNNPLVTFT 540
26          QPFGAGRHRVCVGEQFAYTQLSTIFTYVVRNF T LKLA VPKFPETNYRTMIVQPNNPLVTFT 540
30          QPFGAGRHRVCVGEQFAYTQLSTIFTYVVRNF T LKLA VPKFPETNYRTMIVQPNNPLVTFT 540
          *****

ref          LRNAEVK 547
26          LRNAEVK 547
30          LRNAEVK 547
          *****

```

FIGURA 8. Alinhamento das sequências de aminoácidos do isolado 26 (sensível) e 30 (resistente) com a sequência de referência da proteína do gene *ERG11* de *Cryptococcus neoformans var grubii* (AY265353) obtida no banco de dados, demonstrando que somente uma mutação no gene foi significativa para troca do aminoácido P (prolina) por L (leucina) na posição 479 (P479L) (Destaque em vermelho).

Quando se alinhou a sequência da proteína *ERG11* lanosterol 14C desmetilase do isolado 30 (resistente) com sequências da mesma de outros fungos como *Candida albicans* (GenBank acesso CAA31658.1), *Saccharomyces cerevisiae* (BROAD acesso SCRG_04712), *Aspergillus fumigatus* (GenBank acesso AAK73659.1) e a sequência de *C. neoformans var. grubii* (GenBank acesso AY265353), podemos observar que a substituição P479L ocorreu em um local conservado em todos os fungos citados. Além disso, a alteração P479L está localizada apenas três aminoácidos antes da região que se liga o grupamento heme mostrado por Revankar et al. em 2004, e muito próxima de uma α -helice, conforme identificação da estrutura secundária da proteína descrita por Sheng et. al. em 2009. (figura 9)

CLUSTAL 2.0.12 multiple sequence alignment

```

Calbicans      -MAIVETVID-----GINYFLSLSV TQQISILLG---VPFVYNLVWQYLYSLR-KDR 47
Scerevisiae    -MSATKSIVGEALEYVNI GLSHFLALPLAQRISLII---IPFIYNIWVQQLLYSLR-KDR 55
Afumigatus     -----MVPMLWLTAYMAVAVL---TAILLN VVYQLFFRLWNRTE 36
Seq30          MSAIIPQVQQLLGQVAQFIPPWF AALPTS VKVVI AVIGIPALVICLN VFQQLCLPRRKDL 60
Cneoformans    MSAIIPQVQQLLGQVAQFIPPWF AALPTS VKVVI AVIGIPALVICLN VFQQLCLPRRKDL 60
          . * : : : : . : * : : :

Calbicans      APLVFWYIPWFGSAASYGQQPYEFFESC RQKYGDVFSFMLLGKIMTVYLGPKGHEFVFNA 107

```

Scerevisiae	PPLVFYWI PWVGS AVVYGMKPYEFFECCQKKYGDIFSFVLLGRVMTVYLGPKGHEFVFN	115
Afumigatus	PPMVFHWVPFLGSTISYGDIPYKFFAFACREKYGDIFTFILLGQKTTVYLGVOGNEFILNG	96
Seq30	PPVVFHYIPWFGSAAYYGEDPYKFLFECRDKYGD LFTFILMGRRVTVALGPKGNLSLGG	120
Cneoformans	PPVVFHYIPWFGSAAYYGEDPYKFLFECRDKYGD LFTFILMGRRVTVALGPKGNLSLGG	120
	. *: ** : : : : : * : * * . * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : . . .	
Calbicans	KLSDVSAEDAYKHLTTPVFGKGVYDCPN SRLMEQKKFAKALT TDSFKRYVPKIREEIL	167
Scerevisiae	KLADVSAEAAAY AHLTTPVFGKGVYDCPN SRLMEQKKFVKGALTKEAFKSYVPLIAEEVY	175
Afumigatus	KLKDVNAEEVYSPLTTPVFGSDVYDCPN SKLMEQKKFIKYGLTQSALESHVPLIEKEVL	156
Seq30	KISQVSAEEAYTHL TTPVFGKGVYDCPN EMLYQKKFIKSGLT TTESLQSYPPMITSECE	180
Cneoformans	KISQVSAEEAYTHL TTPVFGKGVYDCPN EMLYQKKFIKSGLT TTESLQSYPPMITSECE	180
	* : : * . * * . * * * * * . * : * * * * * . * : * * * * * * . * * . : : : : * * . *	
Calbicans	NYFVTDESFKLKEKTHGVANVMKTQPEITIFTASRSLFGDEMRRIFDRSFAQLYSDDLKG	227
Scerevisiae	KYFRDSKNFRLNERTTGTIDVMVTQPEMITIFTASRSLLGKEMRAKLDTFAYLYSDDLKG	235
Afumigatus	DYLRDSPNFQG---SSGRMDISAAMAEITIFTAARALQGEVRSKLTAEFADLYHDDLKG	213
Seq30	DFFTKEVGISP-QKP SATL D L L K S M S E L I I L T A S R T L Q G K E V R E S L N G Q F A K Y Y E D L D G G	239
Cneoformans	DFFTKEVGISP-QKPSATL D L L K S M S E L I I L T A S R T L Q G K E V R E S L N G Q F A K Y Y E D L D G G	239
	. : : . . : : . . : : . * : * * * * : * * : * : . * * * * * *	
Calbicans	FTPINFVFPNLPLPHYWRRDAAQKKISATYMK EIKSRRERGDIDPNRDLIDSLLIHSTYK	287
Scerevisiae	FTPINFVFPNLPLEHYRKRDRHAQKAI SGTYMSLIKERRKNNDIQ-DRDLIDSLMKNSTYK	294
Afumigatus	FTPINFMLPWAPLPHNKKRDAAHARMRSIYVDI INQRRLDGDKDSQKSDMIWNLNCTYK	273
Seq30	TPLNFMFPNLPLPSYKRRDEAQKAMSDFY LKIMENRRK-GESDHEHDMIEN-LQ SCKYR	297
Cneoformans	FTPLNFMFPNLPLPSYKRRDEAQKAMSDFY LKIMENRRK-GESDHEHDMIEN-LQ SCKYR	297
	* * : * * : * * : : * : . : . * * . : : : : . : : . * * :	
Calbicans	DGVKMTDQEIANLLIGILMGGQHTSASTSAWFL LHLGKPHLQDVIYQEVVELLKEKG--	345
Scerevisiae	DGVKMTDQEIANLLIGVLMGGQHTSASTSAWILLHLAERP DVQELYEEQMRVLD----	349
Afumigatus	NGQVPDKEIAHMMITLLMAGQHSSSSISAWIMLR LASQPKVLEELYQEQLANLGPAGPD	333
Seq30	NGVPLS DRDIAHIMIALLMAGQHTSSATSSW TLLHLADRPDVVEALYQE QKQKLG NPD--	355
Cneoformans	NGVPLSDRDIAHIMIALLMAGQHTSSATSSW TLLHLADRPDVVEALYQE QKQKLG NPD--	355
	: * : . * : * * : : * * . * * : * : * : * : * : * : * : * : * *	
Calbicans	GDLNDLTIEDLQKLP SVNNTIKETLRMHMPLHSIFRKVTNPLRIP-----ETNYIVP	397
Scerevisiae	GGK KELTYDLLQEMPLLNTIKETLRMH HPLHSIFRKVMKDMHVP-----NTSYVIP	401
Afumigatus	GSLPPLQYKDLKLPFHQHVIRETLRIHSSIH S IMRKVKSPLPVP-----GTPYMIP	385
Seq30	GTFRDYKYEDLKELPIMDSIIRETLRMHAPIHS IYRKVLSDIPVPPSLSAPSENGQYIIP	415
Cneoformans	GTFRDYKYEDLKELPIMDSIIRETLRMHAPIHS IYRKVLSDIPVPPSLSAPSENGQYIIP	415
	* . * . * : : * : * * * : * : * * * . : : * * : * : *	
Calbicans	KGHYVLVSPGYAHTSERYFDNPEDFDPTRWDTAA--AKANSVSFNSSDEVYDYGFKVSKG	455
Scerevisiae	AGYHVLVSPGYTHLRDEYFPNAHQFNIHRWN-----KDSASSYSVGEEVDYGFGAISKG	455
Afumigatus	PGRVLLASPGVTALSD EHFNPAGCWDPHRWEN-----QATKEQENDEVVDYGYGAVSKG	439
Seq30	KGHYIMAAPGVSQMDPRIWQDAKVWNPARWHDEKGF AAAAMAQYSKAEQVDYGF GSVSKG	475
Cneoformans	KGHYIMAAPGVSQMDPRIWQDAKVWNPARWHDEKGF AAAAMAQYSKAEQVDYGF GSVSKG	475
	* : : : * * : . : : . : : * * . . . : * * * * * : * * *	
Calbicans	VSSPYLPFGGGRHRCIGEQFAYVQLGTIL TTFVYNLRWTI-DGYK-VPDPDYSSMVLPT	513
Scerevisiae	VSSPYLPFGGGRHRCIGEHFAYCQLGVLMSIFIR TLKWHYPEGKT-VPPPDFTSMVTLPT	514
afumigatus	TSSPYLPFGAGRHRRCIGEKFAYVNLGVLAT IVRHLRFLFNVDGKKGVPETDYSSLSFGPM	499
seq30	TESLYQPFAGRHRCVGEQFAYTQLSTIFTYVVRNFTLKLAVPKF--PETNYRTMIVQPN	533
Cneoformans	TESLYQPFAGRHRCVGEQFAYTQLSTIFTYVVRNFTLKLAVPKF--PETNYRTMIVQPN	533
	. . * * * * . * * * * : * * * * : * : : : . : : * : : : : *	
Calbicans	EPAEIIWEKRETCMF- 528	
Scerevisiae	GPAKIIWEKRNPEQKI 530	
afumigatus	KPSIIGWEKRSKNTS- 514	
seq30	NP-LVTFTLRNAEVK- 547	
Cneoformans	NP-LVTFTLRNAEVK- 547	
	* : : * .	

FIGURA 9. Alinhamento das seqüências da proteína *ERG11* lanosterol 14C desmetilase de *Candida albicans* (GenBank acesso CAA31658.1),

Saccharomyces cerevisiae (BROAD acesso SCRG_04712), *Aspergillus fumigatus* (GenBank acesso AAK73659.1), a sequência de *C. neoformans* (GenBank acesso AY265353) com o isolado 30 (resistente) para verificação das regiões conservadas. Baseado no modelo descrito por Sheng et al., 2009, tem-se em destaque na cor rosa as α -helix, e em azul as β -sheet. O destaque amarelo refere-se à região onde o grupamento heme da proteína se liga, mostrado por Revankar et al., 2004. Aminoácidos na cor amarela referem-se aos sítios de interação com fluconazol, também baseado no modelo descrito por Sheng et al., 2009.

5.5. Comparação das sequências nucleotídicas do gene *ERG11* de *C. gattii*.

A análise da sequência nucleotídica do isolado de psitacídeo de *C. gattii* foi realizada através do alinhamento com a sequência do gene de referência *ERG11* depositado no BROAD Institute (acesso número CNBG 0513.2) pelo programa Clustalw2. O alinhamento da sequência de referência de *C. gattii* e do isolado de psitacídeo não revelou pontos de mutação. Mostrando que para esse isolado, possivelmente, a resistência ao fluconazol é devido a outro mecanismo de resistência e não às mutações pontuais no gene *ERG11*. (Figura 10).

Cg ref	ATGTCGGCAATCATCCCCAAGTCCAGCAATTGCTGGGACAAGTGGCCAATACATCCCA	60
Cgattii	ATGTCGGCAATCATCCCCAAGTCCAGCAATTGCTGGGACAAGTGGCCAATACATCCCA	60

Cg ref	CATTGGTTTACTGCCCTCCCTACCTCCTTGAAGATCGTGATCGCTGTCATTGGCATCCCT	120
Cgattii	CATTGGTTTACTGCCCTCCCTACCTCCTTGAAGATCGTGATCGCTGTCATTGGCATCCCT	120

Cg ref	GCTTTTATCATTTGGCTTGAACGTTTTTCACCAGCTTTGCCTTCCCCGTAGAAGAGATCTT	180
Cgattii	GCTTTTATCATTTGGCTTGAACGTTTTTCACCAGCTTTGCCTTCCCCGTAGAAGAGATCTT	180

Cg ref	CCTCCTGTTGTCTTCCACTATATTCCTGGTTTGGCTCAGCTGCTTACTATGGTGAAGAT	240
Cgattii	CCTCCTGTTGTCTTCCACTATATTCCTGGTTTGGCTCAGCTGCTTACTATGGTGAAGAT	240

Cg ref	CCCTACAAATTCCTTGTTCGAGTGCCGTGACAAGTATGGAGACTTATTTACTTTTCATCCTT	300
Cgattii	CCCTACAAATTCCTTGTTCGAGTGCCGTGACAAGTATGGAGACTTATTTACTTTTCATCCTT	300

Cg ref	ATGGGTCGACGCATTACTGTGCGCTCGGACCCAAGGGTAACAACCTTTCTTTGGGTGGA	360
Cgattii	ATGGGTCGACGCATTACTGTGCGCTCGGACCCAAGGGTAACAACCTTTCTTTGGGTGGA	360

Cg ref	AAGATTTCTCAAGTCTCTGCCGAGGAAGCTTACACTCACTTGACTACTCCCGTCTTTGGC	420
Cgattii	AAGATTTCTCAAGTCTCTGCCGAGGAAGCTTACACTCACTTGACTACTCCCGTCTTTGGC	420

```

*****
Cg ref      AAGGGTGTGTTTATGATTGCCCTAACGAGATGCTCATGCAGCAGAAGAAGTTTATCAAG 480
Cgattii     AAGGGTGTGTTTATGATTGCCCTAACGAGATGCTCATGCAGCAGAAGAAGTTTATCAAG 480
*****

Cg ref      TCCGGTCTTACAACCTGAGTCCCTTCAATCTTATCCTCCCATGATCACTAGCGAATGCGAA 540
Cgattii     TCCGGTCTTACAACCTGAGTCCCTTCAATCTTATCCTCCCATGATCACTAGCGAATGCGAA 540
*****

Cg ref      GATTTCCTTACCAAAGAAGTCGGAATTTCTTCCCAGAAGCCTTCTATCACTCTCGACCTC 600
Cgattii     GATTTCCTTACCAAAGAAGTCGGAATTTCTTCCCAGAAGCCTTCTATCACTCTCGACCTC 600
*****

Cg ref      CTCAAGTCCATGTCCGAGCTCATCATTCTTACTGCGTCTCGTACTCTTCAAGGAAAGGAA 660
Cgattii     CTCAAGTCCATGTCCGAGCTCATCATTCTTACTGCGTCTCGTACTCTTCAAGGAAAGGAA 660
*****

Cg ref      GTTCGGAATCTCTTAACGGTCAGTTTGCCAAGTACTACGAGGACCTCGACGGCGGTTTC 720
Cgattii     GTTCGGAATCTCTTAACGGTCAGTTTGCCAAGTACTACGAGGACCTCGACGGCGGTTTC 720
*****

Cg ref      ACTCCTCTCAACTTTATGTTCCCAACTTGCCCTTCCCAGTTACAGGAGACGAGATGAG 780
Cgattii     ACTCCTCTCAACTTTATGTTCCCAACTTGCCCTTCCCAGTTACAGGAGACGAGATGAG 780
*****

Cg ref      GCTCAGAAGGCTATGAGCGACTTTTACTTGAAGATCATGGAGAACAGGAGAAAGGGTGAA 840
Cgattii     GCTCAGAAGGCTATGAGCGACTTTTACTTGAAGATCATGGAGAACAGGAGAAAGGGTGAA 840
*****

Cg ref      AGCGACCACGAGCATGACATGATTGAAAACCTCCAGGGCTGCAAGTACCGAAACGGTGTC 900
Cgattii     AGCGACCACGAGCATGACATGATTGAAAACCTCCAGGGCTGCAAGTACCGAAACGGTGTC 900
*****

Cg ref      CCTCTCTCTGACCGTGATGTTGCCATATCATGATTGCTCTTCTTATGGCTGGCCAACAC 960
Cgattii     CCTCTCTCTGACCGTGATGTTGCCATATCATGATTGCTCTTCTTATGGCTGGCCAACAC 960
*****

Cg ref      ACTTCATCTGCTACTTTCATCTTGGACTCTTCTCCATCTTGCCGACCGACCCGACGTTGTC 1020
Cgattii     ACTTCATCTGCTACTTTCATCTTGGACTCTTCTCCATCTTGCCGACCGACCCGACGTTGTC 1020
*****

Cg ref      GAGGCTCTTTACCAGGAGCAAAAAGAGAAGCTCGGTAACCCTGACGGTACTTTCCGAGAC 1080
Cgattii     GAGGCTCTTTACCAGGAGCAAAAAGAGAAGCTCGGTAACCCTGACGGTACTTTCCGAGAC 1080
*****

Cg ref      TACAATAGCTCTATTTACCGAAAAGTCCTTTCCGACATCCCCGTCGCCACCCAGTCTTGCC 1140
Cgattii     TACAATAGCTCTATTTACCGAAAAGTCCTTTCCGACATCCCCGTCGCCACCCAGTCTTGCC 1140
*****

Cg ref      GCCCCTTCCGAGAACGGCCAATACATTATCCCCAAGGGTCACTACATCATGGCCGCCCT 1200
Cgattii     GCCCCTTCCGAGAACGGCCAATACATTATCCCCAAGGGTCACTACATCATGGCCGCCCT 1200
*****

Cg ref      GGCGTCTCTCAAATGGACCCTCGAATCTGGCAAGATGCCAAGGTCTGGAATCCTGCCCGA 1260
Cgattii     GGCGTCTCTCAAATGGACCCTCGAATCTGGCAAGATGCCAAGGTCTGGAATCCTGCCCGA 1260
*****

Cg ref      TGGCACGACGAAAAGGGATTTGCCCGCGCTGCCATGGCCAGTACACCAAAGCCGAGCAA 1320
Cgattii     TGGCACGACGAAAAGGGATTTGCCCGCGCTGCCATGGCCAGTACACCAAAGCCGAGCAA 1320
*****

Cg ref      GTCGACTATGGTTTCGGTTCTGTGTCAGCAAGGGTACCGAGTCTCCTTACCAGCCTTTCGGT 1380
Cgattii     GTCGACTATGGTTTCGGTTCTGTGTCAGCAAGGGTACCGAGTCTCCTTACCAGCCTTTCGGT 1380
*****

Cg ref      GCTGGCAGGCACAGGTGTGTCGGTGAACAGTTTGGGTACTACTCAGCTTTCGACCATCTTC 1440

```

```

Cgattii      GCTGGCAGGCACAGGTGTGTCCGGTGAACAGTTTGCCTACACTCAGCTTTCGACCATCTTC 1440
*****
Cg ref      ACCTATGTTGTGAGGAATTTCACTTTAAAGCTTGCCGTTCCCAAGTTCCTCCGAAACCAAT 1500
Cgattii     ACCTATGTTGTGAGGAATTTCACTTTAAAGCTTGCCGTTCCCAAGTTCCTCCGAAACCAAT 1500
*****

Cg ref      TACCGTACCATGATTGTCCAACCCAACAACCCCTTGGTTACTTTCACCCTTCGAAATGCT 1560
Cgattii     TACCGTACCATGATTGTCCAACCCAACAACCCCTTGGTTACTTTCACCCTTCGAAATGCT 1560
*****

Cg ref      GAGGTCAAGCAGGAGGTGTAA 1581
Cgattii     GAGGTCAAGCAGGAGGTGTAA 1581
*****

```

FIGURA 10. Alinhamento das sequências nucleotídicas do isolado de psitacédeo de *C. gattii* com a sequência de referência do gene *ERG11* de *Cryptococcus gattii* (CNBG 0512.2) obtida no banco de dados.

5.6. Avaliação da atividade antifúngica e fungicida

A atividade antifúngica dessas substâncias naturais analisadas contra a cepa ATCC 90012, isolado de psitacédeo de *C. gattii* e três isolados sequenciais de *C. neoformans* var. *grubii* (26, 27 e 30), foi considerada forte. Demonstramos também que as mesmas substâncias puras obtiveram atividade fungicida contra os isolados selecionados, sendo os valores de CFM os mesmos encontrados para as CIMs. Na tabela 3 observamos que a substância MJ2 obteve a melhor atividade antifúngica e fungicida, especialmente para os isolados 30 (resistente) de *C. neoformans* e *C. gattii*, isolados esses que já demonstraram suscetibilidade reduzida ao fluconazol. Todos os ensaios foram realizados utilizando as drogas sintéticas, fluconazol e anfotericina B, como controle do teste. (Tabela 1 e tabela 2)

TABELA 2. Valores de CIM e CFM em $\mu\text{g/mL}$ para as substâncias Maitenina (MJ2) e Pristimerina (MF 2.5) contra a cepa ATCC 90012, isolado ambiental *C. gattii* e os isolados sequenciais de *C. neoformans* (26, 27 e 30).

Isolados	CIM $\mu\text{g/mL}$			
	MJ2		MF 2.5	
	CIM	CFM	CIM	CFM
ATCC 90012	0,48	0,48	1,95	1,95
<i>C. neoformans</i> 26	0,48	0,48	1,95	1,95
<i>C. neoformans</i> 27	0,48	0,48	3,9	3,9

<i>C. neoformans</i> 30	3,9	3,9	3,9	3,9
<i>C. gattii</i>	3,9	3,9	3,9	3,9

5.7. Ensaio de citotoxicidade pelo método MTT

Na figura 11, podemos observar que em todas as concentrações avaliadas para a substância Maitenina, as células A549 mostraram valor $\geq 50\%$ de viabilidade. Na faixa de concentração 125 a 3,9 $\mu\text{g/mL}$ a viabilidade celular manteve-se estável e para os isolados 30 (resistente) e de psitacédeo de *C. gattii*, com CIM de 3,9 $\mu\text{g/mL}$ a média percentual de células viáveis após o ensaio foi cerca de 50%.

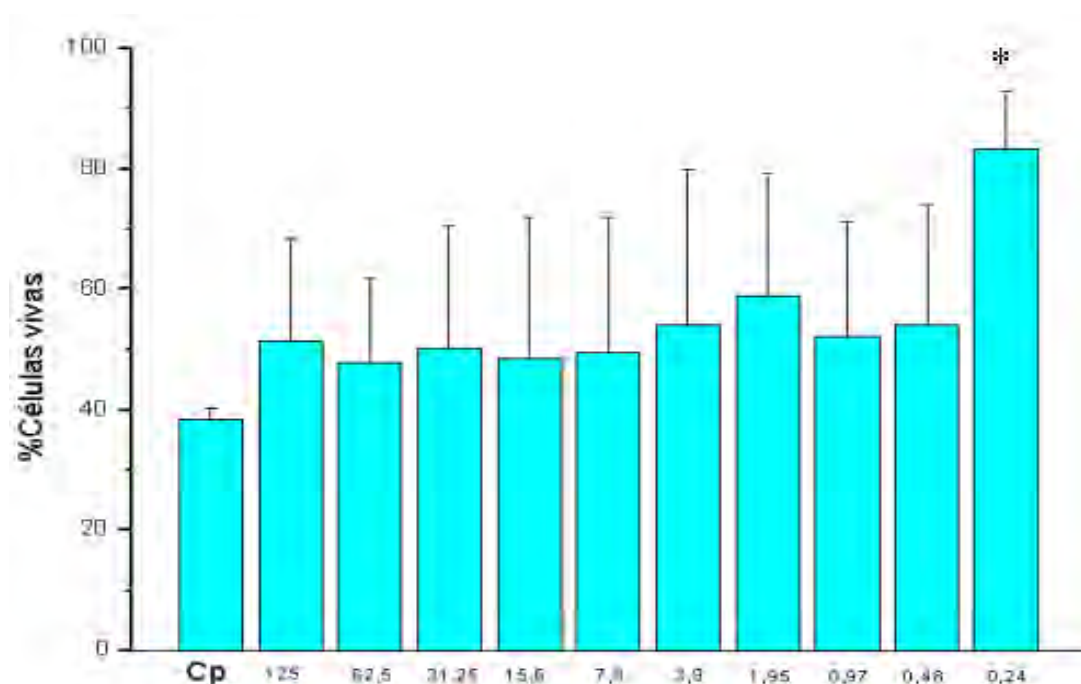


FIGURA 11. Gráfico representativo do efeito citotóxico da substância pura, Maitenina (MJ2), avaliado pelo método MTT com faixa de concentração de 125 a 0,24 $\mu\text{g/mL}$. (*) $p < 0,05$ = Cp (10 $\mu\text{g/mL}$).

Quanto à Pristimerina (MF2.5), observamos na figura 12 que na concentração 3,9 $\mu\text{g/mL}$, a CIM obtida para os isolados clínicos de *C. neoformans* intermediário (27), resistente (30) e o isolado de *C. gattii*, a média percentual de células viáveis foi de 60%. Entretanto, para concentrações acima de 3,9 $\mu\text{g/mL}$ a viabilidade celular para esta substância foi menos estável quando comparado com a Maitenina. A CIM mais baixa identificada para essa

substância pura foi 1,95 µg/mL para a cepa ATCC 90012 e para o isolado sensível (26) de *C. neoformans*, e para essa concentração o valor médio de células viáveis ficou acima de 70% obtendo-se diferença significativa quando comparadas ao controle positivo. Estes dados mostram que Maitenina foi melhor que Pristimerina em altas concentrações.

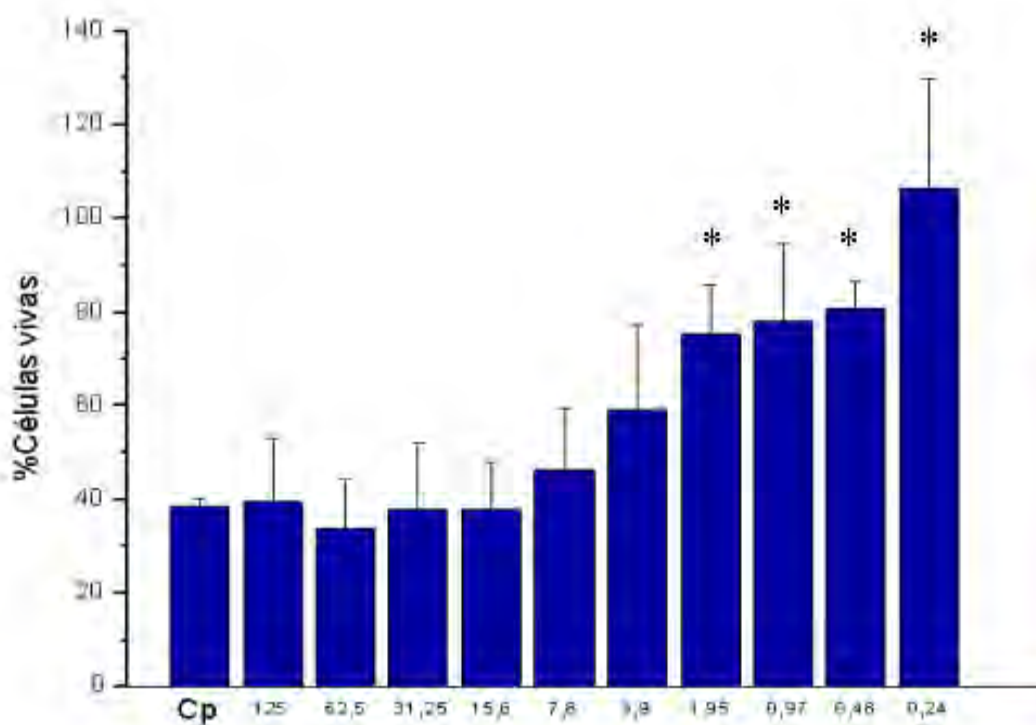


FIGURA 12. Gráfico representativo do efeito citotóxico da substância pura, Pristimerina (MF 2.5), avaliado pelo método MTT com faixa de concentração de 125 a 0,24 µg/mL. (*) $p < 0,05 = Cp$ (10 µg/mL).

Quanto à citotoxicidade, quando comparamos os resultados das duas substâncias puras selecionadas, observamos que nas concentrações maiores que 3,9 µg/mL, a Maitenina obteve melhores resultados frente à Pristimerina. Diferença estatística significativa foi observada em concentrações abaixo de 1,95 µg/mL para a substância Pristimerina, mostrando que para isolados sensíveis esta substância foi menos citotóxica.

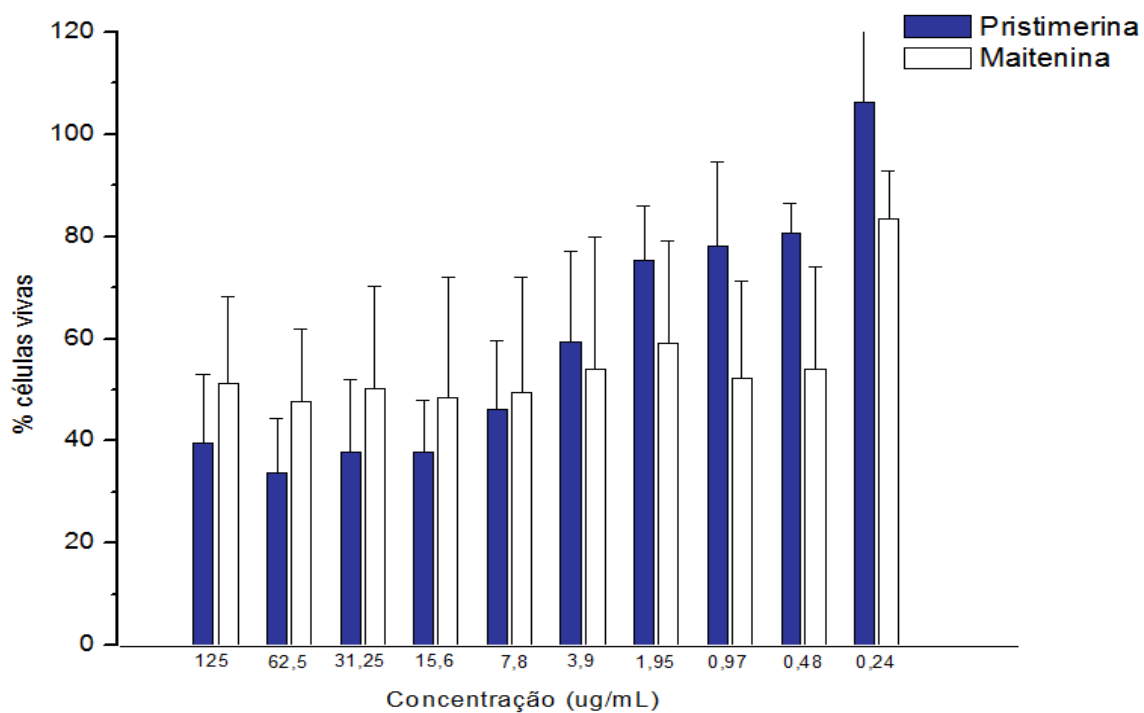


FIGURA 13. Representação da comparação do efeito citotóxico das substâncias puras, Pristimerina (MF 2.5) e Maitenina (MF 2.5), avaliado pelo método MTT com faixa de concentração de 125 a 0,24 µg/mL.

6. Discussão

Cryptococcus neoformans e *Cryptococcus gattii* são patógenos pertencentes ao Phylum Basidiomiceto de interesse médico por causar a criptococose em indivíduos imunocomprometidos, principalmente pacientes com AIDS, e em indivíduos imunocompetentes. Mesmo na atualidade, com a disponibilidade da terapêutica antirretroviral efetiva (TARV) para pacientes infectados pelo HIV, casos de criptococose são frequentes e apresentam alto índice de letalidade. (CHUCK et al. 1989; LINDENBERG et al. 2008; MCCARTHY et al. 2008). Embora a terapêutica das micoses tenha evoluído, melhorando não só sua eficácia e espectro de ação, mas também sua tolerabilidade, manejo e tempo de tratamento, o desenvolvimento de cepas menos sensíveis aos antifúngicos tem sido um importante fator de complicação no tratamento das infecções fúngicas, sobretudo em pacientes imunocomprometidos. (LUMBRERAS; LIZASOAIN; AGUADO, 2003; CHAPMAN; SULLIVAN; CLEARY; 2008). Os triazóis são a maior classe de drogas antifúngicas em uso nas últimas duas décadas. A utilização de FLC por longos períodos para o tratamento de manutenção da criptococose em pacientes com AIDS levou ao surgimento de cepas heteroresistentes (PAUGAM, et al., 1994; ARMENGOU, et al., 1996; VENKATESWARLU, et al., 1997; BERG, et al., 1998; FRIESE, et al., 2001; SIONOV et al. 2009).

Em nosso estudo, os valores de CIM para os isolados de *C. neoformans* 26, 27 e 30 foram 2,0, 16,0 e >64,00 µg/mL, respectivamente para FLC, demonstrando a evolução de resistência desses isolados com perfil genético idêntico, determinados por RAPD, possivelmente durante o tratamento. Para o isolado *C. gattii* também foi encontrado valor de CIM >64,00 µg/mL para FLC. Salientando que este último provavelmente refere-se à resistência natural. Para as drogas itraconazol e voriconal, também observamos valores aumentados de CIM para os isolados caracterizados como resistente a FLC, mostrando que estamos diante de isolados com resistência cruzada aos azóis.

Atualmente, a maioria dos estudos relacionados aos mecanismos de resistência às drogas azólicas estão focados em espécies de *Candida* (SANGLARD, et al. 1995; BENNET, et al, 2004; BRUN, et al. 2004; HELMERHORST, et al. 2006) e, em menor número para *Aspergillus fumigatus* (DIAZ-GUERRA, et al. 2003; DA SILVA, et al. 2004). Os mecanismos de

resistência aos azólicos mais comuns descritos nesses patógenos, incluem o aumento da produção de transportadores de múltiplas drogas ou alterações na enzima alvo dos azóis, a lanosterol 14C desmetilase, devido às mutações no gene *ERG11* e/ou a super expressão desse gene. (COWEN, et al. 2002, SELMECKI, et al. 2008).

Resistência mediada por alterações no gene *Erg11* tem sido amplamente documentado em *C. albicans* envolvendo tanto mutações pontuais quanto a super expressão do gene. Utilizando diferentes abordagens, as mutações F72L, F145L, G464S, Y132F, R467K e S405, na sequência da lanosterol 14 C desmetilase, foram correlacionadas à resistência aos azólicos. (SANGLARD, et al, 1998; ASAI et al,1999; FAVRE, et al, 1999;. KELLY, et al, 1999a, b;. CORDEIRO, et al. 2000, KUDO, et al, 2005).

Em *A. fumigatus*, mutações nas posições L98 e G138 na *Cyp51A* acarretaram à resistência cruzada a todos os azóis em *A. fumigatus*. (GARCIA-EFFRON et al., 2008 a, b, c). Mellado et al em 2007 relatou que a mutação na *Cyp51A* na posição L98H era consistentemente, combinada com a super expressão do gene, conseguindo demonstrar que essas alterações levaram a resistência cruzada a todos os azóis. Curiosamente, a substituição L98H e os mecanismos de alta regulação do gene *cyp51A* também foram encontrados em isolados de *A. fumigatus* de origem ambiental, aumentando assim a questão de como resistência aos azólicos foi adquirida no meio ambiente (SNELDERS et al., 2008).

Em *C. neoformans*, a análise da proteína *ERG11* de um isolado clínico resistente a FLC mostrou que uma mutação pontual, G484S na enzima alvo pode estar ligada ao desenvolvimento da resistência. Essa substituição não foi observada nos isolados sensíveis ao FLC. (RODERO, et al. 2003). O G484 é um resíduo que faz parte do grupamento heme e é conservada em todo o citocromo P450 de leveduras e fungos filamentosos. Essa substituição de aminoácido encontrada (G484S) corresponde à posição G464S em *C. albicans*, onde vários estudos demonstraram que essa mutação pode conferir a uma mudança na orientação do grupamento heme, levando a diminuição da sensibilidade do fungo ao FLC (SANGLARD, et al, 1998; KELLY, et al.1999).

O aumento no surgimento de cepas resistentes de *Cryptococcus* sp. a FLC é potencialmente problemático, pois existem poucas alternativas para o

tratamento dessa micose sistêmica além da anfotericina B, especialmente no Brasil. Portanto, a investigação da resistência ao nível genético e molecular é fundamental para compreender os mecanismos de resistência envolvidos. *Cryptococcus sp.* são modelos importantes para estudar as bases moleculares da resistência aos antifúngicos, uma vez que são taxonomicamente distintos dos ascomicetos (*Candida sp* e *S. cerevisiae*), fungos esses que tem fornecido diversas informações genéticas e moleculares sobre resistência antifúngica. (REVANKAR, et al., 2004).

Em nosso estudo, sequenciamos e analisamos o gene *ERG11* de três isolados com perfil de RAPD idênticos de *C. neoformans var. grubii* (26, 27 e 30) que evoluíram para resistência ao FLC devido à falha terapêutica e um isolado de *C. gattii* recuperado de psitacídio também caracterizado como resistente ao FLC (CIM >64,00 µg/mL). Quando alinhamos a sequência do gene *ERG11* do isolado 30R com o isolado 26S de *C. neoformans var. grubii*, a cepa ATCC e a sequência de referência de *C. neoformans var. grubii* (AY265353), encontramos um ponto de mutação significativo (C1436T) na sequência nucleotídica do gene no isolado 30 (CIM>64,00 µg/mL para FLC). Essa mutação foi responsável pela troca do aminoácido prolina na posição 479 por leucina (P479L) na sequência da proteína *ERG11*. O resíduo P479 é conservado no citocromo P450 em leveduras e fungos filamentosos e essa mutação ocorreu três aminoácidos antes do domínio de ligação do grupamento Heme. A mutação encontrada no isolado 30 de *C. neoformans var. grubii*, quando alinhada às sequências de *C. albicans* (CaERG11) e *A. fumigatus* (AfCyp51A) corresponde às mutações nas posições P459L e P443L, respectivamente, ainda não descritas nestes fungos. Pela primeira vez nós relatamos alteração nesta posição da proteína *ERG11* em um isolado clínico de *C. neoformans var. grubii*.

Como relatado anteriormente, em estudo realizado por Sheng et al, 2009 a proteína alvo dos azóis, a lanosterol 14C desmetilase de *Cryptococcus neoformans var. grubii*, foi analisada quanto à estrutura tridimensional e a localização dos domínios de interação com as moléculas das drogas azólicas (fluconazol, posaconazol, itraconazol, ravuroconazol, voriconazol e albaconazol). As regiões funcionais importantes para modelar novos encaixes estratégicos de drogas, contendo as quatro porções de interação foram

identificadas e a localização dos aminoácidos que interagem com as porções ativas das drogas azólicas foram primeiramente descritas. Através deste estudo foi possível discutir a partir dos nossos resultados se a resistência do isolado 30 é decorrente de alterações significativas na estrutura conformacional da proteína devido à mutação encontrada (P479L). Adicionalmente com estes dados novas modelagens de drogas poderão ser desenvolvidas incluindo nas moléculas azólicas a partir de alterações que podem evoluir para a resistência aos azóis. Através da localização da estrutura secundária realizada por Sheng, et al. em 2009, foi possível localizar nossa mutação (P479L), mostrando que a mesma ocorreu próxima a uma α -helice.

Cada tipo de proteína possui uma única sequência de aminoácidos e essa sequência deve desempenhar um papel fundamental na determinação da estrutura tridimensional, e finalmente, a sua função. Muitas doenças genéticas humanas foram relacionadas à produção de proteínas defeituosas, uma vez que diversas proteínas, muitas vezes são modificadas devido a uma única alteração em sua sequência de aminoácidos, portanto, se a estrutura primária for alterada, a função da proteína também poderá ser mudada. Mas alguma flexibilidade é possível. Muitas dessas variações na sequência possuem pouco ou nenhum efeito na função da proteína. Embora a sequência de aminoácidos em algumas regiões da estrutura primária possa variar consideravelmente sem afetar a função biológica, a maior parte das proteínas contém regiões cruciais que são essenciais para a sua função e cuja sequência é, portanto, conservada.

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

São conhecidos três tipos de conformações secundárias nas proteínas, as α -helices, as folhas β e as dobras β . A α -helice é uma estrutura secundária

comum nas proteínas e a sequência de aminoácidos afeta a estabilidade da α -hélice. Nem todos os peptídicos podem formar uma estrutura dessa estável, e interações entre cadeias laterais de aminoácidos podem estabilizar ou desestabilizar uma α -hélice. Uma das restrições para a formação de uma α -hélice é a presença de prolina. Na prolina o átomo de nitrogênio é parte de um anel rígido. Dessa forma um resíduo de prolina introduz uma torção em uma α -hélice. Além disso, o átomo de nitrogênio de um resíduo de prolina na ligação peptídica não possui o substituinte hidrogênio para participar nas ligações com outros aminoácidos. Por isso a prolina é raramente encontrada dentro de uma α -hélice. As folhas β são conformações mais estendidas das cadeias polipeptídicas, organizadas em folhas. Nas conformações β o esqueleto da cadeia polipeptídica é estendido em vez de estrutura helicoidal. Já as dobras β são conformações de dobras ou alças onde a cadeia polipeptídica reverte sua direção. Esses elementos conectam corridas sucessivas de α -hélice ou conformação β . Os resíduos de Prolina ocorrem frequentemente em dobras β , porque as ligações peptídicas envolvendo o nitrogênio da prolina facilmente assumem a configuração cis, forma que favorece uma dobra mais firme. (LEHNINGER, 2006). Dessa forma, acreditamos que a substituição ocorrida na sequência da proteína *ERG11* do isolado 30 de *C. neoformans*, pode de alguma forma, desestabilizar a estrutura conformacional da proteína ou até mesmo deslocar a α -hélice próxima ao grupamento de ligação heme, fazendo com que haja inibição do encaixe das moléculas de FLC com os sítios ativos da proteína lanosterol 14C desmetilase. No entanto, não podemos afirmar que somente essa mutação pode causar a resistência ao FLC nesse isolado, uma vez que outros mecanismos moleculares de resistência podem estar envolvidos nesse processo, sendo necessários mais estudos para essa comprovação.

O alinhamento do isolado *C. gattii* não revelou nenhum tipo de mutação, demonstrando que o seu desenvolvimento para resistência ao FLC é devido a outros mecanismos e não a mutações pontuais na sequência da proteína *ERG11*. Não podemos descartar também a possibilidade deste isolado ser heteroresistente, pois o mesmo foi recuperado de um psitacédeo que nunca foi exposto a nenhum antifúngico e o mesmo apresentou resistência natural ao FLC com altos valores de CIM. Lembrando que neste caso as pessoas imunocompetentes que eventualmente forem expostas a esta cepa

naturalmente resistente a múltiplas drogas antifúngicas, poderiam adquirir uma infecção de difícil tratamento.

Varma & Kwon-Chung em 2010, em um estudo com 71 isolados clínicos e ambientais de *C. gattii*, demonstraram que todas as amostras recuperadas, até mesmo aquelas coletadas 10 anos antes da disponibilidade dos triazólicos como terapia antifúngica, apresentaram heteroresistência ao fluconazol, sendo ainda, mais virulentas em camundongos, e mais resistentes aos xenobióticos que não estão relacionados ao fluconazol, quando comparadas com isolados de *C. neoformans*.

O aumento de infecções invasivas e a dificuldade no tratamento causada por fungos oportunistas e o surgimento de cepas menos sensíveis aos antifúngicos disponíveis, demonstram que é de extrema urgência a prospecção de novas moléculas ativas, principalmente aquelas advindas de substâncias naturais. O Brasil possui ampla extensão territorial e grande biodiversidade, se mostrando promissor na descoberta de substâncias bioativas que podem servir como protótipos para desenvolver agentes à base de plantas e produtos farmacêuticos.

Há relatos que extratos de plantas obtidos da família Celastraceae, têm sido usados por séculos como inseticida na agricultura tradicional, e também para o tratamento de várias complicações estomacais, febre, artrite reumatóide e câncer. (NÚÑEZ, et al., 2004). Nos últimos 30 anos, uma ampla variedade de metabólitos secundários biologicamente ativos tem sido identificada em membros desta família. Esta família tem como metabólitos secundários muitos terpenóides, incluindo os triterpenos do tipo friedelano; os triterpenos quinonametídeos (CORSINO, et al., 1998b; CHÁVEZ, et al., 1999; ALVARENGA, et al., 1999; NOSSACK, et al., 2004; CLOREN, et al., 2005), os triterpenos eno-quinonametídeos (JELLER, et al., 2004; CARVALHO, et al., 2005) e tipo fenólicos (GONZÁLEZ, et al., 1996; FURBACHER & GUNATILAKA, 2001; lupano (OHSAKI, et al., 2004; SILVA, et al., 2005; OLIVEIRA, et al., 2006; PIMENTA, et al., 2006; oleanano (MUHAMMAD, et al., 2000; BUFFA FILHO, et al., 2002), diversos triterpenos diméricos (SHIROTA, et al., 1997; SHIROTA, et al., 2004), além de diterpenos com esqueleto do tipo kaurano e abietano (TANAKA, et al., 2004) e sesquiterpenos (DESCOINS, et al., 2002; XIA, et al., 2002; CHANG, et al., 2003).

O gênero *Maytenus* é o maior da família Celastraceae. (JOFFILY; VIEIRA, 2005; BRANDÃO, et al., 2006). Para esse gênero, diversas propriedades biológicas, como atividade antiulcerogênica e analgésica (GONZALEZ, et al., 2000; SILVA, et al., 2005.), atividade anti-inflamatória (JORGE, et al., 2004), antitumoral (GONZÁLEZ, et al., 2000; COSTA, et al., 2008), antioxidante (VELLOSA, et al., 2006; MELO, et al., 2001), foram determinadas experimentalmente. Exibem diversos tipos de metabólitos secundários, incluindo flavonóides (CORSINO, et al., 2003a; VILEGAS, et al., 1999, 2001), triterpenos quinonametídeos (BUFFA FILHO, et al., 2000, 2002, 2004; CORSINO et al., 1998c), dímeros de triterpenos (ITOKAWA, et al., 1990; GONZÁLEZ, et al., 2000; SHIROTA, et al., 2004a), triterpenóides tetracíclicos (NÚÑEZ, et al., 2004a), alcalóides piridínicos sesquiterpênicos (CORSINO, et al., 1998a, 1998b; SHIROTA, et al., 2004b), glicosídeos fenólicos (VILEGAS, et al., 1999 e 2001), e maitansinóides (PULLEN, et al., 2003), com interessante espectro de atividades biológicas.

Utilizando extrato etanólico bruto da casca de *Maytenus rígida* Mart (Celastraceae), em modelos animais, Santos, et al. em 2007, demonstraram que doses de 250, 500 e 750 mg/Kg teve um significativo efeito inibitório no edema de pata induzido por carragenina e exibiu propriedade protetora contra ulceração induzida por etanol em ratos. Também foi observada atividade antidiarreica e nenhum sinal de toxicidade aguda nos animais tratados com doses elevadas do extrato (5000 mg/kg, v.o. ou 2000 mg/kg i.p.).

Para *Maytenus ilicifolia*, já foi determinada propriedades antimicrobianas (KLOUCEK al. al., 2007) e leishmanicida (PEREZ-VICTORIA et al., 1999). Suas propriedades farmacológicas têm sido amplamente analisadas na literatura (SANTOS-OLIVEIRA et al. 2009; LEITE, et al. 2001). Diversos metabólitos secundários, incluindo triterpenos quinonametídicos e alcalóides foram encontrados nessa espécie. (LEITE, et. al., 2001; Vilegas, et al. 1999; BUFFA-FILHO, et al. 2000, 2004). Os extratos das folhas e raízes *M. ilicifolia*, possuem efeito antimicrobiano para vários patógenos, dentre eles *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus* sp. Estudos demonstram que os taninos gálicos, presentes nessa espécie, podem inibir o crescimento de bactérias pela modificação da permeabilidade da parede celular (ANNUK, et al. 1999), e de acordo com SINGH & DUBEY em 2001, a friedelina e o friedelan-

3 β -ol possuem atividade antimicrobiana in vitro contra *S. aureus*, *E. coli*, e também contra o fungo *Aspergillus niger*.

Nesse estudo, duas substâncias puras, a Maitenina e a Pristimerina, obtidas da planta *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae), foram testadas quanto à atividade antifúngica e fungicida frente aos nossos isolados clínicos de *C. neoformans*, e do isolado *C. gattii*. A atividade antifúngica dessas moléculas foi considerada forte e a atividade fungicida também foi confirmada, pois os valores de CFM obtidos foram os mesmos valores observados da concentração inibitória mínima frente os isolados selecionados. A avaliação da citotoxicidade mostrou que para as concentrações acima de 3,9 $\mu\text{g/mL}$ (CIM encontrada para os isolados resistentes de *C. neoformans* e *C. gattii*) frente à Maitenina foi observada uma certa estabilidade na citotoxicidade, ou seja a citotoxicidade se manteve em torno de uma média de 50%, mesmo entre as faixas. Entretanto foi observada maior estabilidade na citotoxicidade para concentrações maiores que 3,9 $\mu\text{g/mL}$ quando analisada a viabilidade celular frente à substância Maitenina. Para Pristimerina, foi observado que as concentrações de CIMs para a cepa ATCC de *C. neoformans* e para o isolado clínico 26 (1,95 $\mu\text{g/mL}$), a média percentual de células viáveis ultrapassou 70% e apresentou diferença estatística quando comparada ao controle positivo, mostrando que para isolados sensíveis Pristimerina apresenta menor citotoxicidade.

Maitenina e Pristimerina são compostos triterpenóides quinonametídeos que normalmente são isoladas das raízes de plantas das famílias Celastraceae e Hippocrateaceae. Pesquisas desenvolvidas pelo grupo da Profa. Dra. Maysa Furlan junto ao projeto Biota Fapesp do Instituto de Química da UNESP de Araraquara demonstraram que os triterpenos quinonametídeos são substâncias que apresentam como precursores biossintéticos os triterpenos friedelanos, os quais são biossintetizados nas folhas e posteriormente translocados para as raízes, onde são convertidos aos triterpenos quinonametídeos (CORSINO et al.; 2000). Devido ao amplo espectro de atividades biológicas demonstradas por estes metabólitos, inúmeros pesquisadores intensificaram os estudos químicos de diferentes espécies de Celastraceae.

Em um estudo realizado por dos Santos, 2010, demonstrou que os triterpenos quinonametídeos, Maitenina e Pristimerina, apresentaram potente atividade leishmanicida. Nesse mesmo estudo, foi observado que a Maitenina

também apresentou uma potente e seletiva atividade antitumoral cerebral em células U343 quando comparada ao controle positivo (actinomicina D).

A Pristimerina também tem se mostrado citotóxica em diversas linhagens de células tumorais (CHANG, et al., 2003). Células MDA-MB-231 (câncer de mama) tratadas com Pristimerina (1 e 3 mmol / L) apresentaram rápida indução de apoptose, como indicado pela ativação de caspases, fragmentação de DNA e mudanças morfológicas. A Pristimerina também inibiu a viabilidade celular quando em contato com as linhagens A549, MCF-7, HepG2 e células Hep3B, com IC₅₀ de 0,42-0,61 mmol/L, após tratamento de 72 horas. Porém, quando analisado os efeitos da Pristimerina em uma linhagem de células mamárias não tumorais (MCF-10A), essas células apresentaram maior resistência à Pristimerina quando comparada com os efeitos na linhagem MDA-MB-231, especialmente nas primeiras 24 horas, sugerindo que a Pristimerina possui seletividade potencial para células tumorais. (WU, et al., 2005).

No presente estudo, verificamos que para a linhagem A549 modelo de estudo de nosso grupo, a citotoxicidade das substâncias puras, Maitenina e Pristimerina, corroboram com dados de outros trabalhos, demonstrando que para outras linhagens celulares não tumorais, os resultados podem ser favoráveis para o desenvolvimento de novas drogas antifúngicas a partir dessas moléculas, já que essa atividade foi considerada forte para os isolados clínicos de *C. neoformans* (S, I e R), para o isolado animal resistente ao fluconazol *C. gattii* e para a cepa ATCC de *C. neoformans*. Estudos realizados por nosso laboratório mostraram que essas moléculas purificadas também apresentam atividade antifúngica contra outros fungos, como espécies de *Candida* e até mesmo *Histoplasma capsulatum* (dados não publicados).

Quando comparamos os resultados obtidos pelos ensaios de sensibilidade de nossos isolados frente ao fluconazol e os ensaios de avaliação da atividade antifúngica das substâncias puras, Maitenina e Pristimerina, foi verificado que é necessário maior concentração das substâncias puras para inibir o crescimento do isolado de *C. neoformans* caracterizado como resistentes ao fluconazol. Ou seja, para o fluconazol inibir o crescimento dos isolados clínicos de *C. neoformans* 26S, 27I e o 30R, foi necessário o aumento da concentração da droga, respectivamente. Para a Maitenina e a Pristimerina,

o resultado foi semelhante, pois a concentração que inibiu o crescimento do fungo resistente também foi mais elevada do que as CIMs encontradas para o isolado sensível e o isolado intermediário a fluconazol.

Lião et al, 2008, testou a atividade tripanocida da substância pura Maitenina frente as formas epimastigota (estágio de desenvolvimento do treatomíneo) de *Trypanossoma cruzi*, e observou que para essas formas do parasita a Maitenina se mostrou mais efetiva do que para formas tripomastigota (flagelo visível na parte posterior da célula), acrescentando que esse fato pode ser explicado devido a diferença entre a composição da membrana plasmática das formas, pois a primeira apresenta uma maior percentagem de esteróis em sua composição, principalmente ergosterol, que desempenha um papel importante no transporte das substâncias através da membrana plasmática do parasita (DA SILVEIRA, et al.,1979), transformando as formas epimastigotas mais suscetíveis à ação de substâncias exógenas. Portanto, os mecanismos de inibição do crescimento fúngico da Maitenina e da Pristimerina devem ser investigados para o detalhamento do mecanismo de ação dessas moléculas e o alvo nos fungos.

As moléculas estudadas são promissoras, como futuros antifúngicos, pois em se tratando de fármacos usuais na terapia padrão da criptococose, certa toxicidade é observada, principalmente na utilização de AMB. Modelagens estruturais na molécula de Maitenina e Pristimerina também poderiam reduzir a citotoxicidade, viabilizando no desenvolvimento de formulações incluindo as alternativas como microemulsão ou nas novas tecnologias nano aplicadas para fármacos.

Nossos dados mostraram grandes avanços para continuarmos o estudo dos mecanismos de ação e identificação de novos alvos, uma vez que a atividade das moléculas estudadas foram também eficientes em isolados resistentes. A identificação pontual das moléculas alvos apontadas neste estudo é fundamental para elucidar seus mecanismos de ação e na obtenção de novos fármacos para o tratamento da criptococose.

7. Conclusões

1. Foi possível amplificar e obter a sequência do gene *ERG11* de *C. gattii* por meio da amplificação dos dois pares de *primers* desenhados S1-AS2 e S3-AS4.
2. A sequência nucleotídica do gene *ERG11* do isolado clínico 30, resistente *in vitro*, apresentou um ponto de mutação significativo na posição 1436 substituindo a base C por T (citosina por timina).
3. A sequência de aminoácidos, quando traduzida apresentou somente uma mutação significativa na proteína *ERG11* (lanosterol 14C desmetilase) ocorrendo troca do aminoácido P (prolina) por L (leucina) na posição 479 (P479L), ainda não descrita em *C. neoformans var grubii*.
4. De acordo com a localização da mutação P479L sugere-se possível deslocamento da α -hélice que está próxima do grupamento Heme da proteína, pois esta substituição ocorreu três aminoácidos antes desta.
5. Não ocorreram mutações pontuais na sequência nucleotídica do gene *ERG11* do isolado de psitacídeo de *C. gattii*, demonstrando que sua resistência pode estar relacionada a outros mecanismos.
6. A atividade antifúngica das substâncias vegetais purificadas Maitenina e Pristimerina foi classificada como forte.
7. As substâncias vegetais foram parcialmente citotóxicas para a linhagem A549, porém Maitenina apresentou estabilidade citotóxica em altas concentrações.

8. Referências Bibliográficas

- AGARWAL, A. K.; XU, T.; JACOB, M. R.; FENG, Q.; LI, X. C.; WALKER, L. A.; CLARK, A. M. Genomic and genetic approaches for the identification of antifungal drug targets. **Infect Disord Drug Targets**, V. 8(1), p.2-15, 2008.
- ALARCO, A.M.; BALAN, I.; TALIBI, D.; MAINVILLE, N.; RAYMOND, M.; AP1-mediated multidrug resistance in *Saccharomyces cerevisiae* requires FLR1 encoding a transporter of the major facilitator superfamily. **J Biol Chem.**, V. 272, p. 19304–19313, 1997.
- ALMEIDA, A.M.F.; MATSUMOTO, M.T.; BAEZA, L.C.; SILVA, R.; KLAINER, A.A.P.; MELHEM, M.C.S.; MENDES-GIANNINI, M.J.S.; & The Laboratory Group on Cryptococcosis . Molecular typing and antifungal susceptibility of clinical sequential isolates of *Cryptococcus neoformans* from Sao Paulo State, Brazil. **FEMS Yeast Research**, v. 7, p. 152-164, 2007.
- ALVARENGA, N. L.; VELÁZQUEZ, C. A.; GÓMEZ, R.; CANELA, N. J.; BAZZOCCHI, I. L.; FERRO, E. A. A new antibiotic nortriterpene quinone methide from *Maytenus catingarum*. **Journal of Natural Products**, v. 62, p. 750-751, 1999.
- ANNUK, H.; HIRMO, S.; TURI, E.; MIKELSAAR, M.; ARAK, E.; WADSTROM, T.; Effect on cell surface hydrophobicity and susceptibility of *Helicobacter pylori* to medicinal plant extracts. **FEMS Microbiol Lett.**, V. 172, p. 41-45. 1999.
- ARMENGOU, A.; PORCAR, C.; MASCARO, J.; GARCIA-BRAGADO, F.; Possible development of resistance to fluconazole during suppressive therapy for AIDS-associated cryptococcal meningitis. **Clin. Infect. Dis.**, V. 23, p.1337–1338. 1996.
- ASAI, K.; TSUCHIMORI, N.; OKONOGI, K.; PERFECT, J.R.; GOTOH, O.; YOSHIDA, Y.; Formation of azole-resistant *Candida albicans* by mutation of sterol 14-demethylase P450. **Antimicrob Agents Chemother.** V. 5, p.1163-9, 1999.
- BAIXENCH, MT.; AOUN, N.; DESNOS-OLLIVIER, M.; GARCIA-HERMOSO, D.; BRETAGNE, S.; RAMIRES, S.; PIKETTY, C.; DANNAOUI, E.; Acquired resistance to echinocandins in *Candida albicans*: case report and review. **J Antimicrob Chemother.** V. 59(6), p. 1076-83. 2007.
- BARQUIST, E.; FEIN, E.; SHADICK, D.; JOHNSON, J.; CLARK, J.; SHATZ, D.A. Randomized prospective trial of amphotericin B lipid emulsion versus dextrose colloidal solution in critically ill patients. **J. Trauma.**, v.47, p.336-340, 1999.

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

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

BERG, J.; CLANCY C.J.; NGUYEN, M.H.; The hidden danger of primary fluconazole prophylaxis for patients with AIDS. **Clin. Infect. Dis.**, V. 26, p.186–187. 1998.

BENADUCCI, T. “**Tipos moleculares de *Cryptococcus neoformans* correlacionados com perfis de sensibilidade à drogas sintéticas e de plantas determinadas por Citometria de Fluxo**” 2009. Dissertação (Mestrado em Análises Clínicas). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP-Araraquara, 2009.

BENNETT, J.E.; IZUMIKAWA K & MARR, K.A.; Mechanism of increased fluconazole resistance in *Candida glabrata* during prophylaxis. **Antimicrob Agents Ch.**, V. 48, p.1773–1777, 2004.

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

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 (1), p.25-30, 2007.

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

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

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

BRANDÃO MGL, COSENZA GP, MOREIRA RA, MONTE-MOR RLM. Medicinal plants and other botanical products from the Brazilian Official Pharmacopoeia. **Rev Bras Farmacogn** 16: 408-420, 2006.

BRANDT, M. E.; PFALLER, M. A.; HAJJEH, R. J. H.; PAPPAS, P. G.; REINGOLD, A. L.; RINLAND, D.; WARNOCK, D. W.; THE 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. 3065-3069, 2001.

BUFFA FILHO, W.; BOLZANI, V.S.; FURLAN, M.; PEREIRA, A.M.S.; PEREIRA, S.I.V.; FRANÇA, S.C. In vitro propagation of *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae) as potential source for antitumoral and antioxidant quinomethide triterpenes production. A rapid quantitative method for their analysis by reversephase high-performance liquid chromatography. **Arkivoc**, part 4, p. 137-146, 2004.

BUFFA FILHO, W.; CORSINO, J.; FURLAN, M.; PEREIRA, A. M. S.; FRANÇA, S. C. **Phytochemical Analysis**. V. 13, 75. 2002.

BUFFA FILHO, W.; FURLAN, M.; PEREIRA, A. M. S.; FRANÇA, S. C. Indução de metabólitos bioativos em culturas de células de *Maytenus ilicifolia*. **Eclética Química**, v. 27, p. 403-416, 2000.

CALABRESE, D.; BILLE, J.; SANGLARD, D.; A novel multidrug efflux transporter gene of the major facilitator superfamily from *Candida albicans* (FLU1) conferring resistance to fluconazole. **Microbiology**, V. 146, p. 2743–2754, 2000.

CANNON, RD.; 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**. 22(2)p. 291-321, 2009.

CARLINI, E.A.; FROCHTENGARTEN, M.L.; Toxicologia clínica (Fase I) da espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia*). Brasília-Distrito Federal, p. 67-73, 1988.

CARRILLO-MUÑOZ, A.J.; QUINDÓS, G.; DEL VALLE, O.; SANTOS, P.; GIUSIANO, G.; GUARDIA, C.; ERASO, E.; EZKURRA, P.A.; TUR-TUR, C.; HERNÁNDEZ-MOLINA, J.M.; In vitro antifungal activity of sertaconazole nitrate against recent isolates of onychomycosis causative agents. **J Chemother.**, V. 20(4), p. 521-3, 2008.

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

CARVALHO, P. R. F.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; FURLAN, M. Antioxidant quinonemethide triterpenes from *Salacia campestris*. **Chemistry & Biodiversity**, v. 2, p. 367-372, 2005.

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

CASALI AK, GOULART L, ROSA E SILVA LK, RIBEIRO AM, AMARAL AA, ALVES SH, SCHRANK A, MEYER W, VAINSTEIN MH. Molecular typing of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* isolates in the Brazilian state Rio Grande do Sul. **FEMS Yeast Res.** v.3(4).p. 405-15, 2003.

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

CHANG, F-R.; HAYASHI, K-I.; CHEN, I-H.; LIAW, C-C.; BASTOW, K. F.; NAKANISHI, Y.; NOZAKI, H.; CRAGG, G. M.; WU, Y.-C.; LEE, K.-H. Antitumor agents. 228. Five new agarofurans, Reissantins A-F, and cytotoxic principles from *Reissantia buchananii*. **Journal of Natural Products**, v. 66, p. 1416-1420, 2003.

CHAPMAN SW, SULLIVAN DC, CLEARY JD. In search of the holy grail of antifungal therapy. **Trans Am Clin Climatol.** V.119. p. 197-215, 2008.

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. 77(1). p. 120-7, 2008.

CHÁVEZ, H.; ESTÉVEZ-BRAUN, A.; RAVELO, A. G.; GONZÁLEZ, A. G. New phenolic and quinone-methide triterpenes from *Maytenus amazônica*. **Journal of Natural Products**, v. 62, p. 434-436, 1999.

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

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

CLOREN, C.; CALINGASAN, N. Y.; CHEN, J.; BEAL, M. F. Celastrol protects against MPTP- and 3-nitropropionic acid-induced neurotoxicity. **Journal of Neurochemistry**, v. 94, p. 995-1004, 2005.

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

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

CUNHA SC, **Ação farmacológica da espinheira-santa: usos e precauções**. Lavras, 100 p. Monografia de Especialização, **Universidade Federal de Lavras**. 2003.

CORDONNIER, D.P.; VIVIANI C.; 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.

CORSINO, J.; BOLZANI, V.S.; PEREIRA, A.M.S.; FRANÇA, S.C.; FURLAN, M. Bioactive sesquiterpene pyridine alkaloids from *Maytenus aquifolium*. **Phytochemistry**, v. 48, n. 1, p. 137-140, 1998a.

CORSINO, J.; BOLZANI, V.S.; PEREIRA, A.M.S.; FRANÇA, S.C.; FURLAN, M. Further sesquiterpene pyridine alkaloids from *Maytenus aquifolium*. **Phytochemistry**, v. 49, n. 7, p. 2181-2183, 1998b.

CORSINO, J.; ALÉCIO, A.L.; RIBEIRO, M.L.; PEREIRA, A.M.S.; DUARTE, I.B.; FRANÇA, S.C.; FURLAN, M. Quantitative determination of Maytenin and 22 β -hydroxymaytenin in callus of *Maytenus aquifolium* (Celastraceae) by reversed phase high performance liquid chromatography. **Phytochemical Analysis**, v. 9, p. 245-247, 1998c.

CORSINO, J.; SILVA, D.H.S.; ZANONI, M.V.B.; BOLZANI, V.S.; FRANÇA, S.C.; PEREIRA, A.M.S.; FURLAN, M. Antioxidant flavan-3-ols and flavonol glycosides from *Maytenus aquifolium*. **Phytotherapy Research**, v. 17, p. 913- 916, 2003.

COSTA, P. M.; FERREIRA, P. M. P.; BOLZANI, V. S.; FURLAN, M.; SANTOS, V. A. F. F. M.; CORSINO, J.; MORAES, M. O.; COSTA-LOTUFO, L. V.; MONTENEGRO, R. C.; PESSOA, C.

Antiproliferative activity of pristimerin isolated of *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae) in human HL-60 cells. *Toxicology in Vitro*, v. 22, p. 854-863, 2008.

DA SILVEIRA, J. F.; ABRAHAMSOHN, P.A.; COLLI, W.; Plasma membrane vesicles isolated from epimastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. **Biochim. Biophys.** V. 550, p. 222-232, 1979.

DATTA K, BARTLETT KH, BAER R, BYRNES E, GALANIS E, HEITMAN J, HOANG L, LESLIE MJ, MACDOUGALL L, MAGILL SS, MORSHED MG, MARR KA; Cryptococcus gattii Working Group of the Pacific Northwest. Spread of *Cryptococcus gattii* into Pacific Northwest region of the United States. **Emerg Infect Dis.** v.15(8).p. 1185-91, 2009.

DEL SAL, G.; MANFIOLETTI, G.; SCHNEIDER, C.; The CTAB-DNA precipitation method: a common mini-scale preparation of template DNA from phagemids, phages or plasmids suitable for sequencing. **Bio. Techniques.** V. 7, p. 514-519. 1989.

DESCOINS, C. J. R.; BAZZOCCHI, I. L.; RAVELO, A. G. New sesquiterpenes from *Euonymus europaeus* (Celastraceae). **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 50, n. 2, p. 199-202, 2002.

DIAZ-GUERRA, TM.; MELLADO E.; CUENCA-ESTRELLA, M.; RODRIGUEZ-TUDELA, J.L.; A point mutation in the 14 α -sterol demethylase gene Cyp51A contributes to itraconazole resistance in *Aspergillus fumigatus*. **Antimicrob Agents Ch.**, V. 47, p. 1120–1124, 2003.

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

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

DOS SANTOS VA, DOS SANTOS DP, CASTRO-GAMBOA I, ZANONI MV, FURLAN M. Evaluation of antioxidant capacity and synergistic associations of quinonemethide triterpenes and phenolic substances from *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae). **Molecules.** v. 11;15(10)p. 6956-73, 2010.

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

DROMER, F.; MATHOULIN-PELISSIER, S.; FONTANET, A.; RONIN, O.; DUPONT, B.; LORTHOLARY, O.; FRENCH. Cryptococcosis STUDY GROUP. Epidemiology of HIV-associated

cryptococcosis in France. (1985-2001): comparison of the pre- and post-HAART eras. **AIDS.**, v.20, p. 555-562, 2004.

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

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

ESPINEL-INGROFF, A. Mechanisms of resistance to antifungal agents: yeasts and filamentous fungi. **Rev Iberoam Micol.**, v.25(3), p.101-106, 2008;

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.

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.

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.

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

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

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

FRIESE, G.; DISCHER T.; FUSSELE, R.; SCHMALRECK, A.; LOHMEYER, J.; Development of azole resistance during fluconazole maintenance therapy for AIDS-associated cryptococcal disease. **AIDS.**, V. 15, p. 2344–2345. 2001.

FUSCO-ALMEIDA, A.M. “**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE POLIMORFISMOS E DO GENE ERG11 ASSOCIADOS A MECANISMOS DE RESISTÊNCIA A DROGAS ANTIFÚNGICAS EM ISOLADOS CLÍNICOS DE *Cryptococcus neoformans***” 2005. Dissertação (Doutorado em Análises Clínicas). Faculdade de Ciências Farmacêuticas UNESP-Araraquara, 2005.

GARCIA-EFFRON, G.; DILGER, A.; ALCAZAR-FUOLI, L.; PARK, S.; MELLADO, E.; PERLIN, D.S.; Rapid detection of triazole antifungal resistance in *Aspergillus fumigatus*. *J Clin Microbiol.*, V. 46, p.1200–1206, 2008a.

GARCIA-EFFRON, G.; KATIYAR, S.K.; PARK, S.; EDLIND, T.D.; PERLIN, D.S.; A naturally occurring proline-to-alanine amino acid change in Fks1p in *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* accounts for reduced echinocandin susceptibility. *Antimicrob Agents Ch.*, V. 52, p. 2305–2312, 2008b.

GARCIA-EFFRON, G.; KONTOYIANNIS, D.P.; LEWIS, R.E.; PERLIN, D.S.; Caspofungin-resistant *Candida tropicalis* strains causing breakthrough fungemia in patients at high risk for hematologic malignancies. *Antimicrob Agents Ch* V. 52, p. 4181–4183, 2008c.

GARCIA-HERMOSO, D.; JANBORN, G.; DROMER, F.; Epidemiological evidence for dormant *Cryptococcus neoformans* infection. *J Clin Microbiol.* v. 37. p. 3204-9, 1999.

GIROIS SB, CHAPUIS F, DECULLIER E, REVOL BG. Adverse effects of antifungal therapies in invasive fungal infections: review and meta-analysis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* v. 25(2), 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.; 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.

GONZÁLEZ, A. G.; RODRÍGUEZ, F. M.; BAZZOCCHI, I. L.; RAVELO, A. G. New terpenoids from *Maytenus blepharodes*. *Journal of Natural Products*, v. 63, p. 48-51, 2000.

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

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

GOLLAPUDY, R.; AJMANI, S.; KULKARNI, S.A.; Modeling and interactions of *Aspergillus fumigatus* lanosterol 14-alpha demethylase 'A' with azole antifungals. **Bioorg Med Chem.** V. 12(11), p. 2937-50, 2004.

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.

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

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

PAUGAM, A.; DUPOUY-CAMET, J.; BLANCHE, P.; GANGNEUX, J.P.; TOURTE-SCHAEFER, C.; SICARD, D.; Increased fluconazole resistance of *Cryptococcus neoformans* isolated from a patient with AIDS and recurrent meningitis. **Clin. Infect. Dis.** V. 19, p. 975–976. 1994.

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

ITOKAWA, H.; SHIROTA, O.; MORITA, H.; TAKEYA, K.; TOMIOKA, N.; ITAI, A. New triterpene dimers from *Maytenus ilicifolia*. **Tetrahedron Letters**, V. 31, p. 6881-6882, 1990.

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

JELLER, A. H.; SILVA, D. H. S.; LIÃO, L. M.; BOLZANI, V. S.; FURLAN, M. Antioxidant phenolic and quinonemethide triterpenes from *Cheiloclinium cognatum*. **Phytochemistry**, v. 65, p. 1977-1982, 2004.

JOFFILY, A.; VIEIRA, R. C. Anatomia foliar de *Maytenus* Mol. emend Mol. (Celastraceae), ocorrente no Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 19, n. 3, p. 549-561, 2005.

JOHANN S, OLIVEIRA VL, PIZZOLATTI MG, SCHRIPEMA J, BRAZ-FILHO R, BRANCO A, SMÂNIA JR A. Antimicrobial activity of wax and hexane extracts from Citrus spp. peels. **Mem Inst Oswaldo Cruz.**, V. 102(6),p. 681-5, 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(6), p.511-4, 2008.

JORGE RM, LEITE JP, OLIVEIRA AB, TAGLIATI CA. Evaluation of antinociceptive, anti-inflammatory and antiulcerogenic activities of *Maytenus ilicifolia*. v. 94(1). p. 93-100, **J Ethnopharmacol.**, 2004.

JOSEPH-HORNE T, LOEFFLER RS, HOLLOMON DW, KELLY SL. Amphotericin B resistant isolates of *Cryptococcus neoformans* without alteration in sterol biosynthesis. **J Med Vet Mycol.** v. 34(3). p. 223-5,1996.

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

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. 1-8, 2008. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo.** 2008.

KATIYAR, S.K.; EDLIND, T.D.; Identification and expression of multidrug resistance-related ABC transporter genes in *Candida krusei*. **Med Mycol.**, V. 39, p. 109–116, 2001.

KELLY, S.L.; LAMB, D.C.; KELLY D.E.; Y132H substitution in *Candida albicans* sterol 14 alpha-demethylase confers fluconazole resistance by preventing binding to haem. **FEMS Microbiol Lett.**; V. 2, p.171-5, 1999a.

KELLY, S.L.; LAMB, D.C.; LOEFFLER, J.; EINSELE H.; KELLY D.E.; The G464S amino acid substitution in *Candida albicans* sterol 14 α -demethylase causes fluconazole resistance in the clinic through reduced affinity. **Biochem Biophys Res Commun.**; V. 1, p. 174-9, 1999b.

KELLY, S.; LAMB, D.C.; TAYLOR, M.; CORRAN, A.; BALDWIN, B.; POWDERLY, W.G. Resistance to amphotericin B associated with defective sterol - 8 7 isomerase in a *Cryptococcus neoformans* strain from an AIDS patient. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 122, p. 39-42, 1994.

KIDD SE, HAGEN F, TSCHARKE RL, HUYNH M, BARTLETT KH, FYFE M, MACDOUGALL L, BOEKHOUT T, KWON-CHUNG KJ, MEYER W. A rare genotype of *Cryptococcus gattii* caused the cryptococcosis outbreak on Vancouver Island (British Columbia, Canada). **Proc Natl Acad Sci U S A.** v. 101(49). p. 17258-63, 2004.

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

KUDO, M.; OHI, M.; AOYAMA, Y.; NITAHARA, Y.; CHUNG, SK.; YOSHIDA, Y.; Effects of Y132H and F145L substitutions on the activity, azole resistance and spectral properties of *Candida albicans* sterol 14-demethylase P450 (CYP51): a live example showing the selection of altered P450 through interaction with environmental compounds. **J Biochem.** V. 5, p. 625-32, 2005.

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

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

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

LAMB, D.C.; KELLY, D.E.; WHITE, T.C.; KELLY, S.L.; The R467K amino acid substitution in *Candida albicans* sterol 14 α -demethylase causes drug resistance through reduced affinity. **Antimicrob Agents Ch.**, V. 44, p. 63-67, 2000.

LASS-FLÖRL C, ALASTRUEY-IZQUIERDO A, CUENCA-ESTRELLA M, PERKHOFER S, RODRIGUEZ-TUDELA JL. In vitro activities of various antifungal drugs against *Aspergillus terreus*: Global assessment using the methodology of the European committee on antimicrobial susceptibility testing. **Antimicrob Agents Chemother.** ; v. 53(2),p. 794-5, 2009.

LATOUCHE GN, HUYNH M, SORRELL TC, MEYER W. PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the phospholipase B (PLB1) gene for subtyping of *Cryptococcus neoformans* isolates. **Appl Environ Microbiol.** v. 69(4).p. 2080-6, 2003.

LAZÉRA, M.S.; SALMITO CAVALCANTI, M.A.; LONDERO, A.T.; TRILLES, L.; NISHIKAWA, M.M.; WANKE, B.; Possible primary ecological niche of *Cryptococcus neoformans*. **Med Mycol.** V. 38(5), p.379-83, 2000.

LAZÉRA MS, CAVALCANTI MA, TRILLES L, NISHIKAWA MM, WANKE B. *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*--evidence for a natural habitat related to decaying wood in a pottery tree hollow. **Med Mycol.** 36(2), p.119-22, 1998.

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

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

LEHNINGER., 2006. "Princípios de Bioquímica" – 4ª Edição., Editora Sarvier.

LEITE JPV, RASTRELLI L, ROMUSSI G, OLIVEIRA AB, VILEGAS JHY, VILEGAS W, PIZZA C. Isolation and HPLC quantitative analysis of flavonoid glycosids from Brazilian beverages (*Maytenus ilicifolia* and *Maytenus aquifolium*). **J Agr Food Chem** 49: 3796-3801, 2001.

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

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

LIÃO, L. M.; SILVA, G. A.; MONTEIRO, M. R.; ALBUQUERQUE, S. Trypanocidal activity of quinonemethide triterpenoids from *Cheilocladium cognatum* (Hippocrateaceae). Zeitschrift fuer Naturforschung, C: **Journal of Biosciences**, v. 63, n. 3/4, p. 207-210, 2008.

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

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

LINDENBERG, A.D.E.S.; CHANG, M.R.; PANIAGO, A.M.; LAZÉRA, M.D.O.S.S.; MONCADA, P.M.; BONFIM, G.F.; NOGUEIRA, S.A.; WANKE, B.; Clinical and epidemiological features of 123 cases of cryptococcosis in Mato Grosso do Sul, Brazil. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**. v. 50(2). p. 75-8, 2008.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A.; Plantas medicinais no brasil - nativas e exóticas. São Paulo: Instituto Plantarum, p. 120-122, 2002.

LUMBRERAS, C.; LIZASOAIN, M.; AGUADO, J.M.; **Enferm Infecc Microbiol Clin**. V. 21(7), p. 366-79. 2003.

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

MANN, PA.; PARMEGIANI, RM.; WEI, S.Q.; MENDRICK, C.A.; LI, X.; LOEBENBERG. D.; DIDOMENICO, B.; HARE, R.S.; WALKER, S.S.; MCNICHOLAS P.M.; Mutations in *Aspergillus fumigatus* resulting in reduced susceptibility to posaconazole appear to be restricted to a single amino acid in the cytochrome P450 14alpha-demethylase. *Antimicrob Agents Chemother*. v.2, p. 577-81, 2003

MANSOUR MK, LEVITZ SM. Interactions of fungi with phagocytes. **Curr. Opin. Microbiol.**, v.5, p.359–365. 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.; ODDS FC.; NOBELS, G.; WARNOCK, DW.; TIMMERMAN, V.; VAN BROECKHOVEN, C.; FAY, S.; MOSE-LARSEN, P.; Molecular biological characterization of an azole-resistant *Candida glabrata* isolate. **Antimicrob Agents Chemother**. V. 41(10), p. 2229-37, 1997.

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

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

MASCHMEYER G, HAAS A. The epidemiology and treatment of infections in cancer patients. **Int J Antimicrob Agents.**, v. 31(3),p. 193-7,2008.

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

MCCARTHY K.M; COHEN C; SCHNEIDER H; GOULD S.M; BRANDT M.E; HAJJEH RA; Gauteng Cryptococcal Surveillance Initiative Group. Cryptococcosis in Gauteng: implications for monitoring of HIV treatment programmes. **S Afr Med J.** v. 98(6). p. 452, 454, 2008.

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

MELLADO, E.; GARCIA-EFFRON, G.; ALCAZAR-FUOLI, L.; MELCHERS, W.J.; VERWEIJ, P.E.; CUENCA-ESTRELLA, M.; RODRIGUEZ-TUDELA, .JL.; A new *Aspergillus fumigatus* resistance mechanism conferring in vitro cross-resistance to azole antifungals involves a combination of *cyp51A* alterations. **Antimicrob Agents Ch.**, V. 51, p.1897–1904, 2007.

MING, L.C.; CASTRO, D.M.; DELACHIAVE, M.E.; **Plantas medicinais aromáticas e condimentares.** Botucatu: Universidade Estadual Paulista. 1998.

MITCHELL, T.G.; PERFECT, J.R. Cryptococcosis in the era of AIDS – 100 years after the discovery of *Cryptococcus neoformans*. **Clinical Microbiology Reviews**, v.8, n.4, p. 515-48, 1995.

MIYAZAKI T, MIYAZAKI Y, IZUMIKAWA K, KAKEYA H, MIYAKOSHI S, BENNETT JE, KOHNO S. Fluconazole treatment is effective against a *Candida albicans* erg3/erg3 mutant in vivo despite in vitro resistance **Antimicrob Agents Chemother.** v. 2, p. 580-6, 2006.

MONK, B. C.; GOFFEAU, A. Outwitting multidrug resistance to antifungals. **Science**, v.321, p.367-9, 2008.

MONTENEGRO H, PAULA CR. Environmental isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* and *C. neoformans* var. *neoformans* in the city of São Paulo, Brazil. **Med Mycol.** 38(5). p. 385-90, 2000.

MORAN, G.P.; SANGLARD, D.; DONNELLY, S.; SHANLEY, D.B.; SULLIVAN, D.J.; COLEMAN, D.C.; Identification and expression of multidrug transporters responsible for fluconazole resistance in *Candida dubliniensis*. **Antimicrob Agents Ch.**, V. 42, p. 1819–1830, 1998.

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.

MORSCHHAUSER, J. Regulation of multidrug resistance in pathogenic fungi. **Fungal Genet Biol.**, 2009.

MOYRAND, F.; KLAPROTH, B.; HIMMELREICH, U.; DROMER, F.; JANBON, G. Isolation and characterization of capsule structure mutant strains of *Cryptococcus neoformans*. **Mol. Microbiol.**, v. 45, n. 3, p. 837-849, 2002.

NASCIMENTO, A.M.; GOLDMAN, G.H.; PARK, S.; et al. Multiple resistance mechanisms among *Aspergillus fumigatus* mutants with high-level resistance to itraconazole. **Antimicrob Agents. Ch** V. 47, p. 1719–1726, 2003.

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

NISHIKAWA, M.M.; LAZÉRA, M.S.; BARBOSA, G.G.; TRILLES, L.; BALASSIANO, B.R.; MACEDO, R.C.L.; BEZERRA, C.C.F.; PÉREZ, M.A.; CARDARELLI, P.; WANKE, B. Serotyping of

467 *Cryptococcus neoformans* isolated from clinical and environmental sources in Brazil: Analysis of host and regional patterns. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, n.1, p.73-7, 2003.

NORDOY, I.; GAUSTAD, P.; Drug resistance in the treatment of invasive fungal infections. **Laegeforen.**, V. 20, p. 128(22):2607-11, 2008.

NOSSACK, A.C.; CELEGHINI, R.M.S.; LANÇAS, F.M. YARIWAKE, J.H. HPLC-UV and LC-MS analysis of quinonemethides triterpenes in hydroalcoholic extracts of "espinheira santa" (*Maytenus aquifolium* Martius, Celastraceae) leaves. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 15, n. 4. p. 582-586, 2004.

NÚÑEZ, M.J.; LÓPEZ, M.R.; JIMÉNEZ, I.A.; MOUJIR, L.M.; RAVELO, A.G.; BAZZOCCHI, I. L. First examples of tetracyclic triterpenoids with a D:Bfriedobaccharane skeleton. A tentative biosynthetic route. **Tetrahedron Letters**, v. 45, p. 7367-7370, 2004a.

NÚÑEZ, M. J.; GUADAÑO, A.; JIMÉNEZ, I. A.; RAVELO, A. G.; GONZÁLEZCOLOMA, A.; BAZZOCCHI. Insecticidal sesquiterpene pyridine alkaloids from *Maytenus chiapensis*. **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 14-18, 2004b.

OLIVEIRA, D. M.; SILVA, G. D. F.; DUARTE, L. P.; VIEIRA, S. A. F. Chemical constituents isolated from roots of *Maytenus acanthophylla* Reissek (Celastraceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 34, 661-665, 2006.

OHSAKI, A.; IMAI, Y.; NARUSE, M.; AYABE, S.; KOMIYAMA, K.; TAKASHIMA, J. Four new triterpenoids from *Maytenus ilicifolia*. **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 469-471, 2004.

PAPPALARDO MC, SZESZS MW, MARTINS MA, BACETI LB, BONFIETTI LX, PURISCO SU, BAEZ AA, MELHEM MS. Susceptibility of clinical isolates of *Cryptococcus neoformans* to amphotericin B using time-kill methodology. **Diagn Microbiol Infect Dis.** v. 64(2). p. 146-51, 2009.

PAPPALARDO, M.C.; PASCHOAL, R.C.; MELHEM, M.S. AIDS-associated central nervous system cryptococcosis: a Brazilian case study. **AIDS**, V. 12;21(14), p. 971-2, 2007.

PAPPAS PG, PERFECT JR, CLOUD GA, LARSEN RA, PANKEY GA, LANCASTER DJ, HENDERSON H, KAUFFMAN CA, HAAS DW, SACCENTE M, HAMILL RJ, HOLLOWAY MS, WARREN RM, DISMUKES WE. Cryptococcosis in human immunodeficiency virus-negative patients in the era of effective azole therapy. **Clin Infect Dis.** v. 33(5). p. 690-9, 2001.

PEETERMANS W, BOBBAERS H, VERHAEGEN J, VANDEPITTE J. Fluconazole-resistant *Cryptococcus neoformans* var *gattii* in an AIDS patient. **Acta Clin Belg.** v. 48(6)p. 405-9,1993.

PEMÁN J, CANTÓN E, ESPINEL-INGROFF A. Antifungal drug resistance mechanisms. **Expert Rev Anti Infect Ther.** v. 7(4). p. 453-60, 2009.

PEREA, S.; PATTERSON, TF.; Antifungal resistance in pathogenic fungi. **Clin InfecDis.** V. 9, p. 1073-80, 2002.

PEREIRA RR, PIZZOLLATI, M.G.; DE LIMA, T.C.M.; Ação do extrato de *Velozia stipitata* sobre úlceras gástricas experimentais em ratos. **12º. Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil,** Curitiba. 1992.

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.; CASADEVALL, A. Cryptococcosis. **Infect. Dis. Clin. N.Am.** v.16, p.837–838, 2002.

PERLIN DS, SETO-YOUNG D, MONK BC. The plasma membrane H(+)-ATPase of fungi. A candidate drug target? **Ann N Y Acad Sci.** v. 3 (834), p. 609-17. 1997.

PINA-VAZ, C.; GONÇALVES RODRIGUES, A.; PINTO, E.; COSTA-DE-OLIVEIRA, S.; TAVARES, C.; SALGUEIRO, L.; CAVALEIRO, C.; GONÇALVES, M.J.; MARTINEZ-DE-OLIVEIRA, J.; Antifungal activity of *Thymus* oils and their major compounds. **J Eur Acad Dermatol Venereol.** V. 18(1), p. 73-8. 2004.

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

PFALLER, M.A.; DIEKEMA, D.J.; MENDEZ, M.; KIBBLER, C.; ERZSEBET, P.; CHANG, S.C.; GIBBS, D.L.; NEWELL, V.A.; *Candida guilliermondii*, an opportunistic fungal pathogen with decreased susceptibility to fluconazole: geographic and temporal trends from the ARTEMIS DISK antifungal surveillance program. **J Clin Microbiol.**, V. 44(10), p.3551-6, 2006.

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

PIMENTA, A. A. J.; SILVA, S. R. S.; SILVA, G. D. F.; BARBOSA, L. C. A.; ELLENA, J.; DORIGUETO, A. C. A pentacyclic triterpene from *Maytenus imbricata*: structure elucidation by X-ray crystallography. **Structure Chemical**, v. 17, p. 149-153, 2006.

PINJON, E.; JACKSON, C.J.; KELLY, S.L.; SANGLARD, D.; MORAN, G.; COLEMAN, D.C.; SULLIVAN, D.J.; Reduced azole susceptibility in genotype 3 *Candida dubliniensis* isolates associated with increased CdCDR1 and CdCDR2 expression. **Antimicrob Agents Ch.**, V. 49, p.1312–1318. 2005.

POSTERARO, B.; SANGUINETTI, M.; SANGLARD, D.; et al. Identification and characterization of a *Cryptococcus neoformans* ATP binding cassette (ABC) transporter-encoding gene, CnAFR1, involved in the resistance to fluconazole. **Mol Microbiol.**, V. 47, p. 357–371. 2003.

PULLEN, C. B.; SCHMITZ, P.; DIETMAR, H.; MEURER, K.; BOETTCHER, T.; BAMBERG, D.; PEREIRA, A. M.; FRANÇA, S. C.; HAUSER, M.; GEERTSEMA, H.; WYK, A.; MAHMUD, T.; FLOSS, H. G.; LEISTNER. Occurrence and nondetectability of maytansinoids in individual plants of the genera *Maytenus* and *Putterlickia*. **Phytochemistry**, v. 62, p. 377-387, 2003.

RASO TF, WERTHER K, MIRANDA ET, MENDES-GIANNINI MJ. Cryptococcosis outbreak in psittacine birds in Brazil. **Med Mycol.** v 42(4).p.355-62, 2004.

REVANKAR SG, FU J, RINALDI MG, KELLY SL, KELLY DE, LAMB DC, KELLER SM, WICKES BL. Cloning and characterization of the lanosterol 14 α -demethylase (ERG11) gene in *Cryptococcus neoformans*. **Biochem Biophys Res Commun.** v. 324(2)p. 719-28, 2004.

REX JH, PFALLER MA, BARRY AL, NELSON PW, WEBB CD. Antifungal susceptibility testing of isolates from a randomized, multicenter trial of fluconazole versus amphotericin B as treatment of nonneutropenic patients with candidemia. NIAID Mycoses Study Group and the Candidemia Study Group. **Antimicrob Agents Chemother.** v.39(1).p. 40-4, 1995.

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

RODERO L, MELLADO E, RODRIGUEZ AC, SALVE A, GUELFAND L, CAHN P, CUENCA-ESTRELLA M, DAVEL G, RODRIGUEZ-TUDELA JL. G484S amino acid substitution in lanosterol 14-alpha demethylase (ERG11) is related to fluconazole resistance in a recurrent *Cryptococcus neoformans* clinical isolate. **Antimicrob Agents Chemother.** v. 47(11). p. 3653-6, 2003.

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

RODRÍGUEZ-TUDELA, J.L.; MARTINEZ-SUAREZ, J.V.; Fluconazole and amphotericin B antifungal susceptibility testing by National Committee for Clinical Laboratory Standards broth macrodilution method compared with E-test and semiautomated broth microdilution test. **J Clin Microbiol.** V. 35(1), p. 336-7, 1997.

RODRÍGUEZ-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.

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

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

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

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T.; Molecular cloning a laboratory manual 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, **Cold Spring Harbor**, N.Y., 1989.

SANGALLI-LEITE, F. “**PERFIL FENOTÍPICO E DE EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS DE *Cryptococcus neoformans* APÓS TRATAMENTO COM SUBSTÂNCIAS OBTIDAS DA PLANTA *Pterogyne nitens***” 2010. Dissertação (Mestrado em Análises Clínicas). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP-Araraquara, 2010.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A.R.; DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc Natl Acad Sci U S A.** V. 12, p.5463-7, 1977.

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.

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.

SANGLARD D, ISCHER F, CALABRESE D, MAJCHERCZYK PA, BILLE J. The ATP binding cassette transporter gene CgCDR1 from *Candida glabrata* is involved in the resistance of clinical isolates to azole antifungal agents. **Antimicrob Agents Chemother.** V. 43(11). p. 2753-65, 1999.

SANGLARD, D.; ISCHER, F.; KOYMANS, L.; BILLE, J.; Amino acid substitutions in the cytochrome P-450 lanosterol 14 α -demethylase (CYP51A1) from azole-resistant *Candida albicans* clinical isolates contribute to resistance to azole antifungal agents. **Antimicrob. Agents Chemother.** V. 42, p. 241–253, 1998.

SANGLARD, D., ISCHER, F., MONOD, M. & BILLE, J. Cloning of *Candida albicans* gene conferring resistance to azole antifungal agents: characterization of CDR2, a new multidrug ABC transporter gene. **Microbiology**, v. 143, p. 405-416, 1997.

SANTOS-OLIVEIRA, R.; COULAUD-CUNHA, S.; COLAÇO, W.; Revisão da *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek, Celastraceae. Contribuição ao estudo das propriedades farmacológicas. **Brazilian Journal of Pharmacognosy.** V. 19, p. 650-659, 2009.

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

SILVA, S. R. S.; SILVA, G. D. F.; BARBOSA, L. C. A.; DUARTE, L. P.; VIEIRA FILHO, S. A. Lupane pentacyclic triterpenes isolated from stems and branches of *Maytenus imbricata* (Celastraceae). **Helvetica Chimica Acta**, v. 88, p. 1102-1109, 2005.

SINGH, B.; DUBEY, M.M.; Estimation of triterpenoids from *Heliotropium maifolium* Kohen ex Retz *in vivo* and *in vitro*: antimicrobial screening. **Phytother Res.**, V. 15, p. 231-234, 2001.

SNELDERS, E.; VAN DER LEE, H.A.; KUIJPERS, J.; RIJS, A.J.; VARGA, J.; SAMSON, R.A.; MELLADO, E.; DONDEERS, A.R.; MELCHERS, W.J.; VERWEIJ, P.E.; Emergence of azole resistance in *Aspergillus fumigatus* and spread of a single resistance mechanism. **PLoS Med.** V. 11, p. e219. 2008.

SANTOS, V.L DOS; COSTA, V.B.M.; AGRA, M.F.; SILVA, B.A.; BATISTA, L.M.; Pharmacological studies of ethanolic extracts of *Maytenus rigida* Mart (Celastraceae) in animal models. **Rev. bras. farmacogn.**, v.17, p. 336-342. 2007.

SANTOS WR, MEYER W, WANKE B, COSTA SP, TRILLES L, NASCIMENTO JL, MEDEIROS R, MORALES BP, BEZERRA CDE C, MACÊDO RC, FERREIRA SO, BARBOSA GG, PEREZ MA, NISHIKAWA MM, LAZÉRA MDOS S. Primary endemic *Cryptococcosis gattii* by molecular type VGII in the state of Pará, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** v. 103(8). p. 813-8, 2008.

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

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

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

SHENG C, MIAO Z, JI H, YAO J, WANG W, CHE X, DONG G, LU J, GUO W, ZHANG W. Three-dimensional model of lanosterol 14 alpha-demethylase from *Cryptococcus neoformans*: active-site characterization and insights into azole binding. **Antimicrob Agents Chemother.** v. 53(8)p. 3487-95, 2009.

SHENG, C.; ZHANG, W.; ZHANG M.; SONG Y.; H. JI, J. ZHU, J. YAO, J. YU, S. YANG, Y. ZHOU, AND J. LU. Homology modeling of lanosterol 14 α -demethylase of *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus* and insights into the enzymesubstrate interactions. **J. Biomol. Struct. Dyn.** V. 22, p. 91–99, 2004.

SILVA, PR.; RABELO, RA.; TERRA, AP.; TEIXEIRA, D.N.; Susceptibility to antifungal agents among *Cryptococcus neoformans* varieties isolated from patients at a university hospital. **Rev Soc Bras Med Trop.** V. 41(2), p.158-62, 2008.

SHI, M.; LI, S.S.; ZHENG, C.; JONES, G.J.; KIM, K.S.; ZHOU, H.; KUBES, P.; MODY, C.H. Real-time imaging of trapping and urease-dependent transmigration of *Cryptococcus neoformans* in mouse brain. **J. Clin. Invest.**, 3;120(5):1683-93, 2010.

SHIROTA, O.; SEKITA, S.; SATAKE, M.; MORITA, H.; TAKEYA, K.; ITOKAWA, H. Two cangorosin A type triterpene dimers from *Maytenus chuchuhuasca*. **Chemical Pharmacological**, v. 52, n. 9, p. 1148-1150, 2004a.

SHIROTA, O.; SETSUKO, S.; MOTOYOSHI, S.; MORITA, H.; TAKEYA, K.; ITOKAWA, H.; Two new sesquiterpene pyridine alkaloids from *Maytenus chuchuhuasca*. **Heterocycles**, v. 63, n. 8, p. 1891-1896, 2004b.

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

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

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

SUNG, W.S.; LEE, D.G.; In vitro candidacidal action of Korean red ginseng saponins against *Candida albicans*. **Biol Pharm Bull.** V. 31(1), p. 139-42, 2008.

THAKUR, R; SARMA, S; KUSHWAHA S. Prevalence of HIV-associated cryptococcal meningitis and utility of microbiological determinants for its diagnosis in a tertiary care center. **Indian J Pathol Microbiol.** v. 51(2) p. 212-4.2008

TANAKA, N.; OOBA, N.; DUAN, H.; TAKAISHI, Y.; NAKANISHI, Y.; BASTOW, K.; LEE, KUO-HSIUNG. Kaurane and abietane diterpenoids from *Tripterygium doianum* (Celastraceae). **Phytochemistry**, v. 65, p. 2071-2076, 2004.

TORELLI R, POSTERARO B, FERRARI S, LA SORDA M, FADDA G, SANGLARD D, SANGUINETTI M. The ATP-binding cassette transporter-encoding gene CgSNQ2 is contributing

to the CgPDR1-dependent azole resistance of *Candida glabrata*. **Mol Microbiol** v. 68(1)p.186-201, 2008

TRILLES, L.; LAZÉRA, M. S.; WANKE, B.; OLIVEIRA, R.V.; BARBOSA, G.G.; NISHIKAWA, M.M.; MORALES, B.P.; MEYER, W. Regional pattern of the molecular types of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz.**, v.103, p.455-62, 2008.

VANDEPUTTE, P.; LARCHER G.; BERGES, T.; RENIER, G.; CHABASSE D.; BOUCHARA, J.P.; Mechanisms of azole resistance in a clinical isolate of *Candida tropicalis*. **Antimicrob Agents Ch.**, V. 49, p. 4608–4615, 2005.

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

VERMITSKY JP, EDLIND TD. Azole resistance in *Candida glabrata*: coordinate upregulation of multidrug transporters and evidence for a Pdr1-like transcription factor. **Antimicrob Agents Chemother.** v 48(10). p. 3773-81, 2004.

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. 23(4). p. 216-20, 2006.

VILEGAS, W.; LEITE, J.P.; RASTRELLI, L.; ROMUSSI, G.; OLIVEIRA, A.B.; VILEGAS, J.H.Y.; PIZZA, C. Isolation and HPLC quantitative analysis of flavonoid glycosides from Brazilian beverages (*Maytenus ilicifolia* and *Maytenus aquifolium*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 3796-3801, 2001.

VILEGAS W, SANOMMIYA M., RASTRELLI L, PIZZA C. Isolation and structure elucidation of two new flavonoid glycosides from the infusion of *Maytenus aquifolium* leaves. Evaluation of the antiulcer activity of the infusion. **J Agric Food Chem** 47: 403-406, 1999.

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.

WHITE, T.C.; The presence of an R467K amino acid substitution and loss of allelic variation correlate with an azole-resistant lanosterol 14 α demethylase in *Candida albicans*. **Antimicrob Agents Chemother.**, V. 41(7), p.1488-94, 1997.

WIRSCHING, S.; MORAN, G.P.; SULLIVAN, D.J.; COLEMAN, D.C.; MORSCHHAUSER, J.; MDR1-mediated drug resistance in *Candida dubliniensis*. **Antimicrob Agents Ch.**, V. 45, p. 3416–3421, 2001.

WU, CC.; CHAN, ML.; CHEN, WY.; TSAI, CY.; CHANG, FR.; WU, YC.; Pristimerin induces caspase-dependent apoptosis in MDA-MB-231 cells via direct effects on mitochondria. **Mol Cancer Ther.**, V. 4(8), p.1277-85. 2005.

VELLOSA, J. C. R.; FORMENTON, V. A. F.; XIMENES, V. F.; FONSECA, L. M.; FURLAN, M.; BRUNETI, I. L.; OLIVEIRA, O. M. M. F. Antioxidant activity of *Maytenus ilicifolia* root bark. *Fitoterapia*, v. 77, p. 243-245, 2006.

VENKATESWARLU, K., M. TAYLOR, N. J. MANNING, M. G. RINALDI, AND S. L. KELLY. Fluconazole tolerance in clinical isolates of *Cryptococcus neoformans*. **Antimicrob. Agents Chemother.** V. 41, p. 748–751. 1997.

XIA, W. J.; LI, D. R.; SHI, L.; TU, Y. Q. A novel approach for construction of the naturally occurring dihydroagarofuran sesquiterpene skeleton. **Tetrahedron Letters**, v. 43, n. 4, p. 627-630, 2002.

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

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

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

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

ZONIOS DI, BENNETT JE. Update on azole antifungals. **Semin Respir Crit Care Med**. v. 29(2), p. 198-210, 2008.