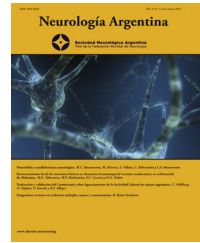




Sociedad Neurológica Argentina
Filial de la Federación Mundial
de Neurología

Neurología Argentina

www.elsevier.es/neurolarg



Artículo original

Ensayo in vitro de la asociación de simvastatina y fluconazol en cultivos de criptococos de pacientes con meningoencefalitis criptocócica que concurrieron al hospital Ángel Padilla de San Miguel de Tucumán[☆]



Juan Paz^{a,*}, José Gorostiaga^b, Patricia Campra^a, Gustavo José^c, Eugenia Matas^d y Fátima Castagnaro^e

^a Médico residente de Neurología, Hospital Padilla, San Miguel de Tucumán, Argentina

^b Bioquímico micólogo, Hospital Padilla, San Miguel de Tucumán, Argentina

^c Médico Staff de Neurología, Hospital Padilla, San Miguel de Tucumán, Argentina

^d Docente de Bioestadística, Facultad de Medicina UNT, San Miguel de Tucumán, Argentina

^e Bioquímica, Hospital Padilla, San Miguel de Tucumán, Argentina

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 27 de febrero de 2017

Aceptado el 8 de septiembre de 2017

On-line el 4 de noviembre de 2017

Palabras clave:

Criptococosis

Fluconazol

Meningitis

Simvastatina

R E S U M E N

La criptococosis meníngea es una de las infecciones oportunistas más frecuentes en pacientes con infección por VIH, con una elevada mortalidad temprana. Para el tratamiento se utiliza anfotericina B, 5-flucitosina y fluconazol. Sin embargo, la toxicidad de la anfotericina B y el aislamiento de un número creciente de cepas resistentes a fluconazol determinan la necesidad de investigar sobre tratamientos alternativos, como la utilización de la simvastatina. Este estudio evaluó las capacidades inhibitorias de la asociación de simvastatina y fluconazol en los cultivos de criptococos en LCR de pacientes con meningitis criptocócica que concurrieron al hospital Padilla durante los años 2015 y 2016. Se realizó un estudio in vitro prospectivo sobre la capacidad antifúngica de la asociaciones de simvastatina con fluconazol en los cultivos de criptococos extraídos de pacientes con criptococosis del SNC que concurrieron al hospital Padilla. Se evaluaron en las 9 muestras de criptococos los distintos tamaños de los halos de inhibición y se compararon los mismos. Hubo inhibición con las soluciones de fluconazol y en las dos asociaciones de simvastatina y fluconazol. En las comparaciones de los halos inhibitorios de las soluciones se observó un aumento

[☆] Este artículo fue realizado conjuntamente por los servicios de Neurología y de Bacteriología en el Hospital Ángel C. Padilla de la provincia de Tucumán, Argentina.

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: juajopaz@gmail.com (J. Paz).

<https://doi.org/10.1016/j.neuarg.2017.09.003>

1853-0028/© 2017 Sociedad Neurológica Argentina. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

significativo del tamaño de los halos en presencia de la simvastatina. La simvastatina tiene una seguridad comprobada, y por lo cual sería un fármaco que podría utilizarse en un estudio clínico que evalúe su eficacia en la meningitis por criptococo.

© 2017 Sociedad Neurológica Argentina. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

In vitro assay of the association of simvastatin and fluconazole in cryptococcal cultures of patients with cryptococcal meningoencephalitis treated at the Ángel Padilla Hospital in San Miguel de Tucumán, Argentina

A B S T R A C T

Keywords:
Cryptococcal
Fluconazole
Meningitis
Simvastatin

Meningeal cryptococcosis is one of the most frequent opportunistic infections in patients with HIV infection with an early mortality. The disease is treated with amphotericin B, 5-flucydosine and fluconazole. However, the toxicity of amphotericin B and the isolation of an increasing number of strains resistant to fluconazole determine the need to research into alternative treatments, such as simvastatin. This study assessed the inhibitory abilities of the combination of simvastatin and fluconazole in *Cryptococcus* cultures of CSF from patients with cryptococcal meningitis who were treated at the Padilla Hospital in 2015 and 2016. We conducted a prospective in vitro study on the antifungal effect of simvastatin combinations with fluconazole in cultures of cryptococci extracted from patients with CNS cryptococcosis who were treated at the Hospital Padilla. The different sizes of the inhibition halos were assessed in the 9 samples of cryptococci and compared. There was inhibition with fluconazole solutions and with the two combinations of simvastatin and fluconazole. In the comparisons of solution inhibitory halos a significant increase in the size of halos was observed in the presence of simvastatin. Simvastatin has proven safety and therefore would be a drug that could be used in a clinical study to evaluate its efficacy in cryptococcal meningitis.

© 2017 Sociedad Neurológica Argentina. Published by Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

Introducción

El criptococo es un basidiomiceto que se encuentra en el ambiente y cuyas levaduras son microbios intracelulares facultativos que en determinadas condiciones pueden crecer de forma independiente e infectar al humano¹. Existen dos variedades con cinco serotipos: *Cryptococcus neoformans* (A, D, AD) y *Cryptococcus gattii* (C, B). *C. neoformans* es el más frecuente como patógeno en los seres humanos, aunque *C. gattii* también puede producir enfermedad y la infección se adquiere por inhalación de las levaduras². Este hongo tiene diversos factores de virulencia, entre los cuales el más estudiado es su cápsula de polisacáridos³, una estructura dinámica que ha demostrado inhibir la fagocitosis y otras respuestas inmunes del huésped⁴. Esta cápsula está muy anclada a la pared de la levadura y está compuesta por dos polisacáridos grandes, el glucuronoxylomanano y el glucuronoxylagalactomanano⁵. Existen otros factores de virulencia además de la cápsula, como la melanina, que provee protección ante el estrés del ambiente; el manitol, que le otorga resistencia osmótica, al calor y al estrés oxidativo, y la fosfolipasa B1⁶⁻⁹. En la actualidad existen muchas investigaciones que están direccionadas a conocer las características de los factores de virulencia de estas levaduras, con el propósito de desarrollar nuevas estrategias terapéuticas¹⁰.

La infección comienza con la inhalación del hongo y con mayor frecuencia durante la infancia¹¹. En los pulmones el hongo interactúa con el sistema inmunitario del huésped, más precisamente con los macrófagos alveolares y las células dendríticas, desarrollando diversos mecanismos de adaptación para poder sobrevivir y replicarse en el interior de los fagocitos¹²⁻¹⁴. A partir de esta interacción y dependiendo del estado inmunitario del paciente, la infección por esta levadura puede limitarse al pulmón sin producir síntomas y suele evolucionar a la curación o conformando granulomas en periodo de latencia y, de acuerdo a los factores del huésped y de la virulencia del hongo, puede diseminarse a sitios extrapulmonares. Este microorganismo tiene una especial predilección por el sistema nervioso central (SNC), al que llega por vía hematogena extracelular o en el interior de un macrófago, para luego atravesar la barrera hematoencefálica (BHE)¹⁵⁻¹⁸. De esta forma, las levaduras ingresan al SNC atravesando la BHE por mecanismos transcelulares y paracelulares, o a través de un macrófago análogo a un caballo de Troya que posteriormente liberará la levadura viva por un proceso denominado vomocitosis, causando meningoencefalitis¹⁹⁻²³.

La criptococosis es una de las infecciones oportunistas más frecuentes en pacientes con infección por VIH y un gran contribuyente de la mortalidad temprana en países en desarrollo²⁴. Aunque dicho microorganismo se conoce desde hace más de cien años, con el surgimiento del sida la criptococosis ha emer-

gido como una causa muy importante de morbilidad como infección oportunista en estos pacientes, fenómeno que ha aumentado su incidencia en casi un millón de casos nuevos en el mundo, con una mayor prevalencia en el África subsahariana; en Latinoamérica se presenta con una letalidad superior al 50% de los casos a los 3 meses del diagnóstico²⁵. La meningitis por criptococo se caracteriza clínicamente por presentar insidiosamente un cuadro febril acompañado de cefalea, náuseas y vómitos, aunque también se ha observado en un cuarto de los pacientes la presencia de signos de inflamación meníngea, encefalitis, deterioro del sensorio, déficit focal y convulsiones²⁶. La sospecha de la presencia del hongo en el líquido cefalorraquídeo (LCR) se realiza luego de una punción lumbar (PL), donde puede encontrarse aumentada la presión de apertura y evidenciar hipoglucorraquia, hiperproteinorraquia y pleocitosis de predominio mononuclear en el LCR. El diagnóstico se confirma con la antigenorraquia del criptococo con una sensibilidad del 95%, y con el cultivo micológico y el examen directo con tinta china con una sensibilidad del 85 y del 75%, respectivamente^{27,28}.

El tratamiento actual de la meningitis por criptococo consiste en administrar anfotericina B y 5-flucitosina como tratamiento de inducción y luego dosis altas de fluconazol^{29,30}. Para los países en los que la 5-flucitosina no está disponible, el tratamiento de inducción se compone de anfotericina B y de altas dosis de fluconazol (800-1.200 mg/día)^{31,32}. Sin embargo, la toxicidad de la anfotericina B y el aislamiento de un número creciente de cepas resistentes a fluconazol determinan la necesidad de investigar tratamientos alternativos y estrategias novedosas³³. Pero para poder acceder a estas posibilidades es necesario estudiar el comportamiento del hongo ante determinados agentes antifúngicos que actúan inhibiendo el crecimiento de los mismos.

La utilización de estatinas, como la atorvastatina y la simvastatina, ha demostrado tener un efecto antifúngico contra el criptococo; además, esta última ha demostrado tener este efecto en concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) menores, por lo que puede utilizarse en menores cantidades que la atorvastatina. Estas drogas actúan inhibiendo a la enzima HMG-CoA reductasa e impidiendo la transformación de su sustrato en mevalonato en una etapa precoz de la síntesis de ergosterol en la pared fúngica³⁴⁻³⁶. En concordancia con estos estudios, se ha demostrado la capacidad antifúngica de la simvastatina en comparación con otras estatinas³⁷⁻³⁹. Continuando con estos aportes, este estudio evaluó las capacidades inhibitorias de la asociación de simvastatina y fluconazol en los cultivos de criptococos en LCR de pacientes con meningitis criptocócica que concurren al hospital Ángel C. Padilla durante los años 2015 y 2016.

Material y métodos

Se realizó un estudio in vitro prospectivo sobre la capacidad antifúngica de la asociación de simvastatina con fluconazol en los medios de cultivo, comparándolas con la inhibición producida por el fluconazol en cultivos de criptococos extraídos de pacientes con criptococosis del SNC que concurren al hospital Padilla durante el periodo comprendido entre los años 2015 y 2016. Se solicitó autorización a los pacientes para el

uso del material biológico mediante un consentimiento informado.

Las cepas de criptococo fueron cultivadas en placas de Petri con medios de Miller Hinton, pero no fueron tipificadas. La concentración utilizada para la simvastatina fue de 2 mg/ml. La solución de simvastatina se preparó utilizando el protocolo de Lorenz y Parks diluyendo la droga en una solución de NaOH etanólico (15% v/v de etanol y 0,25% de NaOH) a 60 °C durante una hora, obteniendo una concentración de 40 mg/ml para luego diluir en solución estéril de RPMI1640 hasta alcanzar una solución de 2 mg/ml, con la que se trabajó finalmente.

En los cultivos de la placa de Petri con medio de Miller Hinton se extrajeron por medio de un sacabocado estéril pocillos correspondientes a 50 µl, donde luego se depositaron las soluciones de OHNa, simvastatina 2 mg/ml, simvastatina 1 mg/ml, simvastatina 0,5 mg/ml, fluconazol 2 mg/ml, fluconazol 1 mg/ml y fluconazol 0,5 mg/ml, así como las asociaciones de simvastatina 0,5 mg más fluconazol 0,5 mg (1 mg/ml) y simvastatina 1 mg más fluconazol 1 mg (2 mg/ml). Se incubaron por 72 h a 37 °C y se evaluó la presencia de halos de inhibición por medio de un calibre de precisión en los 9 pocillos. Se compararon los halos inhibitorios de las soluciones de fluconazol 1 mg/ml con la asociación de fluconazol 1 mg/ml más simvastatina 1 mg/ml; fluconazol 2 mg/ml con asociación de fluconazol 1 mg/ml más simvastatina 1 mg/ml, y fluconazol 0,5 mg/ml con asociación de fluconazol 0,5 mg/ml más simvastatina 0,5 mg/ml. Se excluyeron los cultivos de LCR de pacientes expuestos a más de 3 días de terapia antifúngica.

Resultados

Se evaluaron las 9 muestras de criptococos, se evaluaron los distintos tamaños de los halos de inhibición por medio de un calibre de precisión y se compararon los mismos. Los datos se analizaron con el test estadístico de Wilcoxon para evaluar las medianas. No hubo inhibición en las soluciones de OHNa ni alrededor de los tres pocillos con las diferentes concentraciones de simvastatina. Hubo inhibición en los pocillos con las tres soluciones de fluconazol y con las dos asociaciones de simvastatina y fluconazol.

En las comparaciones de los halos inhibitorios de las soluciones de fluconazol 1 mg/ml con la asociación de fluconazol 1 mg/ml más simvastatina 1 mg/ml se observó un aumento significativo del tamaño de los halos en presencia de la simvastatina (fig. 1). Lo mismo se objetivó en las comparaciones de fluconazol 0,5 mg/ml con asociación de fluconazol 0,5 mg/ml más simvastatina 0,5 mg/ml (fig. 2). Además, no se observó diferencia significativa del tamaño de los halos en la comparación de fluconazol 2 mg/ml con asociación de fluconazol 1 mg/ml más simvastatina 1 mg/ml (fig. 3).

Discusión

A pesar de la limitación del estudio por la escasa población de criptococos estudiados, se demostró que, en las 9 muestras, la asociación de simvastatina con fluconazol tiene una mayor inhibición fúngica que el fluconazol a dosis doble. Esto plantea la hipótesis de que la asociación de fluconazol con simvastatina no solo podría utilizarse en el tratamiento de la

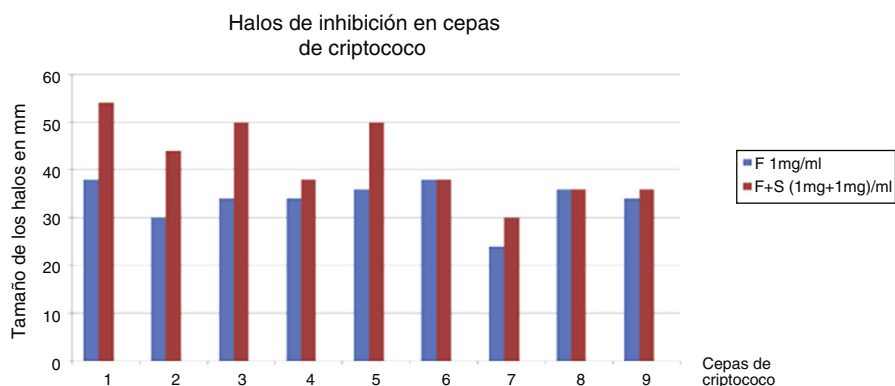


Figura 1 – Se observa una mayor inhibición en las soluciones de la asociación de 1 mg/ml de simvastatina más 1 mg/ml de fluconazol comparándola con la solución de 1 mg/ml de fluconazol ($p = 0,0156$, IC 96,1%).

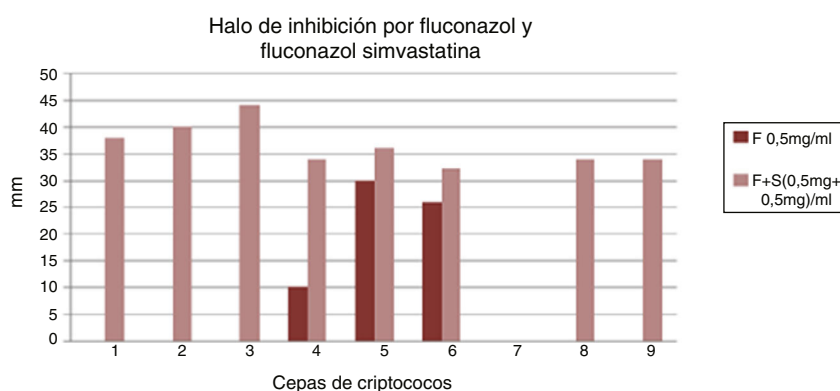


Figura 2 – Se observa una mayor inhibición en las soluciones de la asociación de 0,5 mg/ml de fluconazol más 0,5 mg/ml de simvastatina comparándola con la solución de 0,5 mg/ml de fluconazol ($p = 0,0078$, IC 96,1%). Sin embargo, en la muestra 7 no hubo ningún halo de inhibición.

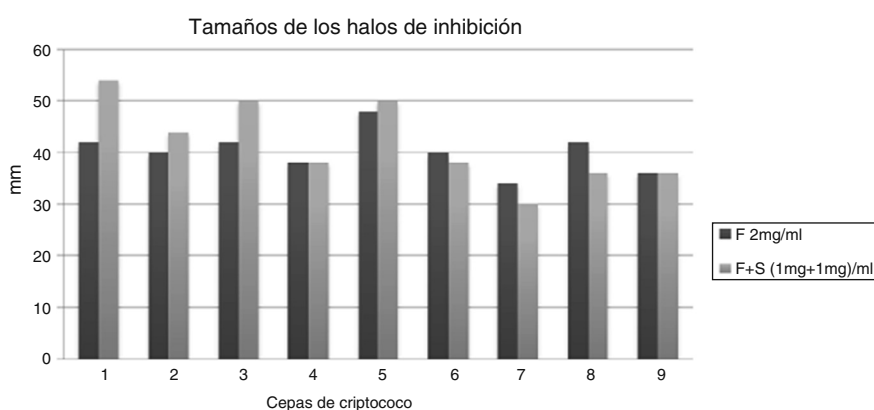


Figura 3 – No se observa diferencia significativa en la comparación de las soluciones de la asociación de 1 mg/ml de fluconazol más 1 mg/ml de simvastatina comparándola con la solución de 2 mg/ml de fluconazol ($p = 0,5781$, IC 96,1%).

meningitis por criptococo, sino también disminuir la dosificación del fluconazol reduciendo los efectos adversos del azol a dosis elevadas administrado en estos pacientes. Este pequeño estudio in vitro contribuye a los estudios previos³⁷⁻³⁹ que sostienen la hipótesis de que la simvastatina podría actuar como un fármaco sinergista en la inhibición fúngica en las infecciones causadas por el criptococo. Sin embargo, se necesitan estudios clínicos para confirmarla.

Hay que tener en cuenta que existe contraindicación en el uso de simvastatina en pacientes con terapia antirretroviral (TARV) debido a que esta interacción eleva los niveles plasmáticos de la estatina, aumentando el riesgo de rabdomiólisis^{40,41}. Sin embargo, en los pacientes que padecen meningitis por criptococo el uso de TARV debe retardarse hasta completar el tratamiento de la infección fúngica, ya que existe un elevado riesgo de desencadenarse un síndrome de

reconstitución inmune⁴²⁻⁴⁴. Es por esto que en la actualidad se aconseja comenzar la TARV luego del tratamiento de la criptococosis meníngea⁴⁵. Además, la simvastatina es la estatina con el perfil de seguridad mejor estudiado^{46,47}, y por ello sería un fármaco que podría utilizarse en la realización de un estudio clínico que evalúe su eficacia en el tratamiento de la meningitis por criptococo.

Responsabilidades éticas

Protección de personas y animales. Los autores declaran que para esta investigación no se han realizado experimentos en seres humanos ni en animales.

Confidencialidad de los datos. Los autores declaran que han seguido los protocolos de su centro de trabajo sobre la publicación de datos de pacientes.

Derecho a la privacidad y consentimiento informado. Los autores han obtenido el consentimiento informado de los pacientes y/o sujetos referidos en el artículo. Este documento obra en poder del autor de correspondencia.

Financiación

Este estudio se llevó a cabo con recursos propios de los investigadores.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

BIBLIOGRAFÍA

1. Steenbergen JN, Nosanchuk JD, Malliaris SD, Casadevall A. *Cryptococcus neoformans* virulence is enhanced after growth in the genetically malleable host *Dictyostelium discoideum*. Infect Immun. 2003;71:4862-72.
2. Kwon-Chung KJ, Varma A. Do major species concepts support one, two or more species within *Cryptococcus neoformans*? FEMS Yeast Res. 2006;6:574-87.
3. Vecchiarelli A, Pericolini E, Gabrielli E, Kenno S, Perito S, Cenci E, et al. Elucidating the immunological function of the *Cryptococcus neoformans* capsule. Future Microbiol. 2013;8:1107-16.
4. Janbon G, Doering TL. Biosynthesis and genetics of the cryptococcal capsule. En: Heitman J, Kozel TR, Kwon-Chung KJ, Perfect JR, Casadevall A, editores. *Cryptococcus: From Human Pathogen to Model Yeast*. Washington, DC: ASM Press; 2011. p. 27-42.
5. Gates MA, Thorkildson P, Kozel TR. Molecular architecture of the *Cryptococcus neoformans* capsule. Mol Microbiol. 2004;52:13-24.
6. Upadhyaya R, Campbell LT, Donlin MJ, Aurora R, Lodge JK. Global transcriptome profile of *Cryptococcus neoformans* during exposure to hydrogen peroxide induced oxidative stress. PLoS One. 2013;8:e55110.
7. Heitman J, Kozel TR, Kwon-Chung KJ, Perfect JR, Casadevall A. *Cryptococcus* From Human Pathogen to Model Yeast. Washington DC: ASM Press; 2011.
8. Ding C, Festa RA, Chen YL, Espart A, Palacios Ò, Espín J, et al. *Cryptococcus neoformans* copper detoxification machinery is critical for fungal virulence. Cell Host Microbe. 2013;13:265-76.
9. Almeida F, Wolf JM, Casadevall A. Virulence-associated enzymes of *Cryptococcus neoformans*. Eukaryot Cell. 2015;14:1173-85.
10. Srikanta D, Santiago-Tirado FH, Doering TL. *Cryptococcus neoformans*: historical curiosity to modern pathogen. Yeast. 2014;31:47-60.
11. Goldman DL, Khine H, Abadi J, Lindenberg DJ, Pirofski L, Niang R, et al. Serologic evidence for *Cryptococcus neoformans* infection in early childhood. Pediatrics. 2001;107:E66.
12. Fairn GD, Grinstein S. How nascent phagosomes mature to become phagolysosomes. Trends Immunol. 2012;33:397-405.
13. Feldmesser M, Kress Y, Novikoff P, Casadevall A. *Cryptococcus neoformans* is a facultative intracellular pathogen in murine pulmonary infection. Infect Immun. 2000;68:4225-37.
14. Davis MJ, Eastman AJ, Qiu Y, Gregorka B, Kozel TR, Osterholzer JJ, et al. *Cryptococcus neoformans* induced macrophage lysosome damage crucially contributes to fungal virulence. J Immunol. 2015;194:2219-31.
15. Johnston SA, May RC. *Cryptococcus* interactions with macrophages: Evasion and manipulation of the phagosome by a fungal pathogen. Cell Microbiol. 2013;15:403-11.
16. Alanio A, Vernel-Pauillac F, Sturny-Leclerc A, Dromer F. *Cryptococcus neoformans* host adaptation: Toward biological evidence of dormancy. MBio. 2015;6:e02580-14.
17. Smith LM, Dixon EF, May RC. The fungal pathogen *Cryptococcus neoformans* manipulates macrophage phagosome maturation. Cell Microbiol. 2015;17:702-13.
18. Sorrell TC, Juillard PG, Djordjevic JT, Kaufman-Francis K, Dietmann A, Milonig A, et al. Cryptococcal transmigration across a model brain blood-barrier: Evidence of the Trojan horse mechanism and differences between *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* strain H99 and *Cryptococcus gattii* strain R265. Microbes Infect. 2016;18:57-67.
19. Tseng HK, Liu CP, Price MS, Jong AY, Chang JC, Toffaletti DL, et al. Identification of genes from the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans* related to transmigration into the central nervous system. PLoS One. 2012;7:e45083.
20. Tseng HK, Huang TY, Wu AY, Chen HH, Liu CP, Jong A. How *Cryptococcus* interacts with the blood-brain barrier. Future Microbiol. 2015;10:1669-82.
21. Charlier C, Nielsen K, Daou S, Brigitte M, Chretien F, Dromer F. Evidence of a role for monocytes in dissemination and brain invasion by *Cryptococcus neoformans*. Infect Immun. 2009;77:120-7.
22. Ma H, Croudace JE, Lammas DA, May RC. Expulsion of live pathogenic yeast by macrophages. Curr Biol. 2006;16:2156-60.
23. Nicola AM, Robertson EJ, Albuquerque P, Derengowski Lda S, Casadevall A. Nonlytic exocytosis of *Cryptococcus neoformans* from macrophages occurs in vivo and is influenced by phagosomal pH. MBio. 2011;2.
24. May RC, Stone NR, Wiesner DL, Bicanic T, Nielsen K. *Cryptococcus*: from environmental saprophyte to global pathogen. Nat Rev Microbiol. 2016;14:106-17.
25. Park BJ, Wannemuehler KA, Marston BJ, Govender N, Pappas PG, Chiller TM. Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. AIDS. 2009;23:525-30.
26. World Health Organization. Rapid Advice: Diagnosis, Prevention and Management of Cryptococcal Disease in HIV-infected Adults, Adolescents and Children. Geneva, Switzerland: W.H.O.; 2011. p. 1-37.
27. Perfect JR, Dismukes WE, Dromer F, Goldman DL, Graybill JR, Hamill RJ, et al. Clinical practice guidelines for management of cryptococcal disease: 2010 update by the Infectious Diseases Society of America. J Clin Infect Dis. 2010;50:291-322.

28. Goodman J, Kaufman L, Koenig M. Diagnosis of cryptococcal meningitis: Value of immunologic detection of cryptococcal antigen. *N Engl J Med.* 1971;285:434-6.
29. Kaplan J, Benson C, Holmes KK, Brooks JT, Pau A, Masur H, et al. Guidelines for prevention and treatment of opportunistic infections in HIV-infected adults and adolescents. Recommendations from CDC, the National Institutes of Health and the HIV Association of the Infectious Diseases Society of America. 2009;58:1-207.
30. Shoham S, Cover C, Donegan N, Fulnecky E, Kumar P. *Cryptococcus neoformans* meningitis at 2 hospitals in Washington, D.C.: Adherence of health care providers to published practice guidelines for the management of cryptococcal disease. *Clin Infect Dis.* 2005;40:477-9.
31. Loyse A, Wilson D, Meintjes G, Jarvis JN, Bicanic T, Bishop L, et al. Comparison of the early fungicidal activity of high-dose fluconazole, voriconazole, and flucytosine as second-line drugs given in combination with amphotericin B for the treatment of HIV-associated cryptococcal meningitis. *Clin Infect Dis.* 2012;54:121-8.
32. Hamill R, Sobel JD, El-Sadr W, Johnson PC, Graybill JR, Javaly K, et al. Comparison of 2 doses of liposomal amphotericin B and conventional amphotericin B deoxycholate for treatment of AIDS-associated acute cryptococcal meningitis: A randomized, double-blind clinical trial of efficacy and safety. *J Clin Infect Dis.* 2010;51:225-32.
33. Jarvis JN, Bicanic T, Harrison TS. Management of cryptococcal meningoencephalitis in both developed and developing countries. En: Heitman J, Kozel TR, Kwon-Chung KJ, Perfect JR, Casadevall A, editores. *Cryptococcus: From Human Pathogen to Model Yeast.* Washington, D.C.: ASM Press; 2011. p. 565-84.
34. Galgóczy L, Nyilasi I, Papp T, Vágvolgyi. Statins as antifungal agents. *World J Clin Infect Dis.* 2011;1:4-10.
35. Macreadie IG, Johnson G, Schlosser T, Macreadie PI. Growth inhibition of *Candida* species and *Aspergillus fumigatus* by statins. *FEMS Microbiol Lett.* 2006;262:9-13.
36. Wikke K, Westermeyer C, Macreadie IG. Biological consequences of statins in *Candida* species and possible implications for human health. *Biochem Soc Trans.* 2007;35:1529-32.
37. Nyilasi I, Kocsubé S, Pesti M, Lukács G, Papp T, Vágvolgyi C. In vitro interactions between primycin and different statins in their effects against some clinically important fungi. *J Med Microbiol.* 2010;59:200-5.
38. Cabral ME, Figueroa LIC, Fariña JI. Synergistic antifungal activity of statin-azole associations as witnessed by *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida utilis* bioassays and ergosterol quantification. *Rev Iberoam Micol.* 2013;30:31-8.
39. Brilhante RS, Caetano EP, Oliveira JS, Castelo-Branco D, Souza ER, Alencar L, et al. Simvastatin inhibits planktonic cells and biofilms of *Candida* and *Cryptococcus* species. *Braz J Infect Dis.* 2015;19:459-65.
40. Kashani A, Phillips C, Foody J, Wang Y, Mangalmurti S, Ko D, et al. Risks associated with statin therapy: A systematic overview of randomized clinical trials. *Circulation.* 2006;114:2788-97.
41. Dube M, Stein J, Aberg J, Fichtenbaum C, Gerber J, Tashima K, et al. Guidelines for the evaluation and management of dyslipidemia in human immunodeficiency virus (HIV)-infected adults receiving antiretroviral therapy: Recommendations of the HIV Medicine Association of the Infectious Disease Society of America and the Adult AIDS Clinical Trials Group. *Clin Infect Dis.* 2003;37:613-27.
42. Meya vD., Manabe Y, Boulware D, Janoff E. The immunopathogenesis of cryptococcal immune reconstitution inflammatory syndrome: Understanding a conundrum. *Curr Opin Infect Dis.* 2016;29:10-22.
43. Walker N, Scriven J, Meintjes G, Wilkinson R. Immune reconstitution inflammatory syndrome in HIV-infected patients. *HIV AIDS (Aukl).* 2015;7:49-64.
44. Huis D, Sun Y, Hung C. The immune reconstitution inflammatory syndrome related to HIV co-infections: A review. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2012;31:919-27.
45. Guía para el manejo de los pacientes adultos con infección por VIH. Dirección de SIDA y ETS. Ministerio de Salud de la Nación argentina 2013. [consultado 12 Dic 2016]. Disponible en: <http://www.msal.gob.ar/images/stories/bes/graficos/0000000109cnt-2013-05.guia-manejo-pacientes-adultos.pdf>.
46. Scandinavian Simvastatin Survival Study Group. Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: The Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). *Lancet.* 1994;344:1383-9.
47. Strandberg TE, Pyörälä K, Cook TJ, Wilhelmsen L, Faergeman O, Thorgeirsson G, et al. Mortality and incidence of cancer during 10-year follow-up of the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). *Lancet.* 2004;364:771-7.