



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA MÉDICA

ELIZABETH RIBEIRO YOKOBATAKE SOUZA

**ATIVIDADE ANTIFÚNGICA *IN VITRO* DE ESTATINAS SOBRE ESPÉCIES  
DE *CANDIDA* E *CRYPTOCOCCUS***

FORTALEZA  
2011

ELIZABETH RIBEIRO YOKOBATAKE SOUZA

ATIVIDADE ANTIFÚNGICA *IN VITRO* DE ESTATINAS SOBRE ESPÉCIES DE  
*CANDIDA* E *CRYPTOCOCCUS*

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre. Área de concentração: Microbiologia Humana e Animal.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante.  
Coorientador: Prof. Dr. José Júlio Costa Sidrim.

FORTALEZA

2011

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca de Ciências da Saúde

- 
- Y53a Yokobatake-Souza, Elizabeth Ribeiro  
Atividade antifúngica in vitro de estatinas sobre espécies de *Candida* e *Cryptococcus* /  
Elizabeth Ribeiro Yokobatake Souza. - 2011.  
96 f. : il.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de  
Pós-graduação em Microbiologia Médica, 2011.  
Orientação: Profa. Dra. Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante  
Coorientação: Prof. Dr. José Júlio Costa Sidrim
1. Inibidores de Hidroximetilglutaril-CoA Redutases 2. Antifúngicos 3. *Candida* 4.  
*Cryptococcus* I. Título.

---

CDD 616.9041

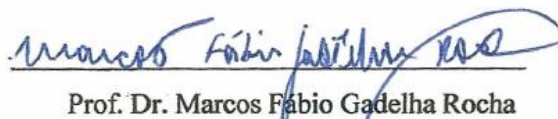
ELIZABETH RIBEIRO YOKOBATAKE SOUZA

ATIVIDADE ANTIFÚNGICA *IN VITRO* DE ESTATINAS SOBRE ESPÉCIES DE *CANDIDA* E *CRYPTOCOCCUS*

Dissertação submetida ao Curso de Pós-Graduação em Microbiologia Médica, do Departamento de Patologia e Medicina Legal, da Faculdade de Medicina, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre. Área de concentração: Microbiologia Humana e Animal.

Data da Defesa: 29 /09 /2011

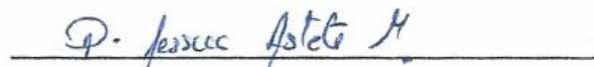
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Marcos Fábio Gadelha Rocha

Faculdade de Veterinária

Universidade Estadual do Ceará (UECE)



Dr. Délia Jessica Astete Medrano

Hospital Universitário Walter Cantídio

Universidade Federal do Ceará (UFC)



Prof. Dr. José Júlio Costa Sidrim

Faculdade de Medicina

Universidade Federal do Ceará (UFC)



Prof. Dr. Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante

(orientadora)

Faculdade de Medicina

Universidade Federal do Ceará (UFC)

Ao meu esposo Fernando Lourenço de Souza e aos  
nossos filhos: Israel, Fernanda, Raul e Carolina.

Dedico

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por minha vida feliz, repleta de oportunidades, e por mais esta conquista.

Ao meu marido, por seu companheirismo, seu apoio e sua compreensão.

Aos meus filhos por todo amor, apoio, carinho e silêncio em casa.

Ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica, da Faculdade de Medicina, da Universidade Federal do Ceará.

À Professora Aparecida Tiemi Nagao Dias, por seus ensinamentos, seu exemplo, por sua humanidade e principalmente, por sua compreensão.

À todos os amigos que estiveram ao meu lado durante esses dois anos, em especial a Isabelle Joyce de Lima Silva Fernandes, Francisco Fábio Martins de Oliveira, Ana Paula Santos do Carmo, Paula Brito e Cabral, Thially Braga Gonçalves.

Ao Professor José Júlio Costa Sidrim, por seu apoio, pela sua orientação, e por acreditar em meu potencial.

Ao Professor Marcos Fábio Gadelha Rocha pela orientação e paciência.

À Professora Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante, pelos ensinamentos.

À Professora Rossana Aguiar Cordeiro, por sua simpatia e apoio constantes.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica, em especial, ao Professor André Jalles Monteiro, por seu apoio estatístico e a professora Cibele Barreto Mano de Carvalho, por seu carinho e paciência.

À Érica Pacheco Caetano e à Débora Castelo Branco Colares Maia, por toda a dedicação, paciência, e orientações, agradeço imensamente.

À toda a equipe do CEMM, pelo apoio, pelos sorrisos, pelos abraços, e por todo carinho em que fui recebida todos os dias em que realizei minha pesquisa, especialmente a Terezinha de Jesus Santos Rodrigues, Daniel Teixeira Lima, Monalisa da Cunha Costa, Carlos Eduardo Cordeiro Teixeira, Kylvia Rocha de Castro e Silva, Rita Amanda Chaves de Lima, Juliana Fernandes, Francisca Jakelyne de Farias Marques, Livia Gurgel do Amaral Valente, Manoel Paiva de Araújo Neto, George Candido, Joyce Fonteles Ribeiro, Kharla Kharolyni Nobre Rabelo Patoilo, Thereza de Jesus Pinheiro Gomes Bandeira, Charles Ielpo.

A Carolinda Vilma Soares de Oliveiral, por todos os auxílios imagináveis e inimagináveis, pela imensa paciência, pela sensibilidade, respeito, amor e carinho com que sempre se dirigiu a mim.

A todos os amigos do Hospital Universitário Walter Cantídio e do Hemoce, por seu apoio e auxílio nas horas difíceis.

## RESUMO

O aumento nos últimos anos de indivíduos imunocomprometidos, como portadores da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida, de doenças malignas, transplantados e outros usuários de terapias imunossupressoras, favorece o surgimento de infecções oportunistas, principalmente as de teor fúngico, como a candidíase e a criptococose. Apesar de a terapia antifúngica atual ser eficiente na maioria dos casos, algumas vezes fazem-se necessárias novas drogas que atuem como alternativa ou como coadjuvantes no tratamento para potencializar o efeito dos antifúngicos utilizados. As estatinas são fármacos hipolipemiantes mais prescritos mundialmente para doenças cardiovasculares. Entretanto, recentemente, tem sido descritos outros efeitos benéficos destas drogas, como, por exemplo, o controle de infecções. Este trabalho teve como objetivo determinar a atividade antifúngica *in vitro* das estatinas ante 51 cepas de *Candida*, sendo 16 de *C. albicans*, 11 de *C. krusei*, 12 de *C. tropicalis* e 12 de *C. parapsilosis*, e 25 cepas de *Cryptococcus*, sendo 12 de *C. gattii* e 13 de *C. neoformans*, por meio de testes de microdiluição em caldo, segundo documento M27-A3 padronizado pelo CLSI. O intervalo de concentração testado para pravastatina foi de 50 a 0,0977 mg/mL, para sinvastatina, 1 a 0,0020 mg/mL e para atorvastatina, 10 a 0,0200 mg/mL. Pravastatina inibiu 37 leveduras do gênero *Candida* apresentando concentração inibitória mínima (CIM) na faixa de 1,56 a 6,25 mg /mL e as cepas restantes não foram inibidas mesmo na maior concentração testada (50 mg /mL), enquanto que sinvastatina e atorvastatina apresentaram atividade antifúngica sobre todas as 51 cepas avaliadas, apresentando CIMs de 0,02 a 1 mg / mL e 0,04 a 5,00 mg / mL, respectivamente. Para o gênero *Cryptococcus*, apenas 4 cepas foram inibidas ante a pravastatina (CIM = 25 mg / mL), por outro lado, sinvastatina inibiu todas as 25 cepas (CIM = 0,06 a 1 mg / mL), e atorvastatina apenas 8 cepas (CIM = 0,62 a 2,5 mg / mL), sendo que as 17 restantes não foram inibidas mesmo na maior concentração testada ( $\geq 10$  mg / mL). Foi determinada concentração fungicida mínima (CFM) de pravastatina sobre 15 cepas do gênero *Candida* (CFM = 3,12 a 25 mg / mL), de sinvastatina sobre 34 cepas (CFM = 0,03 a 1 mg / mL), e de atorvastatina sobre 16 cepas (CFM = 0,04 a 0,31 mg / mL). Para o gênero *Cryptococcus*, das 25 cepas testadas, pravastatina exibiu CFM sobre apenas 3 cepas (CFM = 50 mg / mL), sinvastatina sobre 21 cepas (CFM = 0,12 a 1 mg / mL), e atorvastatina sobre 1 cepa (CFM = 1 mg / mL). Esta atividade inibitória *in vitro* de estatinas sobre espécies de *Candida* e *Cryptococcus*, abre uma perspectiva importante para a investigação do possível uso destas drogas com finalidade antifúngica *in vivo*.

Palavras-chave: Inibidores de Hidroximetilglutaril-CoA Redutases. Antifúngicos. *Candida*. *Cryptococcus*.

## ABSTRACT

In the past years, fungal opportunistic infections, especially, candidiasis and cryptococcosis, have become more frequent because of the increase in the number of immunocompromised individuals, such as AIDS, transplant and cancer patients and those that are on immunosuppressive therapy. In spite of being effective, sometimes it is necessary to use new drugs as alternatives or as adjuvants in order to potentiate the effect of the classical antifungal therapy. Statins are the most prescribed hypolipemiant drugs worldwide for preventing cardiovascular diseases. However, other benefic effects for these drugs have been described, such as the control of infections. This work aimed at determining the antifungal activity of statins against *Candida* spp. and *Cryptococcus* spp. The minimum inhibitory concentrations (MICs) for three different statins (pravastatin, simvastatin and atorvastatin) were determined against 51 strains of *Candida* spp. (16 *C. albicans*, 11 *C.krusei*, 12 *C. tropicalis* and 12 *C. parapsilosis*) and 25 strains of *Cryptococcus* spp. (12 *C. gattii* and 13 *C. neoformans*), through broth microdilution assay, according to the Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI - Document M27-A3). The concentration tested for pravastatin ranged from 50 to 0.0977 mg/mL, for simvastatin, it ranged from 1 to 0.0020 mg/mL and, for atorvastatin, it varied from 10 to 0.0200 mg/mL. Pravastatin inhibited 37 *Candida* strains, with MICs varying from 1.56 to 6.25 mg/mL and the remaining strains were not inhibited, even at the highest concentration tested (50 mg/mL). Simvastatin and atorvastatin, on the other hand, inhibited all 51 *Candida* strains evaluated, presenting MICs ranging from 0.02 to 1 mg/mL and from 0.04 to 5 mg/mL, respectively. Concerning *Cryptococcus* spp., only four strains were inhibited by pravastatin (MIC=25 mg/mL), while all 25 strains were inhibited by simvastatin ( $0.06 \leq \text{MIC} \leq 1$  mg/mL) and eight were inhibited by atorvastatin ( $0.62 \leq \text{MIC} \leq 2.5$  mg/mL) and the remaining 17 were not susceptible to the highest atorvastatin concentration tested (10 mg/mL). The minimum fungicidal concentrations (MFCs) for the tested statins were also determined. The MFC for pravastatin against *Candida* spp. was determined against 15 strains ( $3.12 \leq \text{MFC} \leq 25$  mg/mL). The MFC values for simvastatin were determined for 34 strains of *Candida* spp. ( $0.03 \leq \text{MFC} \leq 1$  mg/mL), while those for atorvastatin were determined against 16 strains ( $0.04 \leq \text{MFC} \leq 0,31$  mg/mL). Concerning *Cryptococcus* spp., the 25 strains tested, MFC values for pravastatin were found against three strains (MFC=50 mg/mL), while those for simvastatin were determined against 21 strains ( $0.12 \leq \text{MFC} \leq 1$  mg/mL) and those for atorvastatin were determined against one single strain (MFC=1 mg/mL). This *in vitro* inhibitory activity of statins against *Candida* spp. and *Cryptococcus* spp. creates an important perspective for the use of these drugs *in vivo* in order to control fungal infections.

Keywords: Hydroxymethylglutaryl-CoA Reductases Inhibitor. Antifungals. *Candida*. *Cryptococcus*.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Micromorfologia de <i>C. albicans</i> em ágar fubá. Presença de pseudo-hifas, blastoconídios e clamidoconídio (seta).....	17
Figura 2 –	CHROMágar <i>Candida</i> ®. Identificação de espécies de levedura do gênero <i>Candida</i> por meio do CHROMágar <i>Candida</i> ®. Placa com crescimento de <i>C. albicans</i> (verde), <i>C. tropicalis</i> (azul) e <i>Candida</i> spp. (lilás).....	18
Figura 3 –	Aspecto microscópico do <i>Cryptococcus</i> corado pela tinta da China, evidenciando a cápsula polissacarídica.....	22
Figura 4 –	<i>Cryptococcus neoformans</i> em ágar-Sabouraud 2% de glicose, apresentando colônias mucóides, de coloração creme.....	23
Figura 5 –	Estrutura química da mevastatina.....	29
Figura 6 –	Estrutura química da pravastatina.....	29
Figura 7 –	Estrutura química da sinvastatina.....	30
Figura 8 –	Estrutura química da atorvastatina.....	30
Figura 9 –	Biossíntese do ergosterol e do colesterol, mostrando as principais etapas.....	31
Figura 10 –	Estruturas moleculares do colesterol (a) e do ergosterol (b). As setas indicam partes das moléculas que são importantes para o crescimento celular.....	32
Figura 11 –	Biossíntese do colesterol com consequente isoprenilação das proteínas Rho e Ras, que inibe a formação da eNOS e activa a NAD(P)H oxidase. Abreviaturas: eNOS- sintetase de óxido nítrico das células endoteliais; HMG-CO- 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A; NAD(P)H- Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato.....	34
Figura 12 –	Mecanismo do aumento da eNOS pelas estatinas. As estatinas modulam a expressão da eNOS por três mecanismos principais: (1) aumento da estabilidade do mRNA da eNOS através da inibição da isoprenilação da Rho; (2) aumento da fosforilação da eNOS, via PI3-cinase; (3) aumento da actividade da eNOS por meio da redução da abundância da caveolina-1. Abreviaturas: eNOS- sintetase de óxido	

	nítrico das células endoteliais GDPguanosina difosfato GTP guanosinatrifosfato NO- óxido nítrico PI3K- fosfatidilinositol-3-cinase ROCK-Rho cinase ROS- espécies reativas do oxigênio.....	36
Figura 13 –	Comparação da CIM da droga pravastatina sobre as espécies sensíveis no intervalo de concentração testado.....	48
Figura 14 –	Comparação da CIM da droga sinvastatina sobre as espécies sensíveis no intervalo de concentração testado.....	49
Figura 15 –	Comparação da CIM da droga atorvastatina sobre as espécies sensíveis no intervalo de concentração testado.....	50
Figura 16 –	Valores médios de CIM entre as espécies e as drogas testadas.....	51
Figura 17 –	Comparação da CFM da droga pravastatina sobre as espécies sensíveis no intervalo de concentração testado.....	53
Figura 18 –	Comparação da CFM da droga sinvastatina sobre as espécies sensíveis no intervalo de concentração testado.....	53
Figura 19 –	Comparação da CFM da droga atorvastatina sobre as espécies sensíveis no intervalo de concentração testado.....	54

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Intervalo de concentração das estatinas testadas ante leveduras dos gêneros <i>Candida</i> e <i>Cryptococcus</i> .....	45
Tabela 2 -	Análise da CFM encontrada entre as espécies e as estatinas testadas.....	52
Tabela 3 -	CIM e CFM de estatinas frente a leveduras do gênero <i>Candida</i> e <i>Cryptococcus</i> . Abreviatura: NT: não testada.....	82
Tabela 4 -	Estatísticas básicas da CIM entre as drogas e as espécies testadas.....	84

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CEMM	Centro Especializado em Micologia Médica
CFM	Concentração Fungicida Mínima
CGB	Canavanina, glicina e azul de bromotimol
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CYP	Citocromo P 450
DMSO	Dimetilsulfóxido
HMG-CoA	Hidroxi-Metil-Glutaril-Coenzima A
LDL	<i>Low Density Lipoproteins</i>
MOPS	Ácido 3-[N-morfolino] propanosulfônico
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	12
1.1	<b>O gênero <i>Candida</i>.....</b>	12
1.1.1	<b>Manifestações clínicas da candidíase.....</b>	14
1.1.2	<b>Identificação laboratorial do gênero <i>Candida</i>.....</b>	16
1.2	<b>O gênero <i>Cryptococcus</i>.....</b>	19
1.2.1	<b>Manifestações clínicas da criptococose.....</b>	21
1.2.2	<b>Identificação laboratorial do gênero <i>Cryptococcus</i>.....</b>	22
1.3	<b>Teste de sensibilidade à antifúngicos.....</b>	25
1.4	<b>Prospecção de novas drogas antifúngicas.....</b>	27
1.4.1	<b>Estatinas.....</b>	28
1.4.2	<b>Aspectos farmacológicos das estatinas.....</b>	32
2	<b>PERGUNTAS DE PARTIDA.....</b>	41
3	<b>HIPÓTESES CIENTÍFICAS.....</b>	41
4	<b>OBJETIVOS.....</b>	42
4.1	<b>Objetivos gerais.....</b>	42
4.2	<b>Objetivos específicos.....</b>	42
5	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	43
5.1	<b>Teste de sensibilidade <i>in vitro</i>.....</b>	43
5.1.1	<b>Microrganismos.....</b>	43
5.1.2	<b>Preparo das drogas utilizadas.....</b>	43
5.1.3	<b>Preparo do inóculo das cepas do gênero <i>Candida</i> e <i>Cryptococcus</i>.....</b>	44
5.1.4	<b>Microdiluição em caldo.....</b>	44
5.2	<b>Determinação da Concentração Inibitória Mínima.....</b>	45
5.3	<b>Determinação da Concentração Fungicida Mínima.....</b>	45
5.4	<b>Análise estatística.....</b>	46
6	<b>RESULTADOS.....</b>	47
7	<b>DISCUSSÃO.....</b>	55
8	<b>CONCLUSÃO.....</b>	61
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	62
	<b>ANEXOS.....</b>	82

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 O gênero *Candida*

O gênero *Candida* pertence ao reino Fungi; filo Ascomycota; classe Saccharomycetes; ordem Saccharomycetales; família Saccharomycetaceae (TAXONOMIA NCBI; 2011), compreendendo aproximadamente 200 espécies (GIOLO; SVIDZINSKI, 2010).

A primeira documentação que relacionou leveduras do gênero *Candida* como patógenos é atribuída a Langenbeck, em 1839, quando as observou e isolou de aftas bucais de um paciente com tifo (SIDRIM; ROCHA, 2004).

Algumas espécies fazem parte da microbiota humana, podendo ser isoladas do trato genital feminino e sistema digestório, incluindo orofaringe, reto e períneo (ALONSO-VALLE, 2003). Estas e outras espécies podem também ser isoladas de animais, solo, água, alimentos, vegetais, atmosfera e ambientes hospitalares, entre outros (GIOLO; SVIDZINSKI, 2010). A fonte endógena, entretanto, é a de maior importância para desenvolvimento de doença em humanos (MORETTI et al., 2000; SAMOUR; NALDO, 2002; KLAPHAKE; CLANCY, 2005; SIDRIM; ROCHA, 2004).

A maioria das espécies de *Candida* apresenta, microscopicamente, estruturas blastoconidiadas, associadas ou não a pseudo-hifas e a pseudomicélios. As colônias crescem à temperatura ambiente, num prazo de 24 a 72 horas, apresentam-se no meio de Sabouraud como colônias de textura glabrosa e com relevo convexo, podendo apresentar variações de cerebriforme a rugosa. Sua coloração varia do branco-amarelado ao laranja, aí se observando um reverso com a mesma coloração do verso e pigmento não difusível no meio (SIDRIM; ROCHA, 2004).

Em razão da sua capacidade adaptativa, as leveduras do gênero *Candida* podem se desenvolver tanto na presença de oxigênio quanto em anaerobiose. Esses microrganismos degradam proteínas e carboidratos para obterem carbono e nitrogênio, elementos essenciais para seu desenvolvimento (GIOLO; SVIDZINSKI, 2010).

Na maioria das vezes, reproduzem-se de maneira assexuada, por brotamento simples. Espécies de *Candida*, no entanto, podem desenvolver estrutura micelial em resposta a diferentes fatores ambientais, e apresentar hifas verdadeiras, fenômeno este denominado de pleomorfismo fúngico. Não são, portanto, consideradas fungos dimórficos, pois este processo

é independente da temperatura. Pseudo-hifas também podem ser encontradas como estruturas de espécies de *Candida*, que podem ocorrer durante o brotamento simples, quando as células se alongam e tornam-se semelhantes a hifas verdadeiras (SIDRIM; ROCHA, 2004; GIOLO; SVIDZINSKI, 2010).

A mudança da *Candida* do estado comensal para o patogênico ocorre possivelmente por deficiência nos mecanismos de defesa, que é a condição biológica favorável para causar infecções e doenças ao hospedeiro ou rompimento das barreiras anatômicas, como queimaduras, cateteres ou cirurgias invasivas (DIGNANI et al., 2003; MOREIRA 2003).

Acreditava-se que as leveduras do gênero *Candida* participavam passivamente da patogênese no estabelecimento da infecção fúngica, considerando a imunidade do hospedeiro como único mecanismo responsável para o estabelecimento da infecção oportunista. Atualmente, é consenso a idéia de que esses microrganismos participam ativamente do processo fisiopatológico da doença, utilizando-se de fatores de virulência (TAMURA, et al, 2007; ZENG et al., 2008; COSTA et al., 2009).

Os principais fatores de virulência das leveduras do gênero *Candida* são: a capacidade de expressão de enzimas extracelulares, como fosfolipases (SAMARANAYAKE, 2005; COSTA et al., 2009) e proteinases, que degradam os tecidos do hospedeiro (FURLANETO-MAIA,2008) levando a quadros clínicos mais graves (IBRAHIM et al., 1995; GACSER et al., 2007; MOHAN; CORREA et al., 2009); a capacidade de adesão a células e tecidos; a formação de biofilmes sobre células e superfícies inanimadas; a produção de tubo germinativo por algumas espécies de *Candida* spp.; a produção de hemolisinas; a hidrofobicidade da superfície celular e a resistência ao peróxido de hidrogênio (CALDERONI; FONZI, 2001; GIOLO; SVIDZINSKI, 2010).

Há relatos de que a produção das estruturas micelianas (hifas) eleva a capacidade de aderência da *Candida* aos tecidos do hospedeiro em decorrência do aumento da superfície de contato, facilitando a invasão tecidual e levando à disseminação das leveduras a órgãos internos do corpo humano. Portanto, as hifas são relatadas como as formas mais virulentas, que possivelmente ocorrem como resposta ao estresse ambiental (ODDS, 1994; CALDERONI; FONZI, 2001).

As pseudo-hifas, são outras estruturas morfológicas observadas em leveduras do gênero *Candida*, produzidas durante sua reprodução por brotamento, na qual os brotos não se destacam da célula-mãe, ocorrendo, então, um encadeamento de células, cuja forma lembra uma hifa (ALMEIDA; SCULLY, 2002). O tubo germinativo é um prolongamento contínuo da

célula-mãe leveduriforme, produzido no início da filamentação, sendo considerado uma forma de transição entre a levedura e o micélio (GIOLO; SVIDZINSKI, 2010).

Estudos sugerem que as hifas, pseudo-hifas e tubos germinativos contribuem de alguma maneira para a virulência de leveduras, como, por exemplo, no caso de *C. albicans* (KUMAMOTO; VINCES, 2005). A capacidade de alteração fenotípica morfológica é um dos mais importantes mecanismos encontrados na patogênese da candidíase (CONSOLARO et al., 2005; DAMBROSO et al., 2009).

### **1.1.1 Manifestações clínicas da candidíase**

Infecções por *Candida* spp. envolvem um espectro amplo de doenças superficiais e invasivas, acometendo pacientes expostos a uma grande diversidade de fatores de risco. Infecções de pele e mucosas podem ser documentadas em pacientes saudáveis, mas com pequenas alterações de natureza imunológica no sítio da infecção, a exemplo de mulheres que desenvolvem candidíase vaginal. Por outro lado, infecções sistêmicas por *Candida* spp. podem comprometer vísceras como resultado da disseminação hematogênica da levedura pelo organismo. Estas complicações são geralmente documentadas em pacientes críticos, imunossuprimidos, portadores de doenças degenerativas crônicas e/ou neoplásicas (DIGNANI et al., 2003; COLOMBO, 2003; GIOLO; SVIDZINSKI, 2010).

Em seres humanos, as espécies mais frequentemente implicadas em quadros clínicos são *C. albicans*, predominante em todo o mundo, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*, na América Latina, e *C. glabrata* nos Estados Unidos da América (PALACIO; VILLAR; ALHAMBRA, 2009; MAIA, 2009).

As candidíases podem ser divididas em três grandes grupos: candidíase cutâneo-mucosa, candidíase sistêmica ou visceral e candidíase alérgica (SIDRIM; ROCHA, 2004).

A candidíase cutâneo-mucosa inclui quadros clínicos nos quais se observam acometimentos de pele, unhas e mucosas orofaríngeas e genitais, como na candidíase oral, onicomicose, vulvovaginite, candidíase intertriginosa, balanopostite e candidíase cutâneo-mucosa crônica (SIDRIM; ROCHA, 2004).

A candidíase oral e/ou esofágica é uma das manifestações clínicas de maior frequência e, em muitos casos, a primeira manifestação de infecção oportunista em pacientes portadores do vírus da Síndrome de Imunodeficiência Adquirida (aids) (GUPTA; EHRINPREIS, 1990; DUPONT et al., 1992; BODEY, 1993; DUBE et al., 1994; PFALLER; BARRY, 1994).



A incidência de infecções fúngicas sanguíneas, principalmente as candidemias, aumentou consideravelmente nas últimas décadas (EGGIMANN et al., 2003; MARTIN et al., 2003; SEON- SOOK et al., 2010). Basseltti et al., (2003), revelaram que a incidência de candidemia aumentou de 1,25 episódio em 10.000 pacientes por ano em 1999 para 3,06 em 2003. Além disso, a candidemia é situada nos Estados Unidos como quarta causa de infecção sanguínea nosocomial e é associada a elevada mortalidade (WISPLINGHOFF et al., 2004; FORREST et al., 2010; SEON- SOOK et al., 2010).

A maioria dos casos de infecções invasivas é causada por *C. albicans*, representando de 50% a 70% (MOREIRA, 2003), a qual é considerada a principal levedura patogênica oportunista, por ser a espécie mais frequentemente isolada em humanos. Nas últimas décadas, porém, é observado aumento de outras espécies, de *Candida* não *albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. glabrata*, entre outras (GIOLO; SVIDZINSKI, 2010). Dentre essas espécies, as mais comumente isoladas em amostras de sangue venoso de pacientes hospitalizados são *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. glabrata* (CHANG et al, 2008; PALACIO; VILLAR; ALHAMBRA, 2009; MAIA, 2009).

No Brasil, em 2003, Colombo et al. conduziram estudo epidemiológico, reunindo dados sobre infecções de corrente sanguínea documentadas em quatro hospitais da cidade de São Paulo, durante um período de 12 meses (março-2002 a fevereiro-2003). Um total de 7.038 episódios de bacteremias e fungemias foi avaliado, sendo que *Candida* spp. responderam por 4,3 % do total das infecções de corrente sanguínea.

Em 2006, Colombo et al., publicaram um estudo envolvendo onze hospitais de nível terciário em 9 cidades brasileiras, e detectaram 712 casos de candidemia, sendo que *Candida* spp. representou o 4º patógeno mais identificado nas hemoculturas realizadas. Na distribuição das espécies de *Candida* isoladas nas amostras deste estudo feito em 2003 e 2004, *C. albicans* foi a espécie mais comum (291 casos; 41%), seguida de *C. tropicalis* (149 casos; 21%) e *C. parapsilosis* (146 casos; 21%).

Em 2006, Medrano et al., realizou uma análise retrospectiva de casos de candidemia em um hospital brasileiro na cidade de Fortaleza, Ceará. Um total de 50 hemoculturas foram analisadas de 40 pacientes com candidemia. O diagnóstico micológico foi baseado na análise fenotípica e os dados dos pacientes foram registrados em arquivos apropriados. As espécies mais frequentes foram *Candida parapsilosis* (n=18), seguido por *C. albicans* (n=14), *C. tropicalis* (n=8), *C. guilliermondii* (n=6), *C. glabrata* (n=2), e *Candida* spp. (n=2). Um estudo descritivo foi realizado com 21 pacientes cujos prontuários estavam

completos. Os episódios de candidemia aconteceram em oito pacientes do sexo masculino e treze do sexo feminino.

No Brasil, os dados obtidos demonstraram que candidemia também é uma complicação infecciosa encontrada em pacientes portadores de diferentes doenças degenerativas ou neoplásicas, internados por períodos prolongados e submetidos a procedimentos invasivos, antibioticoterapia prolongada e de amplo espectro e quimioterápicos (COLOMBO et al, 2003; MEDRANO et al, 2006).

O principal mecanismo de transmissão da candidemia é pela via endógena, na qual espécies de *Candida* que constituem a microbiota de vários sítios anatômicos, sob condições de debilidade do hospedeiro, comportam-se como patógenos oportunistas (COLOMBO; GUIMARÃES, 2003). Métodos de genotipagem mostram a similaridade entre cepas colonizantes e infectantes, comprovando a provável origem endógena da maioria das infecções por tais patógenos (COLOMBO; GUIMARÃES, 2003).

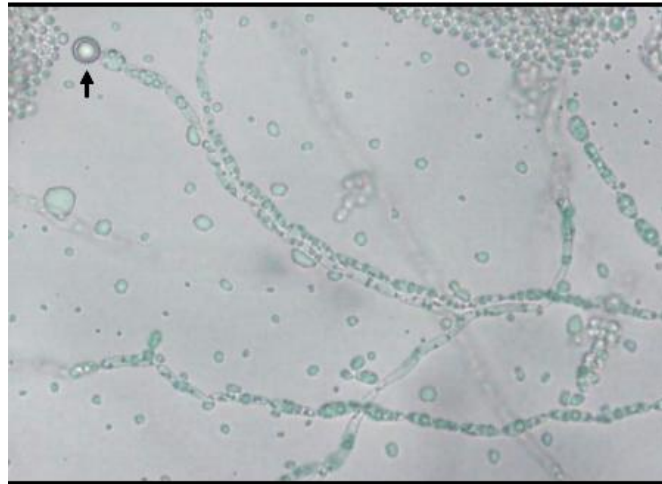
Outro mecanismo para transmissão é pela via exógena, ocorrente em especial, por meio das mãos de profissionais da saúde que cuidam dos pacientes. Também estão envolvidos materiais médico-hospitalares, como cateteres e soluções intravenosas que estejam contaminadas por fungos (EGGIMANN et al., 2003; GIOLO; SVIDZINSKI, 2010).

### **1.1.2 Identificação laboratorial do gênero *Candida***

A identificação de leveduras do gênero *Candida* é baseada em várias provas que avaliam as características morfológicas e bioquímicas desses microrganismos, exames diretos com KOH 10-40%, *imprints* e cortes histológicos corados para observação das estruturas fúngicas (SIDRIM; ROCHA, 2004). Outros testes também são utilizados rotineiramente, produção do tubo germinativo, microcultivo em ágar fubá-tween 80, assimilação de carboidratos ou de nitrogênio e fermentação dos carboidratos (LACAZ, 2002; BRITO et al., 2009; GIOLO; SVIDZINSKI, 2010).

Microcultivo em placa, utilizando ágar arroz ou ágar fubá (figura 1) acrescido de tween 80, permite a identificação definitiva para muitas espécies de *Candida* spp., uma vez que formam estruturas específicas, como hifas e pseudo-hifas, dispostas em padrões característicos para cada espécie (GUÉHO et al., 1993; DE HOOG et al., 2000; MILAN, 2004).

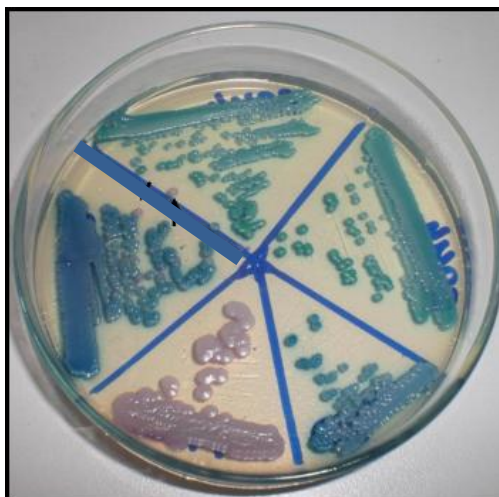
Figura 1 - Micromorfologia de *C. albicans* em ágar fubá. Presença de pseudo-hifas, blastoconídios e clamidoconídio (seta)



Fonte: CEMM, (2011).

Da década de 1990 em diante, foram surgindo meios de cultura cromogênicos que auxiliam na triagem de leveduras patogênicas do gênero *Candida*, diferenciando as colônias conforme a cor produzida e facilitando a detecção de culturas mistas. Essa ferramenta pode também ser utilizada com o intuito de fornecer preliminarmente um laudo rápido para o clínico, para que a intervenção terapêutica seja imediata (MIMICA et al. 2009; GIOLO; SVIDZINSKI, 2010). O CHROMágar Candida® é um meio cromatogênico que permite a identificação não só de *Candida albicans*, como também de *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. krusei* e *C. tropicalis* (ODDS; DAVIDSON, 2000). Apresenta substrato cromogênico, metabolizado por diferentes enzimas de *Candida* sp, como a  $\beta$ -glucosaminidase, o que permite uma distinta coloração entre as colônias, verde para *C. albicans*, azul para *C. tropicalis* e rosa para *C. krusei* (FOX et al., 1991; NEWMAN et al., 1994; DRONDA et al., 1996; COOKE et al., 2002).

Figura 2 - CHROMágar *Candida*®. Identificação de espécies de levedura do gênero *Candida* por meio do CHROMágar *Candida*®. Placa com crescimento de *C. albicans* (verde), *C. tropicalis* (azul) e *Candida* spp. (lilás)



Fonte: CEMM., 2011.

A realização da prova da urease em meio uréia de Christensen, que permite a detecção colorimétrica da enzima, determina a qual divisão pertence o microrganismo, sendo a divisão Ascomycota (*Candida* spp. e *Saccharomyces* spp.) urease negativa e a Basidiomycota (*Cryptococcus* spp., *Trichosporon* spp. e *Rhodotorula* spp.) urease positiva (DE HOOG et al., 2000; MAIA, 2009).

Sistemas automatizados e semiautomatizados facilitam a identificação das leveduras (SANGUINETTI et al., 2007; VALENZA et al. 2008; GIOLO; SVIDZINSKI, 2010), por meio de painéis manuais e automatizados, através da capacidade assimilativa em substratos bioquímicos e enzimáticos, os quais são de realização e interpretação fáceis, além de oferecer o resultado em tempo menor (FENN et al., 1994; SAND; RENNIE, 1999).

Em razão das limitações decorrentes do uso das técnicas diagnósticas tradicionais, ainda há necessidade de desenvolvimento de outros métodos, que permitam um diagnóstico rápido, sensível, preciso e confiável. Com efeito, as técnicas moleculares, como a reação em cadeia da polimerase (PCR), podem ser uma boa opção (AHMAD et al., 2002; GIOLO; SVIDZINSKI, 2010).

## 1.2 O gênero *Cryptococcus*

O gênero *Cryptococcus* pertence ao reino Fungi; filo Basidiomycota; classe Tremellomycetes; ordem Tremellales; família Tremellaceae (TAXONOMIA NCBI, 2011); apresentando cerca de 39 espécies, podendo exibir reprodução sexuada e assexuada no seu ciclo de vida (CHATURVEDI et al., 2000, SCORZETTI et al., 2002; BARRETO DE OLIVEIRA; BOEKHOUT; THEELEN 2004; XUE et al., 2007).

São leveduras esféricas a ovais, geralmente com um só brotamento, cujo tamanho varia de 4 a 10  $\mu\text{m}$  de diâmetro. Pseudo-hifas podem ser produzidas ocasionalmente. O tamanho da cápsula varia, dependendo de fatores genéticos da cepa e das condições de cultivo ou do ambiente. A cápsula é constituída por polissacarídeos, cujo principal constituinte é o glicuronoxilomanana, e representa um importante fator de virulência (AMARO, 2006).

*Cryptococcus neoformans* é cosmopolita, ocorre em diversos substratos orgânicos, frequentemente é associado a habitat de aves, principalmente em excretas secas de pombos, ricas em fontes de nitrogênio, como uréia e creatina (BEHRMAN; MASCI; NICHOLAS, 1990). Fontes ambientais de *Cryptococcus neoformans* foram identificadas em árvores em diferentes partes do Brasil (LÁZERA et al., 2000; FILIÚ et a., 2002).

*C. gattii* tem sido isolado do ambiente principalmente em regiões tropicais e subtropicais, mas áreas de clima temperado e frio devem ser consideradas. Seu habitat natural foi inicialmente descrito na Austrália, associado a restos vegetais de *Eucalyptus camaldulensis* (COSTA 2009). Já foi isolado de eucalipto no Parque Ibirapuera (São Paulo) (MONTENEGRO, 2000) e em em Teresina (Piauí). Atualmente, sabe-se que eucaliptos não representam seu habitat natural específico, uma vez que demonstraram a presença de *C. gattii* em espécies de vegetais (SORREL; ELLIS, 1997; LAZÉRA et al., 2000; RANDAWA et al., 2003; TRILLES et al., 2003; KIDD et al., 2004; GRANADOS; CASTAÑEDA, 2006; KHAN et al., 2007; COSTA 2009).

*C. neoformans* apresenta cinco sorotipos, definidos por antígenos capsulares, mediante sorotipagem baseada em reação imunológica com antissoro produzido contra diferentes epítomos do polissacarídeo que compõe a cápsula dessa levedura, sendo que o *C. neoformans* var. *neoformans* apresentam sorotipo A e AD, *C. neoformans* var. *grubii* apresentam sorotipo A e *C. gatti* apresentam sorotipos B e C (NISHIKAWA et al., 2003; BOEKHOUT et al, 2011; KWON-CHUNG et al., 2002; AMARO, 2006). Análises fenotípicas, epidemiológicas, ecológicas, fisiológicas e genéticas dividiram a espécie em três variedades: *C. neoformans* var. *grubii* (sorotipo A), *C. neoformans* var. *neoformans*

(sorotipo D) e *C. neoformans* var. *gattii* (sorotipos B e C). Atualmente, com base em dados de filogenia, fenotipagem e tipagem genética, a variedade *gattii* passou a ser classificada no plano da espécie (KWON-CHUNG et al., 2002). O sorotipo AD foi classificado como um híbrido diplóide dos sorotipos A e D (NISHIKAWA et al., 2003). Análises filogenéticas sugerem que *C. gattii* diverge de *C. neoformans* em aproximadamente 37 milhões de anos e que a variedade *grubii* e a variedade *neoformans* divergem entre si em aproximadamente 19 milhões de anos (XU; VILGALYS; MITCHELL, 2000; MARRA et al., 2004).

Estudo prospectivo foi realizado no Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia, entre março de 1998 e novembro de 2003, em 96 pacientes com diagnóstico clínico e laboratorial de criptococose, sendo 81,3% portadores de Aids. Cepas de *C. neoformans* foram obtidas de diferentes amostras, sendo 77% em líquido cefalorraquidiano. A var *neoformans* foi isolada em 89 casos e a var *gattii* em 7 (MOREIRA et al., 2006).

123 casos de criptococose diagnosticados no Hospital Universitário da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, no período de janeiro de 1995 até dezembro de 2005, foram avaliados. Cento e quatro (84,9%) casos tinham associação com HIV, seis (4,9%) tinham outra condição predisponente e 13 (10,6%) eram imunocompetentes. Em 77 casos foi possível identificar a espécie do agente, sendo 69 (89,6%) *C. neoformans* e oito (10,4%) *C. gattii* (LINDENBERG et al., 2008).

*C. neoformans* é um patógeno com alguns fatores de virulência estabelecidos, sendo os principais a capacidade de crescer a 37°, a produção da cápsula polissacarídica e a melanina (COSTA, 2009). A melanina possui ação antioxidante e antifagocítica (STEENBERGEN; CASADEVALL, 2003; BOSE et al., 2003; MCFADDEN; DE JESUS; CASADEVALL, 2006; COSTA, 2009). A cápsula mucopolissacarídica, composta por aproximadamente 90% de glucoronoxilomanana (GXM), 7% de galactoxilomanana (GalXM) e 3% de manoproteínas, (MOYRAND et al., 2002), é considerada o principal fator de virulência do microrganismo (CASADEVALL; PERFECT, 1998; CASADEVALL; STEENBERGEN; NOSANCHUK, 2003), dificultando a fagocitose ou promovendo a sobrevivência do microrganismo dentro de macrófagos (FELDMESSER; NOVIKOFF; CASADEVALL, 2000; CASADEVALL, 2002). Durante o curso da infecção, os polissacarídeos capsulares são liberados, ocasionando alterações na regulação de citocinas e interferências na apresentação do antígeno (VECCHIARELLI, 2000; STEENBERGEN; CASADEVALL, 2003; SOMMER; LIU; DOERING, 2003; COSTA, 2009).

### 1.2.1 Manifestações clínicas da criptococose

A infecção por *Cryptococcus* é micose de natureza sistêmica, de porta de entrada inalatória causada por fungos do complexo *Cryptococcus neoformans*, atualmente com duas espécies: *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* (CASTRO; CERVI; MARTINEZ, 2006). *C. neoformans* var. *neoformans*, *C. neoformans* var. *grubii* e *C. gattii* são leveduras encapsuladas ubiqüitárias que podem causar meningoencefalite, pneumonia e doenças disseminadas tanto em indivíduos imunocompetentes como imunocomprometidos (GUPTA, 2010).

A criptococose é considerada importante causa de mortalidade e morbidade, especialmente em pacientes acometidos pela aids (HORTA et al., 2002; PAPPALARDO; MALHEM, 2003; IDNURM et al., 2005; JONGWUTIWES; SUNGKAHUPARPH; KIERTIBURANAKUL, 2008; MANOSUTHI, CHOTTANAPUND, SUNGKANUPARPH, 2008). Mais de 600.000 pessoas no mundo morrem de criptococose por ano e estudos prospectivos sugerem que de 10 a 20% de todas as mortes em pacientes HIV positivos na África são atribuídas a infecção criptocócica, sendo a maioria dos isolados *C. neoformans* var. *grubii* (CONSENSO EM CRIPTOCOCOSE, 2008). A incidência da doença varia em diferentes partes do mundo, oscilando entre 5 a 10% na Europa Ocidental e Estados Unidos e mais de 20% na África Central e leste da Ásia (LIFSON et al., 2006; JARVIS; HARISSON, 2007).

Muitos trabalhos relatam a ocorrência de criptococose em seres humanos após exposição a excretas de aves (LAGROU et al., 2005). Já foi observada a ocorrência desta micose em pacientes transplantados ou sob terapia imunossupressora, que mantinham contato com aves exóticas (cacatua, calopsita) (NOSANCHUK et al., 2000; SHRESTHA et al., 2004; LAGROU et al., 2005). A comprovação da participação de aves como fonte de infecção em seres humanos foi demonstrada pela similaridade bioquímica e genética apresentada pelas cepas ambientais e clínicas recuperadas (FRANZOT et al., 1997; NOSANCHUK et al., 2000; LAGROU et al., 2005; COSTA, 2009)

Contudo, a falha na resposta imune é o principal fator predisponente para o desenvolvimento da infecção, em particular nos pacientes imunossuprimidos, como aqueles portadores da aids, de neoplasias linfoproliferativas ou de sarcomas, aqueles transplantados ou sob tratamento imunossupressor (PAPPALARDO; MELHEM, 2003). Uma variedade de fatores relacionados a imunidade interfere com o estabelecimento da infecção criptocócica. Além das barreiras físicas, como a pele e a mucosa nasal, a atividade do soro e da saliva

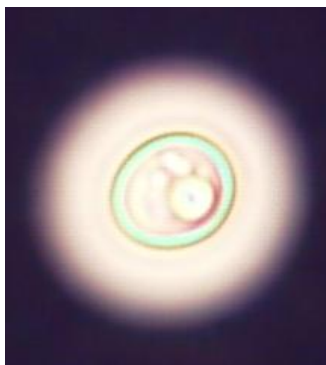
humanos é descrita repetidamente (BAUM; ARTIS, 1961, 1963; IGEL.; BOLANDE, 1966; HENDRY; BAKERSPIGEL, 1969; NASSAR; BRUMMER; STEVENS, 1995; SZILAGYI; REISS; SMITH, 1996; VOELZ; MAY, 2010). O sistema complemento e os fagócitos, entretanto, desempenham o papel central na resposta imune inata contra os *Cryptococcus* spp (VOELZ; MAY, 2010).

A criptococose em humanos começa como uma infecção pulmonar e se dissemina, por via hematogênica, atingindo outros órgãos, como pele, rins, próstata, bem como regiões oculares e ósseo articulares (COSTA, 2009). Produz, no entanto, lesões principalmente no sistema nervoso central (SNC) (MOREIRA et al., 2006; WINN JR. et al., 2006; HUSTON; MODY, 2009; COSTA, 2009).

### 1.2.2 Identificação laboratorial do gênero *Cryptococcus*

A criptococose é uma das micoses de mais fácil diagnóstico por apresentar marcado tropismo pelo SNC, o que leva à abundância de elementos fúngicos no líquido e nas lesões, à presença de cápsula característica, ao diagnóstico imunológico e à coloração tecidual específica. A levedura também pode ser detectada no escarro, lavado brônquico, pus de abscesso, urina, aspirados de medula óssea e de gânglios, e fragmentos de tecidos. O exame do líquido por meio da nigrosina ou tinta da China (figura 3) demonstra as leveduras encapsuladas com uma sensibilidade em torno de 80%, em especial nos pacientes com aids, e em torno de 50% dos pacientes não infectados pelo HIV (CONSENSO EM CRIPTOCOCOSE, 2008).

Figura 3 - Aspecto microscópico do *Cryptococcus* corado pela tinta da China, evidenciando a cápsula polissacarídica.



Fonte: CEMM (2011).



A pesquisa direta por microscopia e a cultura são os métodos mais empregados nos laboratórios clínicos, apresentando elevada especificidade (MOREIRA et al., 2006; COSTA, 2009).

*Cryptococcus* sp. cresce bem em vários meios de cultivos, que não contenham cicloheximida, como ágar-sangue, ágar-Sabouraud e ágar infusão de cérebro-coração. Pode crescer em temperaturas entre 25°C e 37°C, mas cresce melhor a 30°C; a termotolerância máxima é de 40°C. Colônias mucóides de tonalidade creme podem ser observadas em 48h de incubação, como ilustrado na figura 4 (LAZÉRA; IGREJA; WANKE, 2004).

Figura 4 - *Cryptococcus neoformans* em ágar-Sabouraud 2% de glicose, apresentando colônias mucóides, de coloração creme.



Fonte: CEMM (2011).

A produção de melanina é uma característica amplamente utilizada para a diferenciação de *C. neoformans* e *C. gattii* de outras espécies do gênero, que muitas vezes não são capazes de produzir esse fenômeno (CARFACHIA et al., 2006). No entanto, isolados de *C. albidus*, *C. laurentii* e *C. uniguttulatus* podem apresentar produção de melanina, de maneira menos pronunciada do que para *C. neoformans* e *C. gattii* (IKEDA et al., 2002; PEDROSO et al., 2009). Este pigmento é revelado pelo tom escuro (de marrom a preto) das colônias, quando o fungo cresce em meios que contêm compostos fenólicos ou difenólicos na sua composição, como ágar-semente de girassol (*Helianthus annuus*), ágar-alpiste (*Guizotia abyssinica*), ágar semente de níger (NSA), ágar-batata e cenoura, e meios quimicamente definidos, como ágar L-dopa e ágar-ácido caféico. Alguns estudos recentes mostram a produção do pigmento em ágar-semente de mostarda e em ágar-pimenta malagueta (STEPANOVIC et al., 2002; HERNÁNDEZ et al., 2003; NANDHAKUMAR et al., 2006; PEDROSO et al., 2007).

Pode-se também realizar o exame histopatológico para visualização do *Cryptococcus* spp., que normalmente se apresentam com formatos esféricos, ovais ou elípticos, através da coloração mucicarmim de Mayer. Esta coloração diferencia o *Cryptococcus* de outros fungos similares em tamanho e forma, sendo um método exclusivo de visualização do material polissacarídico capsular, como mostrado na figura 7. O carmim liga-se a mucina, a qual se destaca dos outros componentes celulares pela coloração magenta (CHANDLER; WATTS, 1997; LAZCANO et al., 1991; LACAZ et al., 2002).

Caso não seja possível a visualização microscópica das leveduras capsuladas, sugestivas de *Cryptococcus*, a micromorfologia através da prova do microcultivo em meio ágar-fubá tween 80 ou ágar-arroz tween 80 também pode auxiliar no diagnóstico, assim como testes bioquímicos da cultura fúngica (DE HOOG et al., 2000; LAZÉRA; IGREJA; WANKE, 2004; COSTA, 2009).

O gênero *Cryptococcus* é capaz de hidrolisar uréia, importante para diferenciar do gênero *Candida*, que não possui tal característica (MAIA, 2009; COSTA 2009). *Cryptococcus* spp. não possui habilidade de fermentar carboidratos, mas assimila, por metabolismo oxidativo, açúcares como glicose, maltose, sacarose e galactose (DE HOOG et al., 2000; COSTA, 2009).

A detecção de antígeno capsular polissacarídeo de *Cryptococcus* pela aglutinação do látex pode ser realizada no sangue, urina, lavado brônquioalveolar e no LCR. LCR e soro são positivos em mais de 90% nos pacientes com meningite criptocócica; em infecções fora do SNC, estes espécimes fornecem menor positividade para o teste (CONSENSO EM CRIPTOCOCOSE, 2008; SIDRIM et al., 2010).

Para distinção entre as espécies *C. neoformans* e *C. gattii*, pode-se utilizar o meio de CGB, constituído por canavanina, glicina e o indicador azul de bromotimol. Neste meio, *C. gattii* cresce normalmente, já que é resistente à canavanina e é capaz de utilizar a glicina como única fonte de nitrogênio e carbono e, desta forma, produz amônia, elevando o pH, o que modifica a coloração do meio para azul-cobalto, em virtude da presença do azul de bromotimol. Por outro lado, *C. neoformans* não cresce neste meio, pois é naturalmente sensível à canavanina. A assimilação de D-prolina também poderá ser utilizada, com o mesmo objetivo, apesar de sua menor sensibilidade, conforme observado por Nishikawa (1995), ao analisar 37 isolados de *C. gattii* e 193 de *C. neoformans* e comparar estes dois testes. Dentre os isolados de *C. gattii*, 1% deles correspondeu a resultado falso negativo (LACAZ et al., 2002; LAZÉRA et al., 2004; BRITO, 2006).

### 1.3 Teste de sensibilidade a antifúngicos

Testes de sensibilidade antifúngica tornaram-se cada vez mais comuns no exercício da clínica nos últimos anos, em parte pela importância em direcionar melhor conduta terapêutica perante fenótipos cada vez mais resistentes às drogas antifúngicas, o que ocasiona, cada vez mais, falhas na terapia medicamentosa antifúngica (BRITO, 2006).

O uso profilático de algumas drogas em pacientes com maior risco de desenvolver infecções fúngicas invasivas altera o perfil das leveduras de maneira relevante. Um dos mais utilizados com esse fim em hospitais é o fluconazol, responsável, ao menos em parte, pela diminuição de infecções causadas por *C. albicans* (em geral mais sensíveis), mas também pelo aumento do número de espécies não albicans, especialmente *C. glabrata* e *C. krusei*, as quais apresentam sensibilidade reduzida a esse antifúngico (COLOMBO et al., 2006; TALARMIN, 2009; GIOLO; SVIDZINSKI, 2010).

A resistência aos derivados azólicos começou a ser observada com o aparecimento de cepas de *C. albicans* resistentes ao fluconazol, entre pacientes HIV positivos que apresentavam candidíase oral e esofágica, previamente à introdução de terapia antirretroviral (JOHNSON, 2008; COLOMBO; EVANS, 2009; CAETANO, 2010). A prevalência de *C. albicans* resistente a esse grupo de drogas é menor em pacientes com candidíase vaginal e candidemia. Algumas espécies de *Candida*, como *C. krusei*, são, sabidamente, mais resistentes a determinadas drogas, como fluconazol e anfotericina B, e, se tais espécies forem prevalentes, o emprego dos antifúngicos aos quais são resistentes não deve ser priorizado (HOSPENTHAL; MURRAY; RINALDI, 2004).

Geralmente, considera-se que o resultado de infecções fúngicas invasivas, em particular a candidemia, tem melhor prognóstico se houver início imediato de terapia apropriada, hoje baseado em diretrizes atualizadas, porém o conhecimento da sensibilidade dos isolados clínicos locais ante agentes antifúngicos pode ainda orientar melhor a escolha de um antifúngico, com mais propriedade e segurança, o que é especialmente importante em tratamentos a longo prazo (HOSPENTHAL; MURRAY; RINALDI, 2004; MORRELL; FRASER; KOLLEF, 2005; PAPPAS et al., 2009; BORGHI et al., 2010).

O método mundialmente reconhecido como de referência para antifungigrama foi padronizado pelo Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI), em 1997, aperfeiçoado por meio de vários documentos posteriores. A metodologia, cujo princípio é o da diluição em caldo (macro ou microdiluição), apresenta boa reprodutibilidade, porém, além de ser muito trabalhosa, exige grande habilidade do manipulador, em consequência dos detalhes técnicos e

da dificuldade de leitura, sendo, portanto, de aplicação difícil na maioria dos laboratórios de rotina, mas é muito utilizada em pesquisa (CUENCA-ESTRELLA et al., 2002; REX et al, 2001; GIOLO; SVIDZINSKI, 2010).

O teste de microdiluição em caldo é realizado em placas acrílicas estéreis, com 96 poços em formato de U, e consiste na exposição de um inóculo final na ordem de  $10^3$  células / mL de um determinado microorganismo a dez concentrações conhecidas das drogas testadas, sendo possível observar o efeito destas sobre o crescimento fúngico. Após incubação por 48 horas, a leitura final é determinada visualmente, como a menor concentração da droga, capaz de inibir seu crescimento, denominada de concentração inibitória mínima (CIM) (ESPINEL-INGROFF et al., 1998; NCCLS, 2002; COLOMBO e ALVES, 2004; MAIA, 2009; CAETANO, 2010).

O objetivo final dos testes de sensibilidade é prever a resposta dos pacientes à terapia a ser instituída. Muitos fatores, no entanto, além do perfil de sensibilidade *in vitro*, influenciam a resposta clínica, como o sítio de infecção, o *status* imunológico do hospedeiro, a farmacocinética da droga e a adesão do paciente à terapia. Portanto, o estabelecimento da correlação clínica direta entre os valores de CIM e o desfecho terapêutico ainda é limitado na terapia antifúngica (REX; PFALLER, 2002; HOSPENTHAL; MURRAY; RINALDI, 2004; MAIA, 2009), exceto no caso da candidíase orofaríngea em pacientes HIV positivos, em que os dados obtidos dos testes *in vitro* melhor se correlacionam com a resposta terapêutica *in vivo* (ATIQUE, 2006).

Por outro lado, assim como para os testes de sensibilidade a antibacterianos, a regra 90-60 também parece ser útil para a avaliação da sensibilidade a antifúngicos, principalmente para os isolados de *Candida* spp., frente aos derivados azólicos. Tal regra preconiza que 90% das infecções causadas por microorganismos que apresentam sensibilidade *in vitro* e 60% das infecções causadas por microorganismos que apresentam resistência *in vitro* respondem bem à terapia antimicrobiana *in vivo* (REX; PFALLER, 2002; KANAFANI; PERFECT, 2008; MAIA, 2009). Assim, a realização de testes de sensibilidade torna-se importante, uma vez que pode orientar a instituição da terapia antifúngica mais adequada, direcionando o paciente aos 90% de sucesso terapêutico (REX; PFALLER, 2002; MAIA, 2009).

Apesar do relato de casos clínicos com falhas terapêuticas associadas a resistência *in vitro* de infecções causadas por *C. neoformans* (PERFECT; COX, 1999), somente um limitado número de estudos apoia a potencial correlação entre testes de sensibilidade *in vitro* obtidos no momento do diagnóstico e o resultado clínico da infecção por *Cryptococcus*

(ALLER et al., 2000; RODERO et al., 2000; DANNAOUI et al., 2006). Além disso, a maioria destes estudos avalia a eficácia clínica depois de dez semanas de tratamento, e é desconhecido se o CIM dos antifúngicos utilizados durante o início da terapia pode ser usado como preditor do resultado clínico (DANNAOUI et al., 2006). As dificuldades nesta correlação entre teste *in vitro* e eficácia terapêutica podem ser parcialmente explicadas pela ausência de padronização de técnicas (REX; PFALLER, 2002). Embora as técnicas padronizadas pelo CLSI para as leveduras do gênero *Candida* se mostrem confiáveis e clinicamente úteis, ainda existem problemas técnicos para o *C. neoformans* (DANNAOUI et al., 2006).

#### **1.4 Prospecção de novas drogas antifúngicas**

Algumas drogas, apesar de não serem classificadas como antifúngicas, apresentam atividade contra fungos (LACAZ et al., 2002; HANAFY et al., 2007). Entre elas, podemos citar – as quinolonas, o sulfametoxazol, as drogas anti-tuberculose (CAETANO, 2010) e as estatinas. O mecanismo de ação destes fármacos em relação a sua atividade antifúngica ainda não está bem esclarecido, podendo agir de forma isolada ou em combinação com antifúngicos disponíveis atualmente, como a anfotericina B e os azólicos.

O sulfametoxazol é um antagonista competitivo do PABA (ácido p-amino-benzóico), que é um componente integrante da estrutura do ácido fólico em microrganismos (HANAFY et al., 2007). Em combinação com trimetropim, outro inibidor da síntese do ácido fólico, frequentemente é utilizado na profilaxia de pneumonia por *Pneumocystis jirovecii* em pacientes imunossuprimidos e com aids (HIDA et al., 2005). Foi também verificada ação inibitória desta associação ante a cepas do fungo dimórfico *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* (Brilhante et al., 2010). Outros trabalhos relatam a ação de sulfas contra *Paracoccidioides brasiliensis* (HAHN et al., 2003; SCAVONE et al., 2004), e contra *Aspergillus fumigatus* e *C. neoformans* var. *gubii* (HANAFY et al., 2007).

Drogas antituberculose como pirazinamida, isoniazida e rifampicina possuem como mecanismo de ação - inibição enzimática ou bloqueio da síntese protéica em micobactérias (PETRI, 2001;CAMPOS, 2007). Efeito inibitório moderado foi encontrado frente a cepas de *Coccidioides posadasii*, causado por essas drogas isoladas. Porém, quando os antituberculosos foram testados em associação a drogas antifúngicas, um aumento deste efeito inibitório foi observado. Sítios de ligação análogos destes fármacos podem ser

encontrados na mitocôndria fúngica, sugerindo um sinergismo entre os fármacos (CORDEIRO et al., 2006).

Outro estudo analisando dezoito combinações entre fármacos antituberculose e antifúngicos azólicos, anfotericina B e caspofungina foi realizado. Todas as combinações inibiram o crescimento de *C. posadasii*, dez combinações apresentaram interações sinérgicas e antagonismo entre as drogas não foi observado (CORDEIRO et al., 2009).

Fluoroquinolonas são antibacterianos de amplo espectro que atuam sobre a DNA girase (topoisomerase II) e topoisomerase IV, resultando na inibição da replicação, recombinação e transcrição do DNA, causando finalmente, a morte bacteriana (VAN BAMBEKE et al., 2005). Embora fluoroquinolonas não possuam atividade antifúngica intrínseca, altos níveis de topoisomerase II e IV tem sido encontrados em fungos patogênicos (FOSTEL;MONTGOMERY;SHEN, 1992; SHEN et al., 1992; SHEN;FOSTEL, 1994), oferecendo um potencial mecanismo de interação entre fluoroquinolonas e antifúngicos (STERGIOPOULOU et al., 2008). Estudos demonstram inibição do crescimento fúngico causada por fluoroquinolonas isoladas e em associação a antifúngicos (SHEN et al., 1992; NAKAJIMA et al., 1995; SUGAR; LIU; CHEN, 1997; SASAKI et al., 2000). Efeito inibitório *in vitro* de ciprofloxacina combinada com azólicos e anfotericina sobre espécies de *C. posadasii* e *H. Capsulatum* também foi demonstrado (PACHECO, 2010).

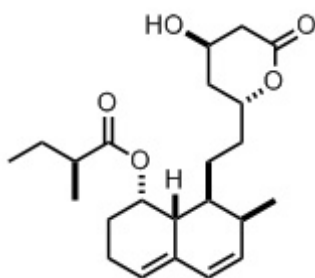
#### **1.4.1 Estatinas**

Os inibidores da HMG-CoA redutase, ou estatinas, foram inicialmente identificados como metabólitos secundários de fungos endofíticos (VIEIRA, 2010). Fungos endofíticos são microrganismos que, durante certo período de suas vidas, colonizam os tecidos internos de plantas sem causar sintomas a estas (PETRINI et al., 1992). É estimado que cerca de 80% das plantas são hospedeiras de fungos (ZHANG et al., 1997). A associação com fungos endofíticos pode ser benéfica à planta, pois esses são capazes de produzir metabólitos secundários que podem auxiliar o sistema imunológico da planta no combate a insetos, com produção de toxinas (JARVIS;MILLER, 1996) e contra outros fungos patogênicos, com produção de fitoalexinas (MARINHO et al., 2007).

Em 1975, Akira Endo, nos laboratórios Sankyo (Japão), isolou o derivado policetídeo, compactina ou mevastatina (figura 5), do fungo fermentado *Penicillium brevicompactum*. Mais tarde, esta substância foi também obtida de *Penicillium citrinum* (VIEGAS-JR et al., 2006). Este composto possui em sua estrutura a função  $\delta$ -lactona- $\beta$ -

hidroxilada que, na forma acíclica, mimetiza o intermediário envolvido na redução promovida pela HMG-CoA redutase, antecipando a possibilidade de que esta enzima possa reconhecer este produto natural, em face da analogia estrutural com seu substrato natural (VIEGAS-JR et al., 2006). Sua afinidade pelo sítio enzimático é cerca de 10.000 vezes superior ao substrato HMG-CoA (CAMPO; CARVALHO, 2007).

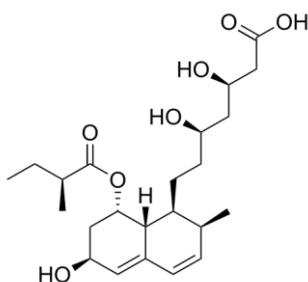
Figura 5 - Estrutura química da mevastatina.



Fonte: WILSON; DANISHEFSKY, 2006

A pravastatina (figura 6) foi obtida pela hidrólise metabólica da função d-lactona- $\beta$ -hidroxilada da mevastatina, sendo seu principal metabólito ativo. Foi a primeira estatina com a função lactona aberta, empregada na terapêutica (VIEGAS-JR et al., 2006).

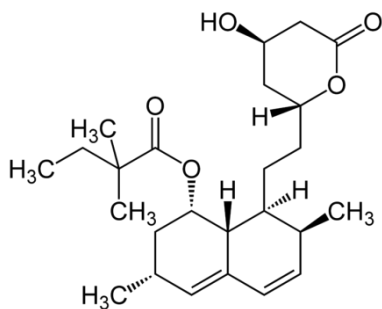
Figura 6 - Estrutura química da pravastatina.



Fonte: WILSON; DANISHEFSKY, 2006

A sinvastatina (figura 7), análoga da lovastatina é semissintética, com grupo metílico adicional na cadeia lateral. (BASTARDA et al., 2005; CAMPO; CARVALHO, 2007; SILVA, 2009).

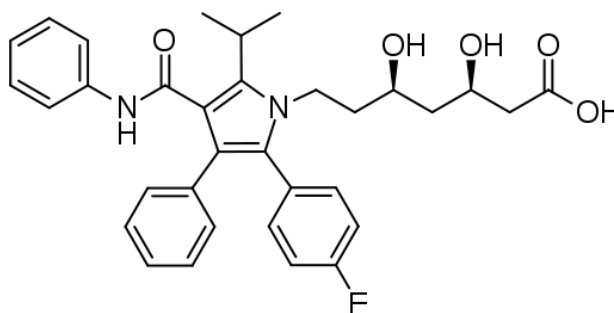
Figura 7 - Estrutura química da sinvastatina.



Fonte: WILSON; DANISHEFSKY, 2006

Apesar das primeiras estatinas conhecidas serem produtos naturais, isoladas do metabolismo de fungos, como a mevastatina, a lovastatina e a pravastatina, outras são completamente sintéticas, como a atorvastatina (figura 8), a cerivastatina e a fluvastatina (BASTARDA et al., 2005; CAMPO; CARVALHO, 2007; SILVA, 2009).

Figura 8 - Estrutura química da atorvastatina.

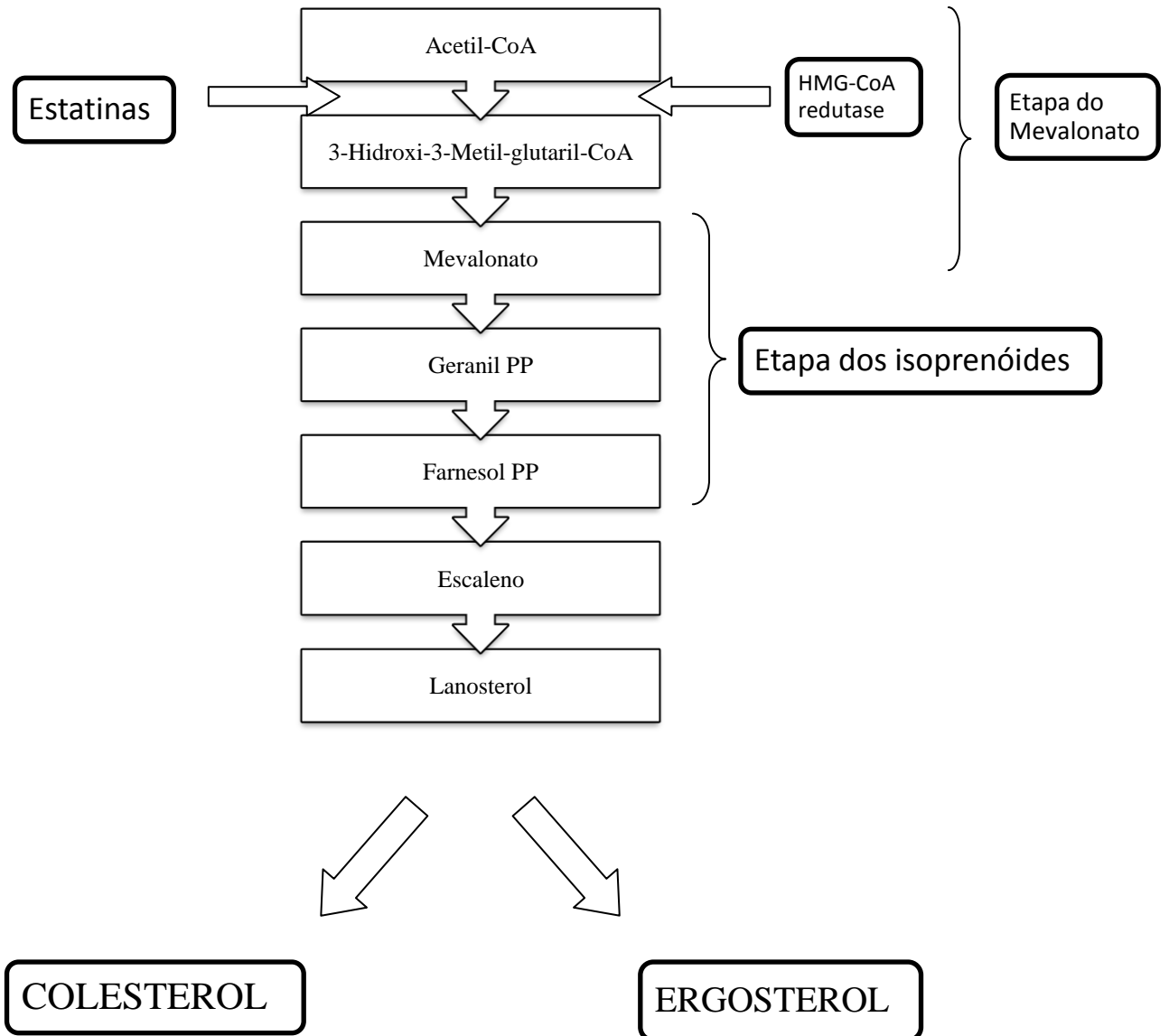


Fonte: WILSON; DANISHEFSKY, 2006

As estatinas inibem a 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG-CoA) redutase que sintetiza o ácido mevalônico (CAMPO; CARVALHO, 2007), um importante precursor na síntese de esteróis, como o ergosterol nos fungos e o colesterol em humanos, como mostrado na figura 10. O genoma humano contém apenas um gene que codifica a HMG-CoA redutase, enquanto as leveduras possuem dois genes denominados HMG 1 e HMG 2. As isoenzimas fúngicas e a enzima humana são muito semelhantes em estrutura e função, e agem na mesma etapa da via sintética do mevanolato (LESZCZYNSKA et al., 2009), portanto a HMG-Co-A redutase torna-se, desta forma, importante alvo para terapia antifúngica (SOUZA; RODRIGUES, 2009).



Figura 9 - Biossíntese do ergosterol e do colesterol, mostrando as principais etapas.

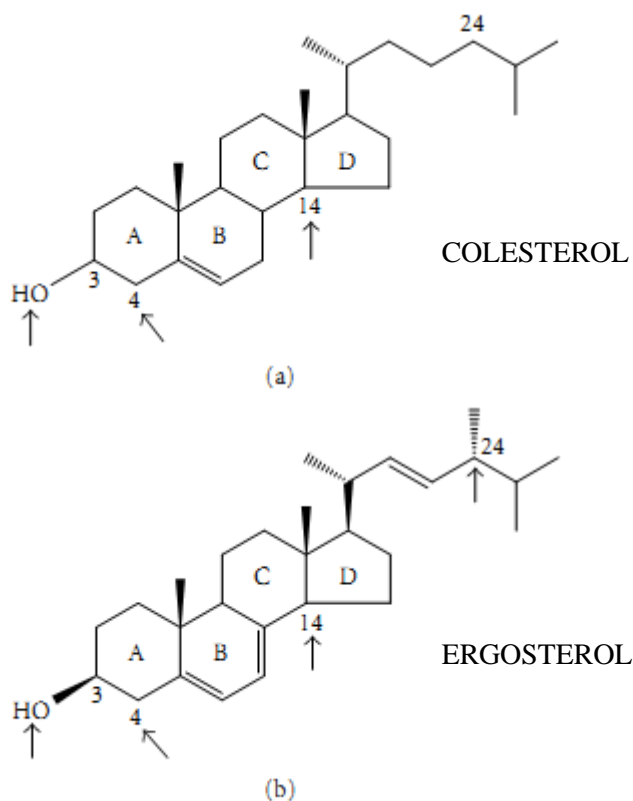


Fonte: adaptado de SOUZA; RODRIGUES, 2009.

Tanto o colesterol quanto o ergosterol são importantes componentes da membrana celular que mantêm o seu equilíbrio e a sua integridade. Diferem apenas em alguns aspectos, como mostrado na figura 10; colesterol tem apenas uma dupla ligação no anel B, e tem uma cadeia lateral saturada sem grupamento metila no carbono 24. Mostra-se que algumas partes da molécula dos esteróis são importantes para sua atividade nas membranas celulares. No núcleo tetracíclico,  $3\beta$ -OH é ligação obrigatória para o crescimento, enquanto a presença de

grupos metil, presentes no carbono 4 e 14, não permitem o crescimento. Essas duas características são essenciais tanto para o colesterol quanto para o ergosterol. No entanto, certas características que estão presentes no ergosterol e ausentes no colesterol, como a presença da dupla ligação no anel B, a presença do  $\beta$ -metil na posição 24 e a dupla ligação no carbono 22, são essenciais para o crescimento dos fungos (SOUZA; RODRIGUES, 2009).

Figura 10 - Estruturas moleculares do colesterol (a) e do ergosterol (b). As setas indicam partes das moléculas que são importantes para o crescimento celular.



Fonte: SOUZA; RODRIGUES, 2009

#### 1.4.2 Aspectos farmacológicos das estatinas

Estatinas mostram-se úteis em restaurar a função endotelial e proteger contra complicações da doença aterosclerótica. Estes mecanismos incluem a redução do crescimento das células do músculo liso, formação de trombo, redução da proteína C reativa, entre outros (DOGGRELL, 2001; TURNER et al., 2007).

A sinvastatina e a atorvastatina estão entre as estatinas recomendadas pela *Heart Association and the American College of Cardiology* como a terapia de primeira escolha para reduzir os níveis de colesterol plasmáticos. As estatinas abaixam o LDL colesterol em 25-45%, dependendo da dose e da estatina empregada. As doses recomendadas de cada estatina são: 20-40 mg/dia de pravastatina, 20-80 mg/dia de sinvastatina e 10-80 mg/dia de atorvastatina (NCEP, 2001; CARVALHO;CAMPO, 2007; SILVA, 2009).

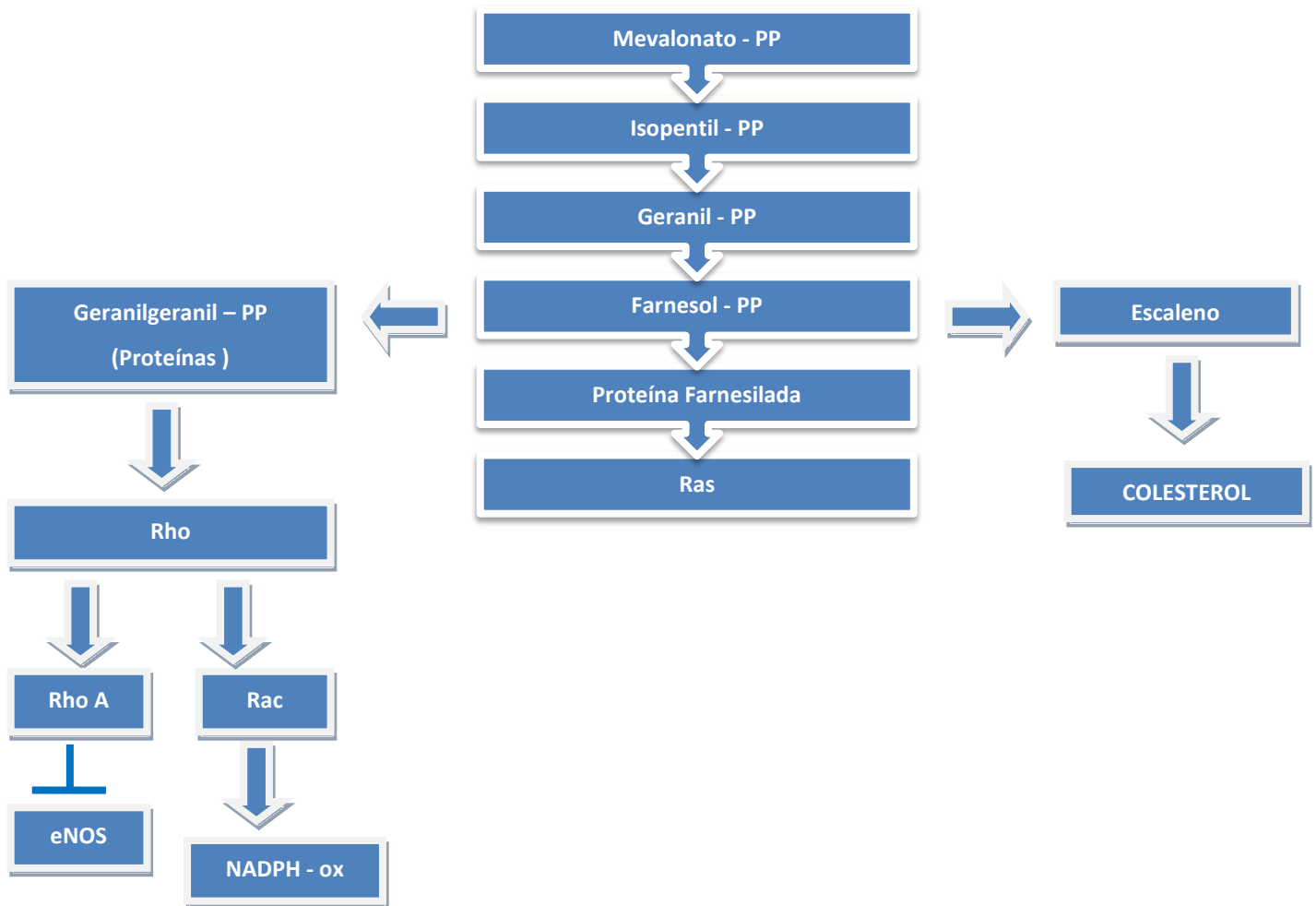
Em estudos realizados para comparar os efeitos das estatinas na redução do colesterol plasmático demonstrou-se que a dose de 20 mg de sinvastatina equivale à dose de 10 mg de atorvastatina, sendo esta a estatina mais potente, seguindo a sinvastatina e a pravastatina com potências semelhantes (JONES et al., 1998; GOODMAN e GILMAN, 2003; SILVA, 2009).

As estatinas diminuem os níveis plasmáticos de colesterol e lipoproteínas mediante a inibição da HMG-CoA redutase e da síntese de colesterol no fígado, aumentando o número de receptores de LDL na superfície do hepatócitos, com o consequente aumento da absorção e do catabolismo do LDL. A afinidade das estatinas pela enzima está na faixa nanomolar, enquanto a afinidade do substrato natural, o HMG-CoA, está na faixa micromolar, ou seja, três ordens de magnitude menor (MOGHADASIAN, 1999; CARVALHO; CAMPO, 2007; SILVA, 2009).

Estudos mais recentes sugerem que as estatinas possuem outros benefícios clínicos independentes da diminuição do colesterol (FAZIO et al., 2000; LIAO; CARVALHO; CAMPO, 2007; Zhou, 2009; VIEIRA, 2010). Estes efeitos independentes do colesterol, também chamados de efeitos pleiotrópicos, são responsáveis pelos resultados favoráveis que se verifica com o uso das estatinas na doença cardiovascular, assim como em outras doenças incluindo neoplasias, degenerescência macular, sépsis, osteoporose, demência, doenças auto-imunes e doença inflamatória intestinal (CAMPO; CARVALHO, 2007; VIEIRA, 2010).

Ao inibirem a síntese de ácido mevalônico, as estatinas reduzem consequentemente a síntese de isoprenóides como o farnesil-pirofosfato (FPP) e o geranylgeranyl-pirofosfato (GGPP), intermediários na cascata de reações que resultam na formação de colesterol. Estes dois isoprenóides promovem a isoprenilação de proteínas com ligações lipofílicas e a sua ativação na membrana celular, como mostrado na figura 11 (VIEIRA, 2010).

Figura 11 - Biossíntese do colesterol com consequente isoprenilação das proteínas Rho e Ras, que inibe a formação da eNOS e activa a NAD(P)H oxidase. Abreviaturas: eNOS- sintetase de óxido nítrico das células endoteliais; HMG-CO- 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A; NAD(P)H- Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato.



Fonte: VIEIRA, 2010. Adaptado de GAHTAN et al., 2010.

A isoprenilação é um passo fundamental para a associação dessas pequenas proteínas à membrana plasmática e é essencial para que estas apresentem atividade biológica (LIAO, 2002). Duas das famílias de proteínas que necessitam desta isoprenilação são as Rho e as Ras, que são pequenas proteínas G. Esta classe de proteínas está envolvida na transmissão de sinais celulares, alterando-as de um estado inativo, quando ligadas a uma guanosina difosfato (GDP), para um estado ativo, quando ligadas a uma guanosina trifosfato (GTP). O funcionamento destas proteínas permite regular diferentes processos celulares, como o crescimento celular, a morfogênese, a migração celular e a cinética celular. As estatinas, ao

inibirem a isoprenilação das proteínas Rho e Ras, levam à inativação e à acumulação destas proteínas no citoplasma, contribuindo estas alterações para alguns dos efeitos pleiotrópicos das estatinas (VIEIRA, 2010).

O grupo de proteínas Rho GTPase é constituído por diferentes subfamílias, como a RhoA, Rac1 e Cdc42, sendo todas estas isopreniladas pela GGPP. Cada um destes membros tem uma função específica na célula, sendo essenciais para a forma, motilidade, secreção e proliferação desta. Pode haver, no entanto, sobreposição destas funções (D'SOUZA-SCHOREY; AELST, 1997; VIEIRA, 2010).

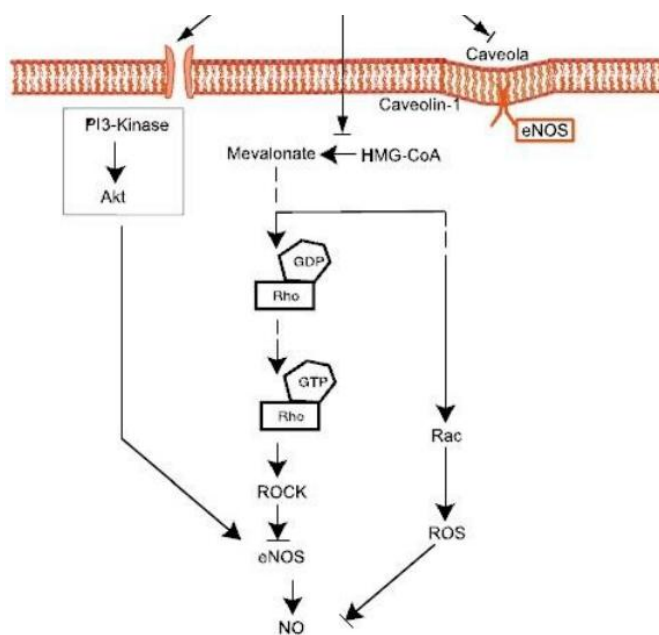
Os efeitos biológicos provocados pelas proteínas RhoA são mediados pelos seus efetores a jusante (RIDLEY; RIENTO, 2003). O mais estudado destes efetores é a Rho cinase (ROCK) que atua no citoesqueleto celular, inibindo o local de ligação da fosfatase às cadeias leves de miosina (MLC). Ao inibir esta fosfatase, a ROCK aumenta a fosforilação das MLC, amplificando a contratilidade da miosina, que leva à instabilidade das fibras e à formação de adesões focais (BURRIDGE; WENNERBERG, 2004). A atividade da ROCK está normalmente elevada em distúrbios cardiovasculares. Assim, as estatinas, ao inibirem a isoprenilação da Rho, diminuem a activação da ROCK, o que afeta pelo menos parcialmente a contração da musculatura lisa vascular. Outros processos envolvidos nesta via Rho/ROCK são a angiogênese, a hipertensão arterial, a hipertrofia cardíaca, a fibrose perivascular e a hipertensão pulmonar (BURRIDGE; WENNERBERG, 2004; HYVELIN et al., 2005; VIEIRA, 2010).

Outra ação ocasionada pela inibição da RhoA pelas estatinas é o aumento da expressão da óxido nítrico sintetase (NOS), como esquematizado na figura 12. Um dos principais marcadores da função do endotélio é o óxido nítrico (NO) produzido pela sintetase das células endoteliais (eNOS). A diminuição da biodisponibilidade de NO é indicativa da existência de disfunção endotelial, sendo uma das manifestações precoces da aterosclerose (HSIA et al., 1989). A atividade antiaterogênica do NO resulta do fato de causar vasodilatação, promover a angiogênese, inibir a agregação plaquetária e diminuir a proliferação de células do músculo liso vascular (VSMC) e a interação entre leucócitos e o endotélio (BUGA et al., 1987; LIAO, 1994; DUTRA et al., 1992; VIEIRA, 2010).

As estatinas aumentam a expressão de eNOS também pela ativação da proteína serina-treonina cinase (Akt) nas células endoteliais pela via de sinalização da fosfatidilinositol-3-cinase (PI3K), levando à fosforilação do eNOS com aumento do NO (VIEIRA, 2010).

Ainda, o terceiro mecanismo pelo qual as estatinas regulariam a atividade da eNOS é por meio dos seus efeitos na caveolina-1, que é uma proteína da membrana celular que se liga à eNOS inibindo a produção do NO (HOFNAGEL et al., 2004). Estudos demonstram que as estatinas reduzem a abundância de caveolina-1 na membrana celular, aumentando a quantidade de eNOS, com o consequente aumento de NO (HORI et al., 2005).

Figura 12 - Mecanismo do aumento da eNOS pelas estatinas. As estatinas modulam a expressão da eNOS por três mecanismos principais: (1) aumento da estabilidade do mRNA da eNOS através da inibição da isoprenilação da Rho; (2) aumento da fosforilação da eNOS, via PI3-cinase; (3) aumento da actividade da eNOS por meio da redução da abundância da caveolina-1.



Fonte: (in LIAO JK, ZHOU Q (2010) Pleiotropic Effects of Statins – Basic Research and Clinical Perspectives.)  
 Abreviaturas: eNOS- sintetase de óxido nítrico das células endoteliais GDP- guanosina difosfato GTP- guanosina trifosfato NO- óxido nítrico PI3K- fosfatidilinositol-3-cinase ROCK- Rho cinase ROS- espécies reativas do oxigênio.

A cascata de reações em que a Rac está envolvida possui duas importantes ações: a remodelagem do citoesqueleto e a formação de espécies reativas do oxigênio (ROS). A Rac influencia múltiplas proteínas da remodelagem do citoesqueleto como as proteínas da síndrome de Wiskott-Aldrich, proteínas ativadoras da calmodulina e a proteína cinase p21. A Rac, ao ligar-se à GTP e migrar para a membrana celular, também ativa a nicotinamida

adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase com a consequente produção de ROS. Esta ação é desencadeada pela Rac na presença de citocinas inflamatórias e de fatores de crescimento (SUNDARESAN et al., 1996). As estatinas, ao inibirem a atividade da Rac e, conseqüentemente, da NADPH oxidase, têm um papel antioxidante importante, diminuindo a produção de ROS induzidas pela angiotensina II e evitando a hipertrofia das células do músculo liso vascular (VSMC) e do miocárdio (TAKEMOTO et al., 2001; WASSMANN et al., 2001).

Ao contrário do que acontece com as proteínas Rho, as proteínas Ras são isopreniladas pela FPP. Vários estudos *in vitro* (KANEKI et al., 2007) e *in vivo* com ratos (AVVEDIMENTO et al., 1995) demonstraram que as proteínas Ras são relevantes para a migração e proliferação das VSMC estimuladas pelo fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF) (CHIEN et al., 2000). Estes estudos evidenciam que a inibição da proteína RAS pode diminuir a progressão da aterosclerose.

Embora os mecanismos da ação dos inibidores da HMG-CoA redutase, na diminuição das moléculas de adesão e da proteína C reativa, ainda não sejam completamente compreendidos, sugere-se que a inibição das proteínas isopreniladas seja responsável por parte do efeito anti-inflamatório destes fármacos (LIAO, 2002; ARNAUD, 2005; BARBARA, 2005). Os inibidores da HMG-CoA redutase, entretanto, podem bloquear as b-2 integrinas e o antígeno de função leucocitária-1 (LFA-1) (que são sinais co estimuladores para ativação das células T) por ligação a um sítio alostérico dentro do LFA-1, independente do efeito na HMG-CoA redutase e, conseqüentemente, das proteínas isopreniladas. Outros efeitos anti-inflamatórios são a diminuição da resposta imune Th1, o aumento da resposta Th2 e a menor expressão de CD 40 em células vasculares (DUNN et al., 2006).

Alguns autores acreditam que as estatinas podem, também, ter uma ação sobre o tecido ósseo: nos osteoclastos, reduzindo a reabsorção e nos osteoblastos, aumentando a formação óssea, pela estimulação da expressão da proteína morfogenética óssea (BMP)-2 (SUGIYAMA, 2000).

O papel das estatinas contribuindo na melhora de sobrevida dos pacientes com sepse bacteriana, apresentando Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica (SIRS) em UTIs, em pacientes com doença renal crônica e pacientes com pneumonia comunitária é discutido atualmente (ALMOG, 2004; GUPTA et al., 2007).

Chin et al., em 1997, relataram um estudo em que investigaram a atividade *in vitro* das estatinas fluvastatina, sinvastatina, pravastatina e lovastatina ante a cepas de *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, e *C. neoformans*, onde somente a fluvastatina

demonstrou inibição contra as leveduras. Também relataram os resultados da interação *in vitro* de fluvastatina com fluconazol e com anfotericina B, por meio de ensaios de microdiluição, que demonstraram sinergismo entre as drogas.

Em 2005, Chamilos et al. demonstraram uma ação significativa da lovastatina perante zigomicetos e, além disso provaram sua ação sinérgica com voriconazol por meio de testes de microdiluição.

Macreadie et al. (2006), avaliaram a ação das estatinas sinvastatina e atorvastatina ante cinco espécies de *Candida* e *Aspergillus fumigatus*, em que apenas *C. krusei* se mostrou resistente. Em um ensaio utilizando culturas aeróbicas suplementadas com colesterol e ergosterol, demonstraram a especificidade da ação das estatinas sobre a via sintética do mevanolato, sugerindo desta forma a utilidade das estatinas como potenciais agentes antifúngicos. Particularmente em *C. albicans*, demonstraram que a inibição do crescimento era fortemente diminuída mediante suplementação de ergosterol ao meio, sugerindo que a inibição do crescimento da levedura induzida pelas estatinas foi devida a redução do nível de ergosterol. Ainda nesse trabalho, os autores advertem para a possibilidade de notar que outros efeitos podem ser esperados, em razão do bloqueio da síntese de produtos finais resultantes da via do mevalonato ou os efeitos sobre a membrana das leveduras causada pela depleção do ergosterol. Por exemplo, a isoprenilação reduzida da proteína Ras causada pela lovastatina em *Mucor racemosus* resultou em apoptose, com a morte celular ( ROZE; LINZ, 1998).

Westermeyer; Macreadie, em 2007, determinaram a diminuição da formação do ergosterol em *C. glabrata*, assim como inibição de seu crescimento e redução do DNA mitocondrial, utilizando duas estatinas - atorvastatina e sinvastatina.

Em 2009, um estudo com a lovastatina observou que, em pH ácido, a forma não ionizada da droga possuía maior facilidade de penetração na célula fúngica; além disso, sua ação foi sinérgica com a ação de agentes antifúngicos, em virtude da menor concentração necessária nestas condições, dessa forma inferindo a utilidade da lovastatina em infecções fúngicas vaginais por *C. albicans* (SCHMIDT; DZOGBETA; BOYER, 2009).

Forrest et al. (2010) realizaram um estudo de coorte retrospectivo avaliando o uso de estatinas concomitantemente com agentes antifúngicos em pacientes de UTI com candidemia confirmada. O estudo concluiu que houve melhora na sobrevivência dos pacientes, porém o resultado não teve significância estatística, necessitando que futuros estudos sejam realizados para validar esta associação.

As estatinas diferem entre si no grau de inibição da HMG-CoA redutase, na ligação às proteínas plasmáticas e na biotransformação. Em sua maioria, são fármacos



metabolizados pelas enzimas microsossomais, especialmente pelo citocromo P450 (CYP) 3A4, com exceção da fluvastatina, que utiliza o CYP 2C9, e da pravastatina, que sofre glucuronidação no citoplasma e não utiliza essas enzimas microsossomais (SLATER; MACDONALD, 1998; MACDONALD, 1998; CORSINI et al, 1999; IZAR, 2005).

Aproximadamente 50% dos fármacos utilizados no exercício da clínica são metabolizados pelo sistema microsossomal P450. Desta forma, muitas interações farmacológicas podem ocorrer com as estatinas, sendo isto, na maioria das vezes, atribuído à inibição do CYP3A4, (FONSECA, 2011). Antifúngicos, como os triazólicos, mostram-se potencialmente interativos, a exemplo do fluconazol, que inibe isoenzimas CYP2C9, CYP2C19 e CYP3A4, do itraconazol, metabolizado extensamente por meio de CYP3A4, e do voriconazol, pelas CYP 3A4, 2C9 e 2C19 (FONSECA, 2011).

A sinvastatina é administrada em sua forma inativa, lactona, como pró-droga, e no fígado é hidrolisada para a forma ativa, o  $\alpha$ -hidroxiácido correspondente. As demais estatinas são administradas na forma ativa. A sinvastatina possui maior seletividade pelo fígado, maior sítio de síntese de colesterol, em comparação com as demais estatinas administradas na forma ativa (MOGHADASIAN, 1999; SILVA, 2009). Pravastatina, mais hidrossolúvel, contudo, possui baixa penetração em células não hepáticas, maior seletividade para inibição de HMG-CoA redutase hepática e início de ação mais rápida, atingindo picos de concentração em apenas 1 h (CARVALHO; CAMPO, 2007).

Esses fármacos estão sujeitos a extenso metabolismo de primeira passagem pelo fígado. Mais de 95% das estatinas (formas lactonas e ativas), estão ligadas às proteínas plasmáticas, com exceção da pravastatina, que apresenta taxa de ligação mais baixa, cerca de 50%. São excretadas nas fezes por meio da bile e uma pequena proporção é excretada na urina (ERTÜRK et al., 2003; GOODMAN e GILMAN, 2003; SILVA, 2009).

Percentuais de cerca de 34% de pravastatina sódica e 85% da sinvastatina são absorvidos, enquanto a atorvastatina cálcica é quase completamente absorvida. Em razão do extenso metabolismo de primeira passagem, as estatinas possuem valores baixos de biodisponibilidade sendo 40,7% para a atorvastatina cálcica, de 10 a 26% para a pravastatina sódica e até 5% para a sinvastatina (MOGHADASIAN, 1999; MOFFAT et al., 2004; SILVA, 2009).

Segundo Bellosta (2004), em um estudo de farmacocinética das estatinas, baseado em uma dose de 40 mg por via oral, atorvastatina alcança uma concentração plasmática máxima numa faixa de 27 a 66 ng / mL, a sinvastatina de 10 a 34 ng / mL e a pravastatina de 45 a 55 ng / mL.

Apesar das evidências encontradas na literatura científica da atividade antifúngica das estatinas, principalmente em relação a sua ação sobre a via da síntese do ergosterol, sobretudo em espécies de *Candida*, nenhum dos trabalhos determinou a CIM da sinvastatina, atorvastatina ou pravastatina.

O sucesso do tratamento antifúngico pode depender não só de novas alternativas, mas também da associação entre drogas, trazendo benefícios substanciais ao paciente, como maior segurança e eficiência na farmacoterapia, devido ao ajuste de doses, diminuição de toxicidade e do sinergismo de efeitos. Nesse sentido, o estudo de Forest et al. (2010) traz à tona a potencialidade antifúngica das estatinas, como agentes auxiliares ou coadjuvantes na terapia antifúngica.

## **2 PERGUNTAS DE PARTIDA**

1. Quais valores de concentração inibitória mínima *in vitro*, as drogas, pravastatina, sinvastatina ou atorvastatina apresentam diante de cepas do gênero *Candida*?
2. As drogas, pravastatina, sinvastatina ou atorvastatina apresentam ação inibitória *in vitro* perante cepas do gênero *Cryptococcus*?

## **3 HIPÓTESE CIENTÍFICA**

Os valores de concentração inibitória mínima encontrados para as drogas pravastatina, sinvastatina e atorvastatina são semelhantes para as espécies de *Candida* e *Cryptococcus*.

## **4 OBJETIVOS**

### **4.1 Objetivo geral**

1. Avaliar a ação inibitória e fungicida *in vitro* de pravastatina, sinvastatina e atorvastatina diante de cepas dos gêneros *Candida* e *Cryptococcus*.

### **4.2 Objetivos específicos**

1. Determinar a CIM e a CFM de pravastatina, sinvastatina e atorvastatina ante cepas de *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* e *C. tropicalis*.
2. Determinar a CIM e a CFM de pravastatina, sinvastatina e atorvastatina diante de cepas de *C. neoformans* e *C. gattii*.

## 5 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 Teste de sensibilidade *in vitro*

#### 5.1.1 Microrganismos

Para a realização deste estudo, foram utilizadas 51 cepas de quatro espécies de leveduras do gênero *Candida* (*C. albicans*: n = 16; *C. parapsilosis*: n = 12; *C. tropicalis*: n = 12; *C. krusei*: n = 11), e 25 cepas de leveduras do gênero *Cryptococcus* (*C. gattii*: n = 12; *C. neoformans*: n = 13). Todas as cepas foram retiradas do estoque na Micoteca do Centro Especializado em Micologia Médica (CEMM), Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, sendo suas identificações confirmadas por análise morfológica e testes bioquímicos.

#### 5.1.2 Preparo das drogas utilizadas

Para a realização dos testes de sensibilidade, foram utilizadas três estatinas: pravastatina (Bristol-Myers-Squibb), sinvastatina (Medley) e atorvastatina (Pfizer). Todas as drogas foram utilizadas isoladamente nas microdiluições em caldo ante cada cepa das espécies de *Candida* e *Cryptococcus*.

Para o preparo das soluções-estoque, a pravastatina e a atorvastatina foram reconstituídas em água destilada estéril, obtendo-se uma concentração de 50 mg/mL de atorvastatina e 200 mg/mL de pravastatina. A sinvastatina é uma pró-droga e para se tornar ativa é necessário abrir seu anel de lactona mediante uma reação de hidrólise. Portanto, se realizou uma hidrólise básica da sinvastatina adaptada do protocolo de Lorenz e Parks (1990). Para a realização da hidrólise, a sinvastatina foi dissolvida em uma solução etanólica de NaOH estéril, obtendo-se uma concentração de 40 mg / mL e colocada em banho-maria a 60° C por uma hora. Um poço controle contendo solução etanólica de NaOH estéril e inóculo de cada uma das cepas testadas foi incluído no ensaio. Todas as soluções-estoque foram homogeneizadas em agitador magnético até completa dissolução da droga e, em seguida, transferidas para tubos estéreis e estocadas a -20°C até o momento do uso (MACREADIE et al., 2006)

Para utilização na microdiluição a solução-estoque de pravastatina 200 mg/mL não foi diluída; a de sinvastatina 40 mg / mL foi diluída em RPMI 1640 estéril (tamponado a pH 7,0 com MOPS) para 4 mg / mL, e a atorvastatina 50 mg / mL foi diluída para 40 mg / mL. Estas concentrações foram baseadas nas doses utilizadas no tratamento de hiperlipidemias (CARVALHO;CAMPO, 2007; SILVA, 2009) e no protocolo de MACREADIE et al., 2006.

### **5.1.3 Preparo do inóculo das cepas de *Candida* e *Cryptococcus***

Para a confecção de todos os inóculos fúngicos, foram preparadas suspensões a partir de culturas mantidas em ágar-batata-dextrose, a 28°C, por 48h. Para tanto, uma pequena quantidade de colônias fúngicas foi suspensa em 5 mL de solução salina estéril 0,9%, com o auxílio de uma alça microbiológica, sendo homogeneizadas até se obter uma turbidez equivalente ao padrão 0,5 da escala McFarland e, em seguida, submetidas a rápida agitação em vórtex. A suspensão foi submetida a duas diluições em RPMI, a fim de se obter uma concentração final de  $1 \times 10^4$  a  $5 \times 10^4$  UFC/mL (CLSI, 2002):

1ª Diluição (1:100) = 10  $\mu$ L de inóculo em 990  $\mu$ L de RPMI

2ª Diluição (1:20) = 125  $\mu$ L de inóculo em 2375  $\mu$ L de RPMI

### **5.1.4 Microdiluição em caldo**

Todas as cepas foram testadas ante as respectivas drogas, para a determinação da CIM. Para tanto, foi utilizado o método de microdiluição em caldo, descrito no documento M27-A3 padronizado pelo CLSI (CLSI, 2008).

Foram utilizadas para o teste microplacas plásticas estéreis com 96 poços, apresentando fundo arredondado em forma de U.

Em cabine de fluxo laminar, foram distribuídas, com auxílio de um pipetador multicanal, alíquotas de 100 $\mu$ L de meio RPMI 1640 estéril (tamponado a pH 7,0 com MOPS) em cada poço da microplaca, onde foi utilizada uma série de 12 poços para cada cepa.

Ao primeiro poço da série, foram adicionados 100  $\mu$ L da droga-teste previamente preparada e, em seguida, foram realizadas diluições seriadas em escala 1:2, transferindo-se 100  $\mu$ L da diluição do primeiro poço para o segundo poço, e assim por diante, até o 10º poço da série. Os 100  $\mu$ L restantes do 10º poço foram transferidos para o 12º poço, servindo como controle negativo de crescimento, contendo apenas RPMI e droga.

As concentrações das drogas testadas estão descritas na tabela a seguir. Por fim, 0,1 mL do inóculo fúngico foi distribuído em cada poço. Controles positivos de crescimento e esterilidade foram incluídos para cada observação testada. Os procedimentos foram realizados em duplicata. A leitura visual dos resultados para a determinação das CIMs foi realizada após 48 horas de incubação a 30-35°C (CLSI, 2008).

Tabela 1 - Intervalo de concentração das estatinas testadas ante leveduras dos gêneros *Candida* e *Cryptococcus*.

Drogas	Concentração (mg mL <sup>-1</sup> )	
	Inicial	Final
Pravastatina	50	0,0977
Sinvastatina	1	0,0020
Atorvastatina	10	0,0200

## 5.2 Determinação da Concentração inibitória mínima (CIM)

A CIM das drogas testadas foi definida como a menor concentração da droga capaz de inibir 80% do crescimento fúngico visível, quando comparado àquele do tubo-controle livre da droga. Foram incluídas no teste cepas-controle, como *C. parapsilosis* ATCC 22019 (Itraconazol, CIM = 0,5 µg mL<sup>-1</sup> e anfotericina, CIM = 1 µg mL<sup>-1</sup>) e *C. krusei* ATCC 6258 (Itraconazol, CIM = 0,5 µg mL<sup>-1</sup> e anfotericina, CIM = 1 µg mL<sup>-1</sup>) (CLSI, 2002).

## 5.3 Determinação da Concentração fungicida mínima (CFM)

Para verificar se a droga possuía atividade fungicida além de inibitória, no intervalo de concentração estudado, foi determinado o CFM. Para tanto, foram transferidas alíquotas de 3 µL de 4 poços da placa de microdiluição, iniciando no poço em que foi determinado o CIM, seguindo no máximo até três poços anteriores ao CIM, em que não foi visualmente detectado crescimento fúngico, para uma placa contendo ágar-batata dividida em quatro partes, sendo semeadas por estriamento e incubadas a 28° por 48 horas. A CFM foi,

então, determinada no quadrante em que não foi visualizado nenhum crescimento fúngico (TAWARA et al., 2000; BRILHANTE et al, 2010).

#### **5.4 Análise estatística**

Na comparação da Concentração Inibitória Mínima entre as espécies avaliadas, para as drogas específicas, foi utilizado o teste t-Student para amostras independentes e quando mais de duas espécies eram analisadas simultaneamente foi realizado uma análise de variância (ANOVA).

Na comparação entre drogas, considerando as várias espécies analisadas, foi utilizado o teste t-Student para amostras pareadas.

O nível de significância adotado para afirmações conclusivas foi de 5%.

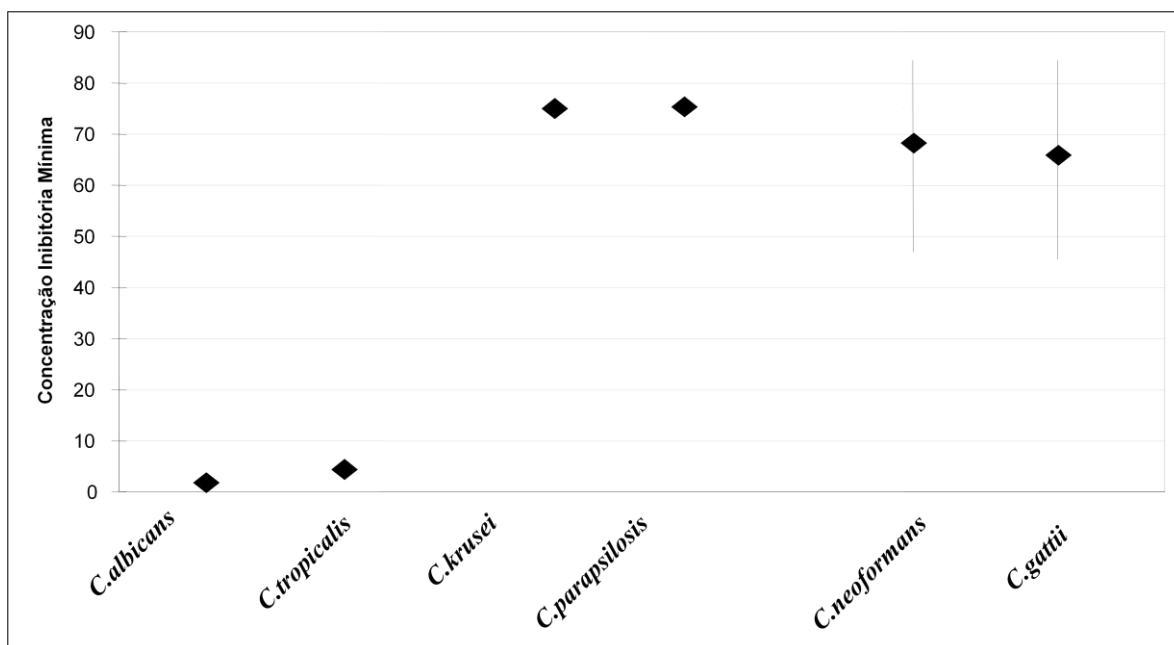


## 6 RESULTADOS

Foram avaliadas 51 cepas de *Candida*, sendo 16 de *C. albicans*, 11 de *C. krusei*, 12 de *C. tropicalis* e 12 de *C. parapsilosis*, e 25 cepas de *Cryptococcus*, sendo 12 de *C. gattii* e 13 de *C. neoformans*, por meio de testes de microdiluição em caldo, segundo documento M27-A3 padronizado pelo CLSI. O intervalo de concentração testado para pravastatina foi de 50 a 0,0977 mg/mL, para sinvastatina, 1 a 0,0020 mg/mL e para atorvastatina, 10 a 0,0200 mg/mL. Pravastatina inibiu 37 leveduras do gênero *Candida* apresentando concentração inibitória mínima (CIM) na faixa de 1,56 a 6,25 mg /mL e as cepas restantes não foram inibidas mesmo na maior concentração testada (50 mg /mL), enquanto que sinvastatina e atorvastatina apresentaram atividade fungistática sobre todas as 51 cepas avaliadas, apresentando CIMs de 0,02 a 1 mg / mL e 0,04 a 5,00 mg / mL, respectivamente. Para o gênero *Cryptococcus*, apenas 4 cepas foram inibidas ante a pravastatina (CIM = 25 mg / mL), por outro lado, sinvastatina inibiu todas as 25 cepas (CIM = 0,06 a 1 mg / mL), e atorvastatina apenas 8 cepas (CIM = 0,62 a 2,5 mg / mL), sendo que as 17 restantes não foram inibidas mesmo na maior concentração testada ( $\geq 10$  mg / mL).

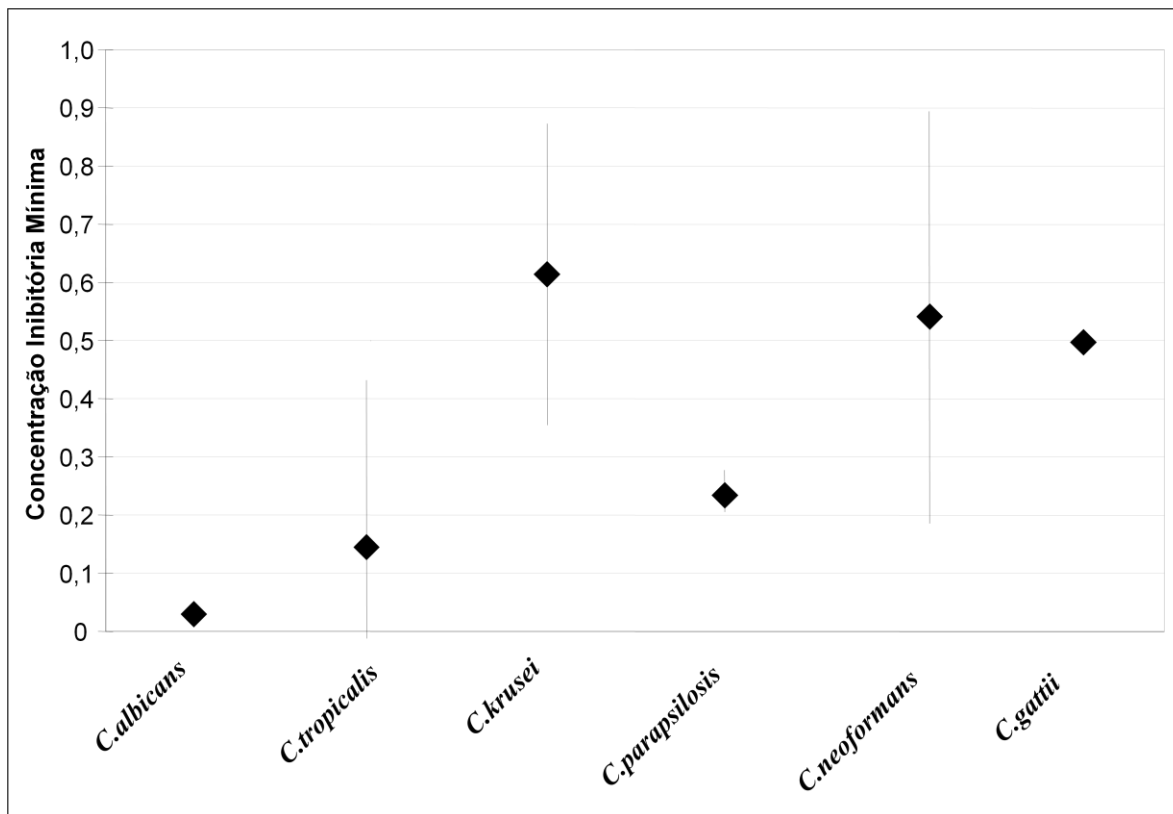
Na comparação da CIM com a utilização da droga pravastatina (figura 13), tem-se: a espécie *C.albicans* possui os menores valores da CIM entre todas as espécies, não havendo porém diferença significativa entre ela e a espécie *C.tropicalis* ( $p=0,1505$ ), havendo diferença quando comparado com *C.gattii* ( $p=0,0000$ ) e com as demais; a segunda espécie com menores valores é *C.tropicalis*, havendo diferença quando comparado com *C.gattii* ( $p=0,0000$ ) e com as demais; as espécies *C.gattii*, *C.neoformans*, *C.krusei* e *C.parapsilosis* não possuem diferença significativa ( $p=0,6802$ ).

Figura 13 - Comparação da CIM da droga pravastatina sobre as espécies sensíveis no intervalo de concentração testado.



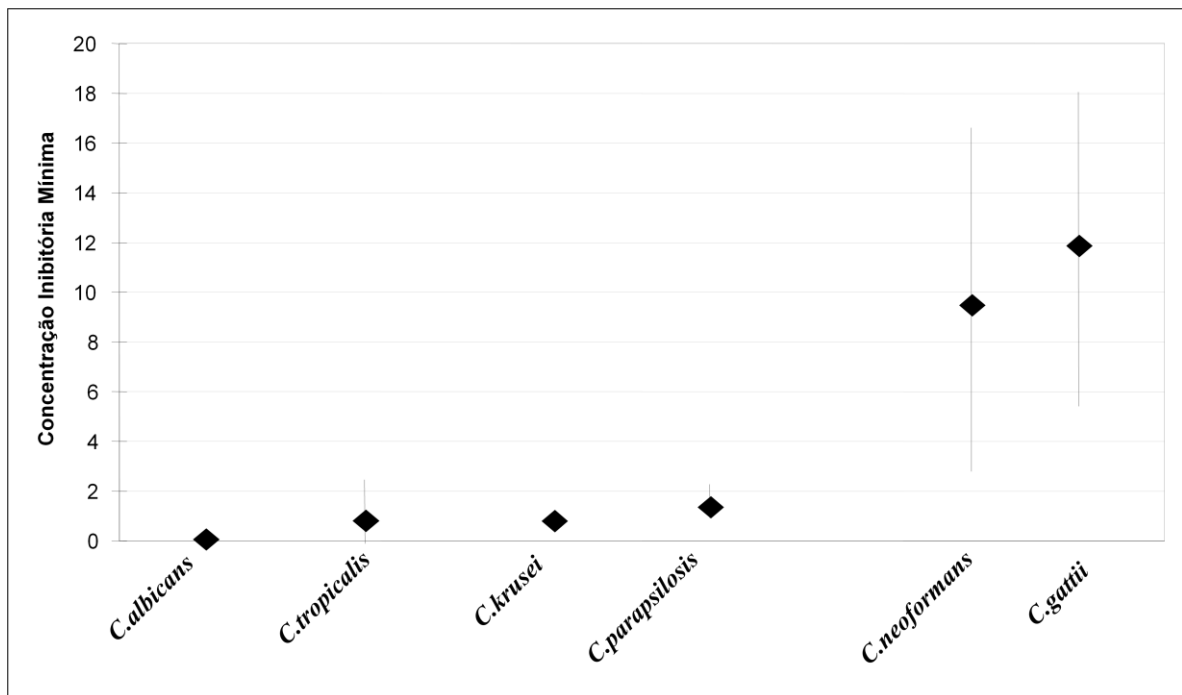
Na comparação da CIM com a utilização da droga sinvastatina (figura 14), tem-se: a espécie *C.albicans* possui os menores valores da CIM entre todas as espécies, não havendo porém diferença significativa entre ela e a espécie *C.tropicalis* ( $p=0,1729$ ), havendo diferença quando comparado com *C.parapsilosis* ( $p=0,0000$ ) e com as demais; a segunda espécie com menores valores é *C.tropicalis*, não havendo porém diferença significativa entre ela e a espécie *C.parapsilosis* ( $p=0,2662$ ), havendo diferença quando comparado com *C.gattii* ( $p=0,0010$ ) e com as demais; na sequência, tem-se *C.parapsilosis*, com valores menores do que *C.gattii* ( $p=0,0000$ ), e as demais; as espécies *C.gattii*, *C.neoformans* e *C.krusei* não possuem diferença significativa ( $p=0,5605$ ).

Figura 14 - Comparação da CIM da droga sinvastatina sobre as espécies sensíveis no intervalo de concentração testado.



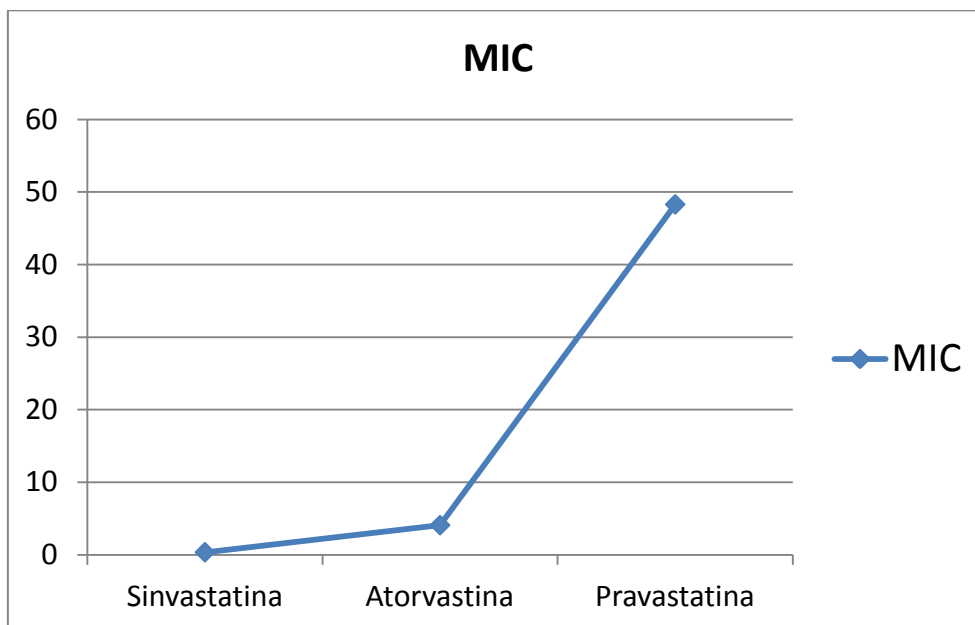
Na comparação da CIM com a utilização da droga atorvastatina (figura 15), tem-se: a espécie *C.albicans* possui os menores valores da CIM entre todas as espécies, não havendo porém diferença significativa entre ela e a espécie *C.tropicalis* ( $p=0,0703$ ), havendo diferença quando comparado com *C.krusei* ( $p=0,0000$ ) e com as demais; a segunda espécie com menores valores é *C.tropicalis*, não havendo porém diferença significativa entre ela e a espécie *C.krusei* ( $p=0,8186$ ), havendo diferença quando comparado com *C.parapsilosis* ( $p=0,0560$ ) e com as demais; na sequência tem-se, *C.krusei*, com valores menores que *C.parapsilosis* ( $p=0,0016$ ), *C.parapsilosis*, com valores menores do que *C.neoformans* ( $p=0,0011$ ), não havendo diferença significativa entre *C.neoformans* e *C.gattii* ( $p=0,5146$ ).

Figura 15 - Comparação da CIM da droga atorvastatina sobre as espécies sensíveis no intervalo de concentração testado.



Na comparação entre as espécies, tem-se: para todas as espécies a droga sinvastatina possui valores da CIM menores que a droga atorvastatina ( $p=0,0022$ ), com exceção da espécie *C.tropicalis*, em que não há diferença significativa ( $p=0,2021$ ); por sua vez, a droga atorvastatina possui valores da CIM menores do que a droga pravastatina entre todas as espécies testadas ( $p=0,0163$ ). Entre as leveduras do gênero *Candida*, *C. albicans* foi a que se mostrou mais sensível ante as estatinas estudadas. E entre as leveduras do gênero *Cryptococcus*, não houve diferença significativa entre os resultados apresentados.

Figura 16 - Valores médios de CIM entre as espécies e as drogas testadas.



Foi determinada CFM de pravastatina sobre 16 cepas do gênero *Candida* (CFM = 3,12 a 50 mg / mL), de sinvastatina sobre 39 (76%) cepas (CFM = 0,03 a 2 mg / mL), e de atorvastatina sobre 21 (42%) cepas (CFM = 0,08 A 0,31 mg / mL). Para o gênero *Cryptococcus*, pravastatina exibiu CFM sobre apenas 3 (12%) cepas (CFM = 50 mg / mL), sinvastatina sobre 25 (100%) cepas (CFM = 0,12 A 2 mg / mL), e atorvastatina sobre 1 (4%) cepa (CFM = 1 mg / mL). As figuras 17, 18 e 19 mostram a CFM encontradas das drogas sobre as espécies avaliadas.

Doze cepas de *C. albicans* foram testadas ante sinvastatina e a atorvastatina, sendo que todas apresentaram CFM. Dezesesseis cepas (4 cepas diferentes, mais doze dos ensaios anteriores) de *C. albicans* foram testadas ante pravastatina, sendo que onze apresentaram CFM (69%). Quatro cepas de *C. tropicalis* apresentaram CFM para pravastatina, onze para sinvastatina e quatro para atorvastatina. Nenhum CFM pode ser determinado para pravastatina ante as 12 cepas de *C. parapsilosis* testadas, por outro lado, foi encontrada CFM para todas as cepas ante a sinvastatina, e, por fim, perante atorvastatina, nenhum MFC foi encontrado. As 11 cepas de *C. krusei* avaliadas não apresentaram CFM para nenhuma estatina testada.

Doze cepas de *C. gattii* foram testadas ante a pravastatina, sinvastatina e atorvastatina, sendo que duas apresentaram CFM quando testadas com pravastatina, todas

apresentaram CFM quando testadas com sinvastatina, e apenas uma apresentou quando testada com atorvastatina.

Treze cepas de *C. neoformans* foram avaliadas. CFM só foi encontrado para uma cepa, no caso da pravastatina, entretanto, foram encontradas CFM para todas as cepas ante a sinvastatina, e somente uma cepa, no caso da atorvastatina.

Todas as análises de CFM mencionadas acima, relacionadas ao gênero *Candida* e ao gênero *Cryptococcus* estão resumidas na tabela 2.

Tabela 2 - Análise da CFM encontrada entre as espécies e as estatinas testadas.

<b><u>Espécies</u></b>	Sinvastatina	Atorvastatina	Pravastatina
	CFM %	CFM %	CFM %
<i>C. albicans</i> (12)	100	100	(16) 69
<i>C. tropicalis</i> (12)	92	33	33
<i>C. parapsilosis</i> (12)	100	0	0
<i>C. krusei</i> (11)	0	0	0
<i>C. gattii</i> (13)	100	8	8
<i>C. neoformans</i> (12)	100	0	17

Figura 17 - Comparação da CFM da droga pravastatina sobre as espécies sensíveis no intervalo de concentração testado.

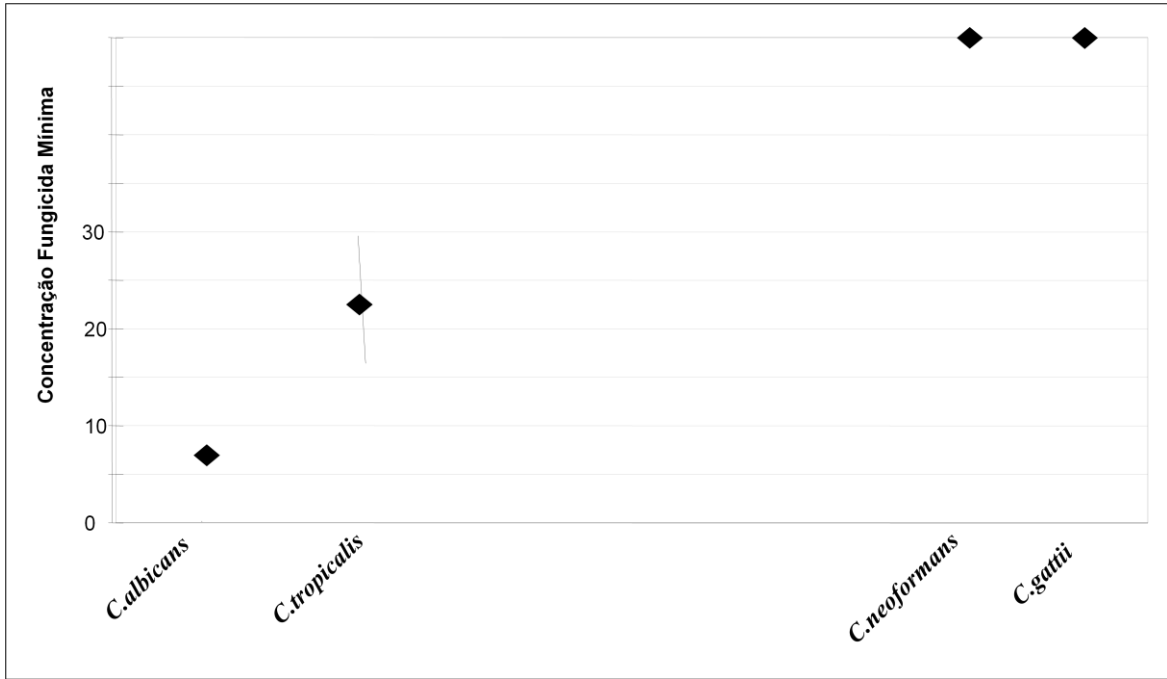


Figura 18 - Comparação da CFM da droga sinvastatina sobre as espécies sensíveis no intervalo de concentração testado.

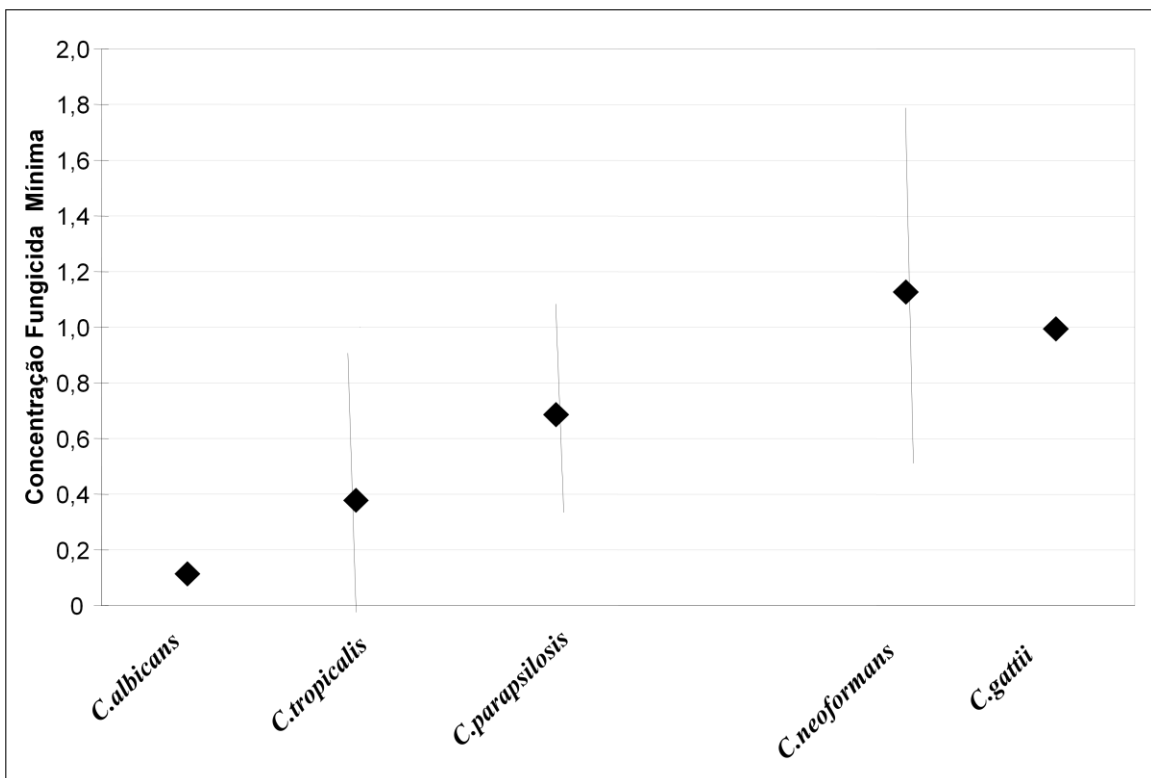
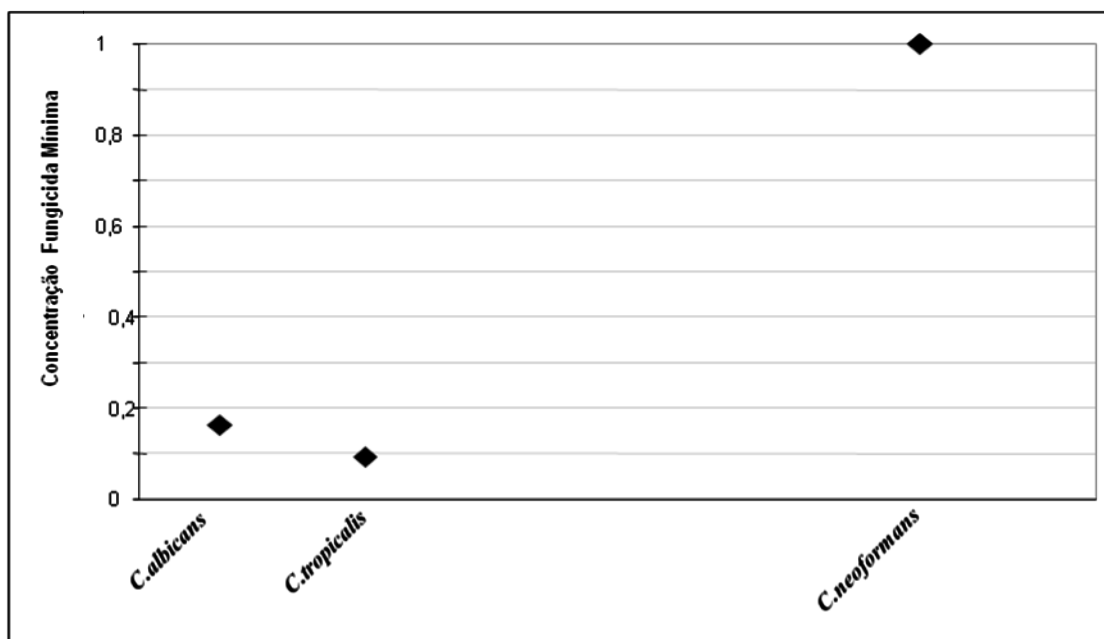


Figura 19 - Comparação da CFM da droga atorvastatina sobre as espécies sensíveis no intervalo de concentração testado.





## 7 DISCUSSÃO

Neste estudo, foram determinadas a CIM e a CFM das drogas pravastatina, sinvastatina e atorvastatina ante 76 leveduras, sendo quatro espécies de *Candida* (*C. albicans*, n=16; *C. tropicalis*, n=12; *C. krusei*, n=11 e *C. parapsilosis*, n=12) e duas espécies de *Cryptococcus* (*C. neoformans*, n=12 e *C. gattii*, n=13), obtidas da micoteca do CEMM da Faculdade de Medicina / UFC.

As atividades antifúngicas das estatinas, fluvastatina, pravastatina, lovastatina e sinvastatina foram investigadas em testes *in vitro* por Chin et al., em 1997. Somente fluvastatina (2 mg), no entanto, apresentou ação antifúngica ante *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. neoformans*; diferindo deste ensaio, pois pravastatina e sinvastatina apresentaram atividade antifúngica. Chin et al. (1997), justificam a ação isolada da fluvastatina no fato da diferença em sua estrutura e por ser a única estatina sintética em comparação com as outras três. Lovastatina e sinvastatina são pró-fármacos, devendo ser hidrolisadas para se tornarem ativas e, então, só depois utilizadas em ensaios *in vitro*. Realizou-se a hidrólise básica da sinvastatina conforme protocolo de Lorenz e Parks (1990), antes do ensaio da microdiluição em caldo, motivo pelo qual provavelmente não ocorreu atividade das estatinas citadas no ensaio de Chin (MACREADIE, 2006). Nesse mesmo artigo, Chin et al. relataram os resultados de testes de microdiluição em caldo, envolvendo a combinação de fluvastatina com fluconazol, itraconazol e anfortecina B ante três cepas de *C. albicans*, duas de *C. tropicalis*, duas de *C. parapsilosis*, uma de *C. glabrata* e três de *C. neoformans*, obtidas de pacientes, onde observou efeitos sinérgicos e aditivos, além de atividade fungicida. Fluvastatina isolada em concentração variando de 16 a 128 µg / mL causou inibição de 80% no crescimento de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*, e na faixa de concentração de 64 a 128 µg / mL apresentou ação fungicida. A atividade contra *C. glabrata* e *C. neoformans*, entretanto, foi menor, apresentando CIM > 128 µg / mL.

Em 2002, Nash et al. publicaram um artigo que contestava as descobertas de Chin, pois não confirmavam a praticidade dos seus resultados laboratoriais, em virtude das altas concentrações de fluvastatina utilizadas em seu estudo. As concentrações máximas de fluvastatina permitidas para uso humano são de 20 a 40 mg / dia, equivalentes a 100 a 300 ng / mL (KIVISTO: KANTOLA; NEUVONEN, 1998), sendo, portanto, as utilizadas por Chin (16 a 128 µg / mL) inatingíveis clinicamente. Nash et al.(2002) testaram oito cepas de *C. albicans*, utilizando 1 µg / mL de fluvastatina, e 0,25 µg / mL de pravastatina (doses clinicamente relevantes) e não encontraram nem sinergismo nem antagonismo na combinação

de fluvastatina ou pravastatina com itraconazol. De acordo com Bellosta (2004), a concentração máxima da pravastatina, baseada em uma dose de 40 mg oral, equivale a uma faixa de 45-55 ng/mL, discordando dos trabalhos citados anteriormente. Em nosso ensaio utilizou-se uma faixa de concentração para pravastatina de 50 a 0,0977 mg / mL. Dentre as espécies, *C. albicans* (CIM = 1,5625 mg / mL) foi a que apresentou maior sensibilidade a pravastatina em nosso estudo. *C. neoformans* também exibiu elevada sensibilidade das cepas ante a pravastatina, mas, em sua maioria as CIMs encontradas foram superiores a 50 mg / mL. Portanto, as CIMs encontradas em nosso estudo para a espécie *Candida albicans* não estão dentro da faixa terapêutica utilizadas no tratamento de hipercolesterolemias. Entretanto, conforme estudos anteriores, (LORENZ;PARKS, 1990; CHIN et al., 1997) a ação das estatinas é mais relevante quando em associação a drogas antifúngicas, e, neste caso, as concentrações necessárias são pelo menos quatro vezes menores.

Em 2006, foi realizado por Macreadie et al. o primeiro estudo que relatou os efeitos das drogas sinvastatina e atorvastatina sobre o crescimento de fungos patogênicos, utilizando três tipos de meios semissólidos contendo concentrações de estatinas variando de 0 a 1000 µM, informando os autores que estes níveis de estatinas utilizados nos ensaios foram similares ao níveis usados no tratamento para hipercolesterolemia (CORSINI et al., 1999). Foram utilizadas neste estudo, 13 cepas, sendo cinco espécies de *Candida* (*C. albicans*, n=4; *C. glabrata*, n=2; *C. tropicalis*, n=3; *C. krusei*, n=2 e *C. parapsilosis*, n=1) e uma cepa de *Aspergillus fumigatus*. Forte inibição de crescimento foi observada nas quatro cepas de *C. albicans* na concentração de 100 µM (equivalente a 0,0418 mg/mL) para sinvastatina e 100 µM (equivalente a 0,0559 mg/mL) para atorvastatina. Em nosso estudo, também forte inibição do crescimento das cepas de *C. albicans* foi encontrada em relação a sinvastatina (CIM = 0,0312 mg/mL) e atorvastatina (CIM = 0,039 mg/mL). Entretanto, nosso estudo obteve resultados mais eficazes. Além disso, nossa amostra foi maior, ou seja, 12 cepas de *C. albicans*, sendo que no caso da sinvastatina (CIM = 0,0312 mg/mL para 11 cepas das 12), os resultados foram mais uniformes do que para atorvastatina (CIM = 0,039 mg/mL para 7 cepas, 0,078 mg/mL para 5 cepas). Como o ensaio de Macreadie et al. não foi feito com a metodologia da microdiluição em caldo, seu resultado não pode ser considerado como concentração inibitória mínima, pois não há certeza do valor inibitório entre 3 e 100 µM no caso da sinvastatina e do valor entre 10 e 100 µM no caso da atorvastatina. Isso implica em inferir que, possivelmente, seus valores poderiam ser semelhantes aos nossos no caso das cepas de *C. albicans* ante a sinvastatina e a atorvastatina. De acordo com Bellosta (2004), as concentrações plasmáticas máximas alcançadas com uma dose oral de 40 mg para

atorvastatina e sinvastatina encontram-se, respectivamente, na faixa de 27 a 66 ng / mL e 10 a 34 ng / mL, discordando com as informações de Macreadie et al. em relação aos níveis de estatinas estarem dentro da faixa de uso para hipercolesterolemias.

Cinco cepas de *C. krusei* foram inibidas por pravastatina (CIM = 50 mg/mL), 11 cepas por sinvastatina (CIM = 0,25 mg/mL) e 11 por atorvastatina (CIM = 0,625 mg/mL) em nosso estudo, além disso, não foi encontrado CFM em nenhuma concentração testada das estatinas para estas 11 cepas. As duas cepas de *C. krusei* no ensaio de Macreadie et al., mostraram-se resistentes a quase todas as concentrações de estatinas testadas sendo inibido seu crescimento apenas com a concentração máxima de 1000 µM de sinvastatina (equivalente a 0,418 mg/mL). Interessantemente, *C. krusei* é intrinsecamente resistente ao fluconazol, tanto *in vitro*, quanto *in vivo* (OROZCO et al., 1998).

Um dos mecanismos descritos da resistência aos azóis para espécies de *Candida* seria a diminuição da absorção das drogas ou aumento do seu efluxo (OROZCO et al., 1998). Além de fornecer as informações necessárias à hidrólise das pró-drogas, lovastatina e sinvastatina, Lorenz e Parks (1990) relataram em seu artigo que o sinergismo encontrado na combinação de lovastatina e os azóis - miconazol, cetoconazol, ou clotrimazol - poderia ser em parte atribuído ao aumento da permeabilidade da membrana celular fúngica, explicado pela maior necessidade de absorção de esterol livre (exógeno), ocasionado pela escassez do esterol endógeno, devido a ação da lovastatina. Concomitantemente, os azóis teriam desta forma, maior facilidade em sua passagem para o interior da célula.

Além disso, os estudos de associação reportam que, em combinação, as drogas diminuem sua CIM, portanto, os valores por hora elevados encontrados com a droga isolada, possivelmente poderiam se enquadrar dentro de uma faixa terapêutica para uso humano. Por fim, diante dos resultados apresentados em nosso estudo das estatinas ante as cepas de *C. krusei*, uma investigação da combinação das estatinas e dos azóis ou outros antifúngicos poderia fornecer subsídios para uma alternativa na farmacoterapia dessas infecções fúngicas causadas por microrganismos resistentes.

As 12 cepas de *C. parapsilosis* tiveram seu crescimento inibido por sinvastatina (CIM = 0,25 mg / mL) e por atorvastatina (CIM = 1,25 mg / mL , 7 cepas; CIM = 2,5 mg / mL, 4 cepas e CIM = 0,625 mg / mL, 1 cepa) em nosso estudo, assim como a única cepa de *C. parapsilosis* testada no experimento de Macreadie et al., mesmo tendo apresentado valores menores de concentração das drogas sinvastatina (100 µM, equivalente a 0,0418 mg/mL) e atorvastatina (100 µM, equivalente a 0,0559 mg/mL).

Em relação a *C. tropicalis*, para sinvastatina, a faixa de CIM apresentada em nosso estudo foi de 0,0312 mg/mL a 1 mg/mL, e para as três cepas de Macreadie et al., também, se observou inibição do crescimento nos meios cuja concentração de sinvastatina foi de 100 µM, equivalente a 0,0418 mg/mL. As três cepas de *C. tropicalis* testadas por Macreadie et al. foram resistentes a todas as concentrações de atorvastatina (0 a 0,559 mg/mL) testadas, diferentemente de nosso experimento em que testamos 12 cepas de *C. tropicalis* que apresentaram CIM na faixa de 0,039 mg/mL a 5 mg/mL.

Este é o primeiro teste de sensibilidade *in vitro* envolvendo *C. neoformans* e *C. gattii* ante a sinvastatina, atorvastatina e pravastatina. Em 1997, Chin et al., como já citado, investigaram a atividade antifúngica de outra estatina, a fluvastatina frente a apenas três cepas de *C. neoformans*.

Também é o primeiro ensaio de microdiluição em caldo apresentando CIM e CFM das estatinas sinvastatina, atorvastatina e pravastatina frente às leveduras do gênero *Candida*. Além disso, em relação a trabalhos anteriores, verifica-se neste, uma quantidade maior de amostras, caracterizando maior consistência nos resultados obtidos.

A inibição do crescimento das células fúngicas ocorre provavelmente pela diminuição do nível de ergosterol das membranas fúngicas, mediante o crescimento na presença das estatinas, como Macreadie et al., (2007) demonstraram em seu experimento de resgate do crescimento com suplementação de esteróis. Isso ocorre em virtude da inibição da enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG-CoA) redutase, impedindo a transformação do seu substrato a mevanolato, em uma etapa precoce da síntese do ergosterol. Conseqüentemente, a produção de isoprenóides também é inibida e funções celulares importantes ficam desreguladas, como já explicado. Trabalhos relatam apoptose de células, quando *Mucor racemosus* é testado ante a lovastatina, além de apresentar diminuição da prenilação da proteína Ras (ROSE;LINZ, 1998).

Forrest et al. (2010) realizaram um estudo de coorte retrospectivo avaliando o uso de estatinas concomitantemente com agentes antifúngicos em pacientes de UTI com candidemia confirmada. O estudo concluiu que houve melhora na sobrevivência dos pacientes, porém o resultado não teve significância estatística, necessitando que futuros estudos sejam realizados para validar esta associação.

Em um estudo clínico realizado por Spanakis et al. (2010), foi observado que o uso de estatinas sem agentes antifúngicos em pacientes que se submeteram a cirurgias do trato gastrointestinal inferior, portadores de *diabetes mellitus* do tipo dois, reduziu a incidência de cultura positiva para espécies de *Candida*. Eles alertam para que os médicos avaliem a

necessidade do uso de estatinas como prevenção da colonização por *Candida* ou mesmo a infecção, ou, talvez, a combinação com outros agentes antifúngicos, especialmente entre pacientes de alto risco para candidíases.

O uso generalizado de estatinas na população humana e seus efeitos antifúngicos podem sugerir uma alteração no padrão normal de colonização fúngica. Além disso, como as estatinas causam uma diminuição do nível de ergosterol nas membranas fúngicas, possivelmente uma alteração da sensibilidade de antifúngicos que também atuam na síntese do ergosterol, como os azóis e anfotericina, poderia acontecer (MACCREADIE et al., 2007).

Estudos relatam que *C. albicans* e *C. tropicalis* produzem mais biofilme do que as outras espécies de *Candida* (SHIN et al., 2002; GASPARETTO et al., 2005; TUMBARELIO et al., 2007). Liu et al. (2009), provou através de experimentos utilizando biofilme e sinvastatina, que cepas de *C. albicans*, na formação de biofilme eram mais suscetíveis a ação da sinvastatina do que na forma planctônica, além disso concentrações muito baixas foram necessárias para a inibição do biofilme sem causar atividade fungicida (1, 2 e 5  $\mu\text{M}$ ). Isto poderia explicar o porque das espécies de *C. albicans* e *C. tropicalis* apresentarem CIMs menores do que as outras espécies do nosso estudo.

Por outro lado, *C. albicans* é a espécie que mais produz farnesol (WEBER et al., 2008), uma importante molécula sinalizadora que impede a formação do biofilme (RAMAGE et al., 2002; NICKERSON; ATKIN; HORNBY, 2006). Com a ação das estatinas inibindo a formação do ergosterol e de toda a via de sua síntese, e, conseqüentemente da formação do farnesol, mais biofilme pode ser produzido pelas células fúngicas, implicando deste modo, na maior sensibilidade de espécies como *C. albicans* e *C. tropicalis*, que nesta situação, aumentariam ainda mais sua produção de biofilme.

Aumento da expressão de genes que codificam bombas de efluxo tem sido amplamente observado em leveduras resistentes ao azóis. Duas famílias de transportadores estão relacionadas ao processo de efluxo de droga: ABC e MTS, sendo os genes mais comuns, CDR e MDR1, respectivamente (SANGLARD et al., 2009).

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).

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; 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 *C. dubliniensis* (CdCDR1 e CdCDR2), *C. krusei* (ABC1 e 2), *C. tropicalis* (homólogo CDR1) e de *C. neoformans* (CnAFR1,) foram reportados em isolados resistentes. (MORAN et al., 1998; BARCHIESI et al., 2000; KATIYAR & EDLIND, 2001; PINJON et al., 2005; SANGLARD et al. 2009).

A existência desses transportadores pode explicar em parte a maior susceptibilidade de *C. albicans* em comparação com as outras espécies de *Candida* observadas em nosso experimento, visto que, geralmente *C. albicans* foi mais sensível às drogas do que as espécies não *albicans*.

## 8 CONCLUSÃO

1. Sinvastatina e atorvastatina tem atividade antifúngica *in vitro* contra leveduras do gênero *Cryptococcus*.
2. Dentre as estatinas testadas, sinvastatina foi a que apresentou menores valores de CIM e de CFM para todas as espécies de *Candida* e *Cryptococcus* avaliadas.
3. Leveduras do gênero *Candida* apresentaram CIMs e CFMs menores do que as leveduras do gênero *Cryptococcus*.
4. Dentro do gênero *Candida*, a espécie *C. albicans* foi a mais sensível perante todas as estatinas estudadas.
5. Dentro do gênero *Cryptococcus*, não houve diferença significativa entre os valores de CIM apresentados pelas espécies *C. neoformans* e *C. gattii*.
6. O trabalho abre perspectivas para realização de estudos fase 4, com o intuito de determinar as doses para a realização de pesquisas *in vivo*.

## REFERÊNCIAS

- AHMAD, S. .; KLAN, Z.; MUSTAFA, A. S.; KLAN, Z. U. Seminested PCR for diagnosis of candidemia: comparison with culture, antigen detection, and biochemical methods for species identification. **J. Clin. Microbiol.**, v. 40, p. 2483-2489, 2002.
- ALLER, A. I., MARTIN-MAZUELOS, E.; LOZANO, F.; GOMEZ-MATEOS, J.; STEELE-MOORE, L.; HOLLOWAY, W. J.; GUTIERREZ, M. J.; RECIO, F. J.; ESPINEL-INGROFF, A. Correlation of fluconazole MICs with clinical outcome in cryptococcal infection. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.44, p.1544-1548, 2000.
- ALMEIDA, O. P.; SCULLY, P. Fungal infections of the mouth. **Braz. J. Oral Sci.**, v. 1, p. 19-26, 2002.
- ALMOG, Y.; SHEFER, A.; NOVACK, V.; MAIMON, N.; BARSKI, L.; EIZINGER, M.; FRIGER, M.; ZELLER, L.; DANON, A: Prior statin therapy is associated with a decreased rate of severe sepsis. **Circulation**, v.110, p.880-885, 2004.
- ALONSO-VALLE, H.; ACHA, O.; GARCÍA-PALOMO, J. D.; FARIÑAS-ÁLVARES, C.; FERNÁNDEZ-MAZARRASA, C.; FARIÑAS, M. C. Candidemia in tertiary care hospital: epidemiology and factors influencing mortality. **Eur. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 22, p. 254-257, 2003.
- AMARO, M. C. O. **Caracterização de isolados clínicos de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* quanto a susceptibilidade ao fluconazol.** Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.
- ARNAUD, C.; BRAUNERSREUTHER, V.; MACH, F. Toward immunomodulatory and anti-inflammatory properties of statins. **Arch. Mal. Coeur Vaiss.**, v.15, p.202-206, 2005.
- ATIQUE, T. S. C. **Pesquisa das espécies e sensibilidade antifúngica de *Candida* sp em indivíduos soropositivos para o HIV.** Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, São José do Rio Preto, 2006.
- AVVEDIMENTO, E.V.; INDOLF, C.; RAPACCUOLO, A.; DI LORENZO, E.; ESPOSITO, G.; STABILE, E.; FELICIELLO, A.; MELE, E.; GIULIANO, P.; CONDORELLI, G. Inhibition of cellular ras prevents smooth muscle cell proliferation after vascular injury in vivo. **Nat. Med.**, v. 1, n. 6, p. 541-545, 1995.
- BAMBEKE, V.; MICHOT, F. J. M.; VAN ELDERE, J.; TULKENS, P. M. Quinolones in 2005: an update. **Clin. Microbiol. Infection**, v. 11, p. 256–280, 2005.
- BARCHIESI, F.; CALABRESE, D.; SANGLARD, D.; FALCONI, D.I.;FRANCESCO, L.; CASELLI, F.; GIANNINI, D.; GIACOMETTI, A.; GAVAUDAN, S.; SCALISE, G. Experimental induction of fluconazole resistance in *Candida tropicalis* ATCC 750. **Antimicrob. Agentes Chemother.**, v.44, p.1578-1584, 2000.
- BASSETTI, M.; RIGHI E.; COSTA A.; FASCE R.; MOLINARI M.P.; ROSSO R.; PALLAVICINI F.B.; VISCOLI C. Epidemiological trends in nosocomial candidemia in intensive care. **BMC Infect. Dis.**, v. 6, p. 21, 2007.



BAUM, G. L.; ARTIS D. Characterization of the growth inhibition factor for *Cryptococcus neoformans* (Gifc) in human serum. **Am. J. Med. Sci.**, v. 246, p.53–57,1963.

BAUM, G. L.; ARTIS D. Fungistatic effects of cell free human serum. **Am. J. Med. Sci.**, v.242, p.761–770, 1961.

BAUM, G. L.; ARTIS D. Growth inhibition of *Cryptococcus neo-formans* by cell free human serum. **Am. J. Med. Sci.**, v. 241, p.613–616, 1961.

BEHRMAN, R. E.; MASCI J. R.; NICHOLAS, P. Cryptococcal skeletal infections: case report and reviews. **Rev. Infect. Dis.**, v. 12, p:181-190, 1990.

BELLOSTA, S.; PAOLETTI, R.; CORSINI, A. Safety of statins: focus on clinical pharmacokinetics and drug interactions. **Circulation**, v.109, n. 23, Suppl. 1, p. III50-57, 2004.

BODEY, G. P. Hematogenous and major organ candidiasis. In: \_\_\_\_\_. **Candidiasis: pathogenesis, diagnosis and treatment**. New York: Ed. Raven Press, 1993. p. 279-329.

BOEKHOUT, T.; THEELEN, B.; DIAZ, 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.

BORGHI, E.; IATTA, R.; SCIOTA R.; BIASSONI, C.; CUNA, T.; MONTAGNA, M. T.; MORACE, G. Comparative Evaluation of the Vitek 2 Yeast Susceptibility Test and CLSI Broth Microdilution Reference Method for Testing Antifungal Susceptibility of Invasive Fungal Isolates in Italy: the GISIA3 Study. **J. Clin. Microbiol.**, v. 48, p. 3153–3157, 2010.

BOSE, I.; REESE, A.J.; ORY, J.J.; JANBON, G.; DOERING, T.L. A yeast under cover: the capsule of *Cryptococcus neoformans*. **Eukaryot. Cell**, v.2, p.655-663, 2003.

BRILHANTE, R. S. N.; FECHINE, M. A. B.; CORDEIRO, R. A.; ROCHA, M. F. G.; RIBEIRO, J. F.; MONTEIRO, A. J.; LIMA, R. A. C.; MESQUITA, J. R. L.; CAMARGO, Z. P.; SIDRIM, J. J.C. In Vitro Effect of Sulfamethoxazole-Trimethoprim against *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 54, p. 3978–3979, 2010.

BRILHANTE, R. S. N.; PAIVA, M. A. N.; SAMPAIO, C. M. S.; TEIXEIRA, C. E. C.; CASTELO-BRANCO, D. S. C. M., LEITE, J. J. G.; MOREIRA, C. A.; SILVA, L. P.; CORDEIRO, R. A.; MONTEIRO, A. J.; SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. Yeasts from *Macrobrachium amazonicum*: a focus on antifungal susceptibility and virulence factors of *Candida* spp. **FEMS Microbiol. Ecology**, v. 76, p. 268-277, 2011.

BRITO, E. H. S.; FONTENELLE, R. O. S.; BRILHANTE, R. S. N.; CORDEIRO, R. A.; MONTEIRO, A. J.; SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. The anatomical distribution and antimicrobial susceptibility of yeast species isolated from healthy dogs. **Vet. J.**, v. 182, p. 320-326, 2009.

BRITO, E. O. D. **Susceptibilidade frente a drogas antifúngicas de amostras de *Cryptococcus neoformans* de origem ambiental e clínica, isoladas no estado de Minas**

**Gerais.** Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006.

BURRIDGE, K.; WENNERBERG, K. Rho and Rac take center stage. **Cell**, v. 116, p.167–179, 2004.

CAETANO, E. P. **Efeito inibitório in vitro de ciprofloxacina isolada e em combinação com antifúngicos frente a *Coccidioides posadasii* e *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*.** Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2010.

CALDERONI, R. A.; FONZI, W. A. Virulence factors of *Candida albicans*. **Trends Microbiol.**, v. 9, p. 327-335, 2001.

CAMPO, V. L.; CARVALHO, I. Estatinas hipolipêmicas e novas tendências terapêuticas. **Quim. Nova**, v. 30, n. 2, p. 425-430, 2007.

CAMPOS, H. S. Tratamento da tuberculose. **Pulmão**, v. 16, p. 21-31, 2007.

CAREW, T.E. Role of biologically modified low-density lipoprotein in atherosclerosis. **Am. J. Cardiol.**, v. 64, p.18-22, 1989.

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

CASTRO, G.; CERVI M.C.; MARTINEZ R. Vertical transmission of *Cryptococcus neoformans* from a mother coinfecting with human immunodeficiency virus: case report. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 39, p. 501-503, 2006.

CHAMILOS, G.; LEWIS R. E.; KONTOYIANNIS D. P. Lovastatin Has Significant Activity against *Zygomycetes* and Interacts Synergistically with Voriconazole. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 50, p. 96–103, 2006.

CHANDLER, F.W.; WATTS, J.C.. Cryptococcosis. In: CONNOR, D. H.; CHANDLER, F. W.; SCHWARTZ, D. A.; MANZ, H. J.; LACK, E. E.; BAIRD, J. K.; UTZ, J. P. (Ed.). **Pathol of infect dis**. Appleton & Lange, Stamford, 1997. v. 7, p. 989-997, 1997.

CHANG, M. R.; CORREIA, F. P.; COSTA, I. C.; XAVIER, P. C. N.; PALHARES, D. B.; TAIRA, D. L.; PANIAGO, A. M. M.; PONTES, E. R. J. C.; MACHADO, V. E. *Candida* bloodstream infection: data from a teaching hospital in Mato Grosso do Sul, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop.**, v. 50, p. 265-268, 2008.

CHATURVEDI, S.; RODEGHIER, B.; FAN, J.; MCCLELLAND, C.M.; WICKES, B.L.; CHATURVEDI, V. Direct PCR of *Cryptococcus neoformans* MAT $\alpha$  and MAT $\alpha$  pheromones to determine mating type, ploidy, and variety: a tool for epidemiological and molecular pathogenesis studies. **J Clin Microbiol.**, v. 38, p. 2007-2009, 2000.

CHIEN, S.; ZHU, Y.; LIAO, H.; WANG, N.; MA, K-S.; VERNA, L. K.; SHYY, J. Y.-J.; STEMERMAN, M. B. Effects of active and negative mutants of ras on rat arterial neointima formation. **J. Surg. Res.**, v. 94, n. 2, p.124-132, 2000.

CHIN, N. X.; WEITZMAN, I.; DELLA LATTA, P. In vitro activity of fluvastatin, a cholesterol-lowering agent, and synergy with fluconazole and itraconazole against *Candida* species and *Cryptococcus neoformans*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 41, p.850-852, 1997.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Método de referência para testes de diluição em caldo para determinação da sensibilidade de leveduras à terapia antifúngica:** Norma aprovada – M27-A2. 2. ed. Pennsylvania, 2002a. v. 2.

\_\_\_\_\_. **Método de referência para testes de diluição em caldo para determinação da sensibilidade a terapia antifúngica dos fungos filamentosos:** Norma aprovada – M38-A, v. 22, Pennsylvania, 2002b. v. 22.

COLE, G.T.; HALAWA A.A.; ANAISSE E.J. The role of the gastrointestinal tract in hematogenous candidiasis: from the laboratory to the bedside. **Clin. Infect. Dis.**, v. 22, p. 73-88, 1996.

COLOMBO, A. L. **Contribuições para o entendimento da epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp. e para sua abordagem terapêutica.** Tese (Livre Docência) - Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, SP, 2003.

COLOMBO, A. L.; NUCCI, M.; SALOMÃO, R.; BRANCHINI, M.L.; RICHTMANN, R.; DEROSI, A. High rate of non-*albicans* candidemia in Brazilian tertiary care hospitals. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 34, p. 281-286, 1999.

COLOMBO, A. L.; NUCCI, M.; PARK, B. J. NOUER, S. A.; ARTHINGTON-SKAGGS, B. MATTA, D. A.; WARNOCK, D.; MORGAN, J. Epidemiology of candidemia in Brazil: nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. **J. Clin. Microbiol.**, v. 44, p. 2816-2823, 2006.

CONSOLARO, M.E.; ALBERTONI, T.A.; SVIDZINSKI, A.E.; PERALTA, R.M.; SVIDZINSKI, T.I. Vulvovaginal candidiasis is associated with the production of germ tubes by *Candida albicans*. **Mycopathologia**, v. 159, p. 501-507, 2005.

COOKE, V. M.; MILES R. J.; PRICE, R. G.; MIDGLEY, G.; KHAMRI, W.; RICHARDSON, A. C. New chromogenic agar Medium for the identification of *Candida* spp. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 68, p. 3622-3627, 2002.

CORDEIRO, R. A.; BRILHANTE, R. S. N.; ROCHA, M. F. G.; MEDRANO, D. J. M.; MONTEIRO, A. J.; TAVARES, J. L.; LIMA, R. A. C.; CAMARGO, Z. P. C.; SIDRIM, J. J. C. *In vitro* synergistic effects of antituberculous drugs plus antifungals against *Coccidioides posadasii*. **J. Antimicrob. Agents**, v. 34, p. 278-280, 2009.

CORRÊA, P. R.; DAVID, P.R.S.; PERES, N. P.; CUNHA, K. C.; ALMEIDA, M. T. G. Caracterização fenotípica de leveduras isoladas da mucosa vaginal em mulheres adultas. **Rev. Bras. Ginecol. Obstetr.**, v. 3, p. 177-181, 2009.

CORSINI, A.; BELLOSTA S.; BAETTA R. New insights into the pharmaco-dynamic and pharmacokinetic properties of statins. **Pharmacol. Therap.**, v. 84, p.413-428, 1999.

COSTA, A. K. F. **Análise fenotípica e molecular de cepas de *Cryptococcus* spp. obtidas de fontes ambientais e clínicas.**2009. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2009.

COSTA, K. R. C.; FERREIRA, J. C.; KOMESU, M. C.; CANDIDO, R. C. *Candida albicans* and *Candida tropicalis* in oral candidosis: quantitative analysis, exoenzyme activity and antifungal drug sensitivity. **Mycopathologia**, v. 167, p. 73-79, 2009.

COSTA-DE-OLIVEIRA, S.; PINA-VAZ, D.; MENDONÇA A.; GONÇALVES R. A first Portuguese epidemiological survey of fungaemia in a university hospital. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 27, p. 365-374, 2008.

CUENCA-ESTRELLA, M. ; LEE-YANG, W.; CIBLAK, M. A.; ARTHINGTON-SKAGGS, B. A.; MELLADO, E.; WARNOCK, D. W.; RODRIGUEZ-TUDELA, J. L. Comparative evaluation of NCCLS M27-A and EUCATEST broth microdilution procedures for antifungal susceptibility testing of *Candida* species. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 46, p. 3644-3647, 2002.

DAMBROSO, D.; SVIDZINSKI, T.I.E.; SVIDZINSKI, A.E.; DALALIO, M.M.O.; MOLITERNO, R.A. Radiotherapy effect on frequency of *Candida* spp. and on virulence of *C. albicans* isolated from the oral cavity of head and neck cancer patients. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Aplicada**, v. 30, p. 25-32, 2009.

DANNAOUI, E.; ABDUL, M.; ARPIN, M.; MICHEL-NGUYEN, A.; PIENS, M. A.; FAVEL, A.; LORTHOLARY, O.; DROMER, F. French Cryptococcosis Study Group Results Obtained with Various Antifungal Susceptibility Testing Methods Do Not Predict Early Clinical Outcome in Patients with Cryptococcosis. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 50, p. 2464–2470, 2006.

DE HOOG, G. S.; GUARRO, J.; GENÉ, J.; FIGUEIRAS, M. J. **Atlas of Clinical Fungi**. 2nd ed. [S.l.]: Editora Baarn, 2000.

DIGNANI, M. C.; SOLOMKIN J. S.; ANAISSIE E. *Candida*. In: ANAISSIE, E.; MCGINNIS, M. R.; PFALLER, M. A. **Medical mycology**. 1st ed. Filadélfia: Churchill Livingstone, 2003. p. 195-239.

DRONDA, F.; ALONSO-SANZ, M.; LAGUNA, F.; CHAVES, F.; MARTINEZ-SUAREZ, J. V.; RODRIGUEZ-TUDELA, J. L.; GONZALEZ-LOPES, A.; VALENCIA, E. Mixed oropharyngeal candidiasis due to *Candida albicans* and non- *albicans* *Candida* strains in HIV infected patients. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v.15,p. 446-452, 1996.

DUBE, M.P.; HESELTINE, P.N.; RINALDI, M.G.; EVANS, S.; ZAWACKI, B. Fungemia and colonization with nystatin-resistant *Candida rugosa* in a burn unit. **Clin. Infect. Dis.**, v.18, p. 77-82, 1994.

DUNN, A. J. Effects of cytokines and infections on brain neurochemistry. **Clin. Neurosci. Res.**, v. 6, p.52-68, 2006.

DUPONT, B.; GRAYBILL, J. R.; ARMSTRONG, D.; LAROCHE, R.; TOUZÉ, J.E.; WHEAT, L. J. Fungal infections in AIDS patients. **J. Med. Vet. Mycol.**, v.30, p. 9-28, 1992.

EGGIMANN, P.; GARBINO J.; PITTET D. Epidemiology of *Candida* species infections in critically ill non-immunosuppressed patients. **Lancet Infect. Dis.**, v. 3, p.685–702, 2003.

ELLIS, D. H.; PFEIFFER, T. J. Ecology, life cycle, and infectious propagule of *Cryptococcus neoformans*. **Lancet**, v. 336, p.923-925, 1990.

ELLIS, D. H.; PFEIFFER, T. J. Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 28, p.1642-1644, 1990.

ERTÜRK, S.; ÖNAL, A.; ÇETIN, S. M. Analytical methods for the quantitative determination of 3-hidroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors in biological samples. **J. Chromatogr. B**, v. 793, p. 193-205, 2003.

EVANS, E.G. Resistance of *Candida* species to antifungal agents used in the treatment of onychomycosis: a review of current problems. **Br. J. Dermatol.**, v. 141, p. 33-35, 1999.

FELDMESSER, M.; KRESS, Y.; MEDNICK, A.; CASADEVALL, A. The effect of the echinocandin analogue caspofungin on cell wall glucan synthesis by *Cryptococcus neoformans*. **J. Infect. Dis.**, v. 182, p.1791-1795, 2000.

FENN, J. P.; SEGAL, H.; BARLAND, B.; DENTON, D.; WHISENANT, J.; CHUN, H.; CHRISTOFFERSON, K.; HAMILTON, L.; CARROL, K. Comparison of update Vitek yeast biochemical card and API 20C yeast identification systems. **J. Clin. Microbiol.**, v.32, p.1184-1187, 1994.

FILIÚ, W.F.; WANKE, B.; AGÜENA, S.M.; VILELA, V.O.; MACEDO, R.C.; LAZÉRA, M. Avian habitats as sources of *Cryptococcus neoformans* in the city of Campo Grande, Mato Grosso do Sul. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.35, p.591-595, 2002.

FONSECA, F. A. H. Farmacocinética das estatinas. **Arq. Bras. Cardiol.**,v. 66, p. 1-7, 2011.

FORREST, G. N.; KOPACK, A. M.; PERENCEVICH, E. N. Statins in Candidemia: clinical outcomes from a matched cohort study. **BMC Infect. Dis.**, v.10, p.152, 2010.

FOSTEL, J. M.; MONTGOMERY, D. A.; SHEN, L. L. Characterization of DNA topoisomerase I from *Candida albicans* as a target for drug discovery. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.36, p.2131–2138, 1992.

FOX, R.; NEAL, K. R.; LEEN C. L.; ELLIS, M. E.; MENDAL, B. K. Fluconazole resistant *Candida* in AIDS. **J. Infection**, v.22, p. 201-204, 1991.

FRANZOT, S. P.; SALKIN, I. F.; CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*: separate varietal status for *Cryptococcus neoformans* sorotype A isolates. **J. Clin. Microbiol.**, v.37, p. 838-840, 1999.

FURLANETO-MAIA, L.; SPECIAN, A. F.; BIZERRA, F. C.; OLIVEIRA, M. T.; FURLANETO, M. C. In vitro evaluation of putative virulence attributes of oral isolates of *Candida* spp. obtained from elderly healthy individuals. **Mycopathologia**, v. 166, p. 209-217, 2008.

GÁCSEER, A.; TROFA, D.; SCHÄFER, W.; NOSANCHUK, J. D. Targeted gene deletion in *Candida parapsilosis* demonstrates the role of secreted lipase in virulence. **J. Clin. Invest.**, v. 117, p. 3049-958, 2007.

GASPARETTO, A.; MELYSSA FERNANDA NORMAN NEGRI; CLAUDETE RODRIGUES DE PAULA; TEREZINHA INEZ ESTIVALET SVIDZINSKI. Produção de biofilme por leveduras isoladas de cavidade bucal de usuários de prótese dentária. **Acta Scientiarum Health Science**, v. 27, n. 1, p. 37-40, 2005.

GIOLO, M. P.; SVIDZINSKI, T. I. E. Fisiopatogenia, epidemiologia e diagnóstico laboratorial da candidemia. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v. 46, p. 225-234, 2010.

GONZÁLEZ G. M. *In vitro* activities of isavuconazole against opportunistic filamentous and dimorphic fungi. **Med. Mycol.**, v. 47, p. 71-76, 2009.

GOODMAN, L. S.; GILMAN, A. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 10. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2003.

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. 282-290, 2005.

GRUPO DO CONSENSO DE CRIPTOCOCOSE. Consenso em criptococose – 2008. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 41, p. 524-544, 2008.

GUÉHO, E.; IMPROVISI, L.; DE HOOG, G. S.; DUPONT, B. *Trichosporon* on humans: a practical account. **Mycoses**, v. 37, p. 3-10, 1993.

GUPTA, G.; FRIES, B. C. Variability of phenotypic traits in *Cryptococcus* varieties and species and the resulting implications for pathogenesis. **Future Microbiol.**, v.5, p. 775–787, 2010.

GUPTA, R.; PLANTINGA, L. C.; FINK, N. E.; MELAMED, M. L.; CORESH, J.; FOX, C. S.; LEVIN, N. W.; POWE, N. R.: Statin use and hospitalization for sepsis in patients with chronic kidney disease. **J. Am. Med. Assoc.**, v.297, p. 1455-1464, 2007.

GUPTA, T. P.; EHRINPREIS, M. N. *Candida*-associated diarrhea in hospitalized patients. **Gastroenterology**, v.98, p. 780-785, 1990.

HAHN, R. C.; MORATO CONCEIÇÃO, Y. T.; SANTOS, N. L.; FERREIRA, J. F.; HAMDAN, J. S. Disseminated paracoccidioidomycosis: correlation between clinical and *in vitro* resistance to ketoconazole and trimethopim sulphamethoxazole. **Mycoses**, v.46, p. 342-347, 2003.

HANAFY, A.; UNO, J.; MITANI, H.; KANG, Y.; MIKAMI, Y. *In vitro* antifungal activities of sulfa drugs against clinical isolates of *Aspergillus* and *Cryptococcus* species. **Jpn. J. Med. Mycol.**, v. 38, p. 47-56, 2007.

HENDRY, A. T.; BAKERSPIGEL A. Factors affecting serum inhibited growth of *Candida albicans* and *Cryptococcus neoformans*. **Sabouraudia**, v.7, p. 219–229, 1969.

HERNÁNDEZ, I. C. V.; MACHÍN, G. M.; ANDREU, C. M.F.; ZARAGOZI, M. T. I. Pigmentación de cepas de *Cryptococcus neoformans* sobre agar semilla de girassol. **Rev. Cub. Med. Trop.**, v.55, p. 119-120, 2003.

HIDA, S.; YOSHIDA, M.; NAKABAYASHI, I.; MIURA, N. N.; ADACHI, Y.; OHNO, N. Antifungal activity of sulfamethoxazole toward *Aspergillus* species. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 28, p. 773-778, 2005.

HOLMBERG, K.; MEYER, R. D. Fungal infections in patients with AIDS and AIDS-related complex. **Scand. J. Infect. Dis.**, v.18, p.407-421, 1986.

HOPE, J. E.; FREI, P. Evaluation of six commercial tests and germ-tube test. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v.18, p. 188-191, 1999.

HORTA, J. A.; STAATS, C.C.; CASALI, A.K.; RIBEIRO, A.M.; SCHRANK, I.S.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M.H. Epidemiological aspects of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* isolates in the Brazilian state Rio Grande do Sul. **Med. Mycol.**, v. 40, p. 565-571, 2002.

HOSPENTHAL, D. R.; MURRAY, C. K.; RINALDI, M. G. The role of antifungal susceptibility testing in the therapy of candidiasis. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v.48, p.153-160, 2004.

HSIA, H. H.; WERNS, S. W.; WALTON, J. A.; NABEL, E. G.; SANZ, M. L.; PITT, B. Evidence of endothelial dysfunction in angiographically normal coronary arteries of patients with coronary artery disease. **Circulation**, v. 79, p. 287-291, 1989.

HUSTON, S. M.; MODY, C. H. Cryptococcosis: an emerging respiratory mycosis. **Clin. Chest Med.**, v. 30, p. 253-264, 2009.

HYVELIN, J. M.; HOWELL, K.; NICHOL, A.; COSTELLO, C. M.; PRESTON, R. J.; MCLOUGHLIN, P. Inhibition of Rho-kinase attenuates hypoxia-induced angiogenesis in the pulmonary circulation. **Circ. Res.**, v. 97, p. 185-191, 2005.

IBRAHIM, A. S.; MIRBOD, F.; FILLER, S. G.; BANNO, Y.; COLE, G. T.; KITAJIMA, Y.; EDWARDS JR, J. E.; NOZAWA, Y.; GHANNOUM, E. M. A. Evidence implicating phospholipase as a virulence factor of *Candida albicans*. **Infect. Immunity**, v. 63, p. 1993-1998, 1995.

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.

IGEL, H. J.; BOLANDE, R. P. Humoral defense mechanisms in cryptococcosis: substances in normal human serum, saliva, and cerebrospinal fluid affecting the growth of *Cryptococcus neoformans*. **J. Infect. Dis.**, v. 116, p.75-83, 1966.

IKEDA, R.; SUGITA, T.; JACOBSON, E. S.; SHINODA, T. Laccase and melanization in clinically important *Cryptococcus* species other than *Cryptococcus neoformans*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 40, p. 1214-1218, 2002.

IZAR, M. C. O. Tratamento hipolipemiante em situações especiais – Pós-transplante e/ou terapia imunossupressora. **Arq. Bras. Cardiol.**, v.85, p. 112-113, 2005.

JARVIS, B. B.; MILLER, J. D. Natural Products, Complexity and Evolution In: ROMEO, J. T.; SAUNDERS, J. A.; BARBOSA, P. (Ed.). **Phytochemical Diversity and Redundancy in Ecological Interactions**. New York: Plenum Press, 1996. v. 8, p. 265-293.

JESSUP, C. J.; PFALLER, M. A.; MESSER, S. A.; ZHANG, J.; TUMBERLAND, M.; MBIDDE, E. K.; GHANNOUM, M. A. Fluconazole susceptibility testing of *Cryptococcus neoformans*: comparison of two broth microdilution methods and clinical correlates among isolates from Ugandan AIDS patients. **J. Clin. Microbiol.**, v. 36, p.2874-2876, 1998.

JOHNSON, E. M. Issues in antifungal susceptibility testing. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 61, p.13–18, 2008.

JOHNSON, J. E.; PERRY, J. E.; FEKETY, F. R.; KADULL, P. J.; CLUFF, L. E. Laboratory acquired coccidioidomycosis. **Ann. Int. Med.**, v. 60, p. 941-956, 2008.

JONES, P.; KAFONEK, S.; LAURORA, I.; HUNNINGHAKE, D. Comparative dose efficacy study of atorvastatin versus simvastatin, pravastatin, lovastatin, and fluvastatin in patients with hypercholesterolemia (the curves study). **Am. J. Cardiol.**, v. 81, p. 582-587, 1998.

JONGWUTIWES, U.; SUNGKANUPARPH, S.; KIERTIBURANAKUL, S. Comparison of clinical features and survival between cryptococcosis in human immunodeficiency virus (HIV)-positive and HIV-negative patients **Jpn. J. Infect. Dis.**, v.61, p.111-115, 2008.

KANEKI, M.; SUGITA, M.; SUGITA, H. Farnesyltransferase inhibitor, manumycin A, prevents atherosclerosis development and reduces oxidative stress in apolipoprotein E-deficient mice. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 27, n. 6, p.1390-1395, 2007.

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.

KHAN, Z. U.; RANDHAWA, H. S.; KOWSHIK, T.; CHOWDHARY, A.; CHANDY, R. Antifungal susceptibility of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* isolates from decayed wood of trunk hollows of *Ficus religiosa* and *Syzygium cumini* trees in north-western India. **J. Antimicrob. Therap.**, v. 60, p. 312-316, 2007.

KIDD, S.E.; HAGEN, F.; TSCHARKE, R.L.; HUYNH, M.; BARTLETT, K.H.; FYFE, M.; MACDOUGALL, L.;BOEKHOUT, T.; KWON-CHUNG, K.J.; 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, p. 17258-17263, 2004.

KIVISTO, K. T.; KANTOLA, T.; NEUVONEN, P. J. Different effects of itraconazole on the pharmacokinetics of fluvastatin and lovastatin. **Br. J. Clin. Pharmacol.**, v. 46, p. 49-53, 1998.

KLAPHAKE, E.; CLANCY, J. Raptor gastroenterology. **Vet. Clin. Exotic Animal Practice**, v. 8, p. 307-327, 2005.



KOCIJAN, A.; GRAHEK, R.; BASTARDA, A.; KRALJ, Z. L. Fast analysis of pravastatin in production media. **J. Chromatography**, v. 822, p. 311-315, 2005.

KUMAMOTO, C. A.; VINCES, M. D. Contributions of hyphae and hyphae-co-regulated genes to *Candida albicans* virulence. **Cell Microbiol.**, v. 7, p. 1546-54, 2005.

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

LACAZ, C. S. **Tratado de micologia médica**. 9. ed. São Paulo: Sarvier, 2002.

LAGROU, K.; VAN ELDERE, J.; KEULEERS, S.; HAGEN, F.; MERCKX, R.; VERHAEGEN, J.; PEETERMANS, W.E.; BOEKHOUT, T. Zoonotic transmission of *Cryptococcus neoformans* from a magpie to an immunocompetent patient. **J. Int. Med.**, v. 257, p.385-388, 2005.

LAZCANO, O.; SPEIGHTS, V. O.; BILBAO, J. JR.; BECKER, J.; DIAZ, J. Combined Fontana-Masson-Mucin staining of *Cryptococcus neoformans*. **Arch. Pathol. Lab.**, v. 115, p. 1145-1149, 1991.

LAZÉRA, M. S.; CAVALCANTI, M. A.; TRILLES, L.; NISHIKAWA, M. M.; WANKE, B. *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* evidence for a natural habitat related to decaying wood in a pottery tree hollow. **Med. Mycol.**, v. 36, p. 119 -122, 1998.

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, p.379 -383, 2000.

LESZCZYNSKA, A.; BURZYNSKA, B.; PLOCHOCKA, D.; KAMINSKA, J.; ZIMNICKA, M.; KANIA, M.; KILISZEK, M.; WYSOCKA-KAPCINSKA, M.; DANIKIEWICZ, W.; SZKOPINSKA, A. Investigating the Effects of Statins on Cellular Lipid Metabolism Using a Yeast Expression System. **PLoS ONE**, v.4, p.9, 2009.

LIAO, J. K. ; TAKEMOTO, M.; HIROKI, J.; SHIMOKAWA, H. Rho-kinase mediates hypoxia-induced downregulation of endothelial nitric oxide synthase. **Circulation**, v. 106, p. 57-62, 2002.

LIN, X. *Cryptococcus neoformans*: Morphogenesis, infection, and evolution. **Infect. Gen. Evol.**, v. 9, p. 401-416, 2009.

LIN, X.; HEITMAN, J. The biology of the *Cryptococcus neoformans* species complex. **Ann. Rev. Microbiol.**, v.60, p.69-105, 2006.

LINDENBERG, A. S. C. CHANG, M. R.; PANIAGO, A. M. M.; Lazéra, M. S.; MONCADA, P. M. F.; 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.**, v. 50, n. 2, p 2008.

LIU, G.; VELLUCCI, V.F.; KYC, S.; HOSTETTER, M. K. Simvastatin inhibits *Candida albicans* biofilm in vitro. **Pediatr. Res.**, v.66, p. 600-604, 2009.

LORENZ, R.T.; PARKS L.W. Effects of lovastatin (mevinolin) on sterol levels and on activity of azoles in *Saccharomyces cerevisiae*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 34, p.1660-1665, 1990.

MCFADDEN, D.; ZARAGOZA, O.; CASADEVALL, A. The capsular dynamics of *Cryptococcus neoformans*. **Trends Microbiol.**, v.14, p. 497-505, 2006.

MACDONALD, R. H. Lipid-lowering drugs and atherosclerosis. In: Brody, T. M. (Ed.). **Human Pharmacology: molecular to clinical**. 3<sup>rd</sup> ed. St. Louis: Mosby, 1998. p. 286-294.

MACREADIE I.G; JOHNSON G.; SCHLOSSER T.; MACREADIE P.I. Growth inhibition of *Candida* species and *Aspergillus fumigates* by statins. **FEMS Microbiol L**, v.262, p. 9-13, 2006.

MAIA, D. C. B. S. C. **Leveduras isoladas do trato gastrintestinal de calopsitas (*Nymphicus hollandicus*):** determinação da microbiota e análise fenotípica. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2010.

MANOSUTHI, W.; CHOTTANAPUND, S.; SUNGKANUPARPH S. Mortality rate of early versus deferred initiation of antiretroviral therapy in HIV-1-infected patients with cryptococcal meningitis. **JAIDS**, v. 48, p. 508-509, 2008.

MARRA, R.E.; HUANG, J.C.; FUNG, E.; NIELSEN, K.; HEITMAN, J.; VILGALYS, R.; MITCHELL, T.G. A genetic linkage map of *Cryptococcus neoformans* variety *neoformans* serotype D (*Filobasidiella neoformans*), **Genetics**, v.167, p.619-631, 2004.

MARINHO, A. M. R.; MARINHO, P. S. B.; RODRIGUES-FILHO, E. Chemical components of *Penicillium* sp, an endophytic fungus from *Murraya paniculata* (Rutaceae). **Rev. Ciênc. Exatas Nat.**, v. 9, p. 113-117, 2007.

MARTIN, R. S.; M.D., MANNINO, D. M.; EATON, S.; MOSS, M. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. **N. Engl. J. Med.**, v. 348, p. 1546-1554, 2003.

MENICHETTI, F.; FIORIO, M.; TOSTI, A.; GATTI, G.; BRUNA PASTICCI, M.; MILETICH, F.; MARRONI, M.; BASSETTI, D.; PAULUZZI, S. High-dose fluconazole therapy for cryptococcal meningitis in patients with AIDS. **Clin. Infect. Dis.**, v.22, p.838-840, 1996.

MEYER, W.; MARSZEWSKA, K.; AMIRMOSTOFINA, M.; IGREJA, R.P.; HARDTKE, C.; METHLING, K.; VIVIANI, M.A.; CHInbjhm8njuhNDAMPORN, A.; SUKROONGREUNG, S.; JOHN, M.A.; ELLIS, D.H.; SORRELL, T.C. Molecular typing of global isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* by PCR-fingerprinting and RAPD. A pilot study to standardize techniques on which to base a detailed epidemiological survey. **Electrophoresis**, v. 20, p. 1790-1799, 1999.

MILAN, E. P.; ZAROR, L. Leveduras: identificação laboratorial. In: SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. **Micologia médica à luz de autores contemporâneos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. cap. 6, p. 50 – 62.

MIMICA, L. M. J. et al. Diagnóstico de infecção por *Candida*: avaliação de testes de identificação de espécies e caracterização do perfil de suscetibilidade. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v. 45, p. 17-23, 2009.

MIYAZAKI, T.; MIYAZAKI, Y.; IZUMIKAWA, K.; KAKEYA, H.; MIYAKOSHI, S.; BENNETT, J.E.; KOHNO, S. Fluconazole treatment is effective against a *Candida albicans* erg3/erg3 mutant in vivo despite in vitro resistance. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.50, p.580-586, 2006.

MOFFAT, A. C.; OSSELTON, M. D.; WIDDAP, B. **Clarke's analysis of drugs and poisons**: in pharmaceuticals, body fluids and postmortem material. 3rd ed. London: Pharmaceutical Press, 2004. v. 2, p. 654-1561.

MOGHADASIAN, M. H. Minireview. Clinical pharmacology of 3-hidroxy-3- methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors. **Life Sci.**, v. 65, 13, p. 1329-1337, 1999.

MOHAN, V.; BALLAL, M. Proteinase and phospholipase activity as virulence factors in *Candida* species isolated from blood. **Rev. Iberoam. Micol.**, v. 25, p. 208-210, 2008.

MONTENEGRO, H.; PAULA, C. R. Environmental isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* and *C. neoformans* var. *neoformans* in the city of São Paulo, Brazil. **Med. Mycol.**, v. 38, p. 385-390, 2000.

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

MOREIRA, T. A.; FERREIRA, M. S.; RIBAS, R.M.; BORGES, A.S. Cryptococcosis: clinical epidemiological laboratorial study and fungi varieties in 96 patients. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 39, p. 255-258, 2006.

MOREIRA, L. S. **Estudo da atividade de drogas antifúngicas através de curvas de crescimento de *Candida albicans* utilizando o sistema automatizado bio-cell tracer®**. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Médicas, da Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

MOREIRA, M. E. L. Controvérsias a respeito da sepse fúngica no pré-termo extremo: profilaxia e esquemas terapêuticos. **J. Pediatr.**, v. 81, p. 52-58, 2005.

MORETTI, A.; FIORETTI, D. P.; BONCIO, L.; PASQUALI, P.; DEL ROSSI, E. Isolation of *Candida rugosa* from turkeys. **J. Vet. Med.**, v. 47, p. 433-439, 2000.

MORRELL, M.; FRASER, V. J.; KOLLEF M. H.. Delaying the empiric treatment of *Candida* bloodstream infection until positive blood culture results are obtained: a potential

risk factor for hospital mortality. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 49, p.3640–3645, 2005.

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, p. 837-849, 2003.

NAKAJIMA, R.; KITAMURA, A.; SOMEYA, K.; TANAKA, M.; SATO, K. *In vitro* and *in vivo* antifungal activities of DU-6859a, a fluoroquinolone, in combination with amphotericin B and fluconazole against pathogenic fungi. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 39, p.1517–1521, 1995.

NANDHAKUMAR, B.; KUMAR, C. P. G.; PRABU, D.; MENON, T. Mustard Seed Agar, a new medium for differentiation of *Cryptococcus neoformans*. **J. Clin. Microbiol.**, v.44, p. 674, 2006.

NASH, J.D.; BURGESS, D.S.; TALBERT, R.L. Effect of fluvastatin and pravastatin, HMG-CoA reductase inhibitors, on fluconazole activity against *Candida albicans*. **J. Med. Microbiol.**, v. 51, p. 105–109, 2002.

NASH, J.D.; BURGESS, D.S.; TALBERT, R.L. Effect of fluvastatin and pravastatin, HMG-CoA reductase inhibitors, on fluconazole activity against *Candida albicans*. **J. Med. Microbiol.**, v.51, p.105-109, 2002.

NASSAR, F.; BRUMMER E.; STEVENS D. A. Different components in human serum inhibit multiplication of *Cryptococcus neoformans* and enhance fluconazole activity. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.39, p. 2490–2493, 1995.

NATIONAL CHOLESTEROL EDUCATION PROGRAM EXPERT PANEL - NCEP. Executive summary of the third report of the National Cholesterol Education Program (NCEP). **Expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult treatment Panel III)**. 2001. Disponível em <<http://www.nhlbi.nih.gov/guidelines/cholesterol/atp3xsum.pdf>> Acesso em: 6 mar. 2007.

NCBI. Taxonomia. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser>>. Acesso em: 8 jul. 2011.

NEWMAN, S. L.; FLANIGAN, T. P.; FISHER, A.; RINALD, M. G.; STEIN, M.; VIGILANT, K. Clinically significant mucosal candidiasis resistant to fluconazole treatment in patients with AIDS. **Clin. Infect. Dis.**, v.19, p.684-686, 1994.

NICKERSON, K. W.; ATKIN, A. L.; HORNBY, J. M. Quorum sensing in dimorphic fungi: farnesol and beyond. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 72, p.3805–3813, 2006.

NISHIKAWA, M. M.; LAZERA, M. S.; BARBOSA, G. G.; TRILLES, L.; BALASSIANO, B. R.; MACEDO, R. C.; BEZERRA, C. C.; PEREZ, M. A.; CARDARELLI, P.; WANKE, B. Serotyping of 467 *Cryptococcus neoformans* 467 isolates from clinical and environmental sources in Brazil: analysis of host and regional patterns. **J. Clin. Microbiol.**, v.41, p.73-77, 2003.

NOSANCHUK, J. D.; ROSAS, A. L.; LEE, S. C.; CASADEVALL, A. Melanisation of *Cryptococcus neoformans* in human brain tissue. **Lancet**, v. 355, p. 2049-2050, 2000.

NUCCI, M.; COLOMBO, A. L. Candidemia due to *Candida tropicalis*: clinical, epidemiologic, and microbiologic characteristics of 188 episodes occurring in tertiary care hospitals. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 58, p. 77-82, 2007.

NUCCI, M.; COLOMBO, A.L.; SILVEIRA, F.; RICHTMANN, R.; SALOMÃO, R.; BRANCHINI, M.L.; SPECTOR, N. Risk factors for death in patients with candidemia. **Infect. Control Hosp. Epidemiol**, v. 19, p.846-850, 1998.

ODDS, F. C.; BERNAERTS, R. CHROMágar *Candida*, a new differential isolation medium for preservative identification of clinically important *Candida* species. *Candida albicans*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 32, p. 1923-1929, 1994.

ODDS, F. C. Pathogenesis of *Candida* infection. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v. 31, p. 2-5, 1994.

ODDS, F. C.; BROWN A. J.P.; GOW, N.A.R. Antifungal agents: mechanisms of action. **Trend Microbiol.**, v. 11, p. 272-279, 2003.

ODDS, F. C.; DAVIDSON, A. "Room temperature" use of CHROMágar *Candida*. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v.38, p. 147-150, 2000.

OROZCO, A.S.; HIGGINBOTHAM, L.M.; HITCHCOCK, C.A.; PARKINSON, T.; DFALCONER, D.; IBRAHIM, A.S.; GHANNOUM, M.A.; FILLER, S.G. Mechanism of fluconazole resistance in *Candida krusei*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.42, p.2645-2649, 1998.

PALACIO, A.; VILLAR, J.; ALHAMBRA, A. Epidemiología de las candidiasis invasoras en población pediátrica y adulta. **Rev. Iberoam. Micol.**, v. 26, p. 2-7, 2009.

PAPPAS, P. G.; KAUFFMAN, C. A.; ANDES, D.; BENJAMIN, D. K.; CALANDRA JR., T. F.; EDWARDS, JR., J. E.; FILLER, S. G.; FISHER, J. F.; KULLBERG, B. J.; OSTROSKY-ZEICHNER, L.; REBOLI, A. C.; REX, J. H.; WALSH, T. J.; SOBEL, J. D. Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: update by the Infectious Diseases Society of America. **Clin. Infect. Dis.**, v. 48, p.503-535, 2009.

PARK, B. J.; WANNEMUEHLER, K. A.; MARSTON, B. J.; GOVENDER, N.; PAPPAS, P. G.; CHILLER, T. M. Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. **AIDS**, v. 23, p.525-530, 2009.

PEDROSO, R. S.; COSTA, K. R. C.; FERREIRA, J. C.; CANDIDO, R. C. Avaliação da produção de melanina por espécies de *Cryptococcus* em quatro diferentes meios de cultura. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.40, p.566-568, 2007.

PERFECT, J. R.; COX, G. M. Drug resistance in *Cryptococcus neoformans*. **Drug Resist Update**, v. 2, p.259-269, 1999.

- PETRI, W. A. Drugs used in the chemotherapy of, *Mycobacterium tuberculosis avium* complex disease, and leprosy. In: HARDMAN, J. G.; LIMBARD, L. E. (Ed.). **The Pharmacological Basis of Therapeutics**. International ed. New York, 2001. v. 49, p.1273–1294.
- PETRINI, O.; SIEBER, T. N.; TOTI, L.; VIRET, O. Ecology, metabolite production, and substrate utilization in endophytic fungi. **Nat. Toxis**, v. 1, p. 185-196, 1992.
- PFALLER, M.A. Epidemiology of candidiasis. **J. Hosp. Infect.**, v.30, p.329-338, 1995.
- PFALLER, M.A.; BARRY, A.L. Evaluation of novel colorimetric broth microdilution method for antifungal susceptibility testing of yeast isolates. **J. Clin. Microbiol.**, v. 32, p. 1992-1996, 1994.
- PFALLER, M.A.; HOUSTON, A.; COFFMANN, S. Application for rapid screening of clinic specimens for *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei* and *Candida (Torulopsis) glabrata*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 34, p.58-61, 1996.
- PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J.; JONES, R. N.; MESSER, A. S.; HOLLIS, R. J.; the SENTRY Participants Group. Trends in antifungal susceptibility of *Candida* spp. isolated from pediatric and adult patients with bloodstream infections: SENTRY antimicrobial surveillance program, 1997 to 2000. **J. Clin. Microbiol.**, v. 40, p. 852-856, 2002.
- PINJON, E.; MORAN, G.P.; COLEMAN, D.C.; SULLIVAN, D.J. Azole susceptibility and resistance in *Candida dubliniensis*. **Biochem. Soc. Trans.**, v. 33, p.1210-1214, 2005.
- RAMAGE, G.; SAVILLE, S. P.; WICKES, B. L.; LOPEZ-RIBOT, J. L. Inhibition of *Candida albicans* biofilm formation by farnesol, a quorum-sensing molecule. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 68, p.5459–5463, 2002.
- RANDHAWA, H. S.; KOWSHIK, T.; KHAN, Z. U. Madeira apodrecida de *Syzygium cumini* e árvores *Ficus religiosa* vivendo em Delhi / Nova Deli área metropolitana como habitat natural de *Cryptococcus neoformans*. **Med. Mycol.**, v. 41, p. 199-209, 2003.
- REX, J. H.; PFALLER, M. A.; WALSH, T. J.; CHATURVEDI, V.; ESPINEL-INGROFF, A.; GHANNOUM, M. A.; GOSEY, L. L.; ODDS, F. C.; RINALDI, M. G.; SHEEHAN D. J. ; WARNOCK, D. W. Antifungal susceptibility testing: practical aspects and current challenges. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 14, p. 643-658, 2001.
- REX, J. H.; PFALLER, M. A. Has antifungal susceptibility testing come of age? **Clin. Infect. Dis.**, v.35, p.982–989, 2002.
- RIDLEY, A.J.; RIENTO, K. Rocks: multifunctional kinases in cell behaviour. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, v. 4, p. 446-456, 2003.
- RIKITAKE, Y.; LIAO, J.K. Rho GTPases, statins, and nitric oxide. **Circ. Res.**, v.97, p.1232-1235, 2005.
- RODERO, L.; CORDOBA, S.; CAHN, P.; HOCHENFELLNER, F.; DAVEL, G.; CANTEROS, C.; KAUFMAN, S.; GUELFAND, L. *In vitro* susceptibility studies of

*Cryptococcus neoformans* isolated from patients with no clinical response to amphotericin B therapy. **J. Antimicrob. Chemother.**, v.45, p.239-242, 2000.

RODERO, L.; CORDOBA, S.; CAHN, S. M.; LUCARINI, M.; DAVEL, G.; KAUFMAN, S.; CANTEROS, C.; GUELFAND, L. Timed-kill curves for *Cryptococcus neoformans* isolated from patients with AIDS. **Med. Mycol.**, v.38, p.201-207, 2000.

ROZE, L.V.; LINZ, J.E. Lovastatin triggers an apoptosis-like cell death process in the fungus *Mucor racemosus*. **Fungal Gen. Biol.**, v. 25, p.119-133, 1998.

SAMARANAYAKE, Y. H.; DASSANAYAKE, R. S.; JAYATILAKE, J. A. M. S.; CHEUNG, B. P. K.; YAU, J. Y. Y.; YEUNG, K. W. S.; SAMARANAYAKE, L. P. Phospholipase B enzyme expression is not associated with other virulence attributes of *Candida albicans* isolates from patients with human immunodeficiency virus infection. **J. Med. Microbiol.**, v. 54, p. 583-593, 2005.

SAMOUR, J. H.; NALDO, J. L. Diagnosis and therapeutic management of candidiasis in falcons in Saudi Arabia. **J. Avian Med. Surg.**, v. 16, p. 129-132, 2002.

SAND, C.; RENNIE, R. P. Comparison of three commercial systems for the identification of germ-tube negative yeast species isolated from clinical specimens. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 33, p. 223-229, 1999.

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, p.1029-1050, 2009.

SANGUINETTI, M.; PORTA, R.; SAL M.; SORDA, M. L.; PECORINI, G.; FADDA, G B. Posteraro Evaluation of vitek 2 and rapid yeast plus systems for yeast species identification: experience at a large clinical microbiology laboratory. **J. Clin. Microbiol.**, v. 45, p. 1343-1346, 2007.

SASAKI, E.; MAESAKI, S.; MIYAZAKI, Y.; YANAGIHARA, K.; TOMONO, K.; TASHIRO, T.; KOHNO, S. Synergistic effect of ofloxacin and fluconazole against azole-resistant *Candida albicans*. **J. Infect. Chemother.**, v. 6, p.151-154, 2000.

SCAVONE, R.; BURGER, E. Paracoccidioidomycosis: reduction in fungal load and abrogation of delayed-type hypersensitivity anergy in susceptible inbred mice submitted to therapy with trimethoprim-sulfamethoxazole. **Med. Microbiol. Immunol.**, v.193, p. 53-59, 2004.

SCHMIDT, M.; DZOGBETA, S.; BOYER, P. M. Inhibition of *Candida albicans* by Fluvastatin Is Dependent on pH. **Biochem. Res. Int.**, v. 50, p. 4, 2009.

SCORZETTI, G.; PETRESCU, I.; YARROW, D.; FELL, J. W. *Cryptococcus adeliensis* sp nov., a xylanase producing basidiomycetous yeast from Antarctica. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 77, p.153-157, 2002.

SEON-SOOK, H.; JAE-JOON, Y.; CHUL-GYU, Y.; YOUNG, W. K.; SUNG, K. H.; YOUNG-SOO, S.; SANG-MIN, L. Clinical Characteristics and Risk Factors for Nosocomial

Candidemia in Medical Intensive Care Units: Experience in a Single Hospital in Korea for 6.6 Years. **J. Korean Med. Sci.**, v.25, p. 671–676, 2010.

SHEN, L. L.; FOSTEL, J. M. DNA topoisomerase inhibitors as antifungal agents. **Adv. Pharmacol.**, v. 29, p. 227–244, 1994.

SHEN, L. L.; BARANOWSKI, J.; FOSTEL, J.; MONTGOMERY, D. A.; LARTEY, P. A. DNA topoisomerases from pathogenic fungi: targets for the discovery of antifungal drugs. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 36, p.2778–2784, 1992.

SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. **Micologia médica à luz de autores contemporâneos**. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2004.

SIDRIM, J. J.; COSTA, A. K.; CORDEIRO, R. A.; BRILHANTE, R. S.; MOURA, F. E.; CASTELO-BRANCO, D. S.; NETO, M. P.; ROCHA, M. F. Molecular methods for the diagnosis and characterization of *Cryptococcus*: a review. **J. Microbiol.**, v. 56, p. 445-458, 2010.

SILVA, T. D. **Desenvolvimento de métodos analíticos e de formulações para estatinas**. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2009.

SLATER, E. E.; MACDONALD, J. S. Mechanism of action and biological profile of HMG CoA reductase inhibitors. **Drugs**, v. 36, p.72-82, 1998.

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

SOUZA,W.; RODRIGUES, J. C. F. Sterol Biosynthesis Pathway as Target for Anti-trypanosomatid Drugs. **Interdiscip. Perspect. Infect. Dis.**, v. 50, p.19, 2009.

SPANAKIS, E. K.; KOURKOUMPETIS, T. K.; LIVANIS, G.; PELEG, A. Y.; MYLONAKIS, E. Statin Therapy and Decreased Incidence of Positive Candida Cultures Among Patients With Type 2 Diabetes Mellitus Undergoing Gastrointestinal Surgery. **Mayo Clin. Proc.**, v. 85, n. 12, p. 1073-1079, 2010.

STEPANOVIC, S.; VIKOVIC, D.; RADONJIC, I.; DIMITRIJEVIC, V.; SVABIC-VLAHOVIC, M. Ground red hot pepper agar in the isolation and presumptive identification of *Cryptococcus neoformans*. **Mycoses**, v.45, p. 384-388, 2002.

STERGIOPOULOU, T.; MELETIADIS, J.; SEIN,T.; PAPAIOANNIDOU, P.; TSIOURIS, I.; ROILIDES, E.; WALSH, T. J. Isobolographic Analysis of Pharmacodynamic Interactions between Antifungal Agents and Ciprofloxacin against *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 52, p. 2196–2204, 2008.

SOMMER, U.; LIU, H.; DOERING, T. L. Um alfa-1 ,3-mannosyltransferase de *Cryptococcus neoformans*. **J. Biol. Chem.**, v.278, p.47724-47730, 2003.

SUGAR, A. M.; LIU, X. P.; CHEN, R. J. Effectiveness of quinolone antibiotics in modulating the effects of antifungal drugs. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 41, p.2518–2521, 1997.



SUNDARESAN, S.; COLIN, I. M.; PESTELL, R. G.; JAMESON, J. L. Stimulation of mitogen-activated protein kinase by gonadotropin-releasing hormone: evidence for the involvement of protein kinase C. **Endocrinology**, v. 137, p. 304-311, 1996.

SZILAGYI, G.; REISS, F.; SMITH, J. C. The anticryptococcal factor of blood serum. A preliminary report. **J. Invest. Dermatol.**, v. 46, p. 306-308, 1966.

TAKEMOTO, M.; NÓ, K.; NAKAGAMI, H.; LIAO, Y.; GRIMM, M.; TAKEMOTO, Y.; KITAKAZE, M.; LIAO, J.K. Statins as antioxidant therapy for preventing cardiac myocyte hypertrophy. **J. Clin. Invest.**, v. 108, p.1429-1437, 2001.

TAKEO, K.; TANAKA, R.; TANIGUCHI, H.; NISHIMURA, K. Analysis of ploidy and sexual characteristics of natural isolates of *Cryptococcus neoformans*. **Can. J. Microbiol.**, v. 39, p. 958-963, 1993.

TALARMIN, J. P. ; BOUTOILLE, D.; TATTEVIN, P.; DARGÈRE, S.; WEINBRECK, P.; ANSART, S.; CHENNEBAULT , J. M.; HUTIN, P.; LÉAUTEZ-NAINVILLE, S.; GAY-ANDRIEU, F.; RAFFI, F.; LE GERICCO. Epidemiology of candidemia: a one-year prospective observational study in the west of France. **Med. Mal. Infect.**, v. 39, p. 877-885, 2009.

TAMURA, N. K.; NEGRI, M. F. N.; BONASSOLI, L. A.; SVIDZINS, T. I. E. Virulence factors for *Candida* spp recovered from intravascular catheters and hospital workers' hands. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 40, p. 91-93, 2007.

TAWARA, S.; IKEDA, F.; MAKI, K.; MORISHITA, Y.; OTOMO, K.; TERATANI, N.; GOTO, T.; TOMISHIMA, M.; OHKI, H.; YAMADA, A.; KAWABATA, K.; TAKASUGI, H.; SAKANE, K.; TANAKA, H.; MATSUMOTO, F.; KUWAHARA, S. In vitro activities of a new lipopeptide antifungal agente, FK463, against a variety of clinically important fungi. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 44, p. 57-62, 2000.

TORELLI, R.; POSTERARO, B.; FERRARI S.; SORDA, L. A.; 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, p.186-201, 2008.

TRILLES, L.; LAZÉRA, M. S.; WANKE, B.; OLIVEIRA, R. V.; BARBOSA, G. G.; NISHIKAWA, M. M.; MORALES, B. P.; MEYE, W. Regional pattern of the molecular types of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 103, p. 455-461, 2008 .

TUMBARELLO, M.; POSTERARO, B.; TRECARCHI, E. M.; FIORI, B.; ROSSI, M.; PORTA, R.; DONATI, K. G.; SORDA, M. La; SPANU, T.; FADDA, G.; CAUDA, R.; SANGUINETTI, M. Biofilm Production by *Candida* Species and Inadequate Antifungal Therapy as Predictors of Mortality for Patients with Candidemia. **J. Clin. Microbiol.**, v. 8 , p. 1843-1850, 2007.

TURNER, N.A.; MUGHAL, R.S.; WARBURTON, P.; O'REGAN D.J.; BOLA, S.G.; PORTER, K.E. Mechanism of TNF $\alpha$ -induced IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-6 expression in

human cardiac fibroblasts: effects of statins and thiazolidinediones. **Cardiovasc. Res.**, v.76, p.81-90, 2007.

VALENZ, S.; STRASEN, S.; SCHÄFER, F.; FROSCH, M.; KURZAI, MARIANNE-HORN, A. Evaluation of new colorimetric vitek 2 yeast identification card by use of different source media. **J. Clin. Microbiol.**, v. 46, p. 3784-3787, 2008.

VECCHIARELLI, A. Cytokines and costimulatory molecules: positive and negative regulation of the immune response to *Cryptococcus neoformans*. **Arch. Immunol.**, v. 48, p. 465-472, 2000.

VIEIRA, P. A. G. **Estatinas:** transversalidade das suas aplicações clínicas. Dissertação (Mestrado) - Universidade do Porto, Porto, 2010.

VOELZ K.; MAY R. C. Cryptococcal Interactions with the Host Immune System. **Eukaryot. Cell**, v. p. 835–846, 2010.

WASSMANN, S.; LAUFS, U.; BÄUMER, A. T.; MÜLLER, K.; AHLBORY, K.; LINZ, W.; ITTER, G.; ROSEN, R.; BÖHM, M.; NICKENIG, G. HMG-CoA reductase inhibitors improve endothelial dysfunction in normocholesterolemic hypertension via reduced production of reactive oxygen species. **Hypertension**, v.37, p.1450-1457, 2001.

WEBER, K.; SOHR, R.; SCHULZ, B.; FLEISCHHACKER, M.; RUHNKE, M. Secretion of E,E-farnesol and biofilm formation in eight different *Candida* species. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 53, p. 848, 2009.

WESTERMEYER, C.; MACREADIE, I. G.: Simvastatin reduces ergosterol levels, inhibits growth and causes loss of mtDNA in *Candida glabrata*. **FEMS Yeast Res.**, v. 7, p. 436-441, 2007.

WISPLINGHOFF, H.; BISCHOFF, T.; TALLENT, S. M.; SEIFERT, H.; WENZEL, R. P.; EDMOND, M. B. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. **Clin. Infect. Dis.**, v. 39, p. 309–317, 2004.

WITT, M. D.; LEWIS, R. J.; LARSEN, R. A.; MILEFCHIK, E. N.; LEAL, M. A.; HAUBRICH, R. H.; RICHIE, J. A.; EDWARDS JUNIOR, J. E.; GHANNOUM, M. A. Identification of patients with acute AIDS-associated cryptococcal meningitis who can be effectively treated with fluconazole: the role of antifungal susceptibility testing. **Clin. Infect. Dis.**, v.22, p. 322-328, 1996.

XUE, C.; YASUOMI, T.; XINNIAN, D.; JOSEPH, H. The human fungal pathogen *Cryptococcus* can complete its sexual cycle during a pathogenic association with plants **Cell Host Microbe**, v. 4, p. 263-273, 2007.

ZENG, X.; HOU, X.; WANG, Z.; JIANG, L.; XIONG, C; ZHOU, M.; CHEN, Q. Carriage rate and virulence attributes of oral *Candida albicans* isolates from patients with oral lichen planus: a study in an ethnic Chinese cohort. **Mycoses**, v. 52, p. 161-165, 2008.

ZHANG, W.; WENDEL, J. F.; CLARK, L. G. Bamboozled again! Inadverted isolation of fungi rDNA sequences from bamboos (Poaceae: Bambusoideae). **Mol. Phylogenet. Evol.**, v. 8, n. p. 205-217, 1997.

ZHOU, Q.; LIAO, J. K. Rho kinase: an important mediator of atherosclerosis and vascular disease. **Curr. Pharm. Design**, v. 15, p.3108-3115, 2009.

## ANEXOS

Tabela 3. CIM e CFM de estatinas frente a leveduras do gênero *Candida* e *Cryptococcus*.

Abreviatura: NT: não testada.

CIM e CFM de estatinas frente a leveduras do gênero <i>Candida</i> e <i>Cryptococcus</i>							
Espécies	Código	SINVASTATINA (mg mL <sup>-1</sup> )		ATORVASTATINA (mg mL <sup>-1</sup> )		PRAVASTATINA (mg mL <sup>-1</sup> )	
		CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM
<i>C. albicans</i>	CEMM 05-2-026	0,0312	0,125	0,078	0,156	3,125	6,25
	CEMM 05-4-029	0,0312	0,0625	0,078	0,156	1,5625	> 50
	CEMM 05-2-007	0,0312	0,125	0,078	0,312	1,5625	12,5
	CEMM 05-4-030	0,0312	0,0312	0,078	0,156	NE	> 50
	CEMM 05-4-031	0,0312	0,0312	0,039	0,078	3,125	6,25
	CEMM 05-4-032	0,0312	0,0625	0,039	0,078	1,5625	12,5
	CEMM 05-4-033	0,0312	0,0625	0,039	0,078	1,5625	3,125
	CEMM 05-4-034	0,0312	0,125	0,039	0,078	1,5625	6,25
	CEMM 05-2-030	0,0312	0,0625	0,039	0,039	1,5625	> 50
	CEMM 05-4-035	0,0312	0,0625	0,039	0,156	1,5625	3,125
	CEMM 05-2-009	0,0312	0,0625	0,039	0,156	1,5625	> 50
	CEMM 05-4-036	NT	NT	NT	NT	1,5625	3,125
	CEMM 05-4-037	NT	NT	NT	NT	1,5625	6,25
	CEMM 05-4-038	NT	NT	NT	NT	1,5625	6,25
	CEMM 05-4-039	NT	NT	NT	NT	1,5625	6,25
	CEMM 05-4-040	0,0156	0,0312	0,078	0,312	> 50	> 50
<i>C. krusei</i>	CEMM 05-4-041	0,25	>1	0,625	>10	> 50	> 50
	CEMM 05-4-042	0,5	>1	0,625	>10	> 50	> 50
	CEMM 05-4-043	0,5	>1	0,625	>10	> 50	> 50
	CEMM 05-4-044	0,5	>1	0,625	>10	> 50	> 50
	CEMM 05-4-045	0,5	>1	0,625	>10	> 50	> 50
	CEMM 05-4-046	0,5	>1	0,625	>10	> 50	> 50
	CEMM 05-4-047	0,5	>1	0,625	>10	> 50	> 50
	CEMM 05-4-048	1	>1	1,25	>10	> 50	> 50
	CEMM 05-4-049	1	>1	1,25	>10	> 50	> 50
	CEMM 05-4-050	1	>1	1,25	>10	> 50	> 50
	CEMM 05-4-051	0,5	>1	0,625	>10	> 50	> 50
<i>C. tropicalis</i>	CEMM 05-4-052	0,0625	0,5	5	>10	> 50	> 50
	CEMM 05-4-053	0,0625	0,125	0,312	>10	> 50	> 50
	CEMM 05-4-054	0,0312	0,125	0,078	>10	3,125	25
	CEMM 05-4-055	0,0312	0,25	0,039	>10	> 50	> 50
	CEMM 05-4-056	0,0625	0,25	0,078	>10	3,125	12,5

	CEMM 05-4-057	0,0625	0,25	0,078	0,078	> 50	> 50
	CEMM 05-4-058	0,0312	0,125	0,039	0,078	> 50	> 50
	CEMM 05-4-059	0,0312	0,0625	0,078	0,078	3,125	25
	CEMM 05-4-060	1	>1	1,25	>10	> 50	> 50
	CEMM 05-4-061	0,25	>1	1,25	>10	> 50	> 50
	CEMM 05-4-062	0,0625	0,25	0,039	0,078	> 50	> 50
	CEMM 05-4-063	0,0625	0,25	0,078	>10	6,25	25
<b><i>C. parapsilosis</i></b>	CEMM 05-4-064	0,25	1	2,5	>10	> 50	> 50
	CEMM 05-4-065	0,25	0,5	2,5	>10	> 50	> 50
	CEMM 05-4-066	0,25	1	2,5	>10	> 50	> 50
	CEMM 05-4-067	0,25	0,5	1,25	>10	> 50	> 50
	CEMM 05-4-068	0,25	0,25	1,25	>10	> 50	> 50
	CEMM 05-4-069	0,25	1	1,25	>10	> 50	> 50
	CEMM 05-4-070	0,25	0,5	2,5	>10	> 50	> 50
	CEMM 05-4-071	0,25	1	1,25	>10	> 50	> 50
	CEMM 05-4-072	0,25	1	1,25	>10	> 50	> 50
	CEMM 05-4-073	0,25	0,5	1,25	>10	> 50	> 50
	CEMM 05-4-074	0,125	0,25	0,625	>10	> 50	> 50
	CEMM 05-4-075	0,25	0,25	1,25	>10	> 50	> 50
<b><i>C. gattii</i></b>	CEMM 05-4-076	0,5	1	1,25	>10	> 50	> 50
	CEMM 05-4-077	0,5	1	> 10	>10	> 50	> 50
	CEMM 05-4-078	0,5	1	> 10	>10	> 50	> 50
	CEMM 05-4-079	0,5	1	> 10	>10	> 50	> 50
	CEMM 05-4-080	0,5	1	> 10	>10	> 50	> 50
	CEMM 05-4-081	0,5	1	> 10	>10	> 50	> 50
	CEMM 05-4-082	0,5	1	> 10	>10	> 50	> 50
	CEMM 05-4-097	0,5	1	> 10	>10	> 50	> 50
	CEMM 05-4-098	0,5	1	> 10	>10	25	50
	CEMM 05-4-099	0,5	1	> 10	>10	25	50
	CEMM 05-4-084	0,5	1	1,25	>10	> 50	> 50
	CEMM 05-4-085	0,5	1	0,625	>10	> 50	> 50
<b><i>C. neoformans</i></b>	CEMM 05-4-086	0,125	1	0,625	1	25	> 50
	CEMM 05-4-087	0,25	0,5	1,25	>10	> 50	> 50
	CEMM 05-4-088	0,5	1	1,25	>10	> 50	> 50
	CEMM 05-4-089	0,5	1	1,25	>10	> 50	> 50
	CEMM 05-4-091	1	>1	> 10	>10	> 50	> 50
	CEMM 05-4-100	0,5	1	> 10	>10	> 50	> 50
	CEMM 05-4-101	1	>1	> 10	>10	25	50
	CEMM 05-4-096	0,0625	0,125	> 10	>10	> 50	> 50
	CEMM 05-4-093	0,25	1	2,5	>10	> 50	> 50
	CEMM 05-4-102	0,5	1	> 10	>10	> 50	> 50
	CEMM 05-4-103	1	>1	> 10	>10	> 50	> 50
	CEMM 05-4-104	1	>1	> 10	>10	> 50	> 50
CEMM 05-4-095	0,25	0,5	> 10	>10	> 50	> 50	

Tabela 4. Estatísticas básicas da CIM entre as drogas e as espécies testadas.

Espécie	droga		minímo	máximo	média	D-P
<i>C.albicans</i>	Atorvastatina	12	0,04	0,08	0,06	0,02
<i>C.gattii</i>	Atorvastatina	12	0,63	15,00	11,51	6,31
<i>C.krusei</i>	Atorvastatina	11	0,63	1,25	0,80	0,29
<i>C.neoformans</i>	Atorvastatina	13	0,63	15,00	9,76	6,91
<i>C.parapsilosis</i>	Atorvastatina	12	0,63	2,50	1,61	0,68
<i>C.tropicalis</i>	Atorvastatina	12	0,04	5,00	0,69	1,43
<i>C.albicans</i>	Pravastatina	14	1,56	3,13	1,79	0,57
<i>C.gattii</i>	Pravastatina	12	25,00	75,00	66,67	19,46
<i>C.krusei</i>	Pravastatina	5	75,00	75,00	75,00	0,00
<i>C.neoformans</i>	Pravastatina	13	25,00	75,00	67,31	18,78
<i>C.parapsilosis</i>	Pravastatina	4	75,00	75,00	75,00	0,00
<i>C.tropicalis</i>	Pravastatina	4	3,13	6,25	3,91	1,56
<i>C.albicans</i>	Sinvastatina	12	0,02	0,03	0,03	0,00
<i>C.gattii</i>	Sinvastatina	12	0,50	0,50	0,50	0,00
<i>C.krusei</i>	Sinvastatina	11	0,25	1,00	0,61	0,26
<i>C.neoformans</i>	Sinvastatina	13	0,06	1,00	0,53	0,35
<i>C.parapsilosis</i>	Sinvastatina	12	0,13	0,25	0,24	0,04
<i>C.tropicalis</i>	Sinvastatina	2	0,03	1,00	0,15	0,28

## I. PREPARO DO MEIO RPMI 1640

### Material utilizado para o preparo do meio RPMI 1640 medium / MOPS pH=7,0

- 1 proveta de 250 mL
- 2 béquers
- 1 pipeta de 10 mL estéril com ponta fina
- 1 elenmayer ou balão volumétrico para o preparo do meio
- 1 pipetador
- Pinça
- Papel alumínio e paleta p/ a pesagem do meio
- Recipiente estéril para armazenar o meio depois de filtrado
- Filtro com membrana milipore e papel de filtro, montado e esterilizado
- RPMI em pó - guardado na geladeira (2 à 8°C)
- MOPS – guardado na geladeira sempre coberto com papel alumínio

### Preparo do meio líquido RPMI-1640

- Retirar o frasco de RPMI em pó com antecedência da geladeira para a regulagem da temperatura
- Observar as instruções do fabricante e pesar a quantidade de meio RPMI 1640 (*Sigma Chemical co., St Louis, Mo*) com l-glutamina, 2,0 g/L de glicose sem bicarbonato de sódio
- Para obter 250 mL de meio (capacidade total do filtro) pesa-se 2,5975 gramas
- Numa balança analítica pesar o pó em papel alumínio e transferir para o elenmayer, acrescentar água destilada aos poucos até a sua completa dissolução, não colocar a quantidade total, deixar pelo menos 50 mL para completar depois
- Com o auxílio de um pHmetro, tamponar o meio de cultura acrescentando MOPS (ácido 2-[N-morfolino]-propanossulfônico, 0,165M), ajustando para pH = 7,0. Normalmente a solução de RPMI apresenta pH em torno de 7,58 a 7,64 (básico). Deve-se ter muito cuidado ao acrescentar o MOPS para não passar de pH 7,0. São utilizados 10 mL de MOPS para obter-se a neutralidade, caso o pH baixe de 7,0 coloca-se um pouquinho de RPMI em pó para corrigi-lo
- Limpar sempre o pHmetro com água destilada antes e depois do uso
- Transferir a solução para uma proveta e aferir o volume para 250 mL com água destilada

- Homogeneizar a solução por agitação manual
- Na cabine do fluxo laminar (já limpo com álcool e 15' na luz UV) filtrar o meio em filtro com membrana filtrante de 0,2  $\mu\text{M}$  com bomba a vácuo. Após a filtragem, separar sempre 2 tubos de ensaio contendo 1 mL do meio para o teste de pureza e guardar na estufa por 24 horas
- Transferir o líquido para o recipiente estéril (com etiqueta de identificação: nome do meio, data de preparação, data de validade de 3 semanas e nome do responsável) e armazenar na geladeira até o experimento
- Manter a 4°C até o momento do uso, alíquotas do meio também podem ser estocadas a -20°C ou -80°C

**Controle de esterilidade:** retirar uma alíquota de aproximadamente 1mL de RPMI recém-preparado, inocular em caldo de BHI e colocar em estufa a 35°C por 48 horas - se não houver crescimento, liberar o meio para uso.

## **II. Preparo do MOPS - utilizado para tamponar o pH do RPMI**

(PM = 209,27g/mol e C = 0,165mol/L)

- Para obter 200 mL de meio pesa-se 6,9059 gramas de MOPS em pó  
Dissolver o MOPS em 200 mL de água destilada já autoclavada e armazenar na geladeira em garrafa envolvida com papel alumínio

## **III. Preparo do NaOH etanólico:**

1. Pesou-se 0,25 g de NaOH e adicionou-se 100 mL de água destilada, obtendo-se uma solução de NaOH 0,25%.
2. Adicionou-se a 15 mL de etanol 100% 85 mL de água destilada, obtendo-se uma solução de etanol a 15%.
3. Homogeneizou-se as duas soluções, obtendo-se uma solução final de NaOH etanólico a 15% v/v etanol e 0,25% w/v NaOH.
4. Filtrou-se o hidrolisado em capela de fluxo laminar em seringa com filtro acoplado.



## ARTIGO EM ELABORAÇÃO

### Antimicrobial Agents and Chemotherapy

#### Atividade antifúngica *in vitro* de estatinas sobre espécies de *Candida* e *Cryptococcus*

Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante\*, Elizabeth Ribeiro Yokobatake Souza, José Júlio Costa Sidrim, Marcos Fábio Gadelha Rocha, André Jalles Monteiro, Débora Castelo Branco de Souza Collares Maia, Erica Pacheco Caetano

#### Resumo

Este trabalho teve como objetivo determinar a atividade fungistática e fungicida das estatinas ante 51 cepas de *Candida* e 25 cepas de *Cryptococcus*, por meio de testes de microdiluição em caldo, segundo documento M27-A3 padronizado pelo CLSI. Pravastatina inibiu 37 leveduras do gênero *Candida* apresentando concentração inibitória mínima (CIM) na faixa de 1,56 a 6,25 mg /mL, enquanto que sinvastatina e atorvastatina apresentaram atividade fungistática sobre todas as 51 cepas avaliadas, apresentando CIMs de 0,02 a 1 mg / mL e 0,04 a 5,00 mg / mL, respectivamente. Para o gênero *Cryptococcus*, apenas 4 cepas foram inibidas ante a pravastatina (CIM = 25 mg / mL), por outro lado, sinvastatina inibiu todas as 25 cepas (CIM = 0,06 a 1 mg / mL), e atorvastatina apenas 8 cepas (CIM = 0,62 a 2,5 mg / mL). Esta atividade inibitória *in vitro* de estatinas sobre espécies de *Candida* e *Cryptococcus*, abre uma perspectiva importante para a investigação do possível uso destas drogas com finalidade antifúngica *in vivo*.

Palavras-chave: Estatinas, antifúngico, *Candida* spp., *Cryptococcus* spp.

#### Introdução

O aumento nos últimos anos de indivíduos imunocomprometidos, como portadores da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida, de doenças malignas, transplantados e outros usuários de terapias imunossupressoras, tem favorecido o surgimento de infecções oportunistas, como as candidemias e as criptococoses. Apesar da terapia antifúngica atual ser eficiente na maioria dos casos, algumas vezes faz-se necessário novas drogas que atuem como

alternativa ou como coadjuvantes no tratamento para potencializar o efeito dos antifúngicos utilizados. As estatinas são os fármacos hipolipemiantes mais prescritos mundialmente para doenças cardiovasculares, sendo, atualmente descritos outros efeitos benéficos associados a patologias como câncer e infecções. Nosso trabalho teve como objetivo determinar a atividade fungistática das estatinas frente a leveduras do gênero *Candida* e do gênero *Cryptococcus*, através de testes de microdiluição em caldo padronizados conforme técnicas do CLSI.

## Material e Métodos

Para a realização deste estudo, foram utilizadas 51 cepas de quatro espécies de leveduras do gênero *Candida* (*C. albicans*: n = 16; *C. parapsilosis*: n = 12; *C. tropicalis*: n = 12; *C. krusei*: n = 11), e 25 cepas de leveduras do gênero *Cryptococcus* (*C. gattii*: n = 12; *C. neoformans*: n = 13). Todas as cepas foram retiradas do estoque na Micoteca do Centro Especializado em Micologia Médica (CEMM), Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, sendo suas identificações confirmadas por análise morfológica e testes bioquímicos.

Para a realização dos testes de sensibilidade, foram utilizadas três estatinas: atorvastatina, pravastatina e sinvastatina. Para o preparo das soluções-estoque, a atorvastatina e pravastatina foram dissolvidas em água destilada estéril. Já a sinvastatina, por ser uma pró-droga, foi ativada através de uma hidrólise básica com NaOH etanólico adaptada do protocolo de Lorenz; Parks (1990). Todas as cepas foram testadas frente às respectivas drogas para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM). Para tanto, foi utilizado o método de microdiluição em caldo, descrito no documento M27-A3 padronizado pelo CLSI (CLSI, 2008). As concentrações das drogas testadas estão descritas na tabela a seguir:

**Tabela 1 - Intervalo de concentração das estatinas testadas frente às leveduras dos gêneros *Candida* e *Cryptococcus***

Drogas	Concentração ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	
	Inicial	Final
Atorvastatina	10000	19,5
Pravastatina	50000	97,66
Sinvastatina	1000	1,95

A concentração inibitória mínima (CIM) das drogas testadas foi definida como a menor concentração da droga capaz de inibir 80% do crescimento fúngico visível, quando comparado àquele do tubo-controle livre da droga. Foram incluídas no teste cepas-controle, como *C. parapsilosis* ATCC 22019 (Itraconazol, CIM = 0,5 µg mL<sup>-1</sup> e anfotericina, CIM = 1 µg mL<sup>-1</sup>) e *C. krusei* ATCC 6258 (Itraconazol, CIM = 0,5 µg mL<sup>-1</sup> e anfotericina, CIM = 1 µg mL<sup>-1</sup>) (CLSI, 2002).

Na comparação da Concentração Inibitória Mínima entre as espécies avaliadas, para as drogas específicas, foi utilizado o teste t-Student para amostras independentes e quando mais de duas espécies eram analisadas simultaneamente foi realizado uma análise de variância (ANOVA).

Na comparação entre drogas, considerando as várias espécies analisadas, foi utilizado o teste t-Student para amostras pareadas.

O nível de significância adotado para afirmações conclusivas foi de 5%.

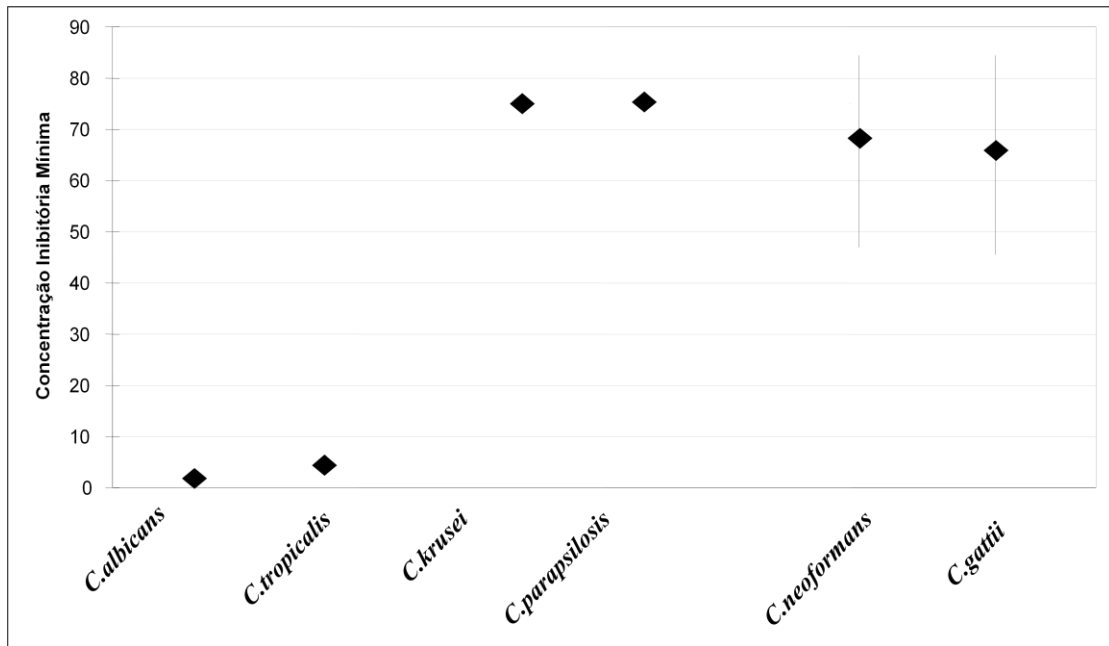
## Resultados

Foram avaliadas 51 cepas de *Candida*, sendo 16 de *C. albicans*, 11 de *C. krusei*, 12 de *C. tropicalis* e 12 de *C. parapsilosis*, e 25 cepas de *Cryptococcus*, sendo 12 de *C. gattii* e 13 de *C. neoformans*, por meio de testes de microdiluição em caldo, segundo documento M27-A3 padronizado pelo CLSI. O intervalo de concentração testado para pravastatina foi de 50 a 0,0977 mg/mL, para sinvastatina, 1 a 0,0020 mg/mL e para atorvastatina, 10 a 0,0200 mg/mL. Pravastatina inibiu 37 leveduras do gênero *Candida* apresentando concentração inibitória mínima (CIM) na faixa de 1,56 a 6,25 mg /mL e as cepas restantes não foram inibidas mesmo na maior concentração testada (50 mg /mL), enquanto que sinvastatina e atorvastatina apresentaram atividade fungistática sobre todas as 51 cepas avaliadas, apresentando CIMs de 0,02 a 1 mg / mL e 0,04 a 5,00 mg / mL, respectivamente. Para o gênero *Cryptococcus*, apenas 4 cepas foram inibidas ante a pravastatina (CIM = 25 mg / mL), por outro lado, sinvastatina inibiu todas as 25 cepas (CIM = 0,06 a 1 mg / mL), e atorvastatina apenas 8 cepas (CIM = 0,62 a 2,5 mg / mL), sendo que as 17 restantes não foram inibidas mesmo na maior concentração testada ( $\geq 10$  mg / mL).

Na comparação da CIM com a utilização da droga pravastatina (figura 1), tem-se: a espécie *C.albicans* possui os menores valores da CIM entre todas as espécies, não havendo porém diferença significativa entre ela e a espécie *C.tropicalis* (p=0,1505), havendo diferença quando comparado com *C.gattii* (p=0,0000) e com as demais; a segunda espécie com menores

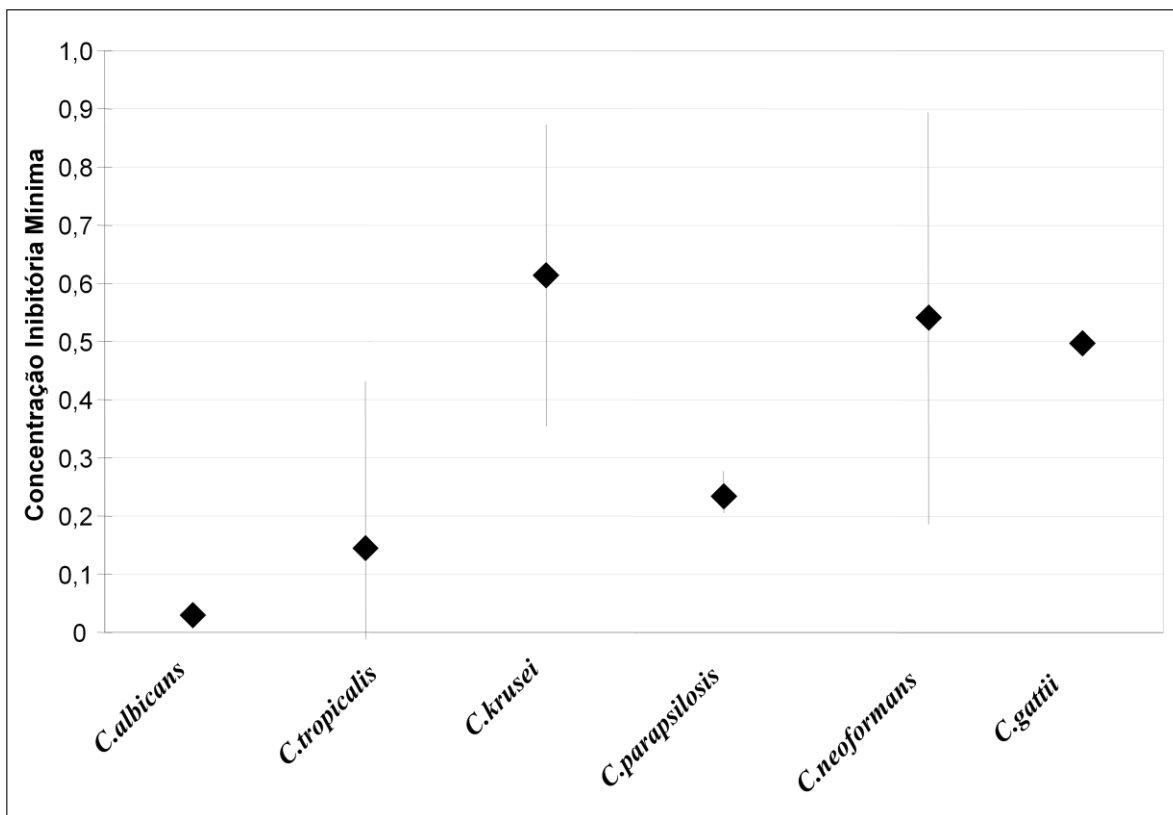
valores é *C.tropicalis*, havendo diferença quando comparado com *C.gattii* ( $p=0,0000$ ) e com as demais; as espécies *C.gattii*, *C.neoformans*, *C.krusei* e *C.parapsilosis* não possuem diferença significativa ( $p=0,6802$ ).

Figura 1. . Comparação da CIM da droga pravastatina sobre as espécies sensíveis no intervalo de concentração testado.



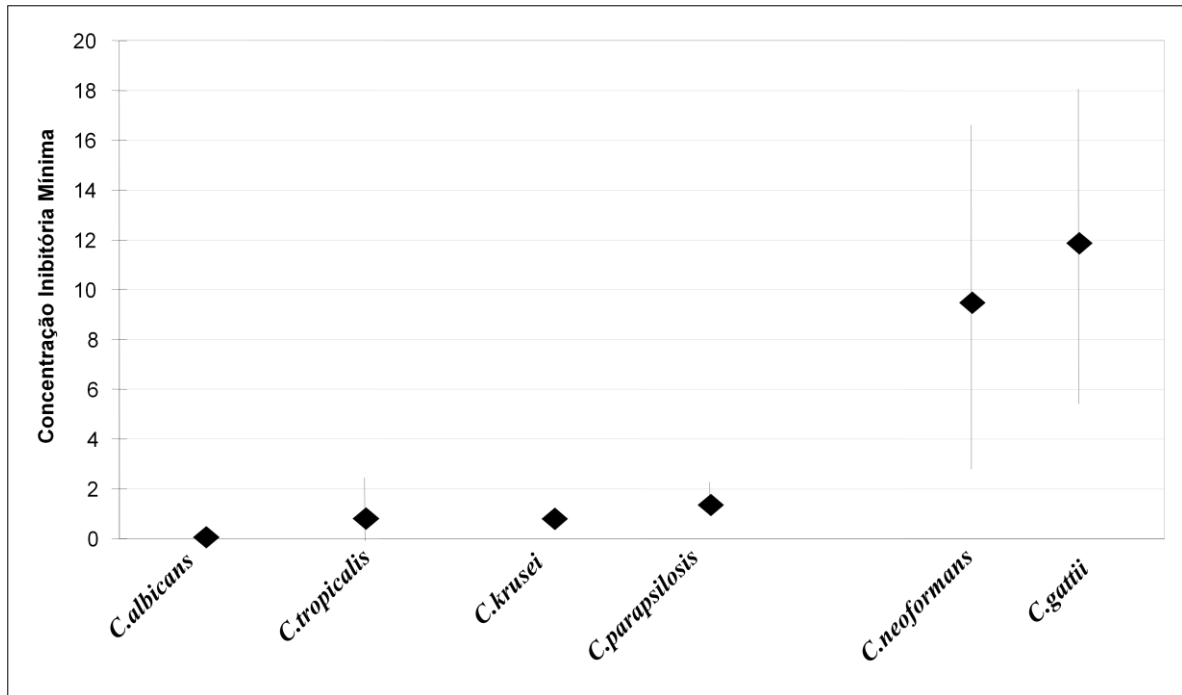
Na comparação da CIM com a utilização da droga sinvastatina (figura 2), tem-se: a espécie *C.albicans* possui os menores valores da CIM entre todas as espécies, não havendo porém diferença significativa entre ela e a espécie *C.tropicalis* ( $p=0,1729$ ), havendo diferença quando comparado com *C.parapsilosis* ( $p=0,0000$ ) e com as demais; a segunda espécie com menores valores é *C.tropicalis*, não havendo porém diferença significativa entre ela e a espécie *C.parapsilosis* ( $p=0,2662$ ), havendo diferença quando comparado com *C.gattii* ( $p=0,0010$ ) e com as demais; na sequência, tem-se *C.parapsilosis*, com valores menores do que *C.gattii* ( $p=0,0000$ ), e as demais; as espécies *C.gattii*, *C.neoformans* e *C.krusei* não possuem diferença significativa ( $p=0,5605$ ).

Figura 2. Comparação da CIM da droga sinvastatina sobre as espécies sensíveis no intervalo de concentração testado.



Na comparação da CIM com a utilização da droga atorvastatina (figura 3), tem-se: a espécie *C.albicans* possui os menores valores da CIM entre todas as espécies, não havendo porém diferença significativa entre ela e a espécie *C.tropicalis* ( $p=0,0703$ ), havendo diferença quando comparado com *C.krusei* ( $p=0,0000$ ) e com as demais; a segunda espécie com menores valores é *C.tropicalis*, não havendo porém diferença significativa entre ela e a espécie *C.krusei* ( $p=0,8186$ ), havendo diferença quando comparado com *C.parapsilosis* ( $p=0,0560$ ) e com as demais; na sequência tem-se, *C.krusei*, com valores menores que *C.parapsilosis* ( $p=0,0016$ ), *C.parapsilosis*, com valores menores do que *C.neoformans* ( $p=0,0011$ ), não havendo diferença significativa entre *C.neoformans* e *C.gattii* ( $p=0,5146$ ).

Figura 3. Comparação da CIM da droga atorvastatina sobre as espécies sensíveis no intervalo de concentração testado.



Na comparação entre as espécies, tem-se: para todas as espécies a droga sinvastatina possui valores da CIM menores que a droga atorvastatina ( $p=0,0022$ ), com exceção da espécie *C.tropicalis*, em que não há diferença significativa ( $p=0,2021$ ); por sua vez, a droga atorvastatina possui valores da CIM menores do que a droga pravastatina entre todas as espécies testadas ( $p=0,0163$ ). Entre as leveduras do gênero *Candida*, *C. albicans* foi a que se mostrou mais sensível ante as estatinas estudadas. E entre as leveduras do gênero *Cryptococcus*, não houve diferença significativa entre os resultados apresentados.

## Discussão

Neste estudo, foram determinadas a CIM das drogas pravastatina, sinvastatina e atorvastatina ante 76 leveduras, sendo quatro espécies de *Candida* (*C. albicans*,  $n=16$ ; *C. tropicalis*,  $n=12$ ; *C. krusei*,  $n=11$  e *C. parapsilosis*,  $n=12$ ) e duas espécies de *Cryptococcus*

(*C. neoformans*, n=12 e *C. gattii*, n=13), obtidas da micoteca do CEMM da Faculdade de Medicina / UFC.

Este é o primeiro teste de sensibilidade *in vitro* realizado envolvendo *C. neoformans* e *C. gattii* ante a sinvastatina, atorvastatina e pravastatina. Em 1997, Chin et al., investigaram a atividade antifúngica de outra estatina, a fluvastatina frente a apenas três cepas de *C. neoformans* e espécies de *Candida*. Fluvastatina isolada em concentração variando de 16 a 128 µg / mL causou inibição de 80% no crescimento de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*. A atividade contra *C. glabrata* e *C. neoformans*, entretanto, foi menor, apresentando CIM > 128 µg / mL.

Em 2006, foi realizado por Macreadie et al. o primeiro estudo que relatou os efeitos das drogas sinvastatina e atorvastatina sobre o crescimento de fungos patogênicos, utilizando três tipos de meios semissólidos contendo concentrações de estatinas variando de 0 a 1000 µM, informando os autores que estes níveis de estatinas utilizados nos ensaios foram similares aos níveis usados no tratamento para hipercolesterolemia (CORSINI et al., 1999). Foram utilizadas neste estudo, 13 cepas, sendo cinco espécies de *Candida* (*C. albicans*, n=4; *C. glabrata*, n=2; *C. tropicalis*, n=3; *C. krusei*, n=2 e *C. parapsilosis*, n=1) e uma cepa de *Aspergillus fumigatus*. Forte inibição de crescimento foi observada nas quatro cepas de *C. albicans* na concentração de 100 µM (equivalente a 0,0418 mg/mL) para sinvastatina e 100 µM (equivalente a 0,0559 mg/mL) para atorvastatina. Em nosso estudo, também forte inibição do crescimento das cepas de *C. albicans* foi encontrada em relação a sinvastatina (CIM = 0,0312 mg/mL) e atorvastatina (CIM = 0,039 mg/mL). Entretanto, nosso estudo obteve resultados mais eficazes. Além disso, nossa amostra foi maior, ou seja, 12 cepas de *C. albicans*, sendo que no caso da sinvastatina (CIM = 0,0312 mg/mL para 11 cepas das 12), os resultados foram mais uniformes do que para atorvastatina (CIM = 0,039 mg/mL para 7 cepas, 0,078 mg/mL para 5 cepas). Como o ensaio de Macreadie et al. não foi feito com a metodologia da microdiluição em caldo, seu resultado não pode ser considerado como concentração inibitória mínima, pois não há certeza do valor inibitório entre 3 e 100 µM no caso da sinvastatina e do valor entre 10 e 100 µM no caso da atorvastatina. Isso implica em inferir que, possivelmente, seus valores poderiam ser semelhantes aos nossos no caso das cepas de *C. albicans* ante a sinvastatina e a atorvastatina.

Cinco cepas de *C. krusei* foram inibidas por pravastatina (CIM = 50 mg/mL), 11 cepas por sinvastatina (CIM = 0,25 mg/mL) e 11 por atorvastatina (CIM = 0,625 mg/mL) em nosso estudo. As duas cepas de *C. krusei* no ensaio de Macreadie et al., mostraram-se resistentes a quase todas as concentrações de estatinas testadas sendo inibido seu crescimento

apenas com a concentração máxima de 1000 µM de sinvastatina (equivalente a 0,418 mg/mL). Interessantemente, *C. krusei* é intrinsecamente resistente ao fluconazol, tanto *in vitro*, quanto *in vivo* (OROZCO et al., 1998).

Um dos mecanismos descritos da resistência aos azóis para espécies de *Candida* seria a diminuição da absorção das drogas ou aumento do seu efluxo (OROZCO et al., 1998). Além de fornecer as informações necessárias à hidrólise das pró-drogas, lovastatina e sinvastatina, Lorenz e Parks (1990) relataram em seu artigo que o sinergismo encontrado na combinação de lovastatina e os azóis - miconazol, cetoconazol, ou clotrimazol - poderia ser em parte atribuído ao aumento da permeabilidade da membrana celular fúngica, explicado pela maior necessidade de absorção de esterol livre (exógeno), ocasionado pela escassez do esterol endógeno, devido a ação da lovastatina. Concomitantemente, os azóis teriam desta forma, maior facilidade em sua passagem para o interior da célula.

Além disso, os estudos de associação reportam que, em combinação, as drogas diminuem sua CIM, portanto, os valores por hora elevados encontrados com a droga isolada, possivelmente poderiam se enquadrar dentro de uma faixa terapêutica para uso humano. Por fim, diante dos resultados apresentados em nosso estudo das estatinas ante as cepas de *C. krusei*, uma investigação da combinação das estatinas e dos azóis ou outros antifúngicos poderia fornecer subsídios para uma alternativa na farmacoterapia dessas infecções fúngicas causadas por microrganismos resistentes.

A inibição do crescimento das células fúngicas ocorre provavelmente pela diminuição do nível de ergosterol das membranas fúngicas, mediante o crescimento na presença das estatinas, como Macreadie et al., (2007) demonstraram em seu experimento de resgate do crescimento com suplementação de esteróis. Isso ocorre em virtude da inibição da enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG-CoA) redutase, impedindo a transformação do seu substrato a mevanolato, em uma etapa precoce da síntese do ergosterol. Conseqüentemente, a produção de isoprenóides também é inibida e funções celulares importantes ficam desreguladas, como já explicado. Trabalhos relatam apoptose de células, quando *Mucor racemosus* é testado ante a lovastatina, além de apresentar diminuição da prenilação da proteína Ras (ROSE;LINZ, 1998).

Forrest et al. (2010) realizaram um estudo de coorte retrospectivo avaliando o uso de estatinas concomitantemente com agentes antifúngicos em pacientes de UTI com candidemia confirmada. O estudo concluiu que houve melhora na sobrevivência dos pacientes, porém o resultado não teve significância estatística, necessitando que futuros estudos sejam realizados para validar esta associação.



Em um estudo clínico realizado por Spanakis et al. (2010), foi observado que o uso de estatinas sem agentes antifúngicos em pacientes que se submeteram a cirurgias do trato gastrointestinal inferior, portadores de *diabetes mellitus* do tipo dois, reduziu a incidência de cultura positiva para espécies de *Candida*. Eles alertam para que os médicos avaliem a necessidade do uso de estatinas como prevenção da colonização por *Candida* ou mesmo a infecção, ou, talvez, a combinação com outros agentes antifúngicos, especialmente entre pacientes de alto risco para candidíases.

Aumento da expressão de genes que codificam bombas de efluxo tem sido amplamente observado em leveduras resistentes ao azóis. Duas famílias de transportadores estão relacionadas ao processo de efluxo de droga: ABC e MTS, sendo os genes mais comuns, CDR e MDR1, respectivamente (GOLDMAN et al., 2004; SANGLARD et al., 2009).

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., 2009).

A existência desses transportadores pode explicar em parte a maior susceptibilidade de *C. albicans* em comparação com as outras espécies de *Candida* observadas em nosso experimento, visto que, geralmente *C. albicans* foi mais sensível às drogas do que as espécies não *albicans*.

## **Conclusão**

Esta atividade inibitória *in vitro* de estatinas sobre espécies de *Candida* e *Cryptococcus*, abre perspectivas para realização de estudos farmacocinéticos, com o intuito de determinar as doses para a realização de pesquisas *in vivo*.

## **Referências**

**Chin, N.X., Weitzman, I.; Della Latta, P.** 1997. In vitro activity of fluvastatin, a cholesterol-lowering agent, and synergy with fluconazole and itraconazole against *Candida* species and *Cryptococcus neoformans*. Antimicrobial Agents Chemotherapy, v. 41, p.850-2.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. **Método de referência para testes de diluição em caldo para determinação da sensibilidade de leveduras à terapia**

**antifúngica: Norma aprovada – M27-A2**, v. 22, 2. ed. Pennsylvania, Estados Unidos, 2002a.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. **Método de referência para testes de diluição em caldo para determinação da sensibilidade a terapia antifúngica dos fungos filamentosos: Norma aprovada – M38-A**, v. 22, Pennsylvania, Estados Unidos, 2008.

**Corsini, A.; Bellosta S.; Baetta R. et al.** New insights into the pharmaco-dynamic and pharmacokinetic properties of statins. **Pharmacology Therapeutics**, v. 84, p.413-28, 1999.

**Forrest, G. N.; Kopack A. M.; Perencevich E. N.** Statins in Candidemia: clinical outcomes from a matched cohort study. **BMC Infectious Diseases**. v.10, p.152, 2010.

**Goodman L. S.; Gilman, A.** **As bases farmacológicas da terapêutica**. 10<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, p. 739-744, 2003.

**Lorenz, R.T.; Parks, L.W.** 1990.Effects of lovastatin (mevinolin) on sterol levels and on activity of azoles in *Saccharomyces cerevisiae*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.34, p.1660-1665.

**Macreadie, I.G, Johnson, G., Schlosser, T., Macreadie, P.I.** 2006. Growth inhibition of *Candida* species and *Aspergillus fumigates* by statins. **FEMS Microbiol L**, v.262, p. 9-13.

**Orozco, A.S.; Higginbotham, L.M.; Hitchcock, C.A.; Parkinson, T.; Dfalconer, D.; Ibrahim, A.S.; Ghannoum, M.A.; Filler, S.G.** 1998. Mechanism of fluconazole resistance in *Candida krusei*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.42, p.2645-9,

**Roze, L.V.; Linz, J.E.** Lovastatin triggers an apoptosis-like cell death process in the fungus *Mucor racemosus*. **Fungal Genetic Biology**, v. 25, p.119-33, 1998.

**Sanglard, D.; Coste, A.; Ferrari, S.** Antifungal drug resistance mechanisms in fungal pathogens from the perspective of transcriptional gene regulation. **FEMS yeast Research**, v. 9, p.1029-50, 2009.

**Spanakis, E.K. et al.** Statin Therapy and Decreased Incidence of Positive *Candida* Cultures Among Patients With Type 2 Diabetes Mellitus Undergoing Gastrointestinal Surgery. **Mayo Clinic Proceedings**, 12/06/2010.

**Westermeyer C.; Macreadie I.G.:** Simvastatin reduces ergosterol levels, inhibits growth and causes loss of mtDNA in *Candida glabrata*. **FEMS Yeast Res.** v.7, p. 436-441, 2007.