

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA – CBiot
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR -
PPGBCM

**Caracterização da atividade antifúngica de extrato aquoso de
sementes de *Allamanda polyantha***

Fernanda Regina Bresciani

Dissertação submetida ao
Programa de Pós-Graduação em
Biologia Celular e Molecular da
UFRGS como requisito parcial
para a obtenção do título de
Mestre.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Marilene Henning Vainstein

Porto Alegre, junho de 2013.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Bioquímica Farmacológica e no Laboratório de Fungos de Importância Médica e Biotecnológica, ambos situados no Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, sendo financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal para o Ensino Superior (CAPES) e pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Parte deste trabalho foi realizada no Laboratório de Farmacognosia, situado na Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Agradecimentos

Agradeço a professora Marilene H. Vainstein por todas as oportunidades que me deu, desde a iniciação científica, pelo apoio e confiança. Aprendi muito com a senhora e admiro a profissional que és.

A professora Gilsane Lino von Poser, por ter me recebido em seu laboratório, pelos ensinamentos, e também pelo entusiasmo e bom humor com que sempre conduziu o trabalho. Muitas vezes cheguei abatida na Faculdade de Farmácia, mas o entusiasmo da professora sempre me animava. Agradeço também aos seus alunos: Maikon Barros, Flávia Corvello, Sati Sakamoto, Fernando e Gari, que me auxiliaram diversas vezes.

Ao professor Jorge A. Guimarães, por ter me recebido em seu laboratório e pelas contribuições ao trabalho.

Aos professores Augusto Schrank e Guido Lenz, membros da comissão de acompanhamento.

A Lucélia Santi e Walter O. Beys da Silva, pelas orientações, apoio e amizade.

A Lívia K. Rosa e Silva e ao professor Charley Staats, que me ajudaram em diversos momentos, sempre prestativos e dispostos, contribuindo para meu aprendizado.

A Renata Terra, que me ensinou os procedimentos para cultura de células mamíferas.

A Bárbara Leal, pelo auxílio para obtenção dos espectros de RMN.

Aos funcionários da sala de esterilização, especialmente ao Sr. Milton, sempre muito prestativo.

Aos secretários do PPGBCM, Luciano Saucedo e Sílvia R. Centeno, pela prestatividade e bom humor com que sempre me atenderam.

Aos colegas dos laboratórios 220 e 214. Em especial a Isadora Sasso e ao Markus Berger, que me deram muito apoio nos momentos difíceis, e ao Charles Rodrigues que antes de viajar, ficou muitas vezes no laboratório até tarde, para que eu não fosse embora do campus sozinha. Agradeço muito a amizade de vocês três.

Aos meus pais, José E. Bresciani e Leonice T. Turcati Bresciani, a minha irmã Laura C. Bresciani e ao meu namorado Marc Emerim, pelo imenso apoio e compreensão. Amo vocês.

Sumário

| | |
|--|-----------|
| SUMÁRIO | 5 |
| 1. INTRODUÇÃO | 13 |
| 1.1 COMPLEXO DE ESPÉCIES <i>CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS</i> | 13 |
| 1.1.1 A infecção por <i>C. neoformans</i> e <i>C. gattii</i> | 17 |
| 1.1.2 Ciclo sexual (<i>mating</i>) | 19 |
| 1.1.3 Fatores de Virulência | 22 |
| 1.2 ANTIFÚNGICOS | 31 |
| 1.3 IRIDOIDES | 37 |
| 1.3.1 Classificação de iridoides | 38 |
| 1.4 <i>ALLAMANDA POLYANTHA</i> | 40 |
| 2. OBJETIVO | 42 |
| 2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 42 |
| 3. MANUSCRITO CIENTÍFICO | 43 |
| 3. RESULTADOS ADICIONAIS | 72 |
| 4. DISCUSSÃO | 72 |
| 5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS | 75 |
| 6. REFERÊNCIAS | 77 |
| APÊNDICE | 87 |
| CURRICULUM VITAE | 95 |

Lista de Abreviaturas, Símbolos e Unidades

- AFLP – polimorfismo de comprimento de fragmento amplificado
- AIDS - síndrome da imunodeficiência adquirida
- ANOVA – análise de variância
- APCSE – extrato aquoso bruto de sementes de *Allamanda polyantha*
- AT – adenina-timina
- ATCC - *American Type Culture Collection*
- CDCl_3 – clorofórmio deuterado
- CD_3O_3 – metanol deuterado
- cm - centímetros
- CO_2 - gás carbônico
- DAPI - 4',6-diamidino-2-fenilindol
- DMSO - dimetilsulfóxido
- DNA – ácido desoxirribonucleico
- dsDNA – DNA dupla fita
- g – gramas
- g/mL – gramas por mililitros
- GalXM – galactoxilomanana
- GlcNAc - N-acetilglicosamina
- GXM - glicuronoxilomanana
- GXMGal – glicuronoxilomananagalactana
- h – horas
- HIV – vírus da imunodeficiência humana
- mbar - megabar

MFC – concentração fungicida mínima

MHz – mega hertz

MIC – concentração inibitória mínima

mg/mL – miligramas por mililitros

min - minutos

mL – mililitros

MOPS – ácido 3-(*N-Morfolino*)propanosulfônico

MTT - Brometo de 3-[4,5-Dimetiltiazol-2-il]-2,5-Difenil-Tetrazolium.

nm - nanômetros

PCR – reação em cadeia da DNA polimerase

pH – potencial de hidrogênio

PI – iodeto de propídio

RDA – análise da diferença representacional

RMN – ressonância magnética nuclear

RNA – ácido ribonucleico

rpm – rotações por minuto

RPMI – meio de cultivo desenvolvido por *Roswell Park Memorial Institute*

SAGE – análise seriada da expressão gênica

spp – abreviatura que faz referência a mais de uma espécie de determinado gênero

TLC – cromatografia em camada delgada

UV – ultravioleta

var – variedade

x – vezes

WGA - aglutinina de germe de trigo

µg – microgramas

μL – microlitros

μm – micrometros

$\mu\text{g/mL}$ – microgramas por mililitros

% - porcento

$^{\circ}\text{C}$ - graus Celsius

Lista de Tabelas

Introdução

| | |
|---|----|
| Tabela 1: Tipos moleculares (TM) de <i>C. neoformans</i> e <i>C. gattii</i> e suas distribuições geográficas e clínicas. | 14 |
|---|----|

Manuscrito

| | |
|---|----|
| Table 1: Minimal inhibitory concentration (MIC) values of the <i>A. polyantha</i> crude seed extract (APCSE) against <i>Cryptococcus</i> spp. | 51 |
| Table 2: Minimal inhibitory concentration (MIC) values and minimal fungicide concentration (MFC) values of plumieride and plumieridine isolated from <i>A. polyantha</i> seed extract against <i>Cryptococcus</i> spp. | 58 |

Lista de Figuras

Introdução

| | |
|---|----|
| Figura 1: Formação de hifas e produção de esporos por <i>Cryptococcus</i> spp. | 20 |
| Figura 2: Preparação de células de <i>C. neoformans</i> com nanquim. | 25 |
| Figura 3: Produção do pigmento melanina por <i>C. neoformans</i> | 26 |
| Figura 4: Estruturas de iridoïdes e seus derivados. | 38 |
| Figura 5: Imagens de <i>Allamanda polyantha</i> | 41 |

Manuscrito

| | |
|---|----|
| Fig. 1: The effect of <i>A. polyantha</i> seed extract (APCSE) on the viability of NIH3T3 fibroblasts. | 52 |
| Fig. 2: Effect of <i>A. polyantha</i> crude seed extract (APCSE) upon <i>Cryptococcus</i> capsule formation. | 53 |
| Fig. 3: <i>A. polyantha</i> crude seed extract (APCSE) alters <i>C. neoformans</i> H99 cell morphology. | 54 |

| | |
|---|----|
| Fig. 4: Fluorescence microscope analyses of <i>C. neoformans</i> H99 strain stained with DAPI..... | 56 |
| Fig. 5: Fluorescence microscope analyses of <i>C. neoformans</i> H99 strain stained with calcofluor white (blue) and WGA (green). | 57 |
| Fig. 6: Chemical structure of iridoids isolated from <i>A. polyantha</i> crude seed extract (APCSE)..... | 57 |
| Fig. 7: Plumieride alters <i>C. neoformans</i> H99 strain cell morphology. | 58 |

Apêndice

| | |
|---|----|
| Figura 1: Espectro de RMN ¹ H (400 MHz) da mistura de plumericina (A) e isoplumericina (B) em CDCl ₃ | 87 |
| Figura 2: Espectro de RMN ¹³ C (101 MHz) da mistura de plumericina (A) e isoplumericina (B) em CDCl ₃ | 88 |
| Figura 3: Espectro de RMN ¹ H (400 MHz) de plumierídeo em CD ₃ OD. | 89 |
| Figura 4: Espectro de RMN ¹³ C (101 MHz) de plumierídeo em CD ₃ OD..... | 90 |
| Figura 5: Espectro de RMN ¹ H (400 MHz) de plumieridina em CD ₃ OD. | 91 |
| Figura 6: Espectro de RMN ¹³ C (101 MHz) de plumieridina em CD ₃ OD. | 92 |
| Figura 7: Espectro de RMN ¹ H (400 MHz) de protoplumericina em CD ₃ OD. | 93 |
| Figura 8: Espectro de RMN ¹³ C (101 MHz) de protoplumericina em CD ₃ OD. | 94 |

Resumo

O número de casos de infecções fúngicas invasivas tem aumentado nas duas últimas décadas, estando associado com aumento do número de pacientes com AIDS ou submetidos a terapias imunossopressoras. *Cryptococcus neoformans* e *C. gattii* estão entre os agentes causadores mais comuns dessas infecções. Os antifúngicos atualmente utilizados apresentam limitações relacionadas à toxicidade e surgimento de resistência, tornando importante a busca por novos medicamentos. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a atividade antifúngica do extrato aquoso bruto de sementes de *Allamanda polyantha* (APCSE) frente a *C. neoformans* e *C. gattii*. Os valores de concentração inibitória mínima (CIM) foram determinados por teste de microdiluição. APCSE apresentou melhor atividade contra *C. gattii* (CIM 70 e 36 µg/mL, para as linhagens R265 e R272, respectivamente) em comparação com *C. neoformans* H99 (CIM 563 µg/mL). APCSE inibiu formação de cápsula polissacarídica em *C. neoformans*, fenótipo associado à virulência, e reduziu o tamanho de corpo celular em *C. gattii*. Aparentemente, APCSE inibiu a divisão celular completa em *C. neoformans*, causando a formação de cadeias lineares de células que apresentam fragmentação nuclear e não reagem com marcador para oligômeros de quitina. Quatro compostos foram isolados de APCSE por métodos cromatográficos e identificados por ressonância magnética nuclear: plumieridina, plumierídeo, protoplumericina, além de uma mistura dos iridoides plumericina e isoplumericina. Os valores de CIM de plumieridina e plumierídeo para *Cryptococcus* spp. foram maiores que os de APCSE, indicando que outros compostos podem estar contribuindo para atividade do extrato ou que os compostos possuem maior eficácia em associação. Protoplumericina não foi ativa contra *Cryptococcus* spp. Plumierídeo foi um dos compostos causadores de alteração morfológica em *C. neoformans*. APCSE e compostos isolados a partir do extrato apresentaram potencial atividade antifúngica e podem prover uma nova ferramenta para estudos da biologia celular de *C. neoformans* e *C. gattii*.

Abstract

The number of cases of invasive fungal infections has increased in the last two decades, and is associated with increased numbers of patients with AIDS or patients undergoing immunosuppressive therapies. *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii* are among the most common causative agents of such infections. Antifungal drugs currently used have limitations related to toxicity and emergence of resistance, making it important to search for new drugs. The objective of this study was to evaluate the antifungal activity of an aqueous crude seed extract from *Allamanda polyantha* (APCSE) against *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. The values of minimum inhibitory concentration (MIC) were determined by broth microdilution test. APCSE showed better activity against *C. gattii* (MIC 70 and 36 $\mu\text{g/mL}$, for strain R265 and R272, respectively) compared with *C. neoformans* H99 (MIC 563 $\mu\text{g/mL}$). APCSE inhibited polysaccharide capsule formation in *C. neoformans*, a virulence associated phenotype, and reduced the cell body size in *C. gattii*. Apparently, APCSE inhibited cell division in *C. neoformans*, causing the formation of linear chains of cells that exhibit nuclear fragmentation and do not react with marker for chitin oligomers. Four compounds were isolated from APCSE by chromatographic methods and identified by nuclear magnetic resonance: plumieridine, plumieride, protoplumericin, and a mixture of the iridoids plumericin and isoplumericin. MIC values of plumieridine and plumieride for *Cryptococcus* spp were higher than those of APCSE, indicating that other compounds may be contributing to the activity of the extract or that these compounds are more efficient in combination. Protoplumericin was not active against *Cryptococcus* spp. Plumieride was one of the compounds causing morphological change in *C. neoformans*. APCSE and compounds isolated from this extract showed potential antifungal activity and may provide a new tool for studies of *C. neoformans* and *C. gattii* cell biology.

1. Introdução

1.1 Complexo de espécies *Cryptococcus neoformans*

O complexo de espécies *C. neoformans* compreende duas espécies de leveduras basidiomicéticas: *C. neoformans* (var. *neoformans* e var. *grubii*) e *C. gattii*, que são os agentes etiológicos da criptococose, uma doença que afeta animais e o homem. Estima-se que essas espécies tenham divergido a aproximadamente 37 milhões de anos (Xu *et al.*, 2000).

Cryptococcus neoformans e *C. gattii* possuem epidemiologia distinta. Enquanto *C. gattii* afeta principalmente indivíduos imunocompetentes, *C. neoformans* afeta imunocomprometidos, especialmente pacientes HIV positivos, mas também pacientes que receberam transplante de órgãos, terapia com corticosteroides, bem como quimioterapia (Chayakulkeeree & Perfect, 2006; Byrnes *et al.*, 2011).

Diferenças na composição e estrutura do polissacarídeo glicuronoxilomanana (GXM), presente na cápsula polissacarídica que circunda a célula determinam características antigênicas que possibilitaram a classificação do complexo de espécies *C. neoformans* em cinco sorotipos: *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* (sorotipo A), *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (sorotipo D), o híbrido de *C. neoformans* var. *neoformans* e *C. neoformans* var. *grubii* (sorotipo AD) e *C. gattii* (sorotipos B e C) (Lin & Heitman, 2006; Vecchiarelli & Monari, 2012).

Estudos moleculares, envolvendo as técnicas de PCR *fingerprinting* e AFLP, levaram a classificação de *C. neoformans* e *C. gattii* em 8 tipos moleculares (Meyer *et al.*, 1999; Boekout *et al.*, 2001; Meyer *et al.*, 2003), conforme listado na Tabela 1. Adicionalmente, Litvintseva *et al.* (2006) propuseram a classificação de tipo molecular VNB para isolados de Botswana, na África.

Tabela 1: Tipos moleculares (TM) de *C. neoformans* e *C. gattii* e suas distribuições geográficas e clínicas.

| Espécies/híbridos | Sorotipo | TM | AFLP | Distribuição | Pacientes de risco |
|---|----------|-------|--------|--|---|
| <i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i> | A | VNI | AFLP1 | Global | Imunocomprometidos, casos em imunocompetentes na China e Coréia |
| | | VNII | AFLP1B | Austrália | Imunocomprometidos, raro em imunocompetentes |
| | | VNB | AFLP1A | Botswana, África | Imunocomprometidos, raro em imunocompetentes |
| <i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i> - <i>C. neoformans</i> var. <i>neoformans</i> | AD | VNIII | AFLP3 | Europa, América do Sul | Imunocomprometidos, raro em imunocompetentes |
| <i>C. neoformans</i> var. <i>neoformans</i> | D | VNIV | AFLP2 | Europa, América do Sul | Imunocomprometidos, raro em imunocompetentes |
| <i>C. gattii</i> | B e C* | VGI | AFLP4 | Global | Imunocompetentes, raro em imunocomprometidos |
| | | VGII | AFLP6 | América do Norte e Sul, subtipos moleculares responsáveis por surtos na América do Norte | Imunocompetentes |
| | | VGIII | AFLP5 | Global, altos níveis observados no sul da Califórnia, México e América do Sul | Casos esporádicos, mais comum em HIV+ |
| | | VGIV | AFLP7 | África, Índia e América do Sul | Raro, mais comum em HIV+ |

*Ao contrário de *C. neoformans*, *C. gattii* não apresenta relação clara entre sorotipos e tipos moleculares.

Construção da tabela baseada em dados descritos por Ma & May (2009), Byrnes & Heitman (2009), Byrnes *et al.* (2011) e Springer *et al.* (2012).

C. neoformans foi isolado em 1894 por Sanfelice, a partir de suco de pêssego, e por Busse, de uma lesão de tíbia de um paciente, indicando que este não é um patógeno humano obrigatório, possuindo capacidade de vida livre (Lin & Heitman, 2006). *C. neoformans* é cosmopolita, sendo isolado de excreta de aves (especialmente pombos), solo e árvores (Idnurm *et al.*, 2005). Já *C. gattii* é comumente isolado de árvores, especialmente *Eucalyptus camaldulensis*. Inicialmente acreditava-se que essa espécie vegetal constituía o habitat natural exclusivo de *C. gattii* (Ellis & Pfeiffer, 1990), mas foram descritos isolamentos em outras espécies arbóreas, e também do ar, solo e de corpos d'água em regiões altamente infestadas (Kidd *et al.*, 2007)

Cryptococcus gattii foi descrito como endêmico de regiões tropicais e subtropicais, porém, surtos de criptococose causados por essa espécie na América do Norte modificaram a noção de distribuição restrita que se tinha (Chaturvedi & Chaturvedi, 2011). Esses surtos iniciaram em 1999, nas ilhas Vancouver, na Colúmbia Britânica, no Canadá, com registro de casos de pneumonia e/ou meningoencefalite em animais e humanos (Kidd *et al.*, 2004; Springer *et al.* 2012). Entre 2002 e 2005 a incidência de infecção por *C. gattii* nas ilhas de Vancouver atingiu o valor de 36 casos/milhão de pessoas/ano, enquanto na Austrália, considerada endêmica para *C. gattii*, o valor mais alto de incidência no período de 1994-1997 foi de 8,5 casos/milhão de pessoas/ano, observado na região nordeste (Chen *et al.*, 2000; MacDougall *et al.*, 2007). Kidd *et al.* (2004) identificaram subtipos do tipo molecular VGII/AFLP6 como os causadores do surto nas ilhas Vancouver: VGIIa/AFLP6a (linhagem R265), mais frequente e

hipervirulento, e VGIIb/AFLP6b (linhagem R272), menos frequente e menos virulento que VGIIa/AFLP6a.

Entre 2004 e 2005 foram registrados casos de infecção na Colúmbia Britânica, em indivíduos que não viajaram para as ilhas de Vancouver, nem tiveram qualquer contato com áreas endêmicas de *C. gattii*. Neste mesmo período foram registrados casos de infecção em humanos no Oregon, e em animais em Washington, nos Estados Unidos, dando início ao quadro de infecção no Noroeste do Pacífico (MacDougall *et al.*, 2007). Os subtipos moleculares VGIIa/AFLP6a e VGIIb/AFLP6b também foram isolados nessas regiões, indicando a ocorrência de expansão do surto de criptococose das ilhas Vancouver (Byrnes *et al.*, 2009). Mas, esses subtipos apresentaram-se geneticamente distintos dos isolados nas ilhas Vancouver (MacDougall *et al.*, 2007). Adicionalmente, foi identificado um novo subtipo VGIIc/AFLP6c, em Oregon, que parece ser restrito a essa região e é altamente virulento (Byrnes *et al.*, 2009 e 2010).

Os surtos causados por *C. gattii* no Noroeste do Pacífico atraíram maior atenção a esta espécie, pouco estudada anteriormente. Pesquisadores ainda buscam entender a origem, modo de expansão desses surtos e se novas áreas de risco podem surgir em regiões de clima temperado. Nesse sentido torna-se importante a identificação de amostras clínicas humanas e veterinárias em nível molecular, facilitando o monitoramento da infecção por *Cryptococcus* spp. (Springer *et al.*, 2012).

1.1.1 A infecção por *C. neoformans* e *C. gattii*

A infecção por *Cryptococcus* spp. ocorre pela inalação de células fúngicas provenientes do meio ambiente, podendo gerar uma infecção aguda ou ainda, assintomática, que pode ser eliminada pelo sistema imune ou permanecer como uma forma dormente de infecção, manifestando-se futuramente quando a imunidade do hospedeiro estiver comprometida (Idnurm *et al.*, 2005; Lin & Heitman, 2006). Após a infecção pelas vias respiratórias, o fungo dissemina-se pela via hematogênica, atingindo o sistema nervoso central (SNC), causando meningoencefalite (Lin & Heitman, 2006). Além do trato respiratório e do SNC, comumente envolvidos na infecção, outros órgãos podem ser atingidos, como pele, olhos, trato urinário, entre outros (Chayakulkeeree & Perfect, 2006).

A manifestação clínica da infecção causada por *C. gattii* difere da de *C. neoformans*. Pacientes infectados com *C. gattii* apresentam, com frequência, criptococomas nos pulmões e cérebro, que geralmente requerem intervenção cirúrgica e/ou terapia antifúngica prolongada, muitas vezes havendo sequelas neurológicas (Chen *et al.*, 2000; Chayakulkeeree & Perfect, 2006; Byrnes *et al.*, 2011). Um estudo comparativo da progressão da infecção por *C. neoformans* e *C. gattii* em camundongos infectados por via intranasal (Ngamskulrungraj *et al.*, 2012b) corroborou achados clínicos, como os de Galanis & McDougall (2010), de que *C. gattii* causa frequentemente infecção pulmonar em pacientes imunocompetentes, com menor número de casos de infecção no SNC. Quando camundongos foram infectados com *C. gattii* por via intravenosa, tendo sido previamente infectados por via intranasal (2 semanas antes), eles apresentaram aumento de sobrevivência, e o mesmo não ocorreu para *C. neoformans*. Assim,

sugere-se que o desenvolvimento de uma resposta imune adaptativa durante a infecção com *C. gattii* afetaria a disseminação para o cérebro e outros órgãos (Ngamskulrungrroj *et al.*, 2012b).

Ainda existem dúvidas se a infecção por *Cryptococcus* spp. se dá pela inalação de esporos ou células leveduriformes desidratadas. Ambos possuem tamanho adequado para penetrar as vias respiratórias até os alvéolos pulmonares. Apesar dos esporos serem fortes candidatos, por apresentarem maior resistência às condições adversas do meio ambiente, nunca foram isolados diretamente na natureza (Lin & Heitman, 2006; Kronstad *et al.*, 2011).

Estudos em camundongos demonstraram que os esporos são capazes de causar infecção em modelo de infecção intranasal (Guiles *et al.*, 2009; Velagapudi *et al.*, 2009). Em cultura, são rapidamente fagocitados por macrófagos, sem necessidade de opsonização, ao contrário das leveduras. Se os macrófagos não forem ativados, os esporos germinam, crescem e se proliferam dentro da célula fagocítica na forma de leveduras. Se os macrófagos são ativados com lipopolissacarídeo e interferon δ , os esporos tornam-se suscetíveis a eles, ao contrário das leveduras (Guiles *et al.*, 2009). Com isso, Botts & Hull (2010) sugeriram que a eficiência da infecção por esporos depende de uma espécie de disputa entre o fungo e o hospedeiro: os esporos do fungo precisam germinar rapidamente, pois na forma de leveduras são resistentes aos macrófagos, já os macrófagos também devem ser ativados com rapidez, pois os esporos são suscetíveis a macrófagos ativados. Assim, hospedeiros imunocomprometidos, como pacientes HIV positivos, perderiam essa disputa, favorecendo a infecção por *C. neoformans*. Os autores ainda sugerem que a capacidade de *C. gattii*

infectar hospedeiros imunocompetentes poderia estar relacionada a uma taxa de germinação mais rápida, permitindo o estabelecimento da infecção mesmo frente a uma resposta imune mais rápida.

1.1.2 Ciclo sexual (*mating*)

Apesar de a forma de levedura haplóide ser predominante no meio ambiente e nos hospedeiros, a formação de hifas durante o *mating* é um aspecto importante da patogenicidade de *Cryptococcus* spp. A reprodução sexuada gera variabilidade genética e os esporos resultantes desse processo são partículas infecciosas, conforme discutido anteriormente. Alguns genes localizados no locus *mating type* (MAT) são importantes durante o *mating* e durante a infecção do hospedeiro (Kozubowski & Heitman, 2012).

O locus MAT contém genes que regulam a reprodução sexuada de *Cryptococcus* spp., e pode ser de dois tipos: MAT α ou MAT a . Cada um desses dois *mating types* expressa feromônios e receptores específicos que determinam sua compatibilidade (Kozubowski & Heitman, 2012). Em resposta a essa sinalização, células de *mating types* opostos (a e α) fusionam, levando a formação de hifas dicarióticas (Fig. 1A). No basídio, uma estrutura formada pela diferenciação da célula apical da hifa, ocorre fusão dos núcleos (cariogamia), seguida por meiose. Após a meiose ocorrem alguns processos de mitose, que levam a formação de quatro cadeias de esporos (basidiósporos) que brotam do basídio (Lin, 2009; Kozubowski & Heitman, 2012).

Sia *et al.* (2000) descreveram a formação de leveduras diplóides após a germinação de esporos oriundos de *mating*. Estas células reproduzem-se por brotamento quando cultivadas a 37 °C, mas produzem hifas e esporulam quando cultivadas a 24 °C (Fig. 1A).

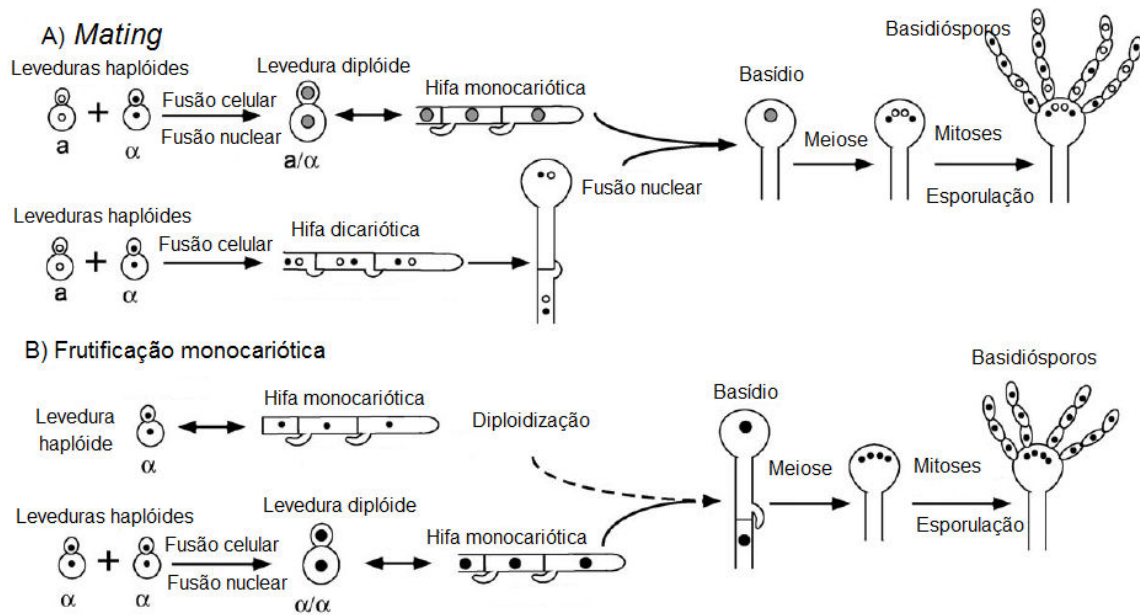


Figura 1: Formação de hifas e produção de esporos por *Cryptococcus* spp.

A) o painel superior representa o processo descrito por Sia *et al.* (2000), em que células de *mating type* opostos fusionam e reproduzem-se por brotamento como leveduras diplóides (com núcleos fusionados) se cultivadas a 37 °C, passando a produzir hifas monocarióticas quando cultivadas a 24 °C. A diferenciação da célula apical das hifas em basídio, seguida por meiose e mitoses resulta na produção de quatro cadeias de esporos haplóides dos dois *mating types*, que germinarão nas condições apropriadas dando origem a leveduras. O painel inferior descreve o processo comum de *mating* em que células de *mating type* opostos fusionam, formando uma hifa dicariótica (sem fusão nuclear). Durante a diferenciação da célula apical das hifas em basídio ocorre a cariogamia, seguida por meiose e mitoses com produção de esporos como descrito acima. B) no processo de frutificação monocariótica, uma célula filamenta (painel superior), formando hifas monocarióticas. A diploidização dá-se por endoreplicação, e pode ocorrer em diversas etapas do processo, desde o estágio de levedura. A hifa diplóide forma basídio com produção de esporos por meiose e mitoses como no *mating*, porém nesse caso são gerados esporos de um único *mating type*. Esse processo também ocorre por fusão de duas células do mesmo *mating type* (painel inferior). Adaptado de Lin (2009).

Os basidiósporos também são formados por frutificação monocariótica (Fig. 1B) um processo que envolve um único *mating type*. Uma célula pode formar hifas monocarióticas com ou sem diploidização, mas células diplóides filamentam com mais facilidade (Lin, 2009; Kozubowski & Heitman, 2012). A diploidização ocorre por endoreplicação, e posteriormente as hifas formam esporos por meiose e mitose como no processo de *mating*, mas todos os esporos são de um único *mating type*, o mesmo da levedura que os originou. Alternativamente, pode ocorrer fusão de duas células do mesmo *mating type*, seguida por fusão nuclear e formação de hifa monocariótica, com produção de basidiósporos (Lin, 2009; Kozubowski & Heitman, 2012). Wickes *et al.* (1996) descreveram esse processo em *C. neoformans* como uma forma de reprodução assexuada, restrita as células *mating type* α , porém posteriormente demonstrou-se que a frutificação monocariótica também ocorre em células *mating type* a, ainda que com menor frequência (Tscharke *et al.*, 2003; Idnum *et al.*, 2005). Com a descoberta de que ocorre recombinação genética durante a frutificação monocariótica, esse processo passou a ser reconhecido como uma forma de reprodução sexuada (Lin *et al.*, 2005). A frutificação monocariótica em *C. gattii* ainda não foi descrita em condições laboratoriais, mas evidências indiretas, por estudos genéticos apontam para sua ocorrência (Fraser *et al.*, 2005; Springer *et al.*, 2012). Tanto para *C. neoformans* como para *C. gattii*, ocorre abundância do *mating type* α no ambiente, e sabe-se que a frutificação monocariótica predomina nesse *mating type* assim, a frutificação monocariótica deve ser uma fonte importante de variabilidade genética, e uma explicação para essa abundância (Fraser *et al.*, 2005; Idnum *et al.*, 2005; Lin *et al.*, 2005; Lin, 2009).

Mating e frutificação monocariótica são estimulados por condições ambientais similares: escassez de nitrogênio, baixa umidade e escuridão (Idnurm *et al.*, 2005). Já condições encontradas no hospedeiro, como a temperatura de 37 °C, umidade e alta concentração de dióxido de carbono, inibem o *mating* (Kozubowski & Heitman, 2012).

1.1.3 Fatores de Virulência

A expressão de diversos genes por *C. neoformans* e *C. gattii* foi associada a virulência. Muitos desses genes necessários para sobrevivência durante a infecção também estão associados à sobrevivência no meio ambiente, onde as leveduras interagem com hospedeiros heterólogos como amebas e nematodos, e estão sujeitas a danos oxidativos, entre outros (Idnurm *et al.*, 2005; Lin & Heitman, 2006). A seguir estão descritos três fatores de virulências considerados clássicos, que são compartilhados por *C. neoformans* e *C. gattii*: a presença de cápsula polissacarídica, a capacidade de síntese de melanina e a capacidade de desenvolvimento a 37°C. Outros fatores de virulência incluem, por exemplo, a produção de enzimas extracelulares, como fosfolipases e urease, importantes para invasão do tecido pulmonar e do sistema nervoso central, respectivamente (Kronstad *et al.*, 2011).

Cápsula Polissacarídica

A presença de cápsula polissacarídica de *Cryptococcus* spp. é uma característica diferencial. O principal constituinte de cápsula é GXM, compreendendo cerca de 90-95 % da massa dessa estrutura. Além de GXM, a cápsula contém 5-8 % de galactoxilomanana (GalXM), e menos de 1 % de

manoproteínas (Zaragoza *et al.*, 2009; Vecchiarelli & Monari, 2012). Recentemente, Heiss *et al.* (2009) revisaram a estrutura de GalXM e propuseram a adoção de uma nova nomenclatura, passando a referi-la como glicuronoxilomananogalactana (GXMGal), uma vez que sua estrutura principal é composta por galactana e não manana, e que ácido glicurônico é um de seus substituintes.

Os polissacarídeos que compõem a cápsula de *Cryptococcus* spp. são sintetizados intracelularmente e transportados através da parede celular em vesículas, sendo posteriormente ligados não-covalentemente à parede celular (revisado em O'Meara & Alspaugh, 2012). Considera-se que GXM esteja distribuída por toda extensão da cápsula, mas a localização exata de GXMGal ainda não foi completamente elucidada. Da mesma forma, a localização de manoproteínas e suas funções na arquitetura da cápsula polissacarídica também não foram bem estabelecidas (Zaragoza *et al.*, 2009). Um estudo recente, utilizando anticorpos específicos, indica localização de GXMGal e de um tipo de manoproteína de maneira pontuada próxima a parede celular (De Jesus *et al.*, 2010).

No meio ambiente, a cápsula confere proteção contra desidratação e predadores naturais (McFadden *et al.*, 2006; O'Meara & Alspaugh, 2012). Durante a infecção, ela reduz a resposta imune do hospedeiro, inibindo a migração de leucócitos e a apresentação de antígenos por monócitos, por exemplo, além de dificultar a fagocitose por células do hospedeiro, e atuar como proteção frente a espécies reativas de oxigênio (Zaragoza *et al.*, 2003; Zaragoza & Casadevall, 2004; McFadden *et al.*, 2006; O'Meara & Alspaugh, 2012). Tanto GXM como

GXMGal apresentam atividade imunossupressora e induzem apoptose em linfócitos T (Zaragoza *et al.*, 2009).

Isolados ambientais apresentam tamanho da cápsula reduzido, e o mesmo ocorre em condições padrão de laboratório, com cultivo em meio rico em nutrientes (Zaragoza & Casadevall, 2004, McFadden *et al.*, 2006). Porém, *in vivo*, as células de *Cryptococcus* spp. apresentam grande aumento de tamanho da cápsula, e observa-se diferença de tamanho conforme o órgão analisado no hospedeiro. Assim, células isolados de pulmão apresentam cápsulas maiores do que as de células isoladas de cérebro (Zaragoza *et al.*, 2003). Isso demonstra o quão dinâmica essa estrutura é, e como é finamente regulada em resposta a diferentes ambientes (O'Meara & Alspaugh, 2012). Nas preparações de microscopia óptica, utilizando tinta nanquim (Fig. 2), a cápsula é observada como uma estrutura contínua, mas sabe-se que ela apresenta diferença de densidade, sendo as regiões mais próximas a parede celular cerca de seis vezes mais densas do que as regiões próximas à borda da cápsula (McFadden *et al.*, 2006). Diversas condições de cultivo *in vitro* têm sido descritas como indutoras do aumento de cápsula, dentre elas destacam-se cultivo em meio com privação de ferro e cultivo com incubação em atmosfera rica em CO₂, condições que mimetizam o ambiente do hospedeiro (Zaragoza & Casadevall, 2004).

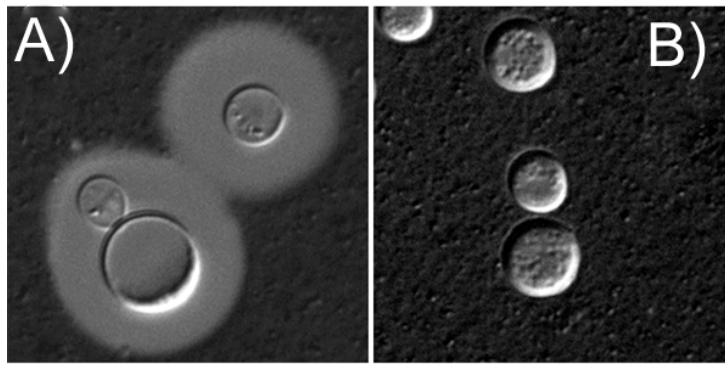


Figura 2: Preparação de células de *C. neoformans* com nanquim. A) Células produzindo cápsula polissacarídica após cultivo em condições indutoras. B) Células cultivadas em condição não indutora. As células nas imagens variam de 5 a 10 μm . Adaptado de Kronstad *et al.* (2008).

Um extenso número de genes quando deletados resulta em alteração de tamanho da cápsula. Isto permitiu a identificação de genes envolvidos na biossíntese da cápsula (como os genes *CAP* e *CAS*, dentre outros), bem como de genes envolvidos na ligação da cápsula a parede celular, e no remodelamento da parede celular. Dentre a variedade de sinais que induzem aumento da cápsula, ainda não está claro se eles atuam por rotas distintas de sinalização celular e se há um elemento comum a todos os sinais (Zaragoza *et al.*, 2009). Sinalização por cAMP é envolvida na indução de aumento de cápsula por cultivo em privação de ferro, assim como em alta concentração de CO_2 , demonstrando que diferentes sinais de indução podem compartilhar rotas de sinalização celular (Zaragoza *et al.*, 2003). Estudos futuros possibilitarão o entendimento de como diferentes sinais transmitidos por rotas de sinalização celular são integrados para chegar ao seu produto final que é a formação da cápsula (Kumar *et al.*, 2011).

Melanina

Melaninas são pigmentos hidrofóbicos, negativamente carregados, de alto peso molecular, formados pela polimerização oxidativa de compostos fenólicos e/ou indólicos (Casadevall *et al.*, 2000). A produção de melanina por *C. neoformans* (Fig. 3) foi descoberta no início da década de 60, por F. Staib (Casadevall *et al.*, 2000; Zhu & Williamson, 2004). O genoma de *C. neoformans* apresenta dois genes que codificam a enzima lacase, a qual sintetiza melanina, *LAC1* e *LAC2*. A lacase codificada a partir do gene *LAC1* localiza-se na parede celular, covalentemente ligada a carboidratos, e apresenta maior expressão (Zhu & Williamson, 2004; Eisenman & Casadevall, 2012). Já Lac2, parece ser citoplasmática (Missall *et al.*, 2005).

Ao contrário de outros fungos, *Cryptococcus* spp. não é capaz de produzir melanina sem a presença de um substrato exógeno e, desta forma, dependendo da estrutura química do substrato adicionado ao meio ocorrem variações no tipo de pigmento sintetizado, alterando, por exemplo, sua solubilidade e cor (Casadevall *et al.*, 2000; Eisenman & Casadevall, 2012).

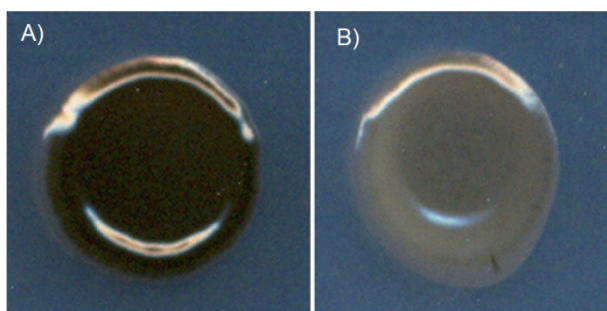


Figura 3: Produção do pigmento melanina por *C. neoformans*. A) imagem de uma colônia de *C. neoformans* melanizada, resultante de cultivo em de substrato

fenólico. B) imagem de uma colônia de *C. neoformans* não melanizada, resultante de cultivo em meio sem substrato fenólico. Adaptado de Kronstad *et al.* (2008).

No ambiente, a melanina protege as células do fungo de luz ultravioleta e agentes oxidantes (Liu & Nizet, 2009; Eisenman e Casadevall, 2012). Já durante infecção, mutantes incapazes de produzir melanina apresentam virulência reduzida (Kwon-Chung *et al.*, 1982; Noverr *et al.*, 2004). Estudos *in vitro* demonstraram que a presença do pigmento protege as células de oxidação, e do antifúngico anfotericina B (Jacobson & Tinell, 1993; Wang & Casadevall, 1994). A expressão do gene *LAC1* é associada a disseminação da infecção dos pulmões para outros órgãos (Noverr *et al.*, 2004). Independentemente de sua atividade produtora de melanina, a enzima lacase foi associada a proteção contra macrófagos alveolares, por sua atividade de ferro oxidase (Liu *et al.*, 1999). *C. neoformans* pode converter catecolaminas, como os neurotransmissores dopamina, norepinefrina e epinefrina, em melanina. Isso justificaria seu tropismo pelo sistema nervoso central, já que áreas do cérebro ricas em catecolaminas geralmente são infectadas por *C. neoformans* (Casadevall *et al.*, 2000).

Desenvolvimento a 37 °C

Dentre a variedade de espécies de fungos conhecidas atualmente, apenas uma minoria apresenta capacidade de crescimento na temperatura fisiológica dos hospedeiros mamíferos, uma característica essencial ao estabelecimento de infecções fúngicas invasivas.

Cryptococcus neoformans e *C. gattii* são as únicas espécies do gênero *Cryptococcus* que apresentam desenvolvimento eficiente acima de 30 °C (Perfect, 2006). Martinez *et al.* (2001), em um estudo comparativo, identificaram que

isolados de *C. neoformans* var. *neoformans* em geral são mais suscetíveis ao calor do que isolados de *C. neoformans* var. *grubii*. Isso demonstra que existem diferenças na adaptação a temperatura entre sorotipos.

Diversos estudos tem descrito genes associados ao crescimento a 37 °C em *Cryptococcus* spp. Um dos primeiros foi o gene *CNA1* que codifica calcineurina A, a subunidade catalítica da proteína calcineurina (Odom *et al.*, 1997). Inicialmente, Odom *et al.* (1997) identificaram que o tratamento de *C. neoformans* com drogas conhecidas como inibidoras de calcineurina inibe o crescimento a 37 °C, mas não a 24 °C. Com a construção de um mutante para o gene *CNA1*, os pesquisadores comprovaram que calcineurina é necessária para virulência de *C. neoformans*, uma vez que os mutantes não são viáveis a 37 °C, 5 % de CO₂ e pH alcalino, e não foram virulentos em modelo animal de infecção. Em estudo recente, Chen *et al.* (2013), demonstraram que mutantes de *C. gattii* para *CNA1* também apresentam deficiência de crescimento a 37 °C e virulência muito atenuada ou ausente. Os pesquisadores ainda demonstraram que tanto em *C. neoformans* quanto em *C. gattii* mutantes para calcineurina apresentam disrupção da membrana plasmática a 37 °C. Porém, diferentemente de *C. neoformans*, *C. gattii* requer calcineurina para o crescimento na presença de Ca²⁺, sugerindo diferenças no papel da proteína para homeostase deste íon. Além das diferenças entre as espécies, os pesquisadores sugerem que haja um papel diferenciado da calcineurina no controle da termotolerância entre os tipos moleculares de *C. gattii*, uma vez que *C. gattii* VGIIa *cna1*Δ apresentou tolerância ao crescimento a 37 °C.

Com o objetivo de identificar produtos gênicos envolvidos na rota de sinalização por calcineurina, Fox *et al.* (2003) identificaram o gene *CTS1*, que

quando superexpresso reestabelece o crescimento a 37 °C em linhagem de *C. neoformans* mutante para calcineurina. Mutantes para o gene *CTS1* também apresentam deficiência de crescimento a temperaturas elevadas e virulência atenuada, além de defeitos na citocinese em crescimento vegetativo, e no crescimento de hifas.

Outros genes identificados em *C. neoformans*, relacionados ao desenvolvimento a 37 °C incluem: *UGD1*, que codifica UDP-glicose desidrogenase, e cujos mutantes apresentam deficiência de crescimento a 37 °C, deficiência na produção de cápsula, morfologia alterada e ausência de crescimento em modelo animal (Moyrand & Janbon, 2004; Griffith *et al.*, 2004); *VPH1*, que codifica para subunidade de uma bomba de prótons ATPase vacuolar, e cuja mutação resulta em defeito na produção de cápsula, melanina e crescimento a 37 °C, sendo o mutante avirulento (Erickson *et al.*, 2001); *TSA1* e *TSA3*, que codificam para tiol peroxidase, e que possuem maior expressão a 37 °C, em comparação com 25 °C, sendo que o mutante *tsa1*Δ apresenta deficiência de crescimento a temperaturas elevadas, sensibilidade a estresse oxidativo e nitrosativo, e virulência atenuada (Missall *et al.*, 2004); além de genes envolvidos no metabolismo de aminoácidos, como *ILV2* (que codifica acetolactato sintase), e *SP3/LYS9* (que codifica espermidina sintase-sacaropina desidrogenase), cujos mutantes além de apresentarem redução de crescimento a 37 °C, são avirulentos em modelo de infecção animal, apresentam redução da produção de cápsula (*ILV2* e *SP3/LYS9*) e melanina (*SP3/LYS9*) (Kingsbury *et al.*, 2004a, b). Esses exemplos demonstram a variedade de funções dos transcritos de genes regulados pela temperatura, e além desses diversos outros poderiam ser citados.

Estudos objetivando a identificação global de genes com expressão diferenciada em *C. neoformans* sob cultivo em diferentes temperaturas foram realizados através das técnicas de Análise Seriada da Expressão Gênica (SAGE), microarranjo, e Análise da Diferença Representacional (RDA) (Steen *et al.*, 2002; Kraus *et al.*, 2004; Rosa e Silva *et al.*, 2008).

Através da técnica de SAGE, observou-se diferença no padrão de expressão em resposta a temperatura entre os sorotipos A e D de *C. neoformans*, o que pode ter relação com as observações de diferença de adaptabilidade a temperatura entre esses sorotipos realizadas por Martinez *et al.* (2001). A maior parte das análises de SAGE, para identificação de genes diferencialmente expressos a 25 ou 37 °C foram realizadas para *C. neoformans* var. *neoformans* (sorotipo D). Identificou-se diferença nos níveis de transcritos de histonas, indicando modificação na estrutura de cromatina a 37 °C, aumento na expressão de proteínas de choque térmico, de enzimas envolvidas no metabolismo de compostos fenólicos, e proteínas envolvidas na resposta a estresse, como superóxido dismutase (Steen *et al.*, 2002).

Da mesma forma, análise por microarranjo e RDA revelaram aumento da expressão de genes envolvidos na resposta a estresse durante crescimento a 37 °C, e na integridade de membrana (Kraus *et al.*, 2004, Rosa e Silva *et al.*, 2008). A análise por microarranjo permitiu a identificação do fator de transcrição *MGA2*, induzido a 37 °C. Os alvos desse fator de transcrição são genes que codificam enzimas envolvidas na biossíntese de ácidos graxos, sugerindo que ocorre remodelamento de membrana na adaptação ao crescimento em altas temperaturas (Kraus *et al.*, 2004). RDA também revelou gene envolvido na

integridade de parede celular (*CHS2*, que codifica quitina sintase 2), e destacou o gene precursor de glioxal oxidase, que apresentou expressão aumentada a 37 °C, e já havia sido descrito como induzido em resposta a hipóxia (Lee *et al.*, 2007), outra condição que mimetiza o ambiente do hospedeiro (Rosa e Silva *et al.*, 2008).

Uma observação importante é que nem todos os genes regulados por temperatura são correlacionados com fenótipo sensível a temperatura, e esses genes podem ou não estar associados a expressão de virulência (Perfect, 2006). Este é o caso do gene *TSA3*, por exemplo, apesar de seu produto apresentar expressão aumentada a 37 °C, mutantes *tsa3Δ* não apresentam deficiência de crescimento a 37 °C, e não possuem virulência atenuada, sendo que a perda de *TSA3* não parece ser compensada por aumento da expressão de *TSA1* (Missall *et al.*, 2004).

1.2 Antifúngicos

O tratamento de infecções fúngicas é um desafio, uma vez que, sendo eucariotos, fungos e mamíferos apresentam similaridade na maquinaria celular, havendo poucos fármacos disponíveis para o tratamento das doenças fúngicas (Idnurm *et al.*, 2005).

Baseado no seu mecanismo de ação, os principais antifúngicos utilizados clinicamente podem ser classificados em cinco grupos: poliênicos, fluoropirimidinas, azóis, alilaminas e equinocandinas.

A classe dos poliênicos inclui o fármaco anfotericina B. Este se liga ao ergosterol, o principal esterol constituinte da membrana de fungos, causando desestabilização da estrutura, formando áreas de tensão na membrana, aumentando a permeabilidade a cátions, e por fim, causando morte celular (Kontoyiannis & Lewis, 2002; Odds *et al.*, 2003). Anfotericina B é eficiente no tratamento de um amplo espectro de infecções fúngicas, porém é tóxica as células mamíferas, apresentando alta frequência de nefrotoxicidade. Formulações lipídicas do fármaco são tão eficientes quanto a forma convencional, com a vantagem de apresentarem redução da nefrotoxicidade, mas o problema não foi eliminado e essas formulações são mais caras que a forma convencional (Chen & Sorrel, 2007). A resistência a anfotericina B é pouco frequente em leveduras patogênicas como *Candida* e *Cryptococcus* spp., sendo mais encontrada entre fungos filamentosos, como espécies do gênero *Aspergillus*, *Scedosporium apiospermum*, *Scedosporium prolificans* e espécies do gênero *Fusarium* (Kanafani & Perfect, 2008). Dick *et al.* (1980), descreveram isolados de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *Torulopsis glabrata* resistentes a anfotericina B, que apresentaram redução do conteúdo de ergosterol de membrana. Essas espécies foram isoladas de pacientes que apresentavam granulocitopenia e foram submetidos a quimioterapia com agentes citotóxicos e tratamento durante longos períodos com polienos. Kelly *et al.* (1994) descreveram um isolado de *C. neoformans*, coletado de um paciente com AIDS que não respondeu ao tratamento com fluconazol e anfotericina B. O isolado também apresentou resistência a anfotericina B devido a diminuição da concentração de ergosterol na

membrana, causada por defeito na enzima estero $\Delta^8 \rightarrow 7$ isomerase, adquirido após tratamento com o fármaco.

Fluoropirimidinas incluem o fármaco flucitosina, que atua inibindo a síntese de DNA e de proteínas. Flucitosina é transportada para o interior das células fúngicas por citosina permeases e convertida por citosina deaminases (enzima ausente em tecidos humanos) a 5-fluorouracil (Vermes *et al.*, 2000; Hanson *et al.*, 2009). A partir de 5-fluorouracil, dois mecanismos de atividade antifúngica podem ser distinguidos: 5-fluorouracil pode ser convertido, em um processo com algumas etapas, a 5-fluorouridina trifosfato (FUTP), que é incorporado ao RNA, levando a inibição da síntese proteica, ou, pode ser convertido a 5-fluorodeoxiuridina monofosfato (FdUMP) pela enzima uridina monofosfato pirofosforilase, levando a inibição da síntese de DNA pela inibição da enzima timidilato sintase, crucial para geração de timidina (Vermes *et al.*, 2000). Muitos fungos filamentosos não possuem as enzimas citosina permease e citosina deaminase, o que restringe o uso do fármaco a leveduras, sendo ativa contra *Candida* e *Cryptococcus* spp. (Odds *et al.*, 2003). No entanto, o surgimento frequente de resistência secundária em *Candida* e *Cryptococcus* spp. restringe seu uso como terapia única (Kanafani & Perfect, 2008; Chandra *et al.*, 2009). Assim, seu papel torna-se limitado ao uso combinado com outros antifúngicos, como anfotericina B, para o tratamento de meningite causada por *Cryptococcus* spp. (Chen & Sorrel, 2007). Dois mecanismos de resistência foram identificados: mutações que resultam em deficiência nas enzimas necessárias para o transporte celular ou metabolismo do fármaco, e aumento da síntese de pirimidinas, que competem com o fármaco (Vermes *et al.*, 2000; Chandra *et al.*, 2009). Block *et al.* (1973) descreveram

isolados de *C. neoformans*, de pacientes que não responderam ao tratamento com flucitosina, resistentes não só a flucitosina como a 5-fluorouracil, sugerindo que a resistência estaria associada a defeitos em proteínas uridina monofosfato pirofosforilase, ou seja que a resistência estaria associada a etapas mais avançadas do metabolismo do fármaco, não ao transporte para o interior da célula ou a conversão em 5-fluorouracil.

Na classe dos azólicos, o principal alvo dos fármacos é a enzima citocromo P450 lanosterol 14 α -demetilase, que catalisa a remoção do grupo 14 α -metil do lanosterol, em um passo da biossíntese de ergosterol (Kontoyiannis & Lewis, 2002; Odds *et al.*, 2003). Assim, ocorre depleção de ergosterol, e acúmulo de 14 α -metil-3,6-diol, que é tóxico (Kanafani & Perfect, 2008). Estes fármacos podem ainda ser divididos em dois grupos: imidazóis (cetoconazol, miconazol, clotrimazol e econazol) e triazóis (fluconazol, itraconazol, voriconazol, e posaconazol). Triazóis apresentam maior especificidade pela enzima citocromo P450 de fungos do que imidazóis, assim, o uso de imidazóis restringe-se ao tratamento de micoses superficiais (Chen & Sorrel, 2007). Triazóis podem causar hepatotoxicidade, além de outros efeitos adversos e interagir com outros medicamentos, o que pode causar problemas no tratamento de pacientes que recebem medicação diversificada (Odds *et al.*, 2003; Chen & Sorrel, 2007).

Resistência a azóis tem sido descrita extensivamente para *Candida* spp., particularmente em casos de falha no tratamento de infecção orofaríngea em pacientes com AIDS (Rex *et al.*, 1995; Sanglard & Odds, 2002). Mecanismos moleculares de resistência foram identificados em *Candida* spp.: expressão de bombas de efluxo de droga, mutações com substituição de aminoácidos na

enzima alvo do fármaco, superexpressão da enzima alvo, e menos frequentemente, alteração na composição de esteróis de membrana, com ausência de ergosterol, o que também leva a resistência a anfotericina (Perea *et al.*, 2001; Sanglard & Odds, 2002). As bombas de efluxo de droga podem ser de dois tipos: facilitadores principais, codificados pelo gene *MDR1* (*multidrug resistance*), cuja superexpressão parece levar a resistência exclusiva a fluconazol, e transportadores ABC (*ATP-binding cassette*), codificados pelos genes *CDR*, que parecem conferir resistência a diversos azóis (Perea *et al.*, 2001; Sanglard & Odds, 2002).

Resistência a fluconazol também foi descrita em *C. neoformans*. Posteraro *et al.* (2003) em estudo com isolado de *C. neoformans* que obteve resistência a fluconazol após exposição ao fármaco *in vitro*, identificaram um transportador ABC, codificado pelo gene *CnAFR1*, demonstrando o envolvimento de bomba de efluxo de drogas entre os mecanismos de resistência de *C. neoformans*. Resistência por mutação na enzima alvo de fluconazol, citocromo P450 lanosterol 14 α -demetilase, também foi identificada em um isolado recuperado de paciente com AIDS e meningite recorrente (Rodero *et al.*, 2003). Adicionalmente, um fenômeno denominado heteroresistência foi observado em isolados clínicos e ambientais de *C. gattii* e *C. neoformans*, demonstrando ser um mecanismo intrínseco de resistência (Mondon *et al.*, 1999; Varma *et al.* 2010; Sionov *et al.*, 2009). Esse fenômeno é descrito como o surgimento de subpopulações de células provenientes de uma colônia suscetível a fluconazol que adquirem diferentes níveis de resistência. Se uma subpopulação de células homogeneamente resistentes é cultivada em meio livre do fármaco, ocorre retorno

ao estado inicial de heteroresistência (Mondon *et al.*, 1999). O surgimento de heteroresistência tem sido associado a dissomia dos cromossomos 1, 4, 10, e 14 (Sionov *et al.*, 2010; Ngamskulrungrroj *et al.*; 2012a). O cromossomo 1 contém o gene da enzima citocromo P450 lanosterol 14 α -demetilase (*ERG11*) e o gene *AFR1*, assim o aumento de cópias do cromossomo e consequente aumento do número de cópias desses genes, resultaria na resistência ao fármaco (Sionov *et al.*, 2010). O cromossomo 4 contém genes necessários a manutenção da integridade do retículo endoplasmático, que mostraram-se importantes para formação da dissomia, uma vez que mutantes para esses genes não apresentaram dissomia dos cromossomos 1 e 4 (Ngamskulrungrroj *et al.*; 2012a).

Alilaminas também atuam na síntese de ergosterol. Terbinafina, um fármaco dessa classe, inibe esqualeno epoxidase, em um passo inicial da biossíntese de ergosterol (Odds *et al.*, 2003). Assim como azóis, o fármaco causa depleção de ergosterol. Terbinafina pode causar perturbação gastrointestinal e elevação transitória de enzimas do fígado, mas em geral é bem tolerada (Chen & Sorrel, 2007). Porém, apresenta pouca atividade contra leveduras, sendo utilizada no tratamento de onicomicoses e infecções cutâneas (Kontoyiannis & Lewis, 2002; Chen & Sorrel, 2007).

Equinocandinas são metabólitos secundários de fungos que atuam sobre o complexo de proteínas que sintetiza β -1,3 glicana, um polissacarídeo presente na parede celular fúngica, causando inibição de sua síntese (Odds *et al.*, 2003). A diminuição desse polissacarídeo na parede celular leva ao aumento de suscetibilidade de lise osmótica da célula fúngica (Kontoyiannis & Lewis, 2002). O uso desses fármacos é vantajoso, por apresentarem baixa toxicidade, uma vez

que glicana não é encontrado nas células mamíferas. Porém, equinocandinas não possuem atividade eficiente contra *C. neoformans*, limitando seu espectro de ação a espécies como *Candida* e *Aspergillus* spp. (Krishnarao & Galgiani, 1997; Kontoyiannis & Lewis, 2002).

Diante das limitações apresentadas pelos antifúngicos utilizados clinicamente, faz-se necessária a busca por novos fármacos. Neste sentido, produtos naturais assumem um papel importante, como fontes para busca por novos antifúngicos. Em uma revisão sobre as novas drogas aprovadas no período de 1981 a 2010, Newman & Cragg (2012) registraram 1355 novos químicos, sendo apenas 29 % considerados de origem sintética. Das drogas aprovadas em 2010, metade foi considerada produto natural ou diretamente derivada de produto natural, o que demonstra a importância que esses produtos possuem no mercado farmacêutico.

1.3 Iridoides

Iridoides são metabólitos secundários produzidos por plantas e animais (mais raramente), terrestres e aquáticos (Dinda *et al.*, 2007a). Inicialmente, foram nomeados de amaroides, devido ao seu sabor amargo, e pseudoindicanos, já que polimerizam originando uma substância de coloração escura por hidrólise ácida em condições oxidativas (El-Nagger & Beal, 1980; von Poser, 1997). Os primeiros iridoides foram isolados na década de 50: *iridomyrmecin* e *iridodial*. Estes compostos foram obtidos de secreção das formigas australianas do gênero

Iridomyrmex, nas quais exercem função defensora (El-Naggar & Beal, 1980; Ghisalberti, 1998). O nome Iridoides surgiu de uma adaptação da nomenclatura utilizada nestes primeiros compostos isolados.

Apesar de terem sido inicialmente obtidos de formigas, a maior parte dos iridoides isolados até hoje é proveniente de plantas, nas quais geralmente são encontrados na forma glicosilada, e atuam na proteção contra predadores, devido ao seu sabor amargo (El-Naggar & Beal, 1980; Dinda *et al.*, 2007a).

1.3.1 Classificação de iridoides

Com relação a sua estrutura, iridoides são monoterpênicos ciclopentano-[C]-pirano (Sampaio-Santos & Kaplan, 2001). A característica estrutural mais comum dos iridoides é a estrutura representada na figura 4A. A clivagem oxidativa do anel ciclopentano entre os carbonos 6 e 8 origina os *seco*-iridoides (Fig. 4B), e a clivagem do anel pirano origina derivados de iridoides (Fig. 4C).

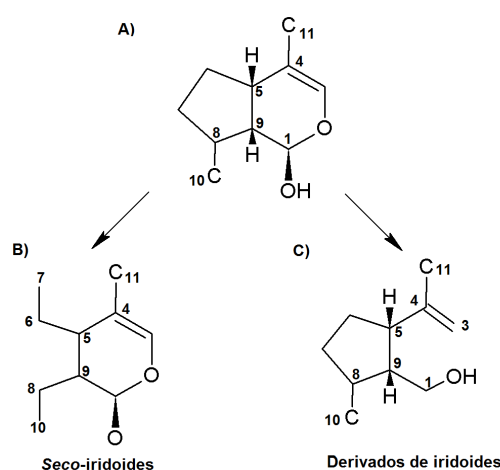


Figura 4: Estruturas de iridoides e seus derivados. A) representação da estrutura química mais comum de iridoides; B) representação da estrutura química de *seco*-iridoides, originados pela clivagem do anel ciclopentano da estrutura representada em A; C) representação da estrutura química de derivados de iridoides, gerados pela clivagem do anel pirano da estrutura representada em A. Adaptado de Dinda *et al.* (2007a).

A maioria dos iridoides já descritos difere apenas no grau e tipo de substituição presentes na estrutura básica do anel ciclopentano (Sampaio-Santos & Kaplan, 2001).

Considerando uma classificação geral, iridoides podem ser divididos em dois grandes grupos: iridoides carbocíclicos e *seco*-iridoides. Modificações nestas estruturas principais dão origem à múltipla gama de compostos conhecidos.

Por possuírem distribuição restrita a determinados grupos de plantas, iridoides são considerados importantes marcadores quimiotaxonômicos. Dentre as famílias que possuem estes compostos encontram-se Apocynaceae, Scrophulariaceae, Diervillaceae, Lamiaceae, Loganiaceae e Rubiaceae, entre outras (Tundis *et al.*, 2008). A biossíntese desses compostos é bastante complexa, e estudos objetivando a elucidação de rotas biossintéticas permitiram a identificação de duas rotas principais, encontradas em diferentes grupos de plantas, o que auxilia na determinação de relações filogenéticas (Jensen, 1992). Assim, a rota I origina iridoides carbocíclicos e *seco*-iridoides, enquanto a rota II origina iridoides carbocíclicos descarboxilados, e alguns *seco*-iridoides com estrutura diferente dos produzidos pela rota I (Jensen *et al.*, 2002). Determinados grupos de plantas possuem exclusivamente a rota I ou a rota II (Jensen, 1992).

Durante um longo período iridoides foram ignorados quanto a sua importância farmacológica, porém, a descoberta de que estes compostos estão presentes em diversas formulações utilizadas na medicina popular atraiu a atenção de pesquisadores para o estudo da bioatividade dos mesmos (Ghisalberti, 1998, Dinda *et al.*, 2007b). Dentre as atividades descritas para

iridoides encontram-se: hepatoprotetora, anti-diabética, anti-inflamatória, antiespasmódica, anti-tumoral, anti-viral, purgativa, antialérgica, antiartrítica, antifúngica, antibacteriana, anti-coagulante, inseticida, neuroprotetora, entre outras (Ghisalberti, 1998; Dinda *et al.* 2007b, 2009 e 2011).

1.4 *Allamanda polyantha*

A família Apocynaceae inclui 424 gêneros e 3700 espécies, com distribuição predominantemente pantropical, possuindo alguns representantes em regiões temperadas (Endress & Bruyans, 2000; Souza & Lorenzi, 2008). No Brasil ocorrem cerca de 95 gêneros e 850 espécies (Souza & Lorenzi, 2008), sendo encontradas 12 espécies do gênero *Allamanda*, dentre elas *Allamanda polyantha* (Sakane, 1981).

Allamanda polyantha (Fig. 5), popularmente conhecida como Alamanda-ereta ou Alamanda-de-cerca, foi descrita com ocorrência nos litorais Norte e Nordeste do Brasil, com registros de coleta também na Mata Atlântica, nos estados de Espírito Santo e Minas Gerais, sendo considerada endêmica do Brasil (Lorenzi & Souza, 2008; Koch *et al.*, 2012). Esta planta é um arbusto semilenhoso ereto, latescente, atingindo de 1 a 2 metros de altura, com folhas cartáceas, glabras e brilhantes, de 6 a 9 cm, e flores amarelas que se formam quase o ano todo, produzindo frutos secos deiscentes, espinescentes, com numerosas sementes (Lorenzi & Souza, 2008). Devido a essas características, *A. polyantha* é

amplamente cultivada como espécie ornamental, muitas vezes sendo utilizada na construção de cercas-vivas.

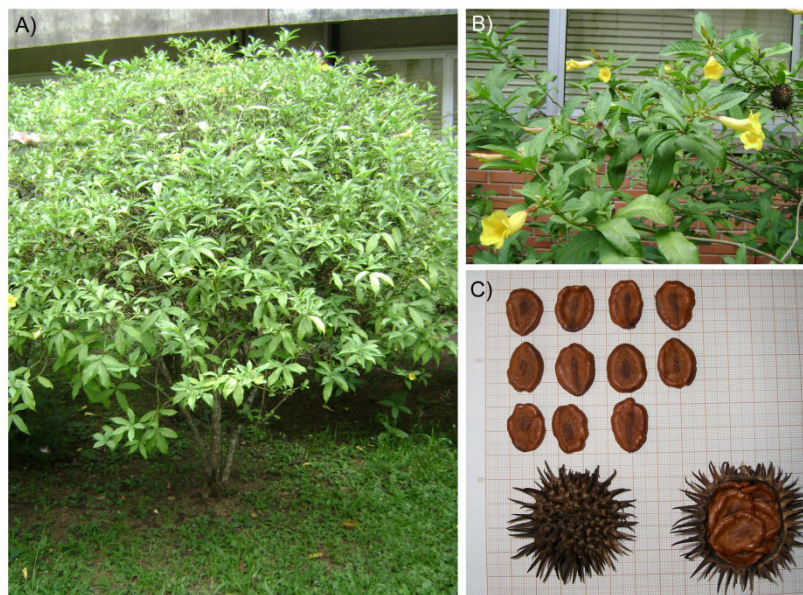


Figura 5: Imagens de *Allamanda polyantha*. A) fotografia de uma planta, evidenciando seu porte de arbusto semilenhoso ereto; B) detalhe de um ramo com flores e um fruto; C) fruto e sementes de *A. polyantha*: o fruto foi aberto, a esquerda está exposta a face externa de uma das metades, e as sementes retiradas do interior; a direita é mostrada a face interna da outra metade do fruto contendo sementes. Fotografias elaboradas por Fernanda Bresciani.

O gênero *Allamanda* (entre outros da família Apocynaceae), possui como característica a presença de iridoides com anel lactona ligado ao carbono 8, dentre eles plumericina, isoplumericina, alamandina, plumierídeo e protoplumericina, que parecem ser restritos a família, e são encontrados em diferentes partes das plantas, como folhas, raízes, flores (Coppen & Cobb, 1983; Abe *et al.*, 1984). Apesar de as folhas serem o material mais abundante e de fácil obtenção, o uso de sementes para isolamento desses compostos é vantajoso por ser menos agressivo as plantas. Além de as sementes serem abundantes, podem ser estocadas por longo período.

Diversas atividades biológicas foram descritas para os iridóides encontrados em *Allamanda* spp., entre elas: algicida (isoplumericina, plumericina, plumierídeo cumarato, plumierídeo cumarato glicosídeo), antidermatofítica (plumierídeo), antifúngica (plumericina, isoplumericina) e antileucêmica (alamandina) (Kupchan *et al.*, 1974; Coppen & Cobb, 1983; Abdel-Kader *et al.*, 1997; Tiwari *et al.*, 2002).

2. Objetivo

Diante da problemática exposta, do limitado número de antifúngicos utilizados para o tratamento de infecções fúngicas invasivas, e dos problemas associados a esses fármacos, o objetivo do presente trabalho é identificar e caracterizar a atividade antifúngica do extrato aquoso de sementes *Allamanda polyantha* e dos compostos isolados a partir desse extrato contra *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*.

2.1. Objetivos específicos

- Determinar a concentração inibitória mínima do extrato aquoso de sementes para as espécies *C. neoformans* e *C. gattii*;
- Avaliar o efeito do extrato sobre a formação de cápsula polissacarídica por *C. neoformans* e *C. gattii*, que é um importante fator de virulência.
- Isolar, elucidar as estruturas e determinar a concentração inibitória mínima de compostos presentes no extrato aquoso de sementes.

3. Manuscrito Científico

Os resultados obtidos durante o desenvolvimento desta Dissertação foram organizados na forma de um manuscrito científico. O manuscrito está formatado de acordo com as regras do periódico *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, ao qual será submetido.

Antifungal activity of *Allamanda polyantha* seeds extract promotes cellular alterations in the yeast pathogens *Cryptococcus gattii* and *C. neoformans*

Fernanda Regina Bresciani,^a Charles Teilor Rodrigues,^a Lucélia Santi,^a Walter O. Beys-da-Silva,^a Markus Berger,^a Jan Schripsema,^b Gilsane Lino von Poser,^c Marilene Henning Vainstein,^{ad*}

^a Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, P. O. Box 15005, Avenida Bento Gonçalves 9500, 91501-970 Porto Alegre, RS, Brazil,

^b Centro de Ciências Exatas e Tecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Av. Alberto Lamego 2000, 28015-620 Campos dos Goytacazes, RJ, Brazil,

^c Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Avenida Ipiranga 2752, 90610-000 Porto Alegre, RS, Brazil,

^d Departamento de Biologia Molecular e Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, P. O. Box 15005, Avenida Bento Gonçalves 9500, 91501-970 Porto Alegre, RS, Brazil.

Correspondence should be addressed to Marilene Henning Vainstein, mhv@cbiot.ufrgs.br

Abstract

Cryptococcus neoformans and *C. gattii* are among the most common causes of invasive fungal infections. The current antifungal agents present limitations, associated to toxicity and resistance, indicating the importance of search for new drugs. In this study we describe the antifungal activity of an aqueous crude seed extract from *Allamanda polyantha* (APCSE) and of two iridoids, plumieride and plumieridine, isolated from APCSE. The MIC values of APCSE for *C. gattii* strains (70 µg/mL and 36 µg/mL for strains R265 and R272, respectively) were better than for *C. neoformans* H99 (563 µg/mL). APCSE inhibited *C. neoformans* H99 capsule formation, and decreased cell body size for *C. gattii* R262 and R272. *C. neoformans* H99 cells have also presented morphological alterations, with defect in bud detachment, nuclear fragmentation and did not react with wheat germ agglutinin (which binds to β -1,4-N-acetylglucosamine oligomers). The MIC values of plumieride and plumieridine were higher than APCSE, indicating that other compounds could contribute to antifungal activity and/or the compounds have a better activity in association. Plumieride was one of the compounds responsible for morphological alterations in *C. neoformans* H99 cells, providing a new tool for cell biology researches and a potential antifungal agent.

1. Introduction

The incidence of invasive mycosis has increased in the last two decades, and this can be related to an increase in susceptible hosts, which include patients with HIV, and those receiving organ transplantation, immunosuppressive therapy and prolonged use of intravascular catheters [1, 2]. Among the most common causes of invasive mycosis in humans is *Cryptococcus* spp.

The occurrence of cryptococcal meningitis among patients with HIV was estimated in around 1 million of cases per year, leading to approximately 625,000 deaths [3]. The pathogenic *Cryptococcus* species complex consists of *C. neoformans* and *C. gattii*. While *C. neoformans* is considered an opportunistic pathogen, infecting immunosuppressed hosts, *C. gattii* is considered a primary pathogen, infecting immunocompetent hosts. Recent outbreaks in parts of North America have attracted more attention to *C. gattii*, which was originally considered to be restricted to the tropics and subtropics regions [4].

Current antifungal drugs present limitations associated with toxicity and resistance. Amphotericin B is effective against *Cryptococcus* species, but show renal toxicity [5]. Fluconazol is less toxic than amphotericin B, but presents problems of interaction with other drugs, and there is register of resistance in *C. neoformans* [6, 7]. Flucytosine can also be toxic and has frequent register of secondary resistance in *Cryptococcus* species, which restrict its use as monotherapy [5, 8]. The newest class of antifungal drug, echinocandins, shows no activity against *Cryptococcus neoformans* [9]. So, there is a great requirement for new antifungal molecules with different targets.

A review of new drugs approved between 1981 and 2010 has registered that among 1355 new chemical approved, only 29 % were classified as synthetic in origin, demonstrating the influence of natural products and derivated of natural products in drug discovery and development process [10]. Of the drugs approved in 2010, fully half were natural products or directly derived of natural products [10].

Plants are interesting sources for new drugs, and in this study, we evaluated the antifungal activity of an aqueous seed extract of *Allamanda polyantha* (Apocynaceae), an endemic species from Brazil [11], against *C. neoformans* and *C. gattii*. This is the first report of antifungal activity of *A. polyantha*. We also isolated two molecules from seed extract, one causing important morphological alterations on *C. neoformans* H99 cells.

2. Methods

2.1. Preparation of aqueous crude seed extract (APSCE). Powdered seeds from *Allamanda polyantha* were extracted by agitation with MilliQ water (1 g/20 mL) for 4 h. The liquid suspension was centrifugated and the solid material was further washed for 3 times with MilliQ water in the same proportion described above, under agitation, for 1 h, followed by centrifugation. The four parts of the resulting supernatants were combined and the liquid was filtered in filter paper and polypropylene prefilter (10 µm pore size, Millipore). The aqueous extract was completely lyophilized at -50 °C and 0.040 mbar (Christ Alpha 1-4 LDplus, Germany) and stored at - 20 °C.

2.2. Phytochemistry characterization. Lyophilized crude extract was resuspended in methanol and subjected to silica gel column chromatography (70-320 mesh,

Merck), and fractions were eluted with dichloromethane: methanol (95:5 to 60:40). The fractions were monitored by thin layer chromatography (TLC) using precoated silica gel 60 F₂₅₄ (Merck) plates and a mixture of dichloromethane:methanol (80:20) as eluent. After the development, the spots were visualized by spraying with 2 % anisaldehyde reagent followed by heating at 110 °C. Fractions presenting just one spot in the TLC were submitted to nuclear magnetic resonance (NMR) recorded in CD₃OD, on a Varian spectrometer, operating at 400 MHz. The peak of residual water was used as internal standard in ¹H NMR spectra and the solvent peak was used as internal standard in ¹³C NMR spectra [12]. All NMR spectra were processed with the MestreNova software (version 6.0.2, Mestrelabs Research S. L., Santiago de Compostela, Spain).

2.3. Fungal strains. Antifungal activity of the crude extract and fractions was tested against *Cryptococcus neoformans* H99 strain and *Cryptococcus gattii* R265 and R272 strains. The R265 and R272 strains are representative of VGIIa and VGIIb genotypes of *C. gattii*, respectively, from the Vancouver outbreak and were kindly provided by Dr Wieland Meyer from the culture collection of the Molecular Mycology Research Laboratory, Westmead Hospital, Australia.

2.4. Antifungal susceptibility test. The minimal inhibitory concentration (MIC) of the crude extract and isolated compounds was determined against *Cryptococcus* species by the broth microdilution method, according to the Clinical and Laboratory Standards Institute M27-A2 [13]. Dry extract or compounds were weighted, resuspended in distilled water, and filtered prior to use (polyvinylidene difluoride filter, 0.22 µm pore size, Millipore). In 96-well plates,

extract or fractions were added in serial dilutions. Plates were maintained at 37 °C for 72 h. MIC was defined as the lowest concentration at which the yeasts did not demonstrate visible growth. To determine the fungicide or fungistatic effect, 10 µL of cell suspensions from wells without visible growth were spotted onto Sabouraud plate and incubated for 3 days at 37 °C. No colony formation indicated the fungicidal effect.

2.5. Fibroblast viability assay. Mouse fibroblasts, NIH3T3 cell line, were purchased from American Type Culture Collection (ATCC, USA). A volume of 100 µL of a suspension of 10^5 cells/mL diluted in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM, GIBCO, USA) supplemented with 10 % fetal bovine serum (FBS, GIBCO, USA) was seeded in 96-well plate and incubated for 2 h at 37 °C and 5 % CO₂. Next, different concentrations of crude extract were added to each well, to obtain final concentrations of: 5000, 2250, 1125, 563, 280, 140, 70 and 36 µg/mL, in a final volume of 200 µL per well. After 24 h of incubation at 37 °C and 5 % CO₂, cells were rinsed with phosphate-saline buffer (PBS) and incubated with 100 µL of methylthiazolyl-tetrazolium bromide (MTT) solution (1 mg/mL) for 2 h in the same conditions. DMSO (100 µL) was added to each well and optical density was recorded at 540 nm in a microplate reader (Spectramax, Molecular Devices, Sunnyvale, USA). Cell viability was calculated in relation to a control without extract.

2.6. Phenotyping assay. For capsule measurements, *C. neoformans* or *C. gattii* were grown in YPD for 24 h at 30 °C and 150 rpm. After this time, the culture was centrifugated and the cells were washed twice with PBS. Aliquots of 10^4 cells were

incubated in RPMI-1640 medium (GIBCO, USA) with different concentrations of crude extract, in a final volume of 500 μ l in 24-well plate for 72 h at 37 °C and 5 % CO₂ [14]. Cells were mixed with India ink and analyzed under an Axioskop 40 microscope (Zeiss, Germany). Images were acquired using an Axiocam MRC digital camera (Zeiss, Germany) controlled by Axiovision v. 4.7.2 software (Zeiss, Germany). Cell and capsule sizes were measured using ImageJ software (NIH, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Total cell size was defined as the diameter of the complete cell including the capsule. Capsule size was calculated as the difference between the diameter of the total cell and the cell body diameter, defined by the cell wall. At least 100 cells were measured for each growth condition.

2.7. Fluorescence microscopy. Aliquots of 2×10^4 cells/mL of *C. neoformans* H99 were incubated in 50 mL of RPMI-1640 medium buffered to pH 7.0 with morpholinepropanesulfonic acid (MOPS), at 37 °C and 180 rpm with or without 1126 μ g/mL of crude extract. After 72 h, yeast cells were washed twice in PBS, suspended in 4 % paraformaldehyde and incubated for 30 min at room temperature. Fixed cells were incubated with 0.25 μ g/mL solution of 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, SIGMA, USA) for 10 min and washed twice with PBS before visualization. Staining with wheat germ agglutinin (WGA, Invitrogen, USA) and calcofluor white (SIGMA, USA) was performed according to Rodrigues et al. [15]. Cells were analyzed under an Axioskop 40 microscope (Zeiss, Germany), with UV light emission system HBO 50_{AC} (Zeiss, Germany), using the Filter set 02 (calcofluor white and DAPI) and Filter set 38 (WGA). Images were acquired using an Axiocam MRC (Zeiss, Germany) as described above.

To determine the viability of cells with morphological alterations, *C. neoformans* H99 was incubated with APSCE as described above. After 72 h, cells were washed with saline solution and stained with LIVE/DEAD BacLight kit (Molecular Probes, USA), also commonly used to determine yeast viabilities [16, 17]. Images were acquired and processed as described above, under an Axioskop 40 microscope (Zeiss, Germany) using Filter set 15 for propidium iodide (PI) and Filter set 38 (SYTO 9). Images were merged using ImageJ software.

2.8. *Statistical analysis.* Data were analyzed by ANOVA and Tukey's post test, using GraphPad Prism 5 (San Diego, CA, USA).

3. Results

3.1. *Determination of minimal inhibitory concentration (MIC).* The MICs of *A. polyantha* crude seed extract (APCSE) are described in Table 1. The best activities were observed for *C. gattii* strains than *C. neoformans* H99. In all these cases, at MIC values, APCSE has fungicide activity.

Table 1: Minimal inhibitory concentration (MIC) values of the *A. polyantha* crude seed extract (APCSE) against *Cryptococcus* spp.

| Species | Strain | MIC ($\mu\text{g/mL}$) |
|--------------------------------|--------|--------------------------|
| <i>Cryptococcus neoformans</i> | H99 | 563 |
| <i>Cryptococcus gattii</i> | R265 | 70 |
| | R272 | 36 |

3.2. *Fibroblast viability in the presence of APCSE.* Incubation of fibroblasts with APCSE showed that concentrations lower than 70 µg/mL do not affect cell viability (Fig. 1), and the MIC value identified for *C. neoformans* H99 reduces cell viability around 82 %.

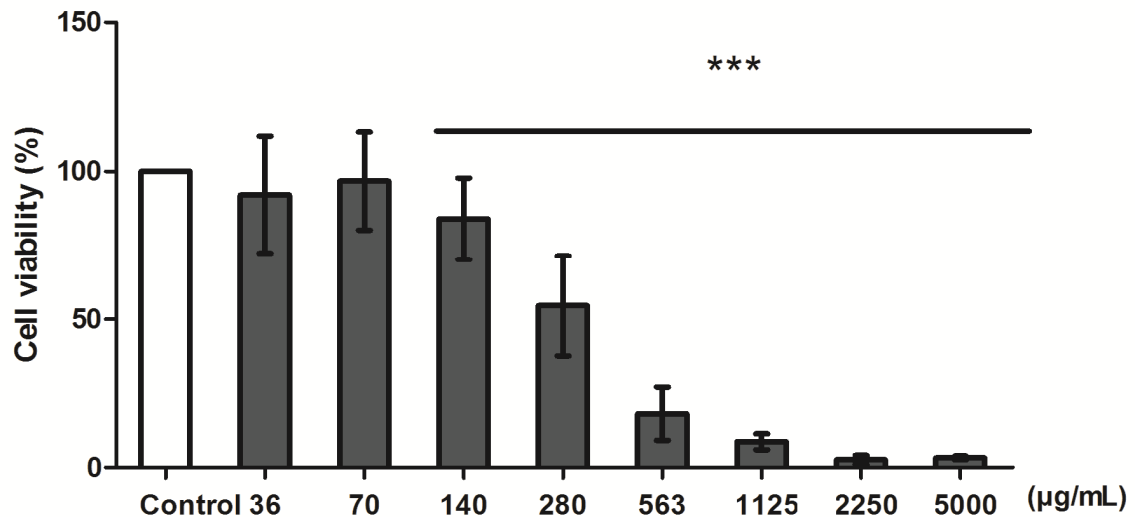


Fig. 1: The effect of *A. polyantha* seed extract (APCSE) on the viability of NIH3T3 fibroblasts. Data are expressed as mean \pm standard deviation from three individual experiments. Mean of control group was set as 100 %. ***P < 0.001.

3.3. *Effect of APCSE upon fungal virulence determinant and cell morphology.* We evaluate the effect of APCSE on the capsule formation by *Cryptococcus* species, a classical virulence determinant. Capsule formation by *C. neoformans* H99 was inhibited by APCSE in a concentration dependent manner (Fig. 2A). APCSE also induced diminishing of *C. gattii* R265 and R272 cell body size, but did not affect capsule size (Fig. 2B and C). We observed a tendency of reduction in cell size of *C. neoformans* H99, similar to *C. gattii* strains (Fig. 2A). However, in the highest concentration tested (1126 µg/mL) most *C. neoformans* H99 cells presented

morphological alterations. Apparently the cells have an incomplete mother-daughter cell separation phenotype (Fig. 3A), and presented deformations with loss of spherical form and increase in diameter mean (Fig. 2A).

Longer extensions of mother-daughter cells attached were promoted by higher concentrations of APCSE (Fig. 3B), being observed as far of twelve cells in chain, in presence of 1126 $\mu\text{g/mL}$ APSCE (Fig. 3A and B).

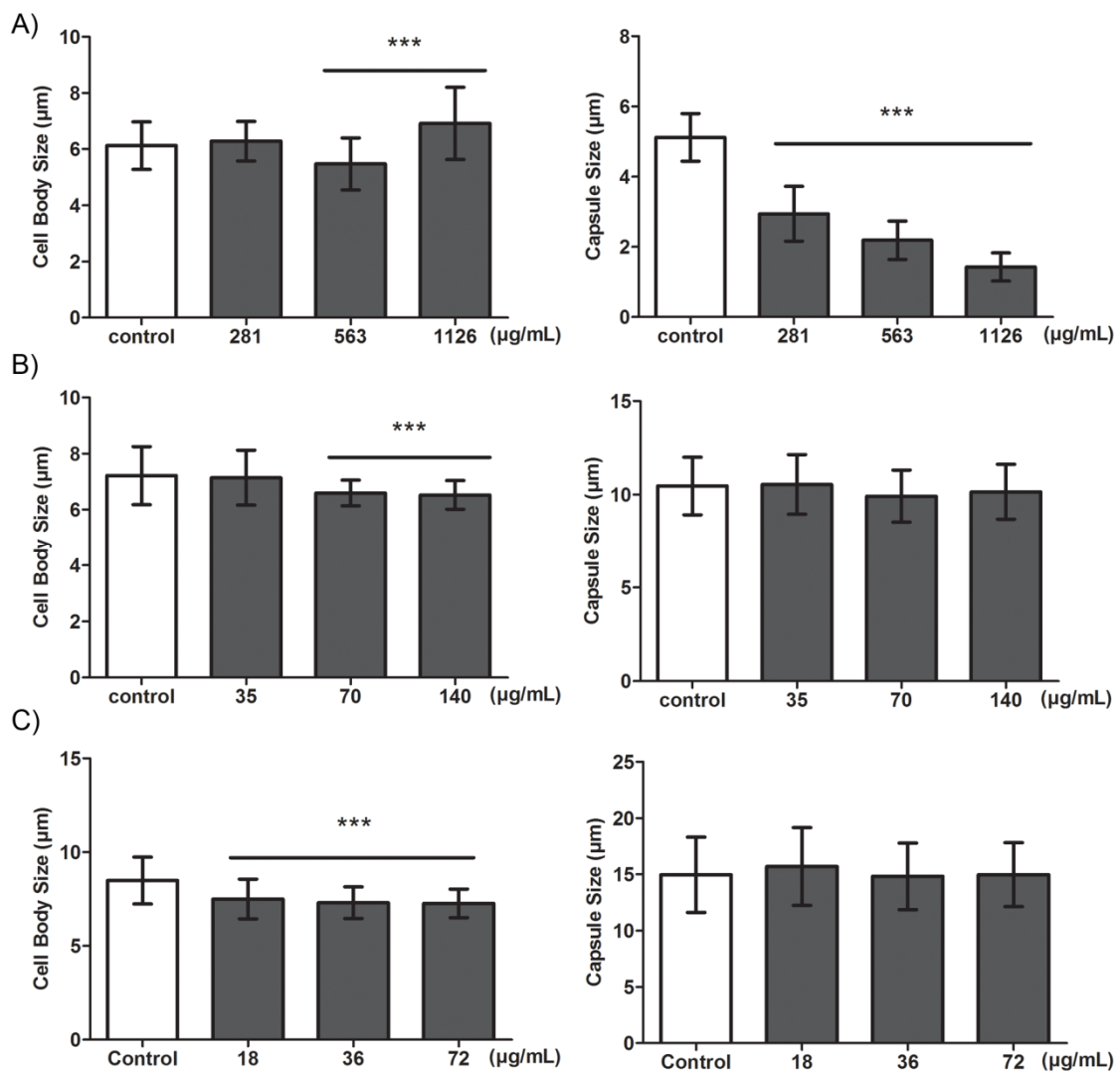


Fig. 2: Effect of *A. polyantha* crude seed extract (APCSE) upon *Cryptococcus* capsule formation. Graphs are presented in two columns: cell body size and

capsule size. A) Parameters for *C. neoformans* H99; B) *C. gattii* R265; C) *C. gattii* R272. ***P < 0.001.

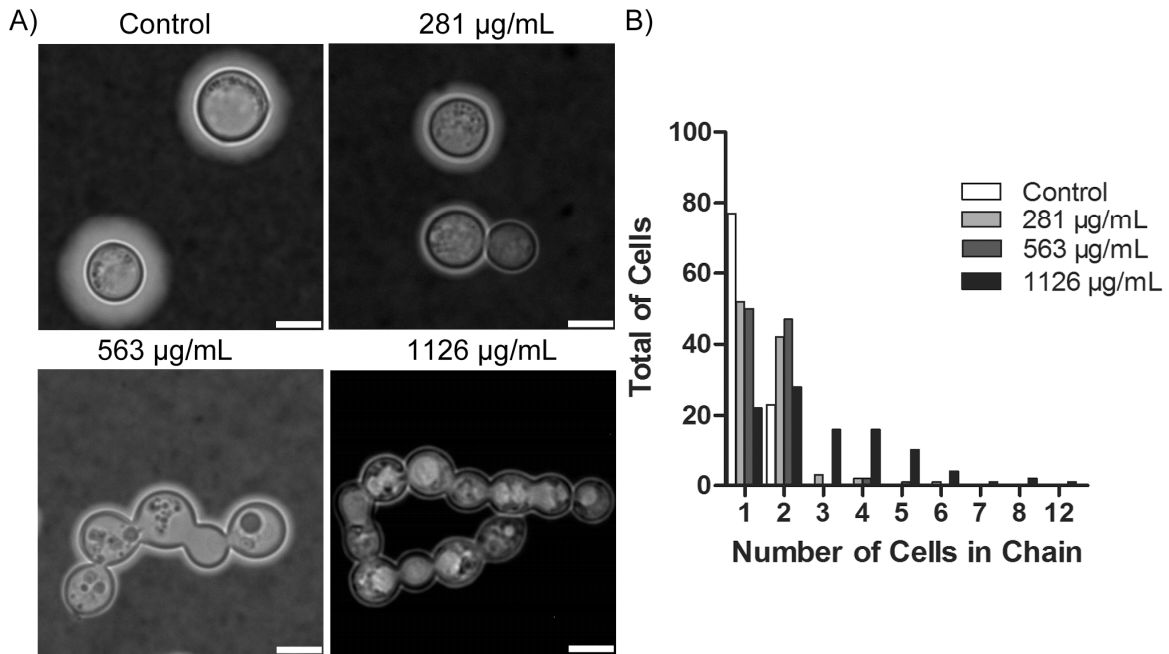


Fig. 3: *A. polyantha* crude seed extract (APCSE) alters *C. neoformans* H99 cell morphology. Cells were incubated for capsule induction in RPMI-1640 medium, at 37 °C and 5 % CO₂ for 72 h, and stained with India ink. A) Image of cells mixed with India ink for visualization, the concentration of seed extract is indicated above each image; B) One hundred cells were counted in each concentration. Individualized cells were classified as “1”, forming chain cells were classified according to the correspondent number of cells attached, two or more. Scale bar = 5 µm, except letter A, 1126 µg/mL, where scale bar correspond to 3.33 µm.

3.4. *Viability of C. neoformans H99 cells with altered morphology.* To evaluate whether cells with altered morphology were viable, we perform staining with LIVE/DEAD kit. We observed viable and non-viable cells forming chain. More than

150 cells were observed in each treatment, and approximately 34 % of treated cells (1126 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of APCSE) were viable. Considering cells with two or more attachments, around 74 % were non-viable and among individual cells, around 61 % were non-viable. In the control, approximately 95 % of cells were viable.

3.5. Fluorescence microscope analyses of C. neoformans H99 cells presenting altered morphology. To evaluate whether the alterations in cell morphology forming chains are projections of one cell or whether all structures in the chain have nucleus, indicating incomplete mother-daughter cell division, we performed DAPI staining, which preferentially stains dsDNA, binding to AT sites within the minor groove of DNA [18]. Multiples DAPI staining bodies in cells forming chain (Fig. 4) indicating nuclear fragmentation were observed [19, 20, 21].

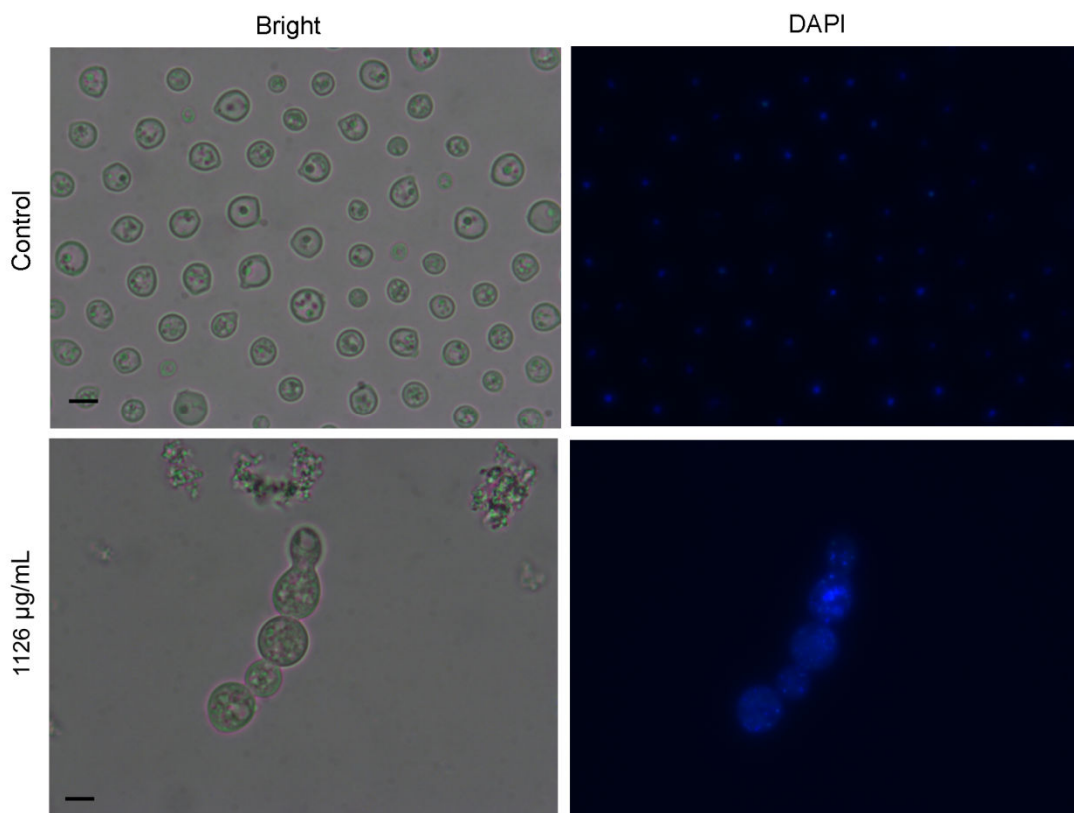


Fig. 4: Fluorescence microscope analyses of *C. neoformans* H99 strain stained with DAPI. Cells were cultivated in presence or absence of APCSE (1126 µg/mL) at 37 °C and 180 rpm. After 72 h cells were fixed and stained with DAPI. Scale bar = 5 µm.

To investigate whether the *C. neoformans* H99 cells with altered morphology have defects in cell wall synthesis, we perform staining with calcofluor white, a fluorescent dye which interacts with chitin, and WGA, which has affinity for β-1,4-N-acetylglucosamine (GlcNAc) oligomers [15, 22]. No differences between control and treated cells were observed in staining with calcofluor white (Fig. 5). As expected for the control, WGA interacted with specific areas in the cell wall, at opposite poles [15]. However, in treated cells forming chains, staining with WGA was observed only in one of the ends of these chains, in the bud neck, at the interface between the cell in the end and the next cell in the chain, (Fig. 5). Cells in the middle of the chain did not interact with WGA.

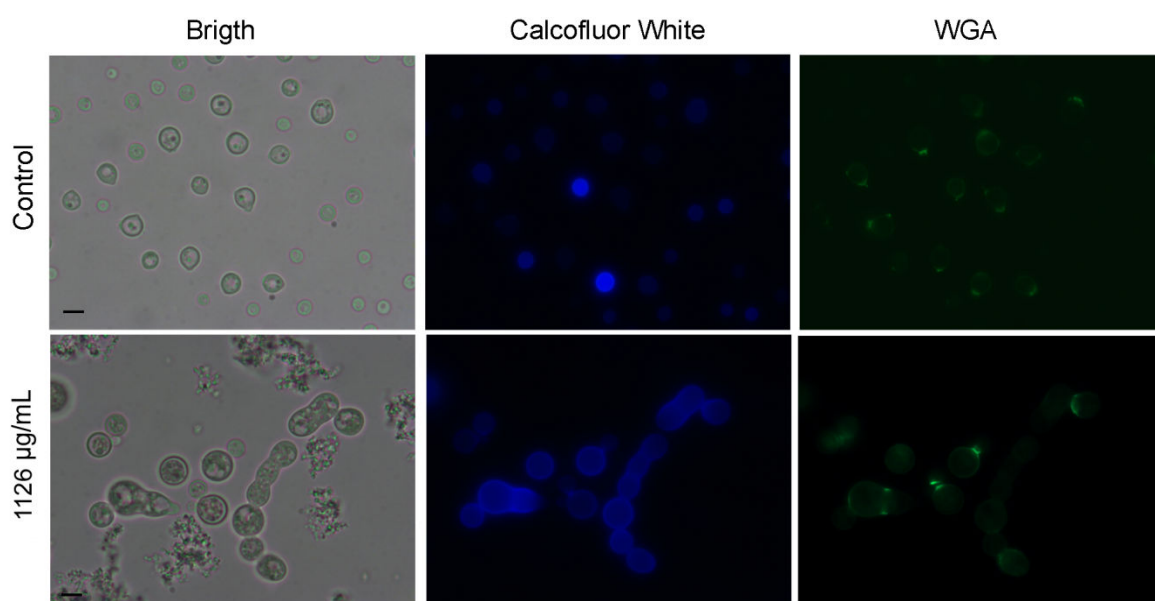


Fig. 5: Fluorescence microscope analyses of *C. neoformans* H99 strain stained with calcofluor white (blue) and WGA (green). Cells were cultivated in the presence or in the absence of APCSE (1126 µg/mL) at 37 °C and 180 rpm. After 72 h cells were fixed and stained with WGA and calcofluor white. Scale bar = 5 µm.

3.6. *Phytochemistry characterization.* Three iridoids were isolated from APCSE by chromatography. The ¹H and ¹³C NMR spectra are in accordance with those described for plumieridine, plumieride and protoplumericin [23, 24, 25]. Chemical structures of the iridoids are showed in Figure 6.

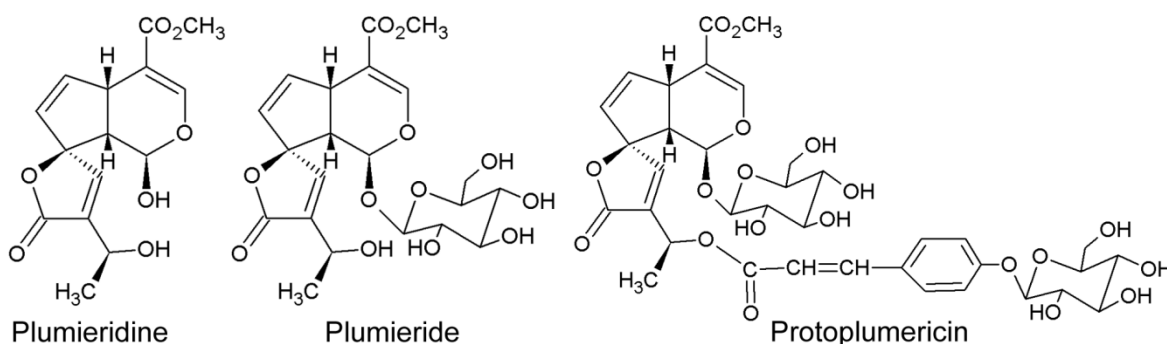


Fig. 6: Chemical structure of iridoids isolated from *A. polyantha* crude seed extract (APCSE).

The MIC values and minimal fungicide concentration (MFC) of plumieride and plumieridine are described in Table 2. For plumieride, MFC values are the double of MIC values and the best activities were obtained against *C. gattii* strains, as observed for APCSE. Plumieridine presented smaller MIC values than plumieride, but higher MFCs for *C. gattii*. Protoplumericin did not present antifungal activity.

Table 2: Minimal inhibitory concentration (MIC) values and minimal fungicide concentration (MFC) values of plumieride and plumieridine isolated from *A. polyantha* seed extract against *Cryptococcus* spp.

| Species | Strain | Plumieride (mg/mL) | | Plumieridine (mg/mL) | |
|--------------------------------|--------|--------------------|-----|----------------------|------|
| | | MIC | MFC | MIC | MFC |
| <i>Cryptococcus neoformans</i> | H99 | 1 | 2 | 0.25 | 0.5 |
| <i>Cryptococcus gattii</i> | R265 | 0.3 | 0.6 | 0.125 | 1 |
| | R272 | 0.25 | 0.5 | 0.25 | 1.35 |

Alterations in *C. neoformans* H99 cell morphology were observed when incubated with plumieride (Fig. 7A and B), indicating that plumieride is one of the compounds in APCSE that alters cell morphology. We can observe multiple vacuoles inside the cell (Fig. 7B), a phenotype also observed during incubation with APCSE. This effect was not observed with plumieridine.

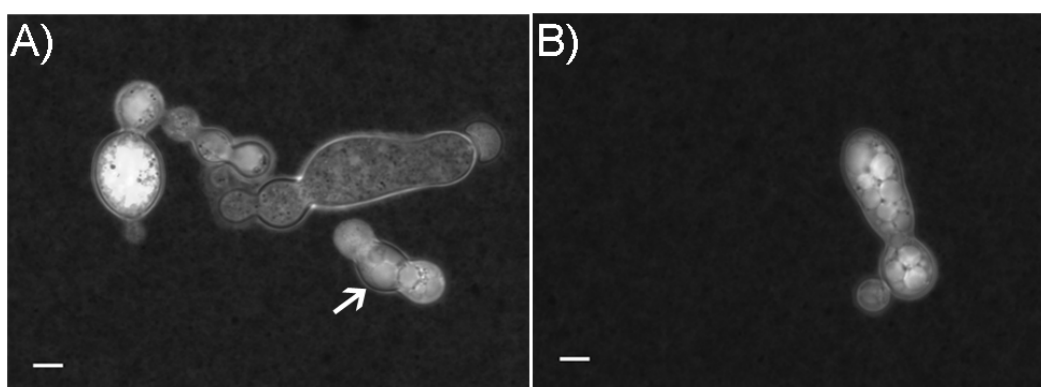


Fig. 7: Plumieride alters *C. neoformans* H99 strain cell morphology. Cells were recuperated by centrifugation from plumieride MIC assay (563 $\mu\text{g/mL}$) and mixed with India ink for visualization. A) Arrow indicates cell with multiple vacuoles; B) Detail of one cell with multiple vacuoles. Scale bar = 5 μm .

Discussion

Available antifungal drugs present mechanism of action restricted to few targets, with limited therapeutic options, since fungi and humans share many similarities in the cellular machinery [26]. Toxicity and development of resistance contribute to limit their use. So, new antifungal agents may provide additional options for the treatment of fungal infections and they may help to overcome the limitations of current treatments without damage to host.

In this study we described antifungal activity from APCSE against *Cryptococcus* species. *C. gattii* strains were more susceptible to APCSE than *C. neoformans*, and we observed differences of MIC values between strains of *C. gattii*. Differences in response to antifungal agents could be associated to genetic variations, since differential antifungal susceptibilities have been observed not only between *C. neoformans* and *C. gattii*, but among serotypes of the same species, and vary according to the drug tested [27, 28, 29]. At the MIC values for *C. gattii* R265 and R272 strains, APCSE do not affect cell viability of fibroblast in the conditions tested, which is a positive aspect for the purpose of application as antifungal drug even being a preliminary result.

As mentioned, capsule formation by *Cryptococcus* is an important virulence factor [30 - 34]. An increase in polysaccharide capsule is observed during host infection, and mutants with decrease or defects in capsule size are attenuated in virulence [30, 31, 32]. The capsule produces suppression of immune response, inhibition of phagocytosis and protection for reactive oxygen species [33, 34]. APCSE inhibited capsule formation by *C. neoformans*, it did not inhibit capsule

formation by *C. gattii* in the concentrations tested, but promoted the decreasing of cell body size, showing that the extract alters the cell physiology. These results are surprising since other studies have indicated that factors controlling cell size also control capsule size [35, 36].

The nuclear fragmentation observed with DAPI staining is an indicative of programmed cell death (PCD) [19, 20, 21]. Some drugs with antifungal properties have been described as PCD inducers. For example, amphotericin B was described to induce apoptotic-like cell death in *C. albicans* and *Aspergillus fumigatus*, marked by chromatin condensation, nuclear fragmentation, phosphatidylserine externalization and reactive oxygen accumulation [37, 38]. Differences between apoptotic machinery of yeasts and mammalian cells could be exploited for the design of new drugs [39, 40].

Cryptococcus cell wall is a complex structure composed of polysaccharides, proteins and lipids [41]. Besides it has been associated with maintenance of virulence factors, such as attachment of polysaccharide capsule and retention of melanin pigment, the cell wall has a primary structural function: it provide strength and rigidity to the cell; but is also flexible and dynamic, characteristics that allow morphologic changes during mating, budding, and other cellular interactions [42]. For maintenance of cell integrity, an essential constituent of cell wall is chitin, a β -1,4-linked polymer of GlcNAc, which is more abundant in its deacetylated form, chitosan. In contrast to *C. albicans* and *Saccharomyces cerevisiae* that contain no chitosan during vegetative growth, *C. neoformans* presents three to five times more chitosan than chitin during vegetative growth [43]. Rodrigues et al [15], studying the association between structures recognized by WGA in the *C.*

neoformans cell wall and capsular glucuronoxylomannan determined that WGA recognizes GlcNAc oligomers at the interface between the capsule and the cell wall, and that molecules recognized by WGA form a ring like structure around the bud neck. The chitooligomers recognized by WGA may include chitin branches, oligomers formed from chitinase-mediated hydrolysis or chitosan. The interaction between chitooligomers and capsular components could be a mechanism involved in capsule separation during the replication of *C. neoformans* [15]. We found that WGA do not recognize *C. neoformans* cells forming chains treated with APCSE. This absence of staining is in accordance with reports showing that chitosan is necessary to complete mother-daughter cell separation [43, 44]. Tsirilakis et al [45] reported the inhibition of *C. neoformans* chitinase activity by methylxanthine, the irregular pattern of WGA staining by the cells treated with this inhibitor and also an incomplete bud detachment. However, *C. neoformans* mutants for endochitinases did not present defects in vegetative growth [46], unlike *S. cerevisiae*, which has a counterbalancing of chitin synthase and chitinase activities during cytokinesis [47]. The molecular mechanisms involved in *C. neoformans* bud detachment and capsule separation are not well described and molecules present in APCSE could prove to be important tools to understand these processes.

Two iridoids presenting antifungal activity were isolated from APCSE: plumieride and its aglycone, plumieridine. Previously, plumieridine was obtained by enzymatic hydrolysis of plumieride [23], and was isolated from *Plumeria obtusa* [48] and *Allamanda neriifolia* [49]. This is the first report of antifungal activity for this compound. Plumieride and other lactone-containing iridoids have been isolated from several species of *Allamanda* and *Plumeria* and seem to be restricted in

occurrence to the family Apocynaceae [50, 51]. Plumieride and plumieridine were described as growth inhibitors of wheat seedling [52, 53]. Antidermatophytic activity against *Epidermophyton floccosum* and *Microsporum gypseum* was described for plumieride [54]. Additional activities for this compound, as arresting spermatogenesis in male rats after oral administration [55], and anticancer activity were also described [56]. The MIC and MFC values of plumieride and plumieridine are higher than MIC values of APCSE, excepting MFC of plumieridine for *C. neoformans* H99. It indicates that possibly other compounds in APCSE could contribute to antifungal activity and/or the compounds present better activity in association. Our results demonstrate that plumieride cause morphological alterations in *C. neoformans* H99 strain. However, other compounds present in APCSE should cause these alterations and should be involved in the antifungal activity of the APCSE.

Conclusions

The results presented here indicate the potential antifungal activity of *A. polyantha* crude seed extract, identifying two iridoids with antifungal activity present in the extract: plumieride and plumieridine. Also, some concentrations of crude seed extract were not toxic for fibroblastic cells, which is very interesting. Furthermore, compounds present in the extract, including plumieride, could be interesting tools to understand cellular biology of *C. neoformans*, through the study of morphological alterations of the cells. Future studies will aim the isolation and characterization of other compounds with antifungal activity in *A. polyantha* seed extract.

Acknowledgements

The authors would like to thank Dr. Charley C. Staats for help with figures editing. We also thank the financial support from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

References

- [1] D. M. Dixon, M. M. McNeil, M. L. Cohen, B. G. Gellin and J. R. La Montagne, "Fungal infections, a growing threat," *Emerging Fungal Infections*, vol. 111, pp. 226-235, 1996.
- [2] M. A. Pfaller and D. J. Diekema, "Epidemiology of invasive mycosis in North America," *Critical Reviews in Microbiology*, vol. 36, no. 1, pp. 1-53, 2010.
- [3] B. J. Park, K. A. Wannemuehler, B. J. Marston, N. Govender, P. G. Pappas and T. M. Chiller, "Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS," *AIDS*, vol. 23, pp. 525-530, 2009.
- [4] V. Chatuverdi and S. Chatuverdi, "*Cryptococcus gattii*: a resurgent fungal pathogen," *Trends in Microbiology*, vol. 19, no. 11, pp. 564-571, 2011.
- [5] D. P. Kontoyiannis and R.E. Lewis, "Antifungal drug resistance of pathogenic fungi," *The Lancet*, vol. 359, pp. 1135-1144, 2002.
- [6] P. Mondon, R. Petter, G. Amalfitano, R. Luzzati, E. Concia, I. Polacheck and K. J. Kwon-Chung, "Heteroresistance to fluconazole and voriconazole in *Cryptococcus neoformans*," *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 43, no. 8, pp. 1856-1861, 1999

- [7] L. Rodero, E. Mellado, A. C. Rodriguez, A. Salve, L. Guelfand, P. Cahn, M. Cuenca-Estrella, G. Davel, and J. L. Rodriguez-Tudela, "G484S amino acid substitution in lanosterol 14- α demethylase (*ERG11*) is related to fluconazole resistance in a recurrent *Cryptococcus neoformans* clinical isolate," *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 47, no. 11, pp. 2676-2684, 2003.
- [8] A. Vermes, H. J. Guchelaar and J. Dankert, "Flucytosine: a review of its pharmacology, clinical indications, pharmacokinetics, toxicity and drug interactions," *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol. 46, pp. 171-179, 2000.
- [9] T. V. Krishnarao and J. N. Galgiani, "Comparison of the in vitro activities of the echinocandin LY303366, the pneumocandin MK-0991, and fluconazole against *Candida* species and *Cryptococcus neoformans*," *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 41, no. 9, pp. 1957-1960, 1997.
- [10] D. J. Newman, and G. M. Cragg, "Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010," *Journal of Natural Products*, vol. 75, pp. 311-335, 2012.
- [11] I. Koch, A. Rapini, L. S. Kinoshita, A. O. Simões and A. P. Spina, "Apocynaceae," in *Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro*. (<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB33605>), 2012.
- [12] H. E. Gottlieb, V. Kotlyar and A. Nudelman, "NMR chemical shifts of common laboratory solvents as trace impurities," *Journal of Organic Chemistry*, vol. 62, pp. 7512-7515, 1997.

- [13] Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI), *Document M27-A2. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts*, Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI), Wayne, Pa, USA, 2nd edition, 2002.
- [14] O. Zaragoza and A. Casadevall, "Experimental modulation of capsule size in *Cryptococcus neoformans*," *Biological Procedures Online*, vol. 6, no. 1, pp. 10-15, 2004.
- [15] M. L. Rodrigues, M. Alvarez, F. L. Fonseca, and A. Casadevall, "Binding of the wheat germ lectin to *Cryptococcus neoformans* suggest an association of chitinlike structures with yeast budding and capsular glucuronoxylomannan," *Eukaryotic Cell*, vol. 7, no. 4, pp. 602-609, 2008.
- [16] T. Zhang and H. H. P. Fang, "Quantification of *Saccharomyces cerevisiae* viability using BacLight," *Biotechnology Letters*, vol. 26, pp. 989-992, 2004.
- [17] Y. Jin, T. Zhang, Y. H. Samaranayake, H. H. P. Fang, H. K. Yip and L. P. Samaranayake, "The use of new probes and stains for improved assessment of cell viability and extracellular polymeric substances in *Candida albicans* biofilms," *Mycopathologia*, vol. 159, pp. 353–360, 2005.
- [18] F. A. Tanious, J. M. Veal , H. Buczak, L. S. Ratmeyer and W. D. Wilson, "DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) binds differently to DNA and RNA: minor-groove binding at AT sites and intercalation at AU sites," *Biochemistry*, vol. 31, no. 12, pp. 3103-3112, 1992.
- [19] F. Madeo, E. Fröhlich and K. U. Fröhlich, "A yeast mutant showing diagnostic markers of early and late apoptosis," *The Journal of Cell Biology*, vol. 139, no. 3, pp. 729–734, 1997.

- [20] B. Hwang, J. S. Hwang, J. Lee, J. K. Kim, S. R. Kim, Y. Kim and D. G. Lee, "Induction of yeast apoptosis by an antimicrobial peptide, Papiliocin," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 408, pp. 89–93, 2011.
- [21] B. Hao, S. Cheng, C. J. Clancy and M. H. Nguyen, "Caspofungin kills *Candida albicans* by causing both cellular apoptosis and necrosis," *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 57, no. 1, pp. 326-332, 2013.
- [22] A. J. Foster, R. A. Bird, S. L. Kelly, K. Nishimura, D. Poyner, S. Taylor, and S. N. Smith, "FITC-lectin avidity of *Cryptococcus neoformans* cell wall and capsular components," *Mycologia*, vol. 96, pp. 1-8, 2004.
- [23] W. Schliemann and G. Adam, "Enzymatic hydrolysis of plumieride to plumieridine," *Phytochemistry*, vol. 21, no. 6, pp. 1438-1439, 1982.
- [24] A. Malheiros, I. T. A. Schuquel and G. J. Vidotti, "Atribuição inequívoca de deslocamentos químicos de RMN de ^1H e ^{13}C de plumierídeo isolado da *Allamanda cathartica*," *Química Nova*, vol. 20, no.5, pp. 457-459, 1997.
- [25] Y. Yamauchi, F. Abe. and M. Taki, "Protoplumericin, an iridoid bis-glucoside in *Allamanda neriifolia*," *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, vol. 29, no. 10, pp. 3051-3055, 1981.
- [26] A. Idnurm, Y. S. Bahn; K. Nielsen, X. Lin, J. A. Fraser and J. Heitman, "Deciphering the model pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*," *Nature Reviews Microbiology*, vol. 3, pp. 753-764, 2005.
- [27] E. Dannaoui, M. Abdul, M. Arpin, A. Michel-Nguyen, M. A. Piens, A. Favel, O. Lortholary, F. Dromer, and the French Cryptococcosis Study Group, "Results obtained with various antifungal susceptibility testing methods do not predict early

clinical outcome in patients with cryptococcosis,” *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, vol. 50, no.7, pp. 2464-2470, 2006.

[28] A. Gomez-Lopez, O. Zaragoza, M. Dos Anjos Martins, M. C. Melhem, J. L. Rodriguez-Tudela and M. Cuenca-Estrella, “In vitro susceptibility of *Cryptococcus gattii* clinical isolates,” *Clinical Microbiology and Infection*, vol. 14, no. 7, pp. 727-730, 2008.

[29] Z. U. Khan, H. S. Randhawa, W. Chehadeh, A. Chowdhary, T. Kowshik, and R. Chandy, “*Cryptococcus neoformans* serotype A and *Cryptococcus gattii* serotype B isolates differ in their susceptibilities to fluconazole and voriconazole,” *International Journal of Antimicrobial Agents*, vol. 33, pp. 559-563, 2009.

[30] R. A. Fromtling, H. J. Shadomy and E. S. Jacobson, “Decreased virulence in stable, acapsular mutants of *Cryptococcus neoformans*,” *Mycopathologia*, vol. 79, pp. 23-39, 1982.

[31] Y. C. Chang and K. J. Kwon-Chung, “Complementation of a capsule deficient mutation of *Cryptococcus neoformans* restores its virulence,” *Molecular and Cellular Biology*, vol. 14, no.7, pp. 4912-4919, 1994.

[32] L. Kmetzsch, L. S. Joffe, C. C. Staats, D. L. de Oliveira, F. L. Fonseca, R. J.B. Cordero, A. Casadevall, L. Nimrichter, A. Schrank, M. H. Vainstein and Marcio L. Rodrigues, “Role for Golgi reassembly and stacking protein (GRASP) in polysaccharide secretion and fungal virulence,” *Molecular Microbiology*, vol. 81, no. 1, pp. 206–218, 2011.

- [33] O. Zaragoza, M. L. Rodrigues, M. De Jesus, S. Frases, E. Dadachova and Arturo Casadevall, "The capsule of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*," *Advances in Applied Microbiology*, vol. 68, pp. 133–216, 2009.
- [34] T. R. O'Meara and J. A. Alspaugh, "The *Cryptococcus neoformans* capsule: a sword and a shield," *Clinical Microbiology Reviews*, vol. 25, no. 3, pp. 387-408, 2012.
- [35] O. Zaragoza, B. C. Fries and A. Casadevall, "Induction of capsule growth in *Cryptococcus neoformans* by mammalian serum and CO₂," *Infection and Immunity*, vol. 71, no. 11, pp. 6155-6164, 2003.
- [36] O. Zaragoza, A. Telzak, R. A. Bryan, E. Dadachova and Arturo Casadevall, "The polysaccharide capsule of the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans* enlarges by distal growth and is rearranged during budding," *Molecular Microbiology*, vol. 59, no. 1, pp. 67-83, 2006.
- [37] J. A. Phillips, I. Sudbery and M. Ramsdale, "Apoptosis induced by environmental stress and amphotericin B in *Candida albicans*," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 100, no. 24, pp.14327-14332, 2003.
- [38] S. A. Mousavi and G. D. Robson, "Oxidative and amphotericin B –mediated cell death in the opportunistic pathogen *Aspergillus fumigatus* is associated with an apoptotic-like phenotype," *Microbiology*, vol. 150, pp. 1937-1945, 2004.
- [39] M. Ramsdale, "Programmed cell death in pathogenic fungi," *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1783, pp. 1369–1380, 2008.

- [40] B. Almeida, A. Silva, A. Mesquita, B. Sampaio-Marques, F. Rodrigues and P. Ludovico, "Drug-induced apoptosis in yeast," *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1783, pp. 1436–1448, 2008.
- [41] L. Nimrichter, M. L. Rodrigues, E. G. Rodrigues, L. R. Travassos, "The multitude of targets for the immune system and drug therapy in the fungal cell wall," *Microbes and Infection*, vol. 7, pp. 789-798, 2005.
- [42] T. L. Doering, "How sweet it is! Cell wall biogenesis and polysaccharide capsule formation in *Cryptococcus neoformans*," *Annual Review of Microbiology*, vol. 63, pp. 223-247, 2009.
- [43] I. R. Banks, C. A. Specht, M. J. Donlin, K. J. Gerik, S. M. Levitz, and J. K. Lodge, "A chitin synthase and its regulator protein are critical for chitosan production and growth of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*," *Eukaryotic Cell*, vol.4, no.11, pp.1902-1912, 2005.
- [44] L. G. Baker, C. A. Specht, M. J. Donlin, and J. K. Lodge, "Chitosan, the deacetylated form of chitin, is necessary for cell wall integrity in *Cryptococcus neoformans*," *Eukaryotic Cell*, vol. 6, no. 5, pp. 855–867, 2007.
- [45] K. Tsirilakis, C. Kim, A. G. Vicencio, C. Andrade, A. Casadevall, and D. L. Goldman, "Methylxanthine inhibit fungal chitinases and exhibit antifungal activity," *Mycopathologia*, vol. 173, pp. 83–91, 2012.
- [46] L. G. Baker, C. A. Specht, and J. K. Lodge, "Chitinases are essential for sexual development but not vegetative growth in *Cryptococcus neoformans*," *Eukaryotic Cell*, vol.8, no.11, pp.1692-1705, 2009.

- [47] E. Cabib, S. J. Silverman and J. A. Shaw, "Chitinase and chitin synthase 1: counterbalancing activities in cell separation of *Saccharomyces cerevisiae*," *Journal of General Microbiology*, vol. 138, pp. 97-102, 1992.
- [48] M. Saleem, N. Akhtar, N. Riaz, M. Shaiq Ali and A. Jabbar, "Isolation and characterization of secondary metabolites from *Plumeria obtusa*," *Journal of Asian Natural Products Research*, vol. 13, no. 12, pp. 1122–1127, 2011.
- [49] F. Abe, T. Mōri and T. Yamauchi, "Iridoids of Apocynaceae. III. Minor iridoids from *Allamanda neriifolia*," *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, vol. 32, no. 8, pp. 2947-2956, 1984.
- [50] J. J. W. Coppen and A. L. Cobb, "The occurrence of iridoids in *Plumeria* and *Allamanda*," *Phytochemistry*, vol. 22, no. 1, pp. 125-128, 1983.
- [51] M. S. Abdel-Kader, J. Wisse, R. Evans, H. van der Werff and D. G. I. Kingston, "Bioactive iridoids and a new lignan from *Allamanda cathartica* and *Himatanthus fallax* from the Suriname Rainforest," *Journal of Natural Products*, vol. 60, pp. 1294-1297, 1997.
- [52] G. Adams, N. H. Khoi, Chr. Bergner and N. T. Lien, "Plant growth inhibiting properties of plumieride from *Plumeria obtusifolia*," *Phytochemistry*, vol. 18, pp. 1399-1400, 1979.
- [53] F. Pardo, F. Perich, R. Torres, F. Delle Monache, "Plant iridoid glycosides and phyto-growth-inhibitory activity of *Verbascum virgatum*," *Biochemical Systematics and Ecology*, vol. 32, pp. 367–370, 2004.

- [54] T. N. Tiwari, V. B. Pandey and N. K. Dubey, "Plumieride from *Allamanda cathartica* as an antidermatophytic agent," *Phytotherapy Research*, vol. 16, pp. 393–394, 2002.
- [55] R. S. Gupta, A. K. Bhatnager, Y. C. Joshi, R. Sharma and A. Sharma, "Effects of Plumieride, an iridoid on spermatogenesis in male albino rats," *Phytomedicine*, vol. 11, pp. 169-174, 2004.
- [56] M. P. Dobhal, G. Li, A. Gryshuk, A. Graham, A. K. Bhatnager, S. D. Khaja, Y. C. Joshi, M. C. Sharma, A. Oseroff and R. K. Pandey, "Structural modifications of plumieride isolated from *Plumeria bicolor* and the effect of these modifications on in vitro anticancer activity," *Journal of Organic Chemistry*, vol. 69, pp. 6165-6172, 2004.

3. Resultados Adicionais

Além dos compostos plumieridina, plumierídeo e protoplumericina, foi isolada uma mistura de plumericina e isoplumericina. As metodologias de isolamento e identificação foram as mesmas descritas no manuscrito. As figuras dos espectros de RMN de hidrogênio e carbono desses compostos constam no apêndice da dissertação: plumericina e isoplumericina (figuras 1 e 2), plumierídeo (figuras 3 e 4), plumieridina (figuras 5 e 6) e protoplumericina (figuras 7 e 8).

A atividade antifúngica da mistura de plumericina e isoplumericina não foi testada por ter sido isolada em pequena quantidade e porque não foi possível solubilizar a mistura em solução aquosa, mesmo com adição de DMSO.

4. Discussão

Os antifúngicos utilizados atualmente apresentam mecanismos de ação restrito a poucas classes, sendo que nem todos podem ser utilizados para o tratamento de infecções fúngicas sistêmicas. As restrições aumentam ainda mais no caso de o patógeno apresentar resistência a mais de um fármaco. Assim, o aumento de casos de infecções fúngicas associado ao aumento dos casos de AIDS e uso de terapias imunossupressoras leva a busca por novos agentes antifúngicos. Essa é uma tarefa difícil, uma vez que o alvo do fármaco deve ser suficientemente conservado entre as espécies fúngicas, para que haja um amplo

espectro de ação, além de ser específico, para que não haja reatividade cruzada com os hospedeiros, também eucariotos (Chong *et al.*, 2012).

Testando a atividade antifúngica de APCSE observamos variações na suscetibilidade entre *C. neoformans* e *C. gattii*, e entre linhagens de *C. gattii*. Outros pesquisadores já relataram essas variações, com menor suscetibilidade para *C. gattii* do que para *C. neoformans* (Trilles, 2004; Khan *et al.*, 2009), ou menor suscetibilidade para *C. neoformans* do que para *C. gattii* (Gomez-Lopez, 2008).

Assim como observamos diferenças de suscetibilidade entre *C. neoformans* e *C. gattii* frente a APCSE, observamos alterações morfológicas distintas em *C. neoformans* quando incubado com APCSE. As células aparentemente possuem divisão celular incompleta, com a célula filha permanecendo ligada à célula mãe, formando cadeias de células lineares. Esse fenótipo não foi observado em *C. gattii*. Além disso, APCSE inibiu a formação de cápsula em *C. neoformans*, mas não em *C. gattii*, e cadeias de células de *C. neoformans* não reagem uniformemente com WGA, ficando marcadas apenas as células de uma das pontas da cadeia.

Rodrigues *et al.* (2008) demonstraram que WGA liga-se especificamente a oligômeros de quitina e que esses oligômeros estão associados com a parede celular de *C. neoformans* e *C. gattii*, mas projetam-se para cápsula, além de formarem uma estrutura em forma de anel ao redor da junção de brotamento entre célula-mãe e filha. Os autores sugerem que os oligômeros de quitina sejam estruturas importantes para conexão da parede celular com componentes da cápsula e que se associem as junções de brotamento nos estágios finais de

divisão celular, permanecendo nas cicatrizes de brotamento. Em estudo recente, Fonseca *et al.* (2013) observaram que o tratamento de *C. neoformans* com WGA, como uma forma de bloqueio dos oligômeros de quitina, afeta a liberação de GXM para o espaço extracelular e inibe a formação de cápsula. Porém, não foi observada inibição de formação de cápsula em *C. gattii* quando tratado com WGA. Esses dados comprovam diferenças fisiológicas de *C. neoformans* e *C. gattii*. Ainda que sejam necessárias mais análises sobre o mecanismo de ação de APCSE, e de compostos isolados a partir do extrato, como o plumierídeo, os dados desses pesquisadores nos levam a hipótese de que compostos presentes no extrato inibam de alguma forma a produção de oligômeros de quitina, já que não houve reação com WGA, e que a ausência de oligômeros de quitina possa ter relação com a deficiência na separação das células e na produção de cápsula por *C. neoformans*. Além disso, outros componentes celulares e vias metabólicas além da produção de oligômeros de quitina podem estar envolvidos nas alterações fenotípicas de *C. neoformans*.

Até o momento foram isolados e identificados quatro compostos, sendo que um corresponde a uma mistura (plumericina e isoplumericina) e não foi testado quanto a atividade antifúngica. Dentre os outros três, plumieridina e plumierídeo apresentaram atividade antifúngica, plumierídeo causou alteração morfológica nas células, já protoplumericina não apresentou atividade antifúngica. Durante o processo de identificação desses compostos a partir dos espectros de RMN de H^1 e C^{13} que obtivemos, percebemos que há divergências na literatura quanto a atribuição dos sinais de hidrogênio e carbonos nas posições 3, 10 e 7 obtidos a partir de espectros unidimensionais, bem como da configuração absoluta das

moléculas. Esses problemas já foram apontados por outros autores, como Malheiros *et al.* (1997), que determinaram a atribuição dos deslocamentos químicos de H¹ e C¹³ do plumierídeo através de técnicas de RMN bidimensional. Para atribuição dos sinais de H¹ e C¹³ da protoplumericina também necessitamos de análises bidimensionais, devido a complexidade da molécula e as divergências na literatura.

Várias questões permanecem em aberto, mas este trabalho abre muitas possibilidades de investigação, seja pela potencial atividade antifúngica de *A. polyantha*, seja pela possibilidade de utilização para estudo da biologia celular de *C. neoformans*, através das alterações morfológicas das células, e das diferenças nas respostas de *C. neoformans* e *C. gattii* frente a APCSE.

5. Conclusões e perspectivas

- APCSE apresenta potencial atividade antifúngica, com valores mais baixos de concentração inibitória mínima para as linhagens de *C. gattii* testados do que para a linhagem de *C. neoformans*.
- Dois compostos isolados de APCSE, identificados como plumieridina e plumierídeo apresentam atividade antifúngica.
- A incubação de fibroblastos com APCSE demonstrou que concentrações abaixo de 70 µg/mL não afetam a viabilidade celular, o que é um aspecto positivo, mesmo que preliminar.

- APCSE inibe a formação de cápsula polissacarídica em *C. neoformans* H99, e causa redução do tamanho do corpo celular das linhagens de *C. gattii* R265 e R272, em condições de cultivo indutoras de cápsula.

- Compostos presentes em APCSE, incluindo plumierídeo, provocam alterações morfológicas nas células de *C. neoformans* H99, representando ferramentas em potencial para estudo da biologia celular desta espécie.

- Associadas às alterações na morfologia celular de *C. neoformans* H99 provocadas por APCSE, observamos fragmentação nuclear, que indica morte celular programada e ausência de marcação para oligômeros de quitina, cujo significado fisiológico necessita ser mais bem estudado.

- Uma perspectiva do trabalho é a continuidade das tentativas de isolamento de moléculas presentes no extrato bruto com atividade antifúngica, e a determinação de seus alvos, além da avaliação mais aprofundada da indução de morte celular programada pelo extrato.

- Outra perspectiva é a investigação dos mecanismos de ação do plumierídeo e outras moléculas que venham a ser identificadas como causadoras de alterações da morfologia celular.

- Pretendemos produzir um artigo científico com dados de RMN bidimensional para protoplumericina e outros iridóides que venham a ser isolados de APCSE, objetivando auxiliar os pesquisadores na identificação segura desses compostos.

6. Referências

- ABE, F.; MŌRI, T. & YAMAUCHI, T. Iridoids of Apocynaceae. III. Minor iridoids from *Allamanda neriifolia*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 32(8): 2947-2956, 1984.
- ABDEL-KADER, M. S; WISSE, J.; EVANS, R.; van der WERFF, H. & KINGSTON, D. G. I. Bioactive iridoids and a new lignan from *Allamanda cathartica* and *Himatanthus fallax* from the Suriname Rainforest. *Journal of Natural Products*, 60: 1294-1297, 1997.
- BLOCK, E. R.; JENNINGS, A. E. & BENNETT J. E. 5-Fluorocytosine resistance in *Cryptococcus neoformans*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 3(6): 649-656, 1973.
- 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*, 147: 891-907, 2001.
- BOTTS, M.R. & HULL, C.M. Dueling in the lung: How *Cryptococcus* spores race the host for survival. *Current Opinion in Microbiology*, 13(4): 437–442, 2010.
- BOROS, C. A. & STERMITZ, F. R. Iridoids, an updated review, par II. *Journal of Natural Products*, 54(5): 1173-1246, 1991.
- BYRNES III, E. J. & HEITMAN J. *Cryptococcus gattii* outbreak expands into Northwestern United States with fatal consequences. *F1000 Biology Reports*, 1(62), 2009.
- BYRNES III, E. J.; BILDFELL, R.J.; FRANK, S.A.; MITCHELL, T.G.; MARR, K.A. & HEITMAN, J. Molecular evidence that the range of the Vancouver Island outbreak of *Cryptococcus gattii* infection has expanded into the Pacific Northwest in the United States. *The Journal of Infectious Diseases*, 199: 1081-1086, 2009.
- BYRNES III, E. J.; LI, W.; LEWIT, Y.; MA, H.; VOELZ, K.; REN, P.; CARTER, D.A.; CHATURVEDI, V.; BILDFELL, R. J.; MAY, R.C.; HEITMAN, J. Emergence and pathogenicity of highly virulent *Cryptococcus gattii* genotypes in the Northwest United States. *Plos Pathogens*, 6(4): 2-16, 2010.
- BYRNES III, E. J.; BARTLETT, K.H.; PERFECT, J.R. & HEITMAN, J. *Cryptococcus gattii*: an emerging fungal pathogen infecting humans and animals. *Microbes and Infection*, 13: 895-907, 2011.
- CASADEVALL, A.; ROSAS, A.L. & NOSANCHUK, J.D. Melanin and virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Current Opinion in Microbiology*, 3: 354-358, 2000.
- CHANDRA, J.; MOHAMMAD, S. & GHANNOUM, M. A. Flucytosine: Site of action, mechanism of resistance and use in combination therapy. *Antimicrobial Drug Resistance*, 27: 313-326, 2009.
- CHATURVEDI, V. & CHATURVEDI, S. *Cryptococcus gattii*: a resurgent fungal pathogen. *Trends in Microbiology*, 19(11):567-571, 2011.

- CHAYAKULKEEREE, M. & PERFECT, J. R. Cryptococcosis. *Infectious Disease Clinics of North America*, 20: 507-544, 2006.
- CHEN, S.; SORRELL, T.; NIMMO, G.; SPEED, B.; CURRIE, B.; ELLIS, D.; MARRIOTT, D.; PFEIFFER, T.; PARR, D.; BYTH, K. & The Australasian Cryptococcal Study Group. Epidemiology and host- and variety-dependent characteristics of infection due to *Cryptococcus neoformans* in Australia and New Zealand. *Clinical Infectious Diseases*, 31: 499-508, 2000.
- CHEN, S. C. A. & SORRELL, T. C. Antifungal agents. *Medical Journal of Australia*, 187(7): 404-409, 2007.
- CHEN, Y.L.; LEHMAN, V.; LEWIT, Y.; AVERETTE, A.F. & HEITMAN, J. Calcineurin governs thermotolerance and virulence of *Cryptococcus gattii*. *G3 Genes, Genomes, Genetics*, 3 (3): 527-539, 2013.
- CHONG, H. S.; CAMPBELL, L.; PADULA, M. P.; HILL, C.; HARRY, E.; LI, S. S.; WILKINS, M. R.; HERBERT, B.; CARTER, D. Time-course proteome analysis reveals the dynamic response of *Cryptococcus gattii* cells to fluconazole. *Plos One*, 7(8): e42835, 2012.
- COPPEN, J. J. W. & COBB, A. L. The occurrence of iridoids in *Plumeria* and *Allamanda*. *Phytochemistry*, 22(1): 125-128, 1983.
- DE JESUS, M.; NICOLA, A. M.; CHOW, S. K.; LEE, I. R.; NONG, S.; SPECHT, C. A.; LEVITZ, S. M.; & CASADEVALL, A. Glucuronoxylomannan, galactoxylomannan and mannoprotein occupy spatially separate and discrete regions in the capsule of *Cryptococcus neoformans*. *Virulence*, 1(6): 500-508, 2010.
- DICK, J. D.; MERZ, W. G. & SARAL, R. Incidence of polyene-resistant yeasts recovered from clinical specimens. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 18(1): 158-163, 1980.
- DINDA, B.; DEBNATH, S. & HARIGAYA, Y. Naturally occurring iridoids, a review, part 1. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 55(2): 159-222, 2007a.
- DINDA, B.; DEBNATH, S. & HARIGAYA, Y. Naturally occurring secoiridoids and bioactivity of naturally occurring iridoids and secoiridoids, a review, part 2. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 55(5): 689-728, 2007b.
- DINDA, B.; ROY CHOWDHURY, D. & MOHANTA, B. C. Naturally occurring iridoids, secoiridoids and their bioactivity, an update review, part 3. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 57(8): 765-796, 2009.
- DINDA, B.; DEBNATH, S. & BANIK, R. Naturally occurring iridoids and secoiridoids, an updated review, part 4. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 59(7): 803—833, 2011.
- EISENMAN, H.C. & CASADEVALL, A. Synthesis and assembly of fungal melanin. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93: 931-940, 2012.
- EL-NAGGAR, L. J. & BEAL, J. L. Iridoids, a review. *Journal of Natural Products*, 43(6): 649-707, 1980.

- ELLIS, D. H. & PFEIFFER, T. J. Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. *Journal of Clinical microbiology*, 28(7): 1642-1644, 1990.
- ELSÄSSER, B.; KROHN, K.; AKHTAR, M. N.; FLÖRKE, U.; KOUAM, S. F.; KUIGOUA, M. G.; NGADJUI, B. T.; ABEGAZ, B. M.; ANTUS, S.; KURTÁN, T. Revision of the absolute configuration of plumerin and isoplumericin from *Plumeria rubra*. *Chemistry & Biodiversity*, 2: 799-808, 2005.
- ENDRESS, M. E. & BRUYNS, P. V. A revised classification of the Apocynaceae s.l. *The Botanical Review*, 66(1): 1-56, 2000.
- ERICKSON, T.; LIU, L.; GUEYIKIAN, A.; ZHU, X.; GIBBONS, J. & WILLIAMSON, P. R. Multiple virulence factors of *Cryptococcus neoformans* are dependent on *VPH1*. *Molecular Microbiology*, 42(4): 1121-1131, 2001.
- FONSECA, F. L.; GUIMARÃES, A. J.; KMETZSCH, L.; DUTRA, F. F.; SILVA, F. D.; TABORDA, C. P.; ARAUJO, G. S.; FRASES, S.; STAATS, C. C.; BOZZA, M. T.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H.; NIMRICHTER, L.; CASADEVALL, A.; RODRIGUES, M. L. Binding of the wheat germ lectin to *Cryptococcus neoformans* chitooligomers affects multiple mechanisms required for fungal pathogenesis. *Fungal Genetics and Biology*, 2013, <http://dx.doi.org/10.1016/j.fgb.2013.04.005>.
- FOX, D.S.; COX, G.M. & HEITMAN, J. Phospholipid-binding protein Cts1 controls septation and functions coordinately with calcineurin in *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryotic Cell*, 2(5): 1025-1035, 2003.
- FRASER, J.A.; GILES, S.S.; WENINK, E.C.; GEUNES-BOYER, S.G.; WRIGHT, J.R.; DIEZMANN, S.; ALLEN, A.; STAJICH, J.E.; DIETRICH, F.S.; PERFECT, J.R. & HEITMAN, J. Same-sex mating and the origin of the Vancouver Island *Cryptococcus gattii* outbreak. *Nature*, 437(27): 1360-1365, 2005.
- GALANIS, E. & MACDOUGALL, L. Epidemiology of *Cryptococcus gattii*, British Columbia, Canada, 1999–2007. *Emerging Infectious Diseases*, 16(2): 251-257, 2010.
- GHISALBERTI, E. L. Biological and pharmacological activity of naturally occurring iridoids and secoiridoids. *Phytomedicine*, 5(2): 147-163, 1998.
- GILES, S.S.; DAGENAIS, T.R.T.; BOTTS, M.R.; KELLER, N.P. & HULL, C.M. Elucidating the pathogenesis of spores from the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Infection and Immunity*, 77(8): 3491-3500, 2009.
- GOMEZ-LOPEZ, A.; ZARAGOZA, O.; DOS ANJOS MARTINS, M.; MELHEM, M. C.; RODRIGUEZ-TUDELA, J. L. & CUENCA-ESTRELLA, M. In vitro susceptibility of *Cryptococcus gattii* clinical isolates. *Clinical Microbiology and Infection*, 14(7): 727-730, 2008.
- GRIFFITH, C. L.; KLUTTS, J. S.; ZHANG, L.; LEVERY, S. B. & DOERING, T. L. UDP-glucose dehydrogenase plays multiple roles in the biology of the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(49): 51669-51676, 2004.
- HANSON, K E.; ALEXANDER, B. D. & PERFECT, J. Drug resistance in *Cryptococcus neoformans*. *Antimicrobial Drug Resistance*, 66: 967-985, 2009.

- HEISS, C.; KLUTTS, J.S.; WANG, Z.; DOERING, T.L. & AZADI, P. The structure of *Cryptococcus neoformans* galactoxylomannan contains β -D-glucuronic acid. *Carbohydrate Research*, 344: 915–920, 2009.
- IDNURM, A.; BAHN, Y.S.; NIELSEN, K.; LIN, X.; FRASER, J.A. & HEITMAN, J. Deciphering the model pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Nature Reviews Microbiology*, 3: 753-764, 2005.
- JACOBSON, E.S. & TINNELL, S.B. Antioxidant function of fungal melanin. *Journal of Bacteriology*, 175(21): 7102-7104, 1993.
- JENSEN, S.R. Systematic implications of the distribution of iridoids and other chemical compounds in the Loganiaceae and other families of the Asteridae. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 79(2): 284-302, 1992.
- JENSEN, S. R.; FRANZVK, H. & WALLANDER, E. Chemotaxonomy of the Oleaceae: iridoids as taxonomic markers. *Phytochemistry*, 60: 213-231, 2002.
- KANAFANI, Z. A. & PERFECT, J. R. Resistance to antifungal agents: mechanism and clinical impact. *Clinical Infectious Disease*, 46(1): 120-128, 2008.
- KELLY, S. L.; LAMB, D. C.; TAYLOR, M.; CORRAN, A. J.; BALDWIN, B. C.; POWDERLY, W. G. Resistance to amphotericin B associated with defective sterol $\Delta^{8\rightarrow7}$ isomerase in a *Cryptococcus neoformans* strain from an AIDS patient. *FEMS Microbiology Letters*, 122(1-2): 39-42, 1994.
- KHAN, Z. U.; RANDHAWA, H. S.; CHEHADEH, W.; CHOWDHARY, A.; KOWSHIK, T. & CHANDY, R. *Cryptococcus neoformans* serotype A and *Cryptococcus gattii* serotype B isolates differ in their susceptibilities to fluconazole and voriconazole. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 33: 559-563, 2009.
- 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). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(49): 17259-17263, 2004.
- KIDD, S. E.; CHOW, Y.; MAK, S.; BACH, P. J.; CHEN, H.; HINGSTON, A. O.; KRONSTAD, J. W. & BARTLETT, K. H. Characterization of environmental sources of the human and animal pathogen *Cryptococcus gattii* in British Columbia, Canada, and the Pacific Northwest of the United States. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(5): 1433-1443, 2007.
- KINGSBURY, J. M.; YANG, Z.; GANOUS, T. M.; COX, G. M. & McCUSKER, J. H. *Cryptococcus neoformans* llv2p confers resistance to sulfometuron methyl and is required for survival at 37 °C and *in vivo*. *Microbiology*, 150: 1547-1558, 2004a.
- KINGSBURY, J. M.; YANG, Z.; GANOUS, T. M.; COX, G. M. & McCUSKER, J. H. Novel chimeric spermidine synthase-saccharopine dehydrogenase gene (SPE3-LYS9) in the human pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryotic Cell*, 3(3): 752–763, 2004b.

- KOCH, I.; RAPINI, A.; KINOSHITA, L. S.; SIMÕES, A. O. & SPINA, A. P. Apocynaceae. In: *Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro*. (<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB33605>), 2012.
- KOZUBOWSKI, L. & HEITMAN, J. Profiling a killer, the development of *Cryptococcus neoformans*. *FEMS Microbiology Reviews*, 36(1): 78–94, 2012.
- KONTOYIANNIS, D. P. & LEWIS, R. E. Antifungal drug resistance of pathogenic fungi. *The Lancet*, 359: 1135-1144, 2002.
- KRAUS, P. R.; BOILY, M.; GILES, S. S.; STAJICH, J. E.; ALLEN, A.; COX, G. M.; DIETRICH, F. S.; PERFECT, J. R. & HEITMAN, J. Identification of *Cryptococcus neoformans* temperature-regulated genes with genomic-DNA microarray. *Eukaryotic Cell*, 3(5): 1249-1260, 2004.
- KRISHNARAO, T. V. & GALGANI, J. N. Comparison of the in vitro activities of the echinocandin LY303366, the pneumocandin MK-0991, and fluconazole against *Candida* species and *Cryptococcus neoformans*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 41(9): 1957-1960, 1997.
- KRONSTAD, J.; JUNG, W.H.; & HU, G. Beyond the big three: systematic analysis of virulence factors in *Cryptococcus neoformans*. *Cell Host & Microbe*, 4(16): 308-310, 2008
- KRONSTAD, J. W.; ATTARIAN, R.; CADIEUX, B.; CHOI, J.; D'SOUZA, C.A.; GRIFFITHS, E.J.; GEDDES, J.M.H.; HU, G.; JUNG, W.H.; KRETSCHMER, M.; SAIKIA, S. & WANG, J. Expanding fungal pathogenesis: *Cryptococcus* breaks out of the opportunistic box. *Nature Reviews Microbiology*, 9: 193-203, 2011.
- KUMAR, P.; YANG, M.; HAYNES, B.C.; SKOWYRA, M. L. & DOERING, T. L. Emerging themes in cryptococcal capsule synthesis. *Current Opinion in Structural Biology*, 21: 597-602, 2011.
- KUPCHAN, S. M.; DESSERTINE, A. L.; BLAYLOCK, B. T. & BRYAN, R. F. Isolation and structural elucidation of allamandin, an antileukemic iridoid lactone from *Allamanda cathartica*. *The Journal of Organic Chemistry*, 39(17): 2477-2482, 1974.
- KWON-CHUNG, K.J.; POLACHEK, I. & POPKIN, T.J. Melanin-lacking mutants of *Cryptococcus neoformans* and their virulence for mice. *Journal of Bacteriology*, 150(3): 1414-1421, 1982.
- LEE, H.; BIEN, C.M.; HUGHES, A.L.; ESPENSHADE, P.J.; KWON-CHUNG, K.J. & CHANG, Y.C. Cobalt chloride, a hypoxia-mimicking agent, targets sterol synthesis in the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Molecular Microbiology*, 65: 1018-1033, 2007.
- LIN, X.; HULL, C.M. & HEITMAN, J. Sexual reproduction between partners of the same mating type in *Cryptococcus neoformans*. *Nature*, 434: 1017-1021, 2005.
- LIN, X. & HEITMAN, J. The biology of the *Cryptococcus neoformans* species complex. *Annual Review of Microbiology*, 60: 69–105, 2006.
- LIN, X. *Cryptococcus neoformans*: morphogenesis, infection, and evolution. *Infection, Genetics and Evolution*, 9: 401-416, 2009.

- LIU, L.; TEWARI, R.P. & WILLIAMSON, P.R. Laccase protects *Cryptococcus neoformans* from antifungal activity of alveolar macrophages. *Infection and Immunity*, 67(11): 6034-6039, 1999.
- LIU, G.Y. & NIZET, V. Color me bad: microbial pigments as virulence factors. *Trends in Microbiology*, 17(9): 406-413, 2009.
- LITVINTSEVA, A.P.; THAKUR, R.; VILGALYS, R. & MITCHELL, T. G. Multilocus sequence typing reveals three genetic subpopulations of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* (serotype A), including a unique population in Botswana. *Genetics*, 172: 2223-2238, 2006.
- LORENZI, H. & SOUZA, H. M. *Plantas ornamentais no Brasil, arbustivas, herbáceas e trepadeiras*. 4. ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2008.
- MA, H. & MAY, R. C. Virulence in *Cryptococcus* species. *Advances in Applied Microbiology*, 67: 131-190, 2009.
- MACDOUGALL, L.; KIDD, S. E.; GALANIS, E.; MAK, S.; LESLIE, M. J.; CIESLAK, P. R.; KRONSTAD, J. W.; MORSHED, M. G. & BARTLETT, K. H. Spread of *Cryptococcus gattii* in British Columbia, Canada, and Detection in the Pacific Northwest, USA. *Emerging Infectious Disease*, 13(1): 42-50, 2007.
- MCFADDEN, D.; ZARAGOZA, O. & CASADEVALL, A. The capsular dynamics of *Cryptococcus neoformans*. *TRENDS in Microbiology*, 14(11): 497-505, 2006.
- MALHEIROS, A.; SCHUQUEL, I. T. A. & VIDOTTI, G. J. Atribuição inequívoca de deslocamentos químicos de RMN de ^1H e ^{13}C de plumierídeo isolado da *Allamanda cathartica*. *Química Nova*, 20(5): 457-459, 1997.
- MARTINEZ, L. R.; GARCIA-RIVERA, J. & CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (serotype D) strains are more susceptible to heat than *C. neoformans* var. *grubii* (serotype A) strains. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(9): 3365-3367, 2001.
- MEYER, W.; MARSZEWSKA, K.; AMIRMOSTOFIAN, M.; IGREJA, R. P.; HARDTKE, C.; METHLING, K.; VIVIANI, M. A.; CHINDAMPORN, A.; SUKROONGREUNG, S.; JOHN, M. A.; ELLIS, D. H.; TANIA C. SORRELL. Molecular typing of global isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* by polymerase chain reaction fingerprinting and randomly amplified polymorphic DNA - a pilot study to standardize techniques on which to base a detailed epidemiological survey. *Electrophoresis*, 20: 1790-1799, 1999.
- MEYER, W.; CASTAÑEDA, A.; JACKSON, S.; HUYNH, M.; CASTAÑEDA, E. & Ibero American Cryptococcal Study Group. Molecular typing of IberoAmerican *Cryptococcus neoformans* isolates. *Emerging Infectious Diseases*, 9(2): 189-195, 2003.
- MISSALL, T. A.; PUSATERI, M. E. & LODGE, J. K. Thiol peroxidase is critical for virulence and resistance to nitric oxide and peroxide in the fungal pathogen, *Cryptococcus neoformans*. *Molecular Microbiology*, 51(5): 1447-1458, 2004.
- MISSALL, T.A.; MORAN, J.M.; CORBETT, J.A. & LODGE, J.K. Distinct stress responses of two functional laccases in *Cryptococcus neoformans* are revealed in

the absence of the thiol-specific antioxidant Tsa1. *Eukaryotic Cell*, 4(1): 202–208, 2005.

MONDON, P.; PETTER, R.; AMALFITANO, G.; LUZZATI, R.; CONCIA, E.; POLACHECK, I. & KWON-CHUNG, K. J. Heteroresistance to fluconazole and voriconazole in *Cryptococcus neoformans*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43(8): 1856-1861, 1999.

MOYRAND, F. & JANBON, G. *UGD1*, encoding the *Cryptococcus neoformans* UDP-glucose dehydrogenase, is essential for growth at 37 °C and for capsule biosynthesis. *Eukaryotic Cell*, 3(6): 1601-1609, 2004.

NEWMAN, D. J. & CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *Journal of Natural Products*, 75: 311-335, 2012.

NGAMSKULRUNGROJ, P.; CHANG, Y.; HANSEN, B.; BUGGE, C.; FISCHER, E. & KWON-CHUNG, K. J. Characterization of the chromosome 4 genes that affect fluconazole-induced disomy formation in *Cryptococcus neoformans*. *Plos One*, 7(3): 1-8, 2012a.

NGAMSKULRUNGROJ, P.; CHANG, Y.; SIONOV, E. & KWON-CHUNG, K. J. The primary target organ of *Cryptococcus gattii* is different from that of *Cryptococcus neoformans* in a murine model. *mBio*, 3(3): e00103-12, 2012b.

NOVERR, M.C.; WILLIAMSON, P.R.; FAJARDO, R.S. & HUFFNAGLE, G.B. *CNLAC1* is required for extrapulmonary dissemination of *Cryptococcus neoformans* but not pulmonary persistence. *Infection and Immunity*, 72(3): 1693–1699, 2004.

ODDS, F.C.; BROWN, A.J.P. & GOW, N.A.R. Antifungal agents: mechanisms of action. *TRENDS in Microbiology*, 11(6): 272-279, 2003.

ODOM, A.; MUIR, S.; LIM, E.; TOFFALETTI, D.L.; PERFECT, J. & HEITMAN, J. Calcineurin is required for virulence of *Cryptococcus neoformans*. *The EMBO Journal*, 16(10): 2576-2589, 1997.

O'MEARA, T.R. & ALSPAUGH, J. A. The *Cryptococcus neoformans* capsule: a sword and a shield. *Clinical Microbiology Reviews*, 25(3): 387-408, 2012.

PEREA, S.; LÓPEZ-RIBOT, J. L.; KIRKPATRICK, W. R.; MCATEE, R. K.; SANTILLÁN, R. A.; MARTÍNEZ, M.; CALABRESE, D. & SANGLARD, D.; PATTERSON, T. F. Prevalence of molecular mechanisms of resistance to azole antifungal agents in *Candida albicans* strains displaying high-level fluconazole resistance isolated from human immunodeficiency virus-infected patients. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(10): 2676-2684, 2001.

PERFECT, J. R. *Cryptococcus neoformans*: the yeast that likes it hot. *FEMS Yeast Research*, 6: 463-468, 2006.

POSTERARO, B.; SANGUINETTI, M.; SANGLARD, D.; LA SORDA, M.; BOCCIA, S.; ROMANO, L.; MORACE, G.; FADDA, G. Identification and characterization of a *Cryptococcus neoformans* ATP binding cassette (ABC) transporter encoding gene, *CnAFR1*, involved in the resistance to fluconazole. *Molecular Microbiology*, 47(2): 357-371, 2003.

REX, J. H.; RINALDI, M. G. & PFALLER, M. A. Resistance of *Candida* species to fluconazol. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 39(1): 1-8, 1995.

RODERO, L.; MELLADO, E.; RODRIGUEZ, A. C.; SALVE, A.; GUELFAND, L.; CAHN, P.; CUENCA-ESTRELLA, M.; DAVEL, G. & RODRIGUEZ-TUDELA, J. L. G484S amino acid substitution in lanosterol 14- α demethylase (*ERG11*) is related to fluconazole resistance in a recurrent *Cryptococcus neoformans* clinical isolate. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(11): 3653-3656, 2003.

RODRIGUES, M. L.; ALVAREZ, M.; FONSECA, F. L. & CASADEVALL, A. Binding of the wheat germ lectin to *Cryptococcus neoformans* suggest an association of chitinlike structures with yeast budding and capsular glucuronoxylomannan. *Eukaryotic Cell*, 7(4): 602-609, 2008.

ROSA E SILVA, L. K.; STAATS, C. C.; GOULART, L. S.; MORELLO, L. G.; FUNGARO, M. H. P.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. Identification of novel temperature-regulated genes in the human pathogen *Cryptococcus neoformans* using representational difference analysis. *Research in Microbiology*, 159: 221-229, 2008.

SAKANE, M. Revisão do gênero *Allamanda* L. (Apocynaceae) no Brasil. Dissertação de Mestrado, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1981.

SAMPAIO-SANTOS, M. I. & KAPLAN, M. A. C. Biosynthesis significance of iridoids in chemosystematics. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 12(2): 144-153, 2001.

SANGLARD, D. & ODDS, F. C. Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. *The Lancet Infectious Diseases*, 2: 73-85, 2002.

SIA, R.A.; LENGELER, K.B.; HEITMAN, J. Diploid strains of the pathogenic basidiomycete *Cryptococcus neoformans* are thermally dimorphic. *Fungal Genetics and Biology*, 29: 153-163, 2000.

SIONOV, E.; CHANG, Y. C.; GARRAFFO, H. M. & KWON-CHUNG, K. J. Heteroresistance to fluconazole in *Cryptococcus neoformans* is intrinsic and associated with virulence. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(7): 2804-2815, 2009.

SIONOV, E.; LEE, H.; CHANG, Y. C.; & KWON-CHUNG, K. J. *Cryptococcus neoformans* overcomes stress of azole drugs by formation of disomy in specific multiple chromosomes. *Plos Pathogens*, 6(4): e1000848, 2010.

SOUZA, V. C. & LORENZI, H. *Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II*. 2. ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2008.

SPRINGER, D.J.; PHADKE, S.; BILLMYER, R.B. & HEITMAN, J. *Cryptococcus gattii*, no longer an accidental pathogen. *Current Fungal Infection Reports*, 6(4): 254-256, 2012

STEEN, B. R.; LIAN, T.; ZUYDERDUYN, S.; MACDONALD, W. K.; MARRA, M.; JONES, S. J. M. & KRONSTAD, J. W. Temperature-regulated transcription in the

pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Genome Research*, 12: 1386-1400, 2002.

TIWARI, T. N.; PANDEY, V. B. & DUBEY, N. K. Plumieride from *Allamanda cathartica* as an antidermatophytic agent. *Phytotherapy Research*, 16: 393–394, 2002.

TRILLES, L.; FERNÁNDEZ-TORRES, B.; LAZÉRA, M. S.; WANKE, B. & GUARRO, J. In vitro antifungal susceptibility of *Cryptococcus gattii*. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(10): 4815-4817, 2004.

TSCHARKE, R.L.; LAZERA, M.; CHANG, Y.C.; WICKES, B.L. & KWON-CHUNG, K.J. Haploid fruiting in *Cryptococcus neoformans* is not mating type α -specific. *Fungal Genetics and Biology*, 39: 230-237, 2003.

TUNDIS, R.; LOIZZO, M.R.; MENICHINI, F.; STATTI, G.A. & MENICHINI, F. Biological and pharmacological activities of iridoids: recent developments. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry* 8(4): 399-420, 2008.

VARMA, A. & KWON-CHUNG, K. J. Heteroresistance of *Cryptococcus gattii* to fluconazole. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(6): 2303-2311, 2010.

VECCHIARELLI, A. & MONARI, C. Capsular Material of *Cryptococcus neoformans*: Virulence and much more. *Mycopathologia*, 173(5-6): 375-386, 2012.

VELAGAPUDI, R.; HSUEH, Y.P.; GEUNES-BOYER, S.; WRIGHT, J.R. & HEITMAN, J. Spores as infectious propagules of *Cryptococcus neoformans*. *Infection and Immunity*, 77(10): 4345-4355, 2009.

VERMES, A.; GUCHELAAR, H. J. & DANKERT, J. Flucytosine: a review of its pharmacology, clinical indications, pharmacokinetics, toxicity, and drug interactions. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 46: 171-179, 2000.

Von POSER, G. L. Iridoides carbocíclicos: importância taxonômica e biossíntese. Tese de Doutorado, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1997.

XU, J.; VILGALYS, R. & MITCHELL, T. G. Multiple gene genealogies reveal recent dispersion and hybridization in the human pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Molecular Ecology*, 9: 1471–148, 2000.

WANG, Y. & CASADEVALLI, A. Growth of *Cryptococcus neoformans* in presence of L-Dopa decreases its susceptibility to amphotericin B. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 38(11): 2648-2650, 1994.

WICKES, B.L.; MAYORGA, M.E.; EDMAN, U. & EDMAN, J.C. Dimorphism and haploid fruiting in *Cryptococcus neoformans*: Association with the α -mating type. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93: 7327-7331, 1996.

ZARAGOZA, O.; FRIES, B.C. & CASADEVALL, A. Induction of capsule growth in *Cryptococcus neoformans* by mammalian serum and CO₂. *Infection and Immunity*, 71(11): 6155-6164, 2003.

ZARAGOZA, O. & CASADEVALL, A. Experimental modulation of capsule size in *Cryptococcus neoformans*. *Biological Procedures Online*, 6(1): 10-15, 2004.

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

ZHU, X. & WILLIAMSON, P.R. Role of laccase in the biology and virulence of *Cryptococcus neoformans*. *FEMS Yeast Research*, 5: 1-10, 2004.

Apêndice

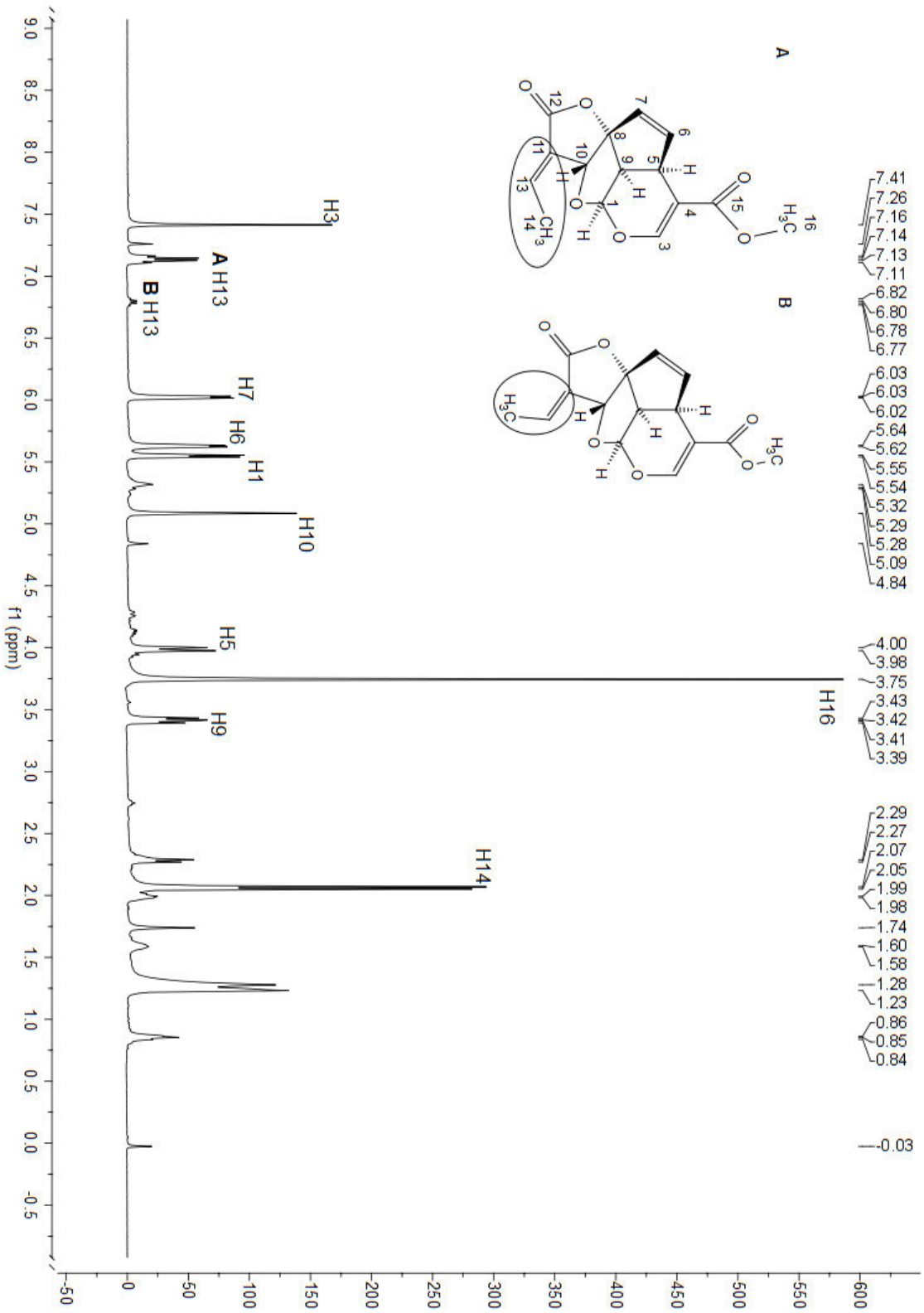


Figura 1: Espectro de RMN ^1H (400 MHz) da mistura de plumericina (A) e isoplumericina (B) em CDCl_3 . A mistura foi isolada por cromatografia do extrato aquoso bruto de sementes de *Allamanda polyantha*. Estrutura da molécula e identificação dos sinais foi feita de acordo com Elsässer *et al.* (2005).

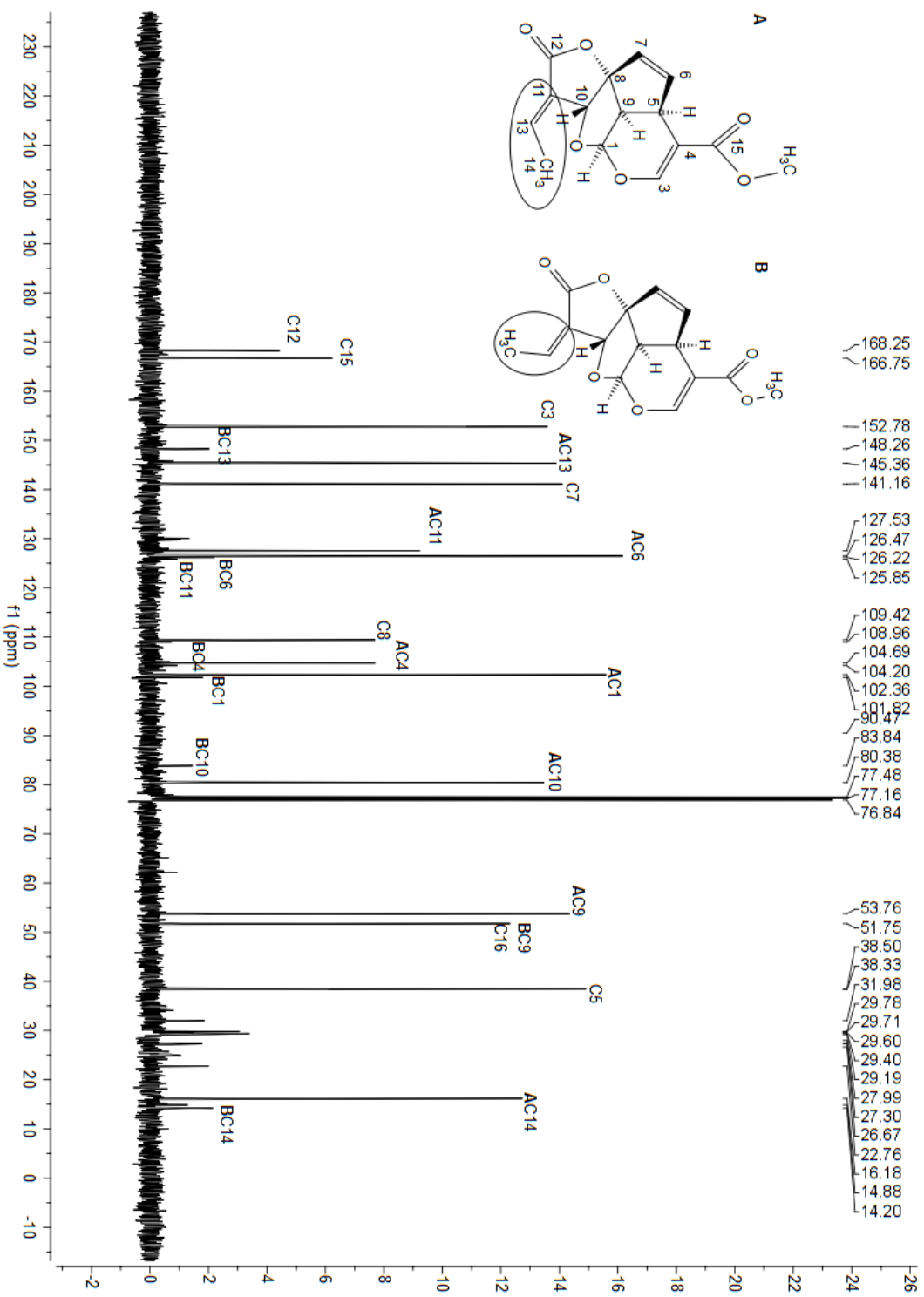


Figura 2: Espectro de RMN ^{13}C (101 MHz) da mistura de plumericina (A) e isoplumericina (B) em CDCl_3 . A mistura foi isolada por cromatografia do extrato aquoso bruto de sementes de *Allamanda polyantha*. Estrutura da molécula e identificação dos sinais foi feita de acordo com Elsässer *et al.* (2005).

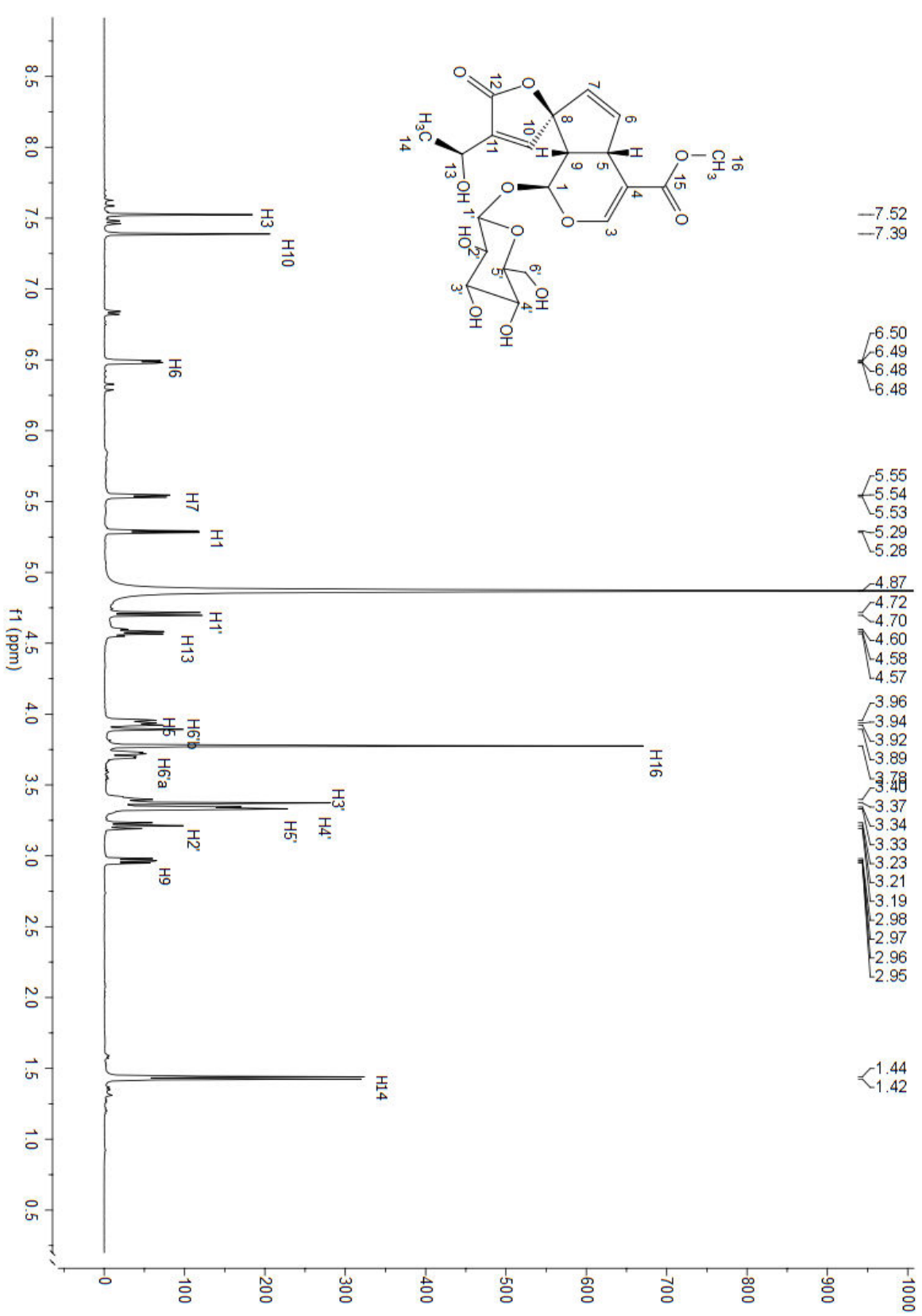


Figura 3: Espectro de RMN ^1H (400 MHz) de plumierideo em CD_3OD . O composto foi isolado por cromatografia do extrato aquoso bruto de sementes de *Allamanda polyantha*. Estrutura da molécula e identificação dos sinais foi feita de acordo com Malheiros *et al.* (1997).

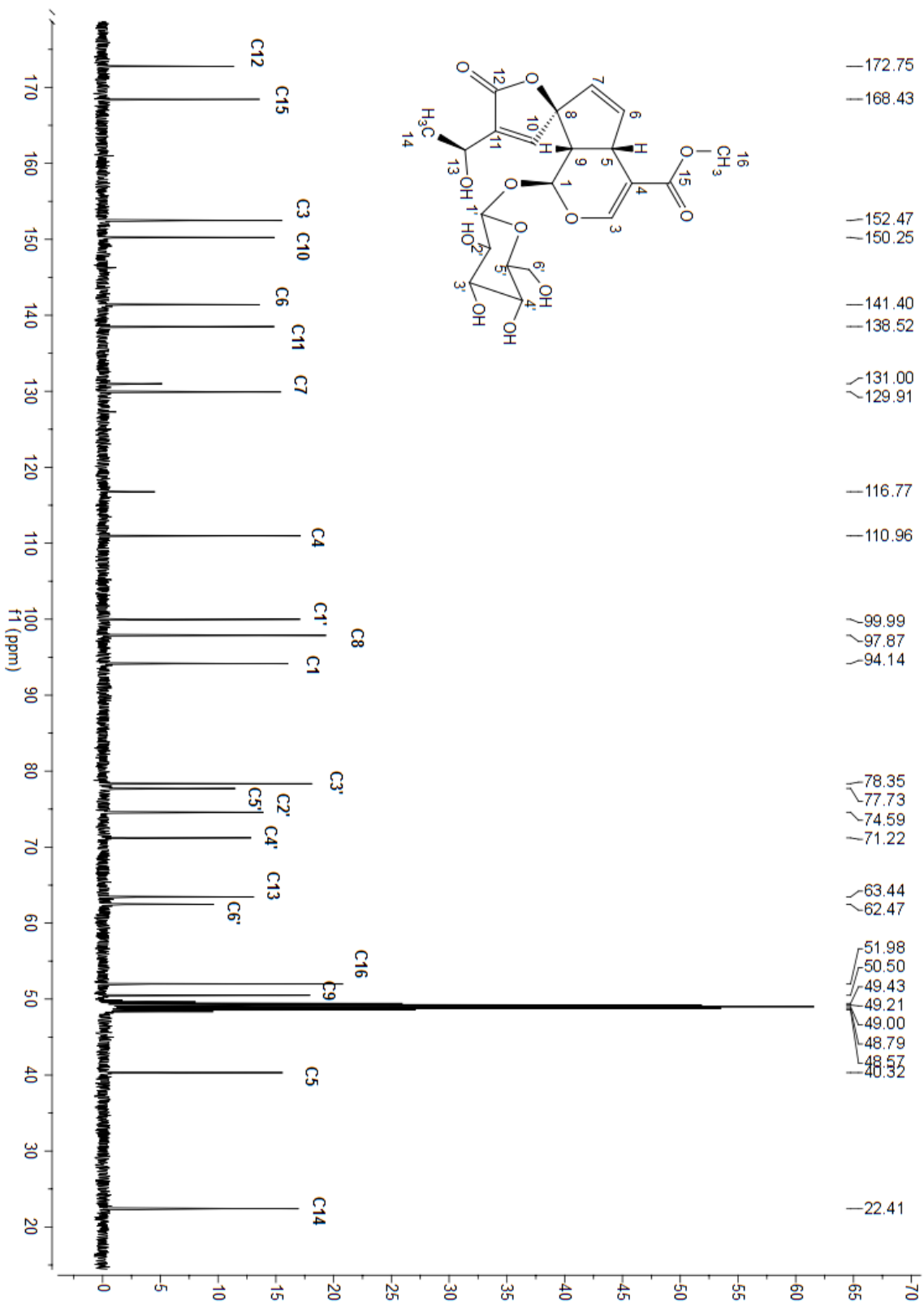


Figura 4: Espectro de RMN ^{13}C (101 MHz) de plumierideo em CD_3OD . O composto foi isolado por cromatografia do extrato aquoso bruto de sementes de *Allamanda polyantha*. Estrutura da molécula e identificação dos sinais foi feita de acordo com Malheiros et al. (1997).

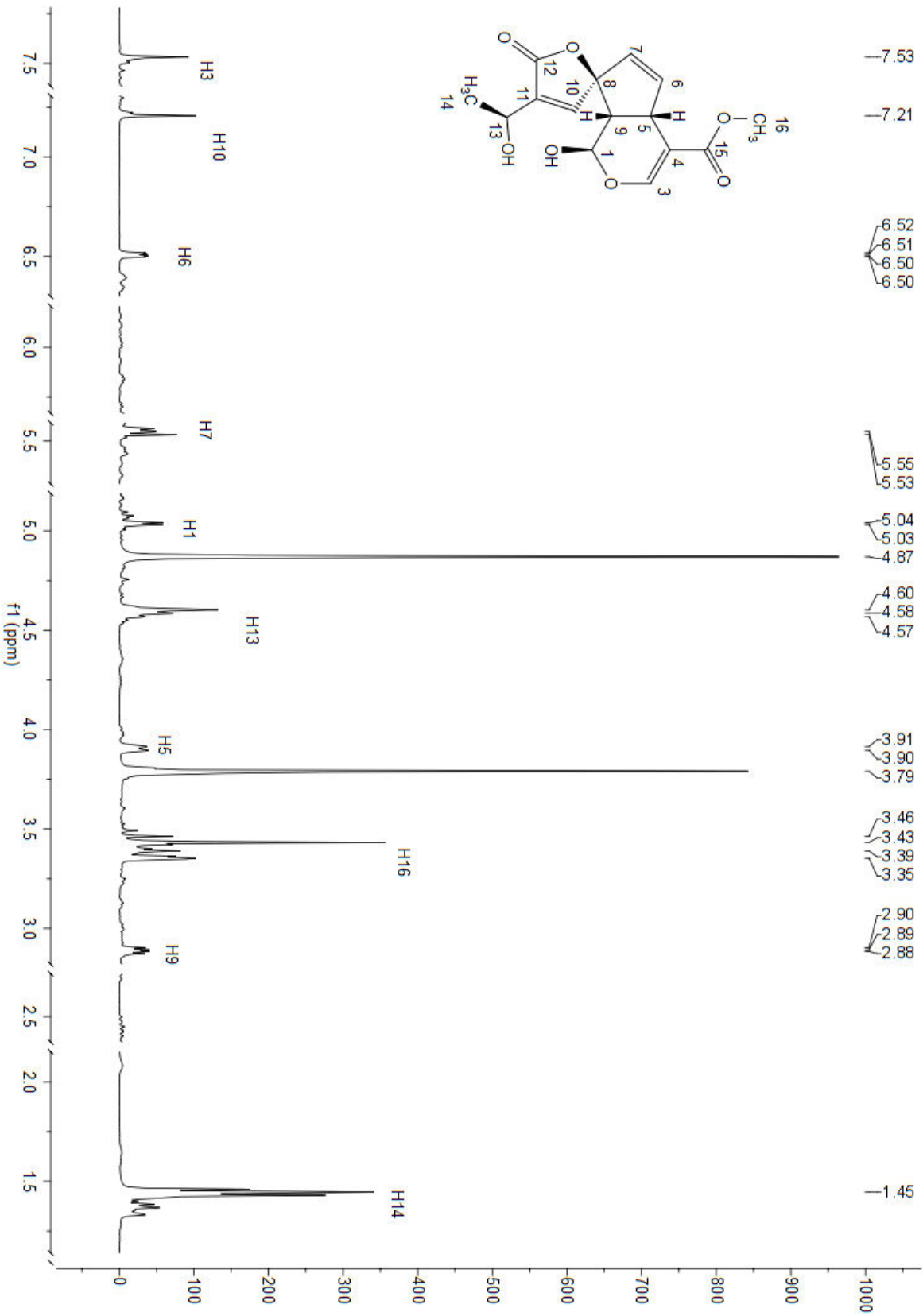


Figura 5: Espectro de RMN ¹H (400 MHz) de plumieridina em CD₃OD. O composto foi isolado por cromatografia do extrato aquoso bruto de sementes de *Allamanda polyantha*. Estrutura química desenhada de acordo com Boros & Sternitz (1991).

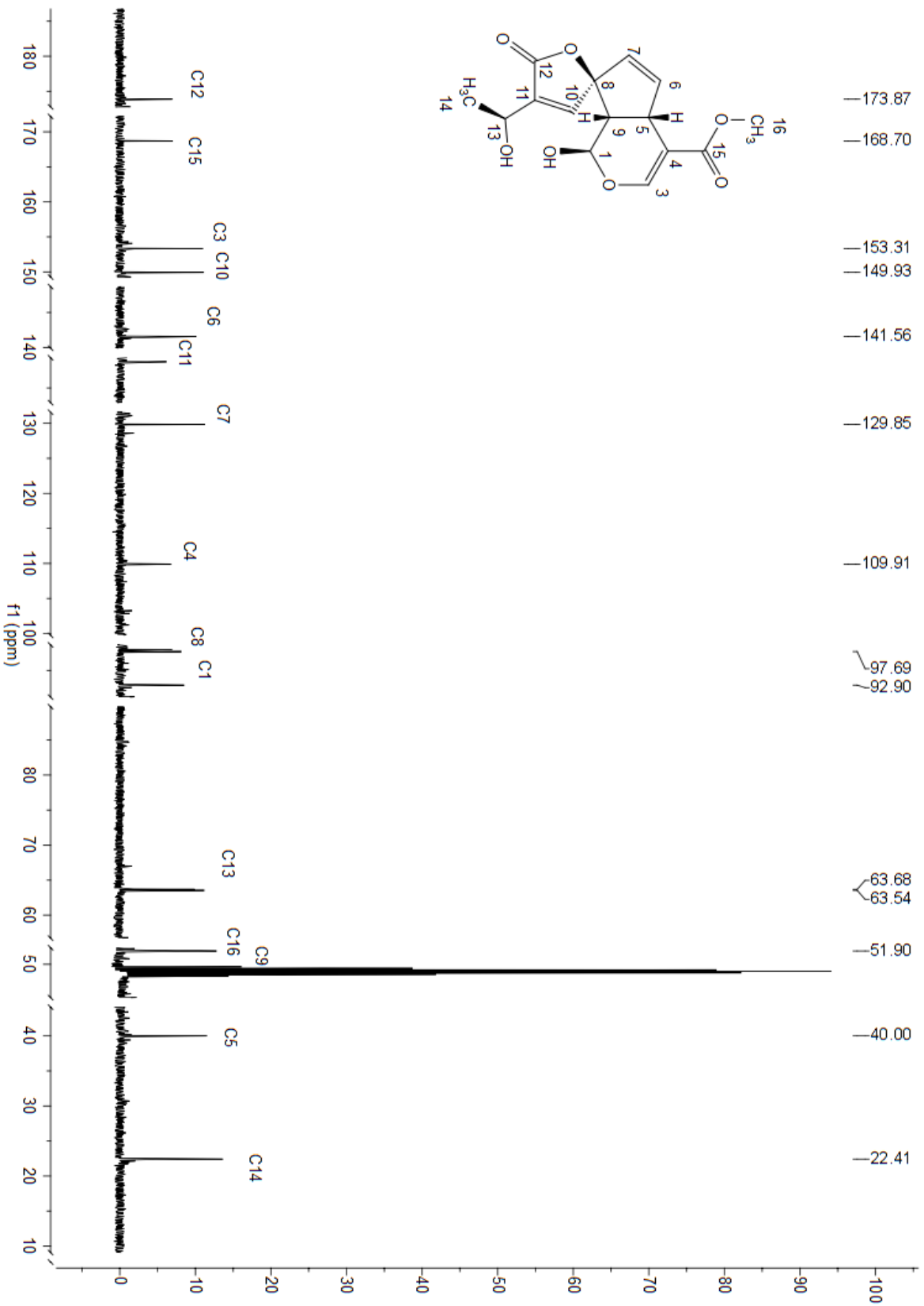


Figura 6: Espectro de RMN ¹³C (101 MHz) de plumieridina em CD₃OD. O composto foi isolado por cromatografia do extrato aquoso bruto de sementes de *Allamanda polyantha*. Estrutura química desenhada de acordo com Boros & Stermitz (1991).

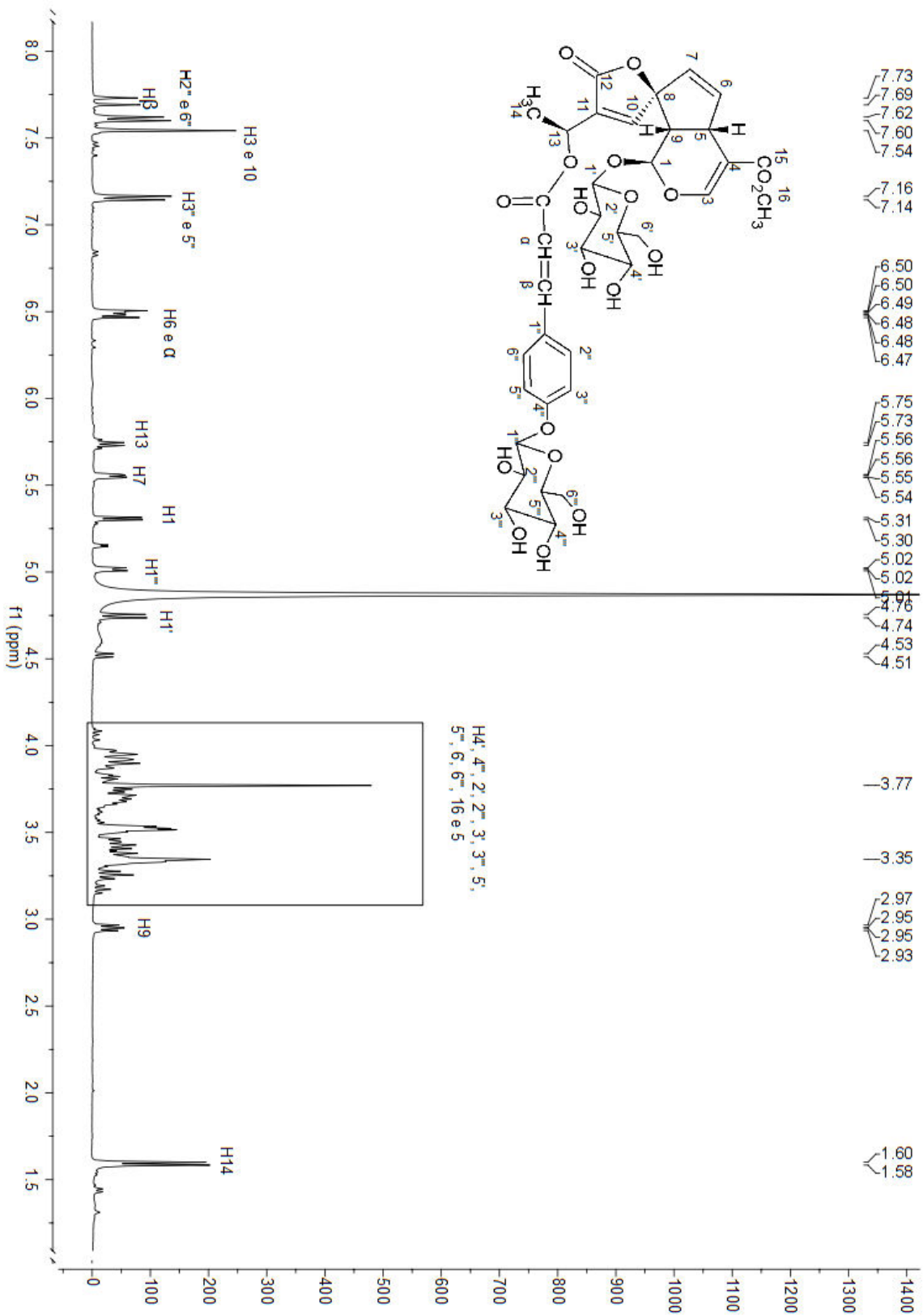


Figura 7: Espectro de RMN ^1H (400 MHz) de protoplumericina em CD_3OD . O composto foi isolado por cromatografia do extrato aquoso bruto de sementes de *Allamanda polyantha*. Estrutura química desenhada de acordo com Boros & Stermitz (1991).

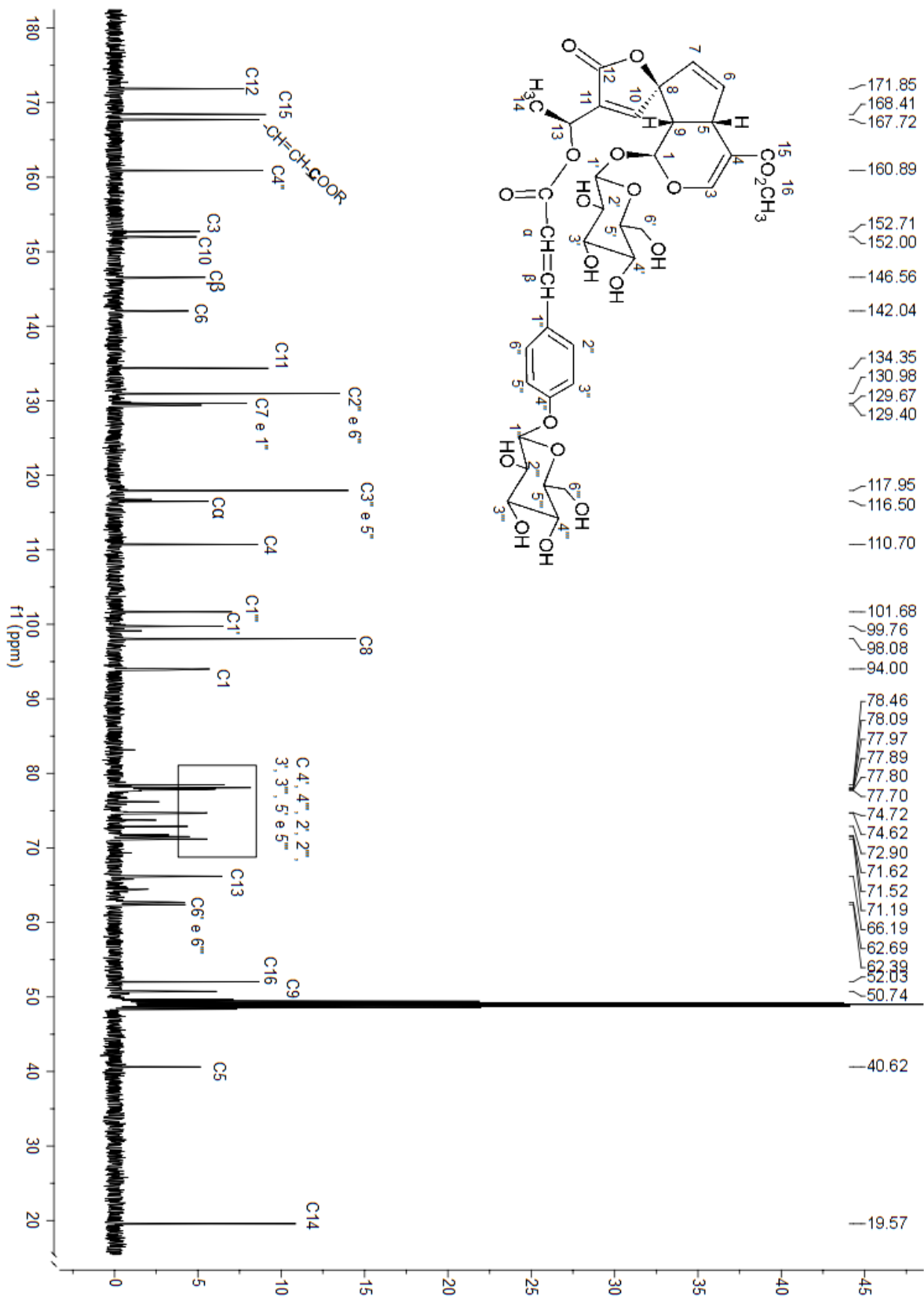


Figura 8: Espectro de RMN ^{13}C (101 MHz) de protoplumericina em CD_3OD . O composto foi isolado por cromatografia do extrato aquoso bruto de sementes de *Allamanda polyantha*. Estrutura química desenhada de acordo com Boros & Sternitz (1991).

CURRICULUM VITAE

BRESCIANI, F. R.

1. DADOS PESSOAIS

Nome: Fernanda Regina Bresciani.

Local e data de nascimento: Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil, 8 de setembro de 1988.

Endereço profissional: Laboratório de Fungos de Importância Médica e Biotecnológica, Centro de Biotecnologia, UFRGS.

Av. Bento Gonçalves 9500, prédio 43421, Porto Alegre, RS.

Telefone profissional: 3308-7767

E-mail: fernandabresciani@gmail.com

2. FORMAÇÃO: Graduada em Licenciatura em Ciências Biológicas (UFRGS, 2006 -2010).

3. ESTÁGIOS:

Estágio não remunerado de Iniciação Científica:

Entidade: UFRGS, Centro de Biotecnologia – Laboratório de Fungos de Importância Médica e Biotecnológica.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Marilene Henning Vainstein.

Trabalho realizado: Otimização de cultivo de bactéria do gênero *Luteibacter* para produção de lipases e caracterização das mesmas, visando aplicação industrial.

Período: março a outubro de 2007.

Bolsista de Iniciação Científica:

Entidade: UFRGS, Centro de Biotecnologia – Laboratório de Fungos de Importância Médica e Biotecnológica.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Marilene Henning Vainstein.

Trabalho realizado: Projeto de Clonagem, expressão e purificação de uma glioxal oxidase de *Cryptococcus neoformans*.

Período: outubro 2007 a janeiro de 2009.

Agência financiadora: CNPq.

Bolsista de Iniciação Científica:

Entidade: UFRGS, Departamento de Botânica – Laboratório de Fitogeografia e Fitoecologia.

Orientador: Prof. Dr. João André Jarenkow.

Trabalho realizado: Criação de classificação em tipos funcionais de espécies arbóreas relacionados a estratégias de estabelecimento em floresta estacional no sul do Brasil.

Período: fevereiro de 2009 a dezembro de 2010.

Agência financiadora: FAPERGS.

4. PRÊMIOS E DISTINÇÕES

Destaque da sessão Microbiologia C do XXIII Salão de Iniciação Científica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

5. EXPERIÊNCIA PROFISSIONAL OU DIDÁTICA ANTERIOR

Experiência didática

Professora voluntária de Biologia, no curso pré-vestibular popular Resgate, no período de agosto de 2008 a abril de 2009.

Bolsista de Desenvolvimento Tecnológico e Industrial

Entidade: UFRGS, Centro de Biotecnologia – Laboratório de Fungos de Importância Médica e Biotecnológica.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Marilene Henning Vainstein.

Trabalhos realizados: Avaliação da atividade enzimática de lipase da superfície esporo do fungo *Metarhizium anisopliae*, visando produção de biodiesel.

Período: janeiro a julho de 2011.

6. ARTIGOS COMPLETOS PUBLICADOS

BRESCIANI, F. R.; BEYS DA SILVA, W. O.; SANTI, L.; MACEDO, A. J.; ABRAHAM, W.R. & VAINSTEIN, M. H. Production and activity of extracellular lipase from *Luteibacter* sp. Artigo aceito para publicação na revista *Annals of Microbiology*.

BEYS DA SILVA, W. O.; SANTI, L.; CORRÊA, A. P. F.; SILVA, L. A. D.; BRESCIANI, F. R.; SCHRANK, A. & VAINSTEIN, M. H. The entomopathogen *Metarhizium anisopliae* can modulate the secretion of lipolytic enzymes in response to different substrates including components of arthropod cuticle. *Fungal Biology*, 114: 911-916, 2010.

7. RESUMOS E TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS

BRESCIANI, F. R.; BEYS DA SILVA, W. O.; SANTI, L., MACEDO, A. J. & VAINSTEIN, M. H. Otimização da produção de lipase por *Luteibacter* sp. In: XIX Salão de Iniciação Científica da Universidade Federal do Rio grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

BRESCIANI, F. R.; ROSA E SILVA, L. K.; STAATS, C. C.; SCHARANK, A. & VAINSTEIN, M. H. Clonagem, expressão e purificação de uma glioxal oxidase de

Cryptococcus neoformans. In: XX Salão de Iniciação Científica da Universidade Federal do Rio grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

BRESCIANI, F. R.; ROSA E SILVA, L. K.; STAATS, C. C.; SCHARANK, A. & VAINSTEIN, M. H. Purificação de uma glioxal oxidase da levedura patogênica *Cryptococcus neoformans*. In: I Encontro Gaúcho de Micologia, Porto Alegre, 2008.

ROSA E SILVA, L. K.; STAATS, C. C.; LEAL, A. L.; POLESE, M.; BRESCIANI, F. R.; SCHARANK, A. & VAINSTEIN, M. H. Evaluation of iron homeostasis regulation and its influence in virulence of *Cryptococcus gattii*. 54º Congresso Brasileiro de Genética, Salvador, 2008.

BRESCIANI, F. R. & JAREKOW, J. A. Tipos funcionais de espécies arbóreas relacionados a estratégias de estabelecimento em floresta estacional no sul do Brasil. In: XXII Salão de Iniciação Científica da Universidade Federal do Rio grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

BRESCIANI, F. R. & JAREKOW, J. A. Tipos funcionais de espécies arbóreas relacionados a estratégias de estabelecimento em floresta estacional no sul do Brasil. In: VI Jornada de Iniciação Científica – Meio Ambiente FZBRS/FEPAM, Porto Alegre, 2010.

BRESCIANI, F. R.; BEYS DA SILVA, W. O.; SANTI, L.; VAINSTEIN, M. H. & GUIMARAES, J. A. Characterization of Lipase Activity Produced by *Luteibacter* sp. In: XL Annual Meeting of The Brazilian Biochemistry and Molecular Biology Society - SBBq, Foz do Iguaçu, 2011.

BRESCIANI, F. R.; BEYS DA SILVA, W. O.; SANTI, L.; MACEDO, A. J.; ABRAHAM, W. R.; SCHRANK, A. & VAINSTEIN, M. H. Produção e caracterização da atividade lipolítica de *Luteibacter* sp. com potencial biotecnológico. In: XXII Salão de Iniciação Científica da Universidade Federal do Rio grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

BRESCIANI, F. R.; SANTI, L.; RODRIGUES, C. T.; BERGER, M.; von POSER, G. L.; GUIMARÃES, J. A. & VAINSTEIN, M. H. Identification and characterization of antifungal activity of seed extract of species of Apocynaceae from Rio Grande do Sul. In: XXII Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil, Bento Gonçalves, 2012.