



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS**

**ANTONIO JOSÉ DE JESUS EVANGELISTA**

**EFEITO DO BLOQUEIO DAS PROTEÍNAS Hsp90 SOBRE A SENSIBILIDADE A  
ANTIFÚNGICOS E PRODUÇÃO DE FATORES DE VIRULÊNCIA NO  
COMPLEXO *Cryptococcus neoformans/C. gattii***

**FORTALEZA-CE**

**2015**

**ANTONIO JOSÉ DE JESUS EVANGELISTA**

**EFEITO DO BLOQUEIO DAS PROTEÍNAS Hsp90 SOBRE A SENSIBILIDADE A  
ANTIFÚNGICOS E PRODUÇÃO DE FATORES DE VIRULÊNCIA NO  
COMPLEXO *Cryptococcus neoformans/C. gattii***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rossana de Aguiar Cordeiro.

Co-orientador: Prof. Dr. Marcos Fábio Gadelha Rocha.

Área de concentração: Biomedicina.

Linha de pesquisa: Doenças Infecciosas e Parasitárias.

**FORTALEZA-CE**

**2015**

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

- 
- E92e Evangelista, Antonio José de Jesus.  
Efeito do bloqueio das proteínas Hsp90 sobre a sensibilidade a antifúngicos e produção de fatores de virulência no complexo *Cryptococcus neoformans/C. gattii* / Antonio José de Jesus Evangelista. – 2015.  
88 f. : il. color.
- Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Departamento de Patologia e Medicina Legal, Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Mestrado em Ciências Médicas, Fortaleza, 2015.  
Área de Concentração: Biomedicina.  
Orientação: Profa. Dra. Rossana de Aguiar Cordeiro.  
Coorientação: Prof. Dr. Marcos Fábio Gadelha Rocha.
1. *Cryptococcus*. 2. Criptococose. 3. Proteínas de Choque Térmico HSP90. 4. *Caenorhabditis elegans*. I. Título.

---

CDD 616.96901

**ANTONIO JOSÉ DE JESUS EVANGELISTA**

**EFEITO DO BLOQUEIO DAS PROTEÍNAS Hsp90 SOBRE A SENSIBILIDADE A  
ANTIFÚNGICOS E PRODUÇÃO DE FATORES DE VIRULÊNCIA NO  
COMPLEXO *Cryptococcus neoformans/C. gattii***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas.

Área de concentração: Biomedicina.

Linha de pesquisa: Doenças Infecciosas e Parasitárias.

Aprovada em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Rossana de Aguiar Cordeiro (Orientadora)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Marcos Fábio Gadelha Rocha (Co-orientador)  
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

---

Prof. Dr. Reginaldo Gonçalves de Lima Neto  
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Aos meus pais José Antônio e Maria Salomé  
(*in memoriam*).

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, o qual é o meu guia em momentos de aflição e o refúgio em meio às turbulências.

Aos meus pais, José Antônio e Maria Salomé (*in memoriam*), que nunca mediram esforços para que a realização desse objetivo fosse alcançada, aos quais serei eternamente grato. Embora minha mãe não puder estar presente fisicamente nesse momento, tenho certeza de que onde estiver, está feliz por essa conquista que também é dela.

A minha noiva Wytatyane Camboim, seus pais Valdenor Camboim e Ana Karenina Camboim, e Luiz Camboim por me apoiarem sempre que precisei ao longo desse mestrado.

Agradeço a minha orientadora, Prof<sup>ª</sup>. Rossana de Aguiar Cordeiro, bem como ao meu co-orientador, Prof. Marcos Fábio Gadelha Rocha, que me auxiliaram na elaboração dessa pesquisa, além de terem sido fundamentais para minha formação acadêmica e profissional.

Aos demais professores que compõem o Centro Especializado em Micologia Médica – CEMM desta Instituição: Prof. José Júlio Costa Sidrim, Prof<sup>ª</sup>. Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante, Prof<sup>ª</sup>. Tereza de Jesus Pinheiro Gomes Bandeira e Prof<sup>ª</sup>. Débora Castelo Branco de Souza Collares Maia, que sempre se dispuseram a me auxiliar na realização desse trabalho.

Aos professores que compuseram as bancas de qualificação e defesa dessa dissertação, contribuindo significativamente com suas sugestões para o engrandecimento desse trabalho.

Aos meus amigos que pude conhecer durante a pós-graduação e que fazem o convívio laboral mais aprazível: em especial a Rosana Serpa que contribuiu fundamentalmente para a realização das etapas experimentais desse estudo, bem como, Jakelyne Marques, Lucas Alencar, Jonathas Sales, Jônatas Franco, Carlos Eduardo, Gláucia Guedes, David Caldas, Giovanna Riello, Jamille Alencar, Paula Bittencourt, Érica Caetano, Manoel Paiva, Silviane Praciano, Charlline Melo, Naylê Holanda, Emerson de Oliveira e Girleudo Coutinho.

Aos funcionários dessa Instituição, em especial os técnicos de laboratório, Terezinha Rodrigues e Daniel Lima, e as secretárias Ivone Fotenele, Rita de Cássia e Carolinda Soares.

A todos os professores e professoras com os quais pude aprender, desde a educação de base, ao nível superior: Patrícia Kocerginsky, Petrusk Marinho, Maria do Livramento, e em especial a Reginaldo Gonçalves que contribuiu diretamente para realização desse objetivo, além de todos terem sido meus percussores na Microbiologia Médica.

A CAPES pela concessão da bolsa e ao CNPq pelo financiamento dessa pesquisa.

A todos vocês, muitíssimo obrigado!

*“Minha vida é andar por esse país  
Prá ver se um dia descanso feliz.  
Guardando as recordações  
Das terras onde passei  
Andando pelos sertões  
Dos amigos que lá deixei.  
Chuva e Sol, poeira e carvão  
Longe de casa, sigo o roteiro mais uma estação.  
E a saudade no coração...”*

*Trecho da música – Vida de viajante.*

*Luiz Gonzaga*

## RESUMO

O Complexo *Cryptococcus neoformans/C. gattii* compreende os principais agentes da criptococose, uma importante micose de natureza sistêmica e caráter oportunista. Essas espécies são capazes de expressar múltiplos fatores de virulência que contribuem para o surgimento de resistência aos antifúngicos de uso terapêutico. Pesquisas que buscam novas medidas eficazes de terapia são necessárias. Proteínas do choque térmico (Hsp) têm se demonstrado um alvo molecular promissor em área médica para o tratamento de diversas doenças, tais como diferentes tipos de câncer e aterosclerose. Estudos demonstram que a expressão dessas chaperoninas também é necessária para a manutenção da homeostase celular em diferentes patógenos fúngicos. Nessa perspectiva, o presente estudo teve como objetivo investigar o efeito do bloqueio das proteínas Hsp90 frente à sensibilidade a antifúngicos *in vitro* em células planctônicas e sésses, produção de fatores de virulência *in vitro* e virulência *in vivo* no Complexo *Cryptococcus neoformans/C. gattii*. Para tanto, a ação das proteínas Hsp90 fúngicas foi bloqueada com o fármaco radicicol – um antibiótico capaz de inibir a atividade ATPásica das Hsp90 – e, em seguida, as culturas foram avaliadas quanto à sensibilidade *in vitro* a antifúngicos de uso terapêutico em células planctônicas e associadas em biofilmes. Também foi avaliado o efeito da inativação das Hsp90 sobre a produção dos fatores de virulência cápsula, melanina e proteases. Além disso, a virulência *in vivo* foi investigada em modelo de infecção experimental utilizando o nematódeo *Caenorhabditis elegans*. Os resultados revelaram que o radicicol inibiu o crescimento das células planctônicas de *Cryptococcus* spp. (n=12), com valores de concentração inibitória mínima (CIM) que variaram de 0,5 – 2 µg/mL. Observou-se sinergismo farmacológico entre o radicicol e os azólicos. Ademais, o bloqueio das Hsp90 potencializou o efeito dos antifúngicos *in vitro*, sobretudo para o fluconazol e o itraconazol, os quais tiveram os valores de CIM reduzidos em até 64 vezes frente às células isoladas (n=12). Embora o bloqueio das Hsp90 pelo radicicol isolado não tenha sido capaz de inibir a formação de biofilme e biofilme formado de *Cryptococcus* spp. (n=12) (p>0,05), a inativação das Hsp90 potencializou o efeito da anfotericina B e derivados azólicos, sobretudo o fluconazol, quando testados em combinação com o radicicol (p<0,05). Além disso, o bloqueio das Hsp90 reduziu significativamente o volume capsular de *Cryptococcus* spp. (n=4) (p<0,05). Porém, não observou-se diferença na produção de melanina por células tratadas com o radicicol (n=4) (p>0,05) assim como na produção de proteases pelas cepas de *Cryptococcus* spp. (n=4) (p>0,05). Em contrapartida, a inativação das Hsp90 diminuiu a virulência de *Cryptococcus* spp. *in vitro* e *in vivo* em *C. elegans* (p<0,0001) além de potencializar o efeito do fluconazol *in vitro* e *in vivo*. Portanto, as Hsp90 são um importante alvo para o desenvolvimento de estratégias antifúngicas. Todavia, estudos mais aprofundados são necessários para melhor compreender o papel das Hsp90 nos patógenos fúngicos do gênero *Cryptococcus* spp.

**Palavras-chave:** *Cryptococcus*; criptococose; Hsp90; radicicol; *Caenorhabditis elegans*.

## ABSTRACT

*Cryptococcus neoformans* species Complex comprises the main agents of cryptococcosis, an important systemic mycosis of nature and opportunistic. These species are capable of expressing multiple virulence factors that contribute to the development of resistance to antifungal therapeutic use. Research seeking new effective therapy measures are necessary. Heat shock proteins (Hsp) have been shown to be a promising molecular target for medical treatment of various diseases such as various forms of cancer and atherosclerosis. Studies have demonstrated that the expression of these chaperonins is also required for the maintenance of cellular homeostasis in different fungal pathogens. From this perspective, this study aimed to investigate the effect of blocking the protein Hsp90 front of sensitivity to antifungal agents in vitro planktonic cells and sessile, production of virulence factors in vitro and in vivo virulence in *Cryptococcus neoformans* species Complex. Therefore, the action of yeast Hsp90 protein was blocked with radicicol drug - an antibiotic capable of inhibiting the ATPase activity of Hsp90 - and then the cultures were evaluated for in vitro susceptibility to antifungal agents for therapeutic use in planktonic cells and associated in biofilms. We also assessed the effect of inactivation of Hsp90 on the production of virulence factors capsule, melanin and proteases. In addition, the in vivo virulence was investigated in a model of experimental infection using the nematode *Caenorhabditis elegans*. The results revealed that radicicol inhibited the growth of planktonic cells *Cryptococcus* spp. (n=12) with values of minimum inhibitory concentration (MIC) ranging from 0.5 to 2 µg/mL. We observed synergy between pharmacological and radicicol azoles. Furthermore, blockade of Hsp90 potentiated the effect of in vitro antifungal agents, particularly for the fluconazole and itraconazole, which MIC values were reduced by up to 64 times the face of isolated cells (n=12). Although the blockade of Hsp90 by isolated radicicol was not able to inhibit biofilm formation and biofilm formed of *Cryptococcus* spp. (n=12) (p>0.05), the inactivation of Hsp90 potentiated the effect of amphotericin B, azoles, especially fluconazole, when tested in combination with radicicol (p<0.05). Moreover, blockade of Hsp90 significantly reduced the volume of capsular *Cryptococcus* spp. (n=4) (p<0.05). However, no difference was observed in production of melanin by radicicol treated cells (n=4) (p>0.05) as well as the production of protease by strains of *Cryptococcus* spp. (n=4) (p>0.05). By contrast, inactivation of Hsp90 decreased virulence *Cryptococcus* spp. in vitro and in vivo in *C. elegans* (p<0.0001) as well as maximize the effect of fluconazole in vitro and in vivo. Therefore, Hsp90 is an important target for the development of antifungal strategies. However, further studies are needed to better understand the role of Hsp90 in fungal pathogens of the genus *Cryptococcus* spp.

**Keywords:** *Cryptococcus*; cryptococcosis; Hsp90; radicicol; *Caenorhabditis elegans*.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> –	Composição atual do Complexo <i>Cryptococcus neoformans/C. gattii</i> dividido em espécies, variedades, sorotipos e genótipos .....	22
<b>Figura 2</b> –	Aspectos morfofisiológicos do Complexo <i>Cryptococcus neoformans/C. gattii</i> .....	23
<b>Figura 3</b> –	Representação esquemática do ciclo de vida do Complexo <i>Cryptococcus neoformans/C. gattii</i> .....	24
<b>Figura 4</b> –	Imagem de microscopia eletrônica de varredura de um biofilme produzido por <i>Cryptococcus</i> spp.....	29
<b>Figura 5</b> –	Principais etapas da patogênese da criptococose.....	32
<b>Figura 6</b> –	Estimativa anual de casos de meningite criptocócica em indivíduos HIV positivos ao redor do mundo.....	33
<b>Figura 7</b> –	Estrutura química do radicicol e sítio alvo de ligação à Hsp90.....	38
<b>Figura 8</b> –	Organograma das principais etapas experimentais do estudo.....	43
<b>Figura 9</b> –	Efeito do bloqueio das Hsp90 pelo radicicol isolado e em combinação com anfotericina B sob a formação de biofilme pelo Complexo <i>Cryptococcus neoformans/C. gattii</i> .....	55
<b>Figura 10</b> –	Efeito do bloqueio das Hsp90 pelo radicicol e em combinação com itraconazol sob a formação de biofilme pelo Complexo <i>Cryptococcus neoformans/C. gattii</i> .....	56
<b>Figura 11</b> –	Efeito do bloqueio das Hsp90 pelo radicicol e em combinação com voriconazol sob a formação de biofilme pelo Complexo <i>Cryptococcus neoformans/C. gattii</i> .....	57
<b>Figura 12</b> –	Efeito do bloqueio das Hsp90 pelo radicicol e em combinação com fluconazol sob a formação de biofilme pelo Complexo <i>Cryptococcus neoformans/C. gattii</i> .....	57
<b>Figura 13</b> –	Efeito do bloqueio das Hsp90 pelo radicicol e em combinação com anfotericina B sobre a viabilidade dos biofilmes formados pelo Complexo <i>Cryptococcus neoformans/C. gattii</i> .....	58
<b>Figura 14</b> –	Efeito do bloqueio das Hsp90 pelo radicicol e em combinação com itraconazol sobre a viabilidade dos biofilmes formados pelo Complexo <i>Cryptococcus neoformans/C. gattii</i> .....	59

<b>Figura 15</b> – Efeito do bloqueio das Hsp90 pelo radicicol e em combinação com voriconazol sobre a viabilidade dos biofilmes formados pelo Complexo <i>Cryptococcus neoformans/C. gattii</i> .....	59
<b>Figura 16</b> – Efeito do bloqueio das Hsp90 pelo radicicol e em combinação com fluconazol sobre a viabilidade dos biofilmes formados pelo Complexo <i>Cryptococcus neoformans/C. gattii</i> .....	60
<b>Figura 17</b> – Produção de cápsula do Complexo <i>Cryptococcus neoformans/C. gattii</i> frente ao radicicol e ao fluconazol, isolados e em combinação.....	63
<b>Figura 18</b> – Produção de melanina por cepas do Complexo <i>Cryptococcus neoformans/C. gattii</i> na presença de radicicol.....	64
<b>Figura 19</b> – Produção de proteases e Unidades Formadoras de Colônia – UFC/mL do Complexo <i>Cryptococcus neoformans/C. gattii</i> frente ao radicicol, e aos antifúngicos, isolados e em combinação.....	65
<b>Figura 20</b> – Efeito do bloqueio das Hsp90 frente à virulência de <i>C. neoformans</i> em modelo de infecção experimental utilizando <i>C. elegans</i> .....	66
<b>Figura 21</b> – Efeito do bloqueio das Hsp90 frente à virulência de <i>C. gattii</i> em modelo de infecção experimental utilizando <i>C. elegans</i> .....	66

## LISTA DE QUADROS E TABELAS

<b>Quadro 1</b> –	Identificação, espécie, sorotipo, genótipo e origem de isolamento das cepas do Complexo <i>Cryptococcus neoformans/C. gattii</i> utilizadas no estudo.....	42
<b>Tabela 1</b> –	Concentrações inibitórias mínimas ( $\mu\text{g/mL}$ ) de radicicol, anfotericina B, itraconazol, voriconazol e fluconazol isolados, frente a células planctônicas do Complexo <i>Cryptococcus neoformans/C. gattii</i> .....	52
<b>Tabela 2</b> –	Concentrações inibitórias mínimas ( $\mu\text{g/mL}$ ) do radicicol e antifúngicos em combinação, frente a células planctônicas do Complexo <i>Cryptococcus neoformans/C. gattii</i> .....	54
<b>Tabela 3</b> –	Produção de fatores de virulência por cepas do Complexo <i>Cryptococcus neoformans/C. gattii</i> .....	62
<b>Tabela 4</b> –	Relação das cepas utilizadas nos testes de sensibilidade e virulência frente à inibição das Hsp90.....	90

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMB	Anfotericina B
AMPc	Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
ATF	Antifúngico
CEMM	Centro Especializado em Micologia Médica
CGB	Canavanina-Glicina-Azul de Bromotimol
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standard Institute</i>
FIC	Concentração Inibitória Fracionada
FICI	Índice da Concentração Inibitória Fracionária
FLU	Fluconazol
GalXM	Galactoxilomanana
GXM	Glucoronoxilomanana
Hsp	<i>Heat shock protein</i>
ITC	Itraconazol
LCR	Líquido cefalorraquidiano
MAP	<i>Mitogen Activated Protein</i>
MOPS	Ácido morfolinopropanosulfônico
RAD	Radicol
SNC	Sistema Nervoso Central
UFC/mL	Unidades Formadoras de Colônia por mililitro
VOR	Voriconazol
XTT	2,3-bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-5-[(fenilamino)carbonil]-2H hidróxido de tetrazólio
YNB	<i>Yeast Nitrogen Base</i>

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	16
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	18
2.1	PANORAMA HISTÓRICO.....	18
<b>2.1.1</b>	<b>Contexto histórico no Brasil</b> .....	20
2.2	O COMPLEXO <i>Cryptococcus neoformans/C. gattii</i> .....	21
<b>2.2.1</b>	<b>Classificação taxonômica</b> .....	21
<b>2.2.2</b>	<b>Aspectos morfofisiológicos</b> .....	22
<b>2.2.3</b>	<b>Fatores de virulência</b> .....	25
2.2.3.1	Cápsula.....	25
2.2.3.2	Melanina e lacase.....	26
2.2.3.3	Termotolerância a 37°C.....	27
2.2.3.4	Produção de enzimas.....	27
2.2.3.5	Biofilme.....	29
2.3	CRÍPTOCOCOSE: PATOGENIA, PRINCIPAIS FORMAS CLÍNICAS, DIAGNÓSTICO LABORATORIAL E EPIDEMIOLOGIA.....	31
2.4	TRATAMENTO E RESISTÊNCIA AOS ANTIFÚNGICOS.....	34
2.5	MODELOS EXPERIMENTAIS DE ESTUDO <i>in vivo</i> .....	36
2.6	Hsp90 COMO UM POTENCIAL ALVO MOLECULAR TERAPÊUTICO.....	37
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	40
3.1	OBJETIVO GERAL.....	40
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	40
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	41
4.1	LOCAL DE ESTUDO.....	41
4.2	MICRO-ORGANISMOS UTILIZADOS.....	41
4.3	DESENHO DO ESTUDO.....	43
4.4	BLOQUEIO DAS Hsp90 SOBRE A SENSIBILIDADE A ANTIFÚNGICOS DO COMPLEXO <i>C. neoformans/C. gattii</i> .....	44
<b>4.4.1</b>	<b>Células planctônicas</b> .....	44
<b>4.4.2</b>	<b>Células associadas em biofilme</b> .....	45
4.4.2.1	Bloqueio das Hsp90 frente à formação do biofilme.....	45
4.4.2.2	Bloqueio das Hsp90 frente ao biofilme formado.....	47
4.5	BLOQUEIO DAS Hsp90 FRENTE À PRODUÇÃO DE CÁPSULA.....	47

4.6	BLOQUEIO DAS Hsp90 FRENTE À PRODUÇÃO DE MELANINA.....	48
4.7	BLOQUEIO DAS Hsp90 FRENTE À PRODUÇÃO DE PROTEASES.....	49
4.8	BLOQUEIO DAS Hsp90 FRENTE À VIRULÊNCIA EM <i>Caenorhabditis elegans</i> .....	50
4.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	51
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>52</b>
5.1	EFEITO DO BLOQUEIO DAS Hsp90 SOBRE A SENSIBILIDADE A ANTIFÚNGICOS DO COMPLEXO <i>C. neoformans/C. gattii</i> .....	52
<b>5.1.1</b>	<b>Células planctônicas</b> .....	<b>52</b>
<b>5.1.2</b>	<b>Células associadas em biofilme</b> .....	<b>55</b>
5.1.2.1	Efeito do bloqueio das Hsp90 frente à formação do biofilme.....	55
5.1.2.2	Efeito do bloqueio das Hsp90 frente ao biofilme formado.....	58
5.2	PRODUÇÃO DE FATORES DE VIRULÊNCIA.....	60
5.3	EFEITO DO BLOQUEIO DAS Hsp90 FRENTE À PRODUÇÃO DE CÁPSULA.....	63
5.4	EFEITO DO BLOQUEIO DAS HSP90 FRENTE À PRODUÇÃO DE MELANINA.....	64
5.5	EFEITO DO BLOQUEIO DAS Hsp90 FRENTE À PRODUÇÃO DE PROTEASES.....	64
5.6	EFEITO DO BLOQUEIO DAS Hsp90 FRENTE À VIRULÊNCIA EM <i>Caenorhabditis elegans</i> .....	65
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>67</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>75</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>76</b>
	<b>APÊNDICE A</b> .....	<b>89</b>
	<b>ANEXO A</b> .....	<b>90</b>

## 1 INTRODUÇÃO

As micoses oportunistas são consideradas um sério problema de saúde pública mundial, pois são responsáveis por elevadas taxas de morbidade e mortalidade dos pacientes acometidos. Nos últimos anos, um número cada vez maior de espécies fúngicas têm sido consideradas agentes de micoses oportunistas. Dentre os principais responsáveis por essas enfermidades, destacam-se os fungos dos gêneros *Candida* e *Cryptococcus* entre as leveduras, *Aspergillus*, *Fusarium* e os zigomicetos dentre os filamentosos e *Histoplasma* e *Coccidioides* entre os dimórficos (ADENIS; AZNAR; COUPPIÉ, 2014; ESSER; KURZAI et al., 2014; STONE; BICANIC, 2014; MAVES; CRUM-CIANFLONE; NANCY, 2012).

O Complexo *Cryptococcus neoformans/C. gattii* é constituído por leveduras capsuladas responsáveis pela criptococose, uma micose sistêmica de caráter oportunista e distribuição cosmopolita que geralmente está associada a pacientes imunodeprimidos, como é o caso dos indivíduos com aids (COELHO; BOCCA; CASADEVALL, 2014). Segundo Park et al. (2009), estima-se que cerca de 957.900 casos de meningite criptocócica ocorrem a cada ano ao redor do mundo, resultando em 624.700 mortes anualmente. No Brasil, acredita-se que a meningite criptocócica representa cerca de 6% das infecções oportunistas em pacientes com aids, sendo a principal causa de doença infecciosa do sistema nervoso central nesses indivíduos (LUGARINE et al., 2008; PEREIRA; BARROS, 2012).

A patogênese da criptococose está diretamente associada à produção de fatores de virulência do fungo, tais como: tolerância térmica a 37°C, síntese de melanina, síntese de enzimas, sobrevivência intracelular, produção de biofilme ocorrendo em resistência a antifúngicos, e a presença da cápsula, sendo esse último o principal responsável pela patogenicidade do micro-organismo (COELHO; BOCCA; CASADEVALL, 2014). Diante dos graves problemas causados pela criptococose, a virulência fúngica e a resistência aos antifúngicos têm sido alvo de pesquisas para a produção de novas medidas eficazes de tratamento (RADAMÉS et al., 2013). Dentre os alvos celulares relacionados, destacam-se as proteínas do choque térmico - *Heat shock proteins* (Hsp).

As Hsp são chaperonas que têm por principal função auxiliar outras proteínas a alcançarem sua conformação tridimensional, sobretudo em diversas condições de estresse celular, tornando-as ativas. Recentemente, as Hsp têm sido intensamente estudadas na área médica. Diversos estudos comprovam que a Hsp90 (um tipo de Hsp de peso molecular de 90 kDa) é um alvo molecular promissor para o tratamento de várias formas de câncer e

aterosclerose (LEE et al., 2012; MADRIGAL-MATUTE et al., 2012; MIYATA et al., 2013; SCHMID; MULTHOFF, 2012; WHITESELL; SANTAGATA; NU, 2012).

Essas proteínas também têm sido investigadas em patógenos fúngicos, sobretudo, no tocante a sua importância durante o processo infeccioso (DAI et al., 2012; SHAPIRO; COWEN, 2012; SHAPIRO; COWEN, 2010; SHAPIRO et al., 2009). Embora a maioria das pesquisas seja conduzida com espécies do gênero *Candida*, sabe-se que em *C. neoformans*, as proteínas Hsp12, Hsp60, Hsp70 e Hsp90, desempenham função fundamental na instalação e desenvolvimento da infecção (BURNIE et al., 2006). Entretanto, o verdadeiro papel dessas proteínas na homeostase celular do fungo não é totalmente compreendido.

A escassez de estudos com o Complexo *Cryptococcus neoformans/C.gattii* acerca desse assunto, fundamenta a necessidade de intensificação das pesquisas para uma melhor compreensão do papel dessas moléculas na modulação da sensibilidade aos antifúngicos, produção de fatores de virulência e virulência em modelos de infecção experimental. Dessa forma, o presente estudo objetivou investigar o efeito do bloqueio das proteínas Hsp90 sobre a sensibilidade a antifúngicos *in vitro*, produção de fatores de virulência *in vitro* e virulência *in vivo* em cepas do Complexo *Cryptococcus neoformans/C. gattii*.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 PANORAMA HISTÓRICO

A primeira descrição da criptococose foi feita por Otto Busse e Abraham Buschke, quando em 1894, na cidade de Greifswald na Alemanha, acompanhavam uma paciente de 31 anos com lesão na tíbia, denominando a doença de *saccharomycosis hominis* e o agente etiológico de *Saccharomyces hominis*. Quase que simultaneamente, na Itália, Francesco Sanfelice isolou uma levedura a partir de um suco de pêsego e a denominou de *S. neoformans*, demonstrando, no ano seguinte, a patogenicidade da levedura isolada através de inoculação experimental em coelhos (HEITMAN et al., 2011).

Um ano após o isolamento da levedura, Ferdinand Curtis, na França, isolou de uma lesão de quadril uma levedura denominando-a de *S. subcutaneous tumefaciens*. Ainda no mesmo ano, Curtis isolou uma levedura de um paciente com meningite, a qual chamou de *Megelococcus myxoides*, o que viria a ser o primeiro relato de meningite causada por *Cryptococcus* spp. No entanto, àquela época, os termos *Cryptococcus* e criptococose ainda não eram consolidados, o que causava divergência na denominação do fungo e da doença provocada (BARNETT, 2010).

A partir de 1901, o pesquisador Jean-Paul Vuillemin relatou casos de criptococose em animais, isolando leveduras esféricas e encapsuladas de lesões pulmonares de suínos bem como de leite bovino e, reconhecendo que se tratava do mesmo gênero das leveduras isoladas pelos demais pesquisadores, o gênero fúngico foi renomeado como *Cryptococcus*. O gênero foi então dividido em duas espécies (*C. hominis* e *C. neoformans*), baseado na incapacidade da levedura fermentar carboidratos e não produzir ascósporos, o que diferenciava do gênero *Saccharomyces* (HEITMAN et al., 2011).

Mesmo depois da definição correta do termo *Cryptococcus*, ainda existia divergência quanto à nomenclatura das espécies do gênero e as doenças causadas por elas. A partir de 1905, Von Hanseman descreveu relatos de meningite com achados de lesões similares à tuberculoma cerebral e, em 1916, Scotdart e Cutler denominaram o fungo de *Torula histolytica* e a doença de torulose, tornando-se difícil determinar um único agente etiológico para a doença em questão (BARNETT, 2010).

Os conflitos de nomenclatura foram solucionados em 1935, quando a pesquisadora Rhoda Benham analisou os casos já relatados e, baseando-se em observações

dos aspectos morfofisiológicos, patogênicos e sorológicos dos isolados, concluiu que estes poderiam ser classificados como uma única espécie – *Cryptococcus neoformans* – a qual se diferenciava em duas variedades: *neoformans* e *grubii*. A partir de então, os termos *Cryptococcus* e criptococose foram definitivamente consolidados (BARNETT, 2010).

Baseado nos estudos de Benham, em 1949, Edward Evans caracterizou o gênero *Cryptococcus* em três sorotipos (A, B e C) baseado em reações antigênicas a partir de testes de aglutinação frente a componentes capsulares do fungo. Nos anos seguintes, foram descritos o sorotipo D e o híbrido AD (KWON-CHUNG; BENNET, 1978).

Com as pesquisas de Chester Emmons a partir de 1951, o gênero *Cryptococcus* passou a ter uma maior relevância, quando o pesquisador conseguiu estabelecer uma relação do fungo com fontes ambientais, mais precisamente com habitats de aves, sobretudo em fezes de pombos da espécie *Columba livia* e madeira em decomposição (EMMONS, 1955). Em 1962, os estudos de Friedrich Staib contribuíram de maneira significativa para uma melhor compreensão dos aspectos fisiológicos do gênero *Cryptococcus*. A partir da observação de que o fungo quando crescido em meio de cultura contendo excretas de pombos ou sementes de níger (*Guizotia abyssinica*) passava a produzir um pigmento de coloração castanha-marrom, tornava-se possível diferenciar o gênero *Cryptococcus* de outros gêneros fúngicos. Posteriormente, tal pigmento foi identificado por Shaw e Kapica (1972) como melanina (BARNETT, 2010).

Em 1970, Gattii e Eeckels descreveram um caso de meningoencefalite em uma criança de sete anos no Zaire, atual República Democrática do Congo, na África. Na ocasião, os pesquisadores relataram que o isolado se assemelhava com *C. neoformans*, no entanto tinha morfologia atípica, apresentando-se como leveduras alongadas, sendo considerada uma nova variedade denominada de *C. neoformans* variedade *gattii* (HEITMAN et al., 2011; KWON-CHUNG; BANNETT, 1978). Em 1978, Kwon-Chung e Bannett colaboradores descreveram dois tipos conjugantes chamados de *mating type a* e *a* ou *MATa* e *MATa*.

A partir de 1980, ocorreu um aumento considerável dos casos de criptococose em todo o mundo. Esse fato se deu em decorrência do surgimento e pandemia da aids, uma das principais condições predisponentes para o estabelecimento da infecção. Com isso, *Cryptococcus* spp. emergiu como um importante agente infeccioso acometendo de 5 a 10% dos indivíduos com aids. Os próximos anos foram marcados pela rápida expansão nas pesquisas acerca do assunto (CHUCK; SANDE, 1989; DORE et al., 1997; HAJJEH et al., 1999).

Em 1990, na Austrália, a variedade *gattii* foi isolada de troncos de eucalipto em decomposição (ELLIS; PFEIFFER, 1990). Em seguida, vários relatos de isolamento em outros tipos de árvores e madeira em decomposição foram descritos ao redor do mundo, bem como em fezes de pombos e outras aves, inclusive no Brasil (CHEE; LEE, 2005; KOBAYASHI et al., 2005; LÁZERA et al., 2000; LÁZERA; WANKE; NISHIKAWA, 1993; PEDROSO; FERREIRA; CANDIDO, 2009). Diante desse fato, foi proposto pela comunidade científica de que as cepas dessa variedade diferiam da variedade *neoformans* e, em 2002, através de estudos filogenéticos e características ecológicas, a variedade *gattii* passou a ser considerada uma nova espécie do gênero *Cryptococcus* (HEITMAN et al., 2011).

Nos últimos anos, o sequenciamento do genoma das cepas JEC21, B3501A, H99, WM276 e R265 de *C. neoformans* e *C. gattii* tem sido realizado e, com os aprimoramentos das técnicas moleculares baseados no método de Reação em Cadeia da Polimerase (*Polymerase Chain Reaction*–PCR) foi possível classificar as duas espécies em nove genótipos ou tipos moleculares (VNI, VNII, VNIII, VNIV, VNB, VGI, VBII, VGIII e VGIV) (HEITMAN et al., 2011).

### **2.1.1 Contexto histórico no Brasil**

Passaram-se 47 anos desde a primeira descrição da criptococose por Otto Busse e Abraham Buschke em 1894 na Alemanha, e o isolamento da levedura quase que simultâneo por Sanfelice na Itália, para que o primeiro caso de criptococose no Brasil fosse relatado por Almeida e Lacaz (1941) na cidade de Rio Preto, Estado de São Paulo. Esse fato é considerado um marco histórico em nosso país. Em seguida, outros relatos da doença foram feitos por Almeida, Lacaz e Salles (1944), Cortez (1949), e Clausell (1949).

Apesar da ocorrência rara, a criptococose era considerada uma doença grave e invariavelmente fatal até 1955. Todavia, com a descoberta da anfotericina B, os casos de criptococose no Brasil e no mundo foram controlados (GIORGI et al., 1959).

O estudo pioneiro de Lacaz e Rodrigues (1983) demonstrou que a maioria das amostras biológicas humanas pertencia à *C. neoformans* var. *neoformans* com prevalência do sorotipo A, seguido do sorotipo D, e *C. gattii* sorotipo B. Em seguida, essa prevalência foi também constatada em amostras ambientais (CALVO; FISCHMAN; CASTELO-FILHO, 1991). Os trabalhos de Lázera et al. (1993; 1996; 1998 e 2000) demonstraram que a levedura está associada não só a *Eucalyptus* spp. mas também as outras espécies de árvores.

Um dos estudos mais completos referente à prevalência da criptococose no Brasil foi realizado por Nishikawa et al. (2003) no qual, foram analisadas 467 amostras clínicas e ambientais, e verificou-se que as regiões sul, sudeste e centro-oeste, *C. neoformans* sorotipo A é o mais prevalente. Enquanto *C. gattii* sorotipo B, é mais encontrado nas regiões norte e nordeste. Esses estudos foram fundamentais para uma melhor compreensão dos aspectos eco-epidemiológicos de *Cryptococcus* spp. e da criptococose.

Por fim, em março de 2006 vários pesquisadores de renome em todo o Brasil se reuniram com o objetivo de estabelecer um “consenso em criptococose” visando responder os principais questionamentos referentes a essa micose em nosso país (KON et al., 2008).

## 2.2 O COMPLEXO *Cryptococcus neoformans/C. gattii*

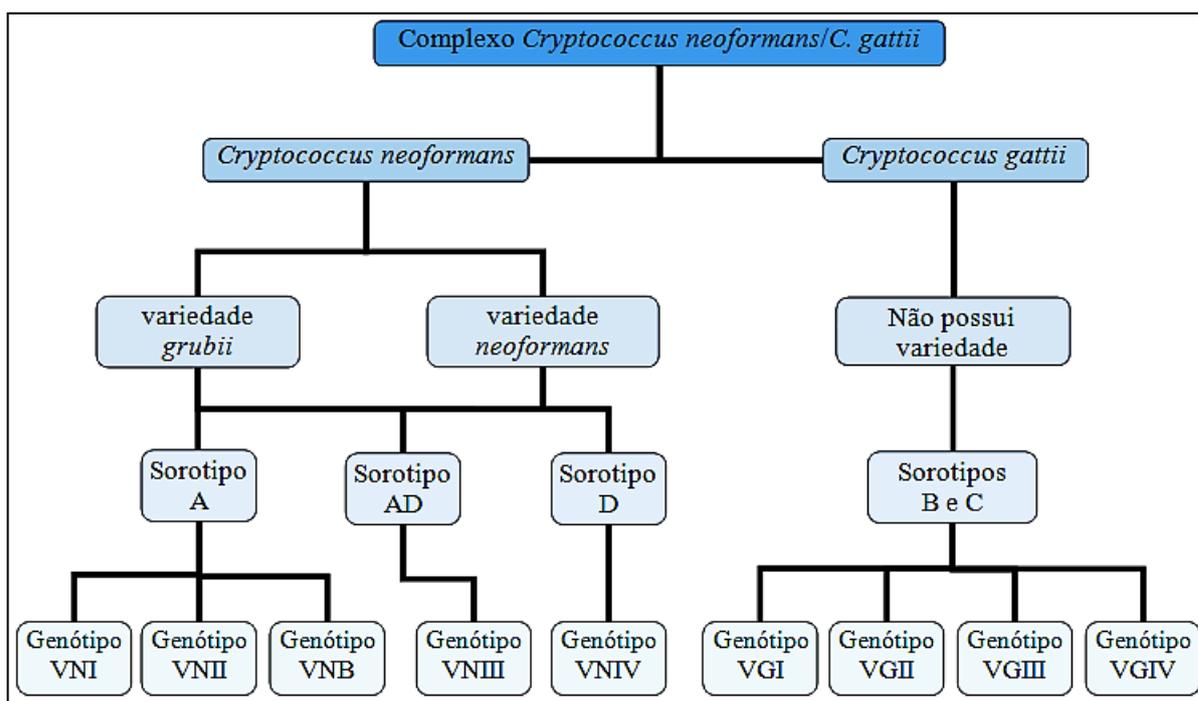
### 2.2.1 Classificação taxonômica

Atualmente são conhecidas 70 espécies do gênero *Cryptococcus*, dessas, duas são consideradas de maior relevância médica, *C. neoformans* e *C. gattii*, as quais são agrupadas em um complexo denominado: Complexo *Cryptococcus neoformans/C. gattii* (KURTZMAN; FELL; BOEKHOUT, 2011; MA; MAY, 2009). Segundo Kurtzman, Fell e Boekhout (2011) a classificação taxonômica de *Cryptococcus* spp. é realizada por meio do estado teleomorfo do fungo, o qual pertence ao Reino Fungi, Filo Basidiomycota, Ordem Tremallales, Família Tremallaceae e Gênero *Filobasidiella*. Quanto às espécies do Complexo, são descritas: *Filobasidiella neoformans* var. *neoformans* e *Filobasidiella neoformans* var. *bacillispora*, sendo seus correspondentes anamorfos respectivos, *C. neoformans* e *C. gattii*.

A espécie *C. neoformans* possui duas variedades: *C. neoformans* var. *grubii* e *C. neoformans* var. *neoformans*, enquanto *C. gattii* não possui variedade. Técnicas sorológicas permitem ainda dividir o Complexo em cinco sorotipos distintos, dos quais, o sorotipo A MAT  $\alpha$  – *C. neoformans* var. *grubii* – é o mais prevalente, isolado em cerca de 98 a 99% das amostras clínicas e ambientais. Existem ainda os sorotipos B e C – *C. gattii* –, sorotipo D – *C. neoformans* var. *neoformans* – e o AD – híbrido entre os sorotipos A e D (KWON-CHUNG; BENNETT, 1978; KWON-CHUNG; EDMAN; WICKES, 1992; LIN; HEITMAN, 2006).

Baseando-se em polimorfismos em sequências de DNA detectados por técnicas de PCR *fingerprinting*, RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) e

MLST (*Multilocus Sequence Typing*) o Complexo *Cryptococcus neoformans/C. gattii* é classificado em nove genótipos. A representação esquemática das características do Complexo está presente na figura 1 (LIN; HEITMAN; 2006; LITVINTSEVA et al., 2005; MEYER et al., 2003; MEYER et al., 1999; SORRELL et al., 1996).

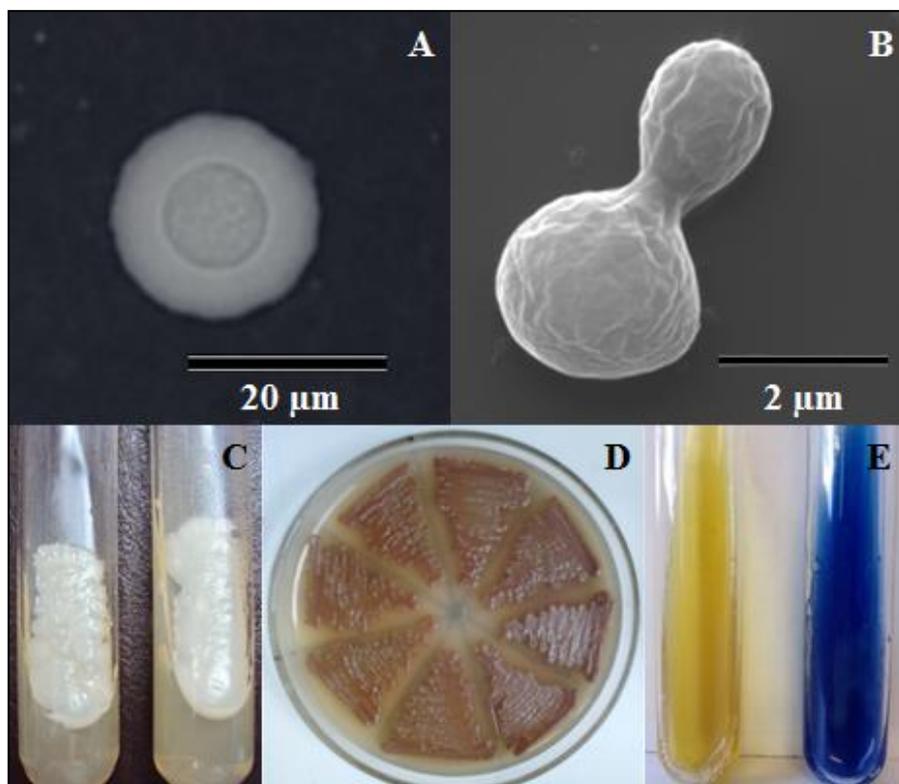


**Figura 1.** Composição atual do Complexo *Cryptococcus neoformans/C. gattii* dividido em espécies, variedades, sorotipos e genótipos. Baseado em Ma; May (2009).

## 2.2.2 Aspectos morfofisiológicos

O Complexo *Cryptococcus neoformans/C. gattii* compreende predominantemente leveduras esféricas ou ovaladas, encapsuladas (Fig. 2A), medindo cerca de 4 a 10  $\mu\text{m}$  de diâmetro – podendo chegar até 80  $\mu\text{m}$  de diâmetro com a cápsula. Produzem urease, assimilam inositol e não fermentam carboidratos. As células são haplóides, se reproduzem por brotamento simples (Fig. 2B) ou múltiplo, sem apresentar hifas ou pseudo-hifas (CASADEVALL; PERFECT, 1998; MA; MAY, 2009). Por serem basidiomicetos heterotáticos e possuírem sistema *mating* bipolar (*MATa* e *MAT $\alpha$* ) que regula o ciclo sexual, podem apresentar fase filamentosa, geralmente sob condições laboratoriais. A partir da fusão entre células haploides *MATa* e *MAT $\alpha$* , origina-se uma hifa dicariótica, que depois de sofrer meiose, dá origem aos basidiósporos haplóides, em sua maioria do tipo *MAT $\alpha$*  sendo

considerado mais virulento do que o tipo *MATa*. A figura 3 traz um esquema do ciclo de vida do Complexo *Cryptococcus neoformans/C. gattii* (BOVERS; HAGEN; BOEKHOUT, 2008).

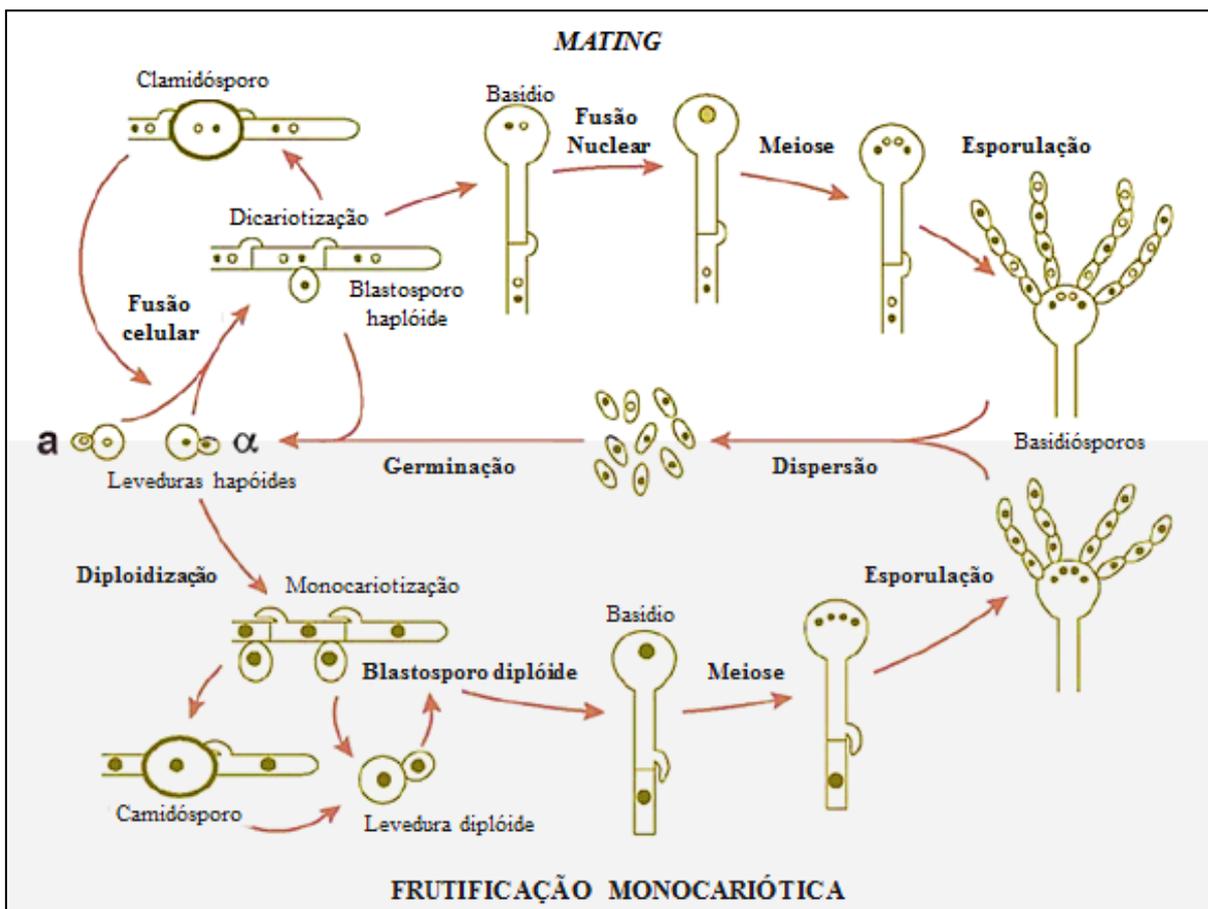


**Figura 2.** Aspectos morfofisiológicos do Complexo *Cryptococcus neoformans/C. gattii*. (A) Célula de *Cryptococcus* spp. encapsulada observada por microscopia óptica com utilização de Tinta da China em aumento de 400 vezes. (B) Célula de *Cryptococcus* spp. com reprodução por brotamento simples observada por microscopia eletrônica de varredura em aumento de 50.000 vezes. (C) Cultivo de 48 horas a 35°C em Ágar Batata evidenciando cultura de coloração branca/creme, de aspecto brilhante e textura mucóide de *C. neoformans* à esquerda e *C. gattii* à direita. (D) Produção de melanina por *Cryptococcus* spp. em meio Ágar Semente de Níger apresentando coloração marrom após 48 horas de incubação a 35°C. (E) Diferenciação das espécies *C. neoformans* à esquerda e *C. gattii* à direita, em meio Canavanina-Glicina-Azul de Bromotimol-CGB após 48 horas de crescimento a 35°C. Fonte: Centro Especializado em Micologia Médica – CEMM/UFC (2014; 2013 e 2011).

Quanto às características macroscópicas, micro-organismos do Complexo *Cryptococcus neoformans/C. gattii* formam colônias claras, variando de branco a creme, de aspecto brilhante e textura mucóide (Fig. 2C) em meios rotineiramente usados em laboratório de micologia, como Ágar Batata e Ágar Sabouraud Dextrose. As colônias podem ainda mudar de coloração se cultivadas em meios específicos como Ágar Semente de Níger, Ágar Caféico e Ágar L-DOPA, apresentando-se com tonalidades castanho-marrom (Fig. 2D). Essa mudança de tonalidade ocorre devido a produção de melanina, em decorrência da ação de uma enzima lacase que oxida compostos difenólicos presentes no meio. Dessa maneira, torna-se possível diferenciar o gênero *Cryptococcus* de outras leveduras de interesse médico aliado ainda com

observação microscópica utilizando Tinta da China que revela a cápsula da levedura, quando presente (HEITMAN et al., 2011).

As espécies do Complexo podem ser diferenciadas utilizando o meio CGB (Canavanina-Glicina-Azul de Bromotimol) que tem como princípio a resistência apresentada por *C. gattii* em meio de cultura contendo L-canavanina além da utilização da glicina como única fonte de carbono e nitrogênio, diferentemente de *C. neoformans* que tem o crescimento inibido (Fig. 2E) (HEITMAN et al., 2011).



**Figura 3.** Representação esquemática do ciclo de vida do Complexo *Cryptococcus neoformans/C. gattii*. Na parte superior, a fusão de leveduras *MAT<sub>a</sub>* e *MAT<sub>α</sub>* resulta no crescimento filamentos, podendo formar clamidósporo ou novos blastosporos. Depois da dicariotização, dois núcleos parentais migram coordenadamente nas hifas para formação do basídeo. Em seguida, ocorre a fusão nuclear entre os blastosporos haplóides, posteriormente quatro produtos meióticos são produzidos em decorrência de meiose, esses esporulam em cadeia, por mitose e brotamento, a partir da base do basídeo. Na parte inferior, durante a frutificação monocariótica, as células de um mesmo tipo *MAT*, por exemplo, células  $\alpha$  originam células  $\alpha/\alpha$  diplóides, por duplicação ou fusão nuclear entre duas células  $\alpha$ . A célula diplóide forma hifas monocarióticas, podendo também formar clamidósporo ou leveduras diplóides. Em seguida, ocorre a formação do basídeo, meiose e esporulação em cadeia. Em ambos os casos, após o crescimento filamentos, os esporos são dispersos e germinam dando origem a fase leveduriforme. Adaptado de Lin; Heitman (2006).

### 2.2.3 Fatores de virulência

A capacidade das espécies do Complexo *Cryptococcus neoformans/C.gattii* em infectar humanos e animais, está intimamente relacionada com a susceptibilidade do hospedeiro e a produção de fatores de virulência, que são mecanismos que possibilitam ao fungo resistência à imunidade do hospedeiro, facilitando a proliferação e sobrevivência, danificando órgãos e tecidos, ocasionando a criptococose. São vários os fatores de virulência produzidos pelo Complexo, sendo os principais a expressão de cápsula, síntese de melanina, termotolerância a 37°C, produção de enzimas (protease, urease e fosfolipase), sobrevivência intracelular, aquisição de nutrientes, biofilme e consequentemente, resistência aos antifúngicos de uso terapêutico (COELHO; BOCCA; CASADEVALL, 2014; HARRIS; GALANIS; LOCKHART et al., 2014).

#### 2.2.3.1 Cápsula

Há um consenso entre a comunidade científica de que a cápsula é o principal fator de virulência de *Cryptococcus* spp. com base no fato de que cepas mutantes não-encapsuladas são avirulentas (CHANG; KWON-CHUNG, 1994). Ao serem inalados, os propágulos fúngicos de maneira geral não apresentam cápsula, mas ao serem depositados nos alvéolos, ocorre rapidamente a síntese capsular (GILES et al., 2009; VELAGAPUDI et al., 2009) seguido do aumento de tamanho, o que confere vantagens para sobrevivência do fungo, frente ao hospedeiro (COELHO; BOCCA; CASADEVALL, 2014; ZARAGOZA et al., 2009).

Estudos demonstram que a cápsula é constituída de 90-95% de glucoronoxilomanana (GXM), 5% de galactoxilomanana (GalXM) e os demais componentes (<1%) são formados por mananoproteínas como MP-98 e MP-99 (MA; MAY, 2009; RAKESH et al., 2008; VAISHNAW et al., 1998). Todavia, ao investigar a sublocalização dos constituintes da cápsula por meio de anticorpo monoclonal conjugado a um fluoróforo, Jesus et al., (2010) levantaram a possibilidade de que GalXM e mananoproteínas fazem parte da parede e não da cápsula, sendo o GXM, de fato, o principal componente capsular. Entretanto, estudo de Cordero et al. (2011) sugeriram que existe mais um componente capsular, ao detectarem  $\beta$ -glucanos associados à cápsula (COELHO; BOCCA; CASADEVALL, 2014).

A cápsula confere ao fungo resistência tanto no ambiente externo quanto no hospedeiro. É importante salientar que a maioria dos isolados ambientais apresenta cápsula

reduzida quando cultivados *in vitro* (O'MEARA; ALSPAUGH, 2012). No hospedeiro, os componentes polissacarídeos da cápsula, sobretudo GXM, desempenham papel fundamental na modulação da resposta imune por diversos mecanismos tais como, inibição da fagocitose pelos macrófagos, alteração de citocinas, neutralização de opsoninas, bloqueio da quimiotaxia de células de defesa, inativação da via clássica do sistema complemento, inibição da produção de anticorpos e interferência na apresentação de antígenos (COELHO; BOCCA; CASADEVALL, 2014; MERSHON-SHIER et al., 2011; VECCHIARELLI et al., 2013).

#### 2.2.3.2 Melanina e lacase

A capacidade de produção de melanina é outro fator de virulência importante na patogenia do fungo, assim como em outros patógenos fúngicos e bacterianos. No entanto, a síntese dessa molécula por *Cryptococcus* spp., depende de fontes exógenas como compostos fenólicos, diferente de outros micro-organismos que conseguem sintetizar essa molécula intrinsecamente. A enzima lacase é responsável pela quebra dos compostos fenólicos e consequentemente, pela síntese de melanina. Cepas mutantes deficientes na produção de lacase e, por conseguinte na gênese da melanina, têm a virulência reduzida (COELHO; BOCCA; CASADEVALL, 2014; LIU; NIZET, 2009; NGAMSKULRUNGROJ; MEYER, 2009).

Embora a estrutura molecular da melanina produzida por *Cryptococcus* spp. ainda seja desconhecida, sabe-se que a molécula possui um radical livre estável, desenvolvendo um papel antioxidativo eficiente (WANG; CASADEVALL, 1994a; 1994b; 1994c). Dessa forma, o pigmento possui capacidade de absorver radiação eletromagnética proveniente da luz ultravioleta ou até mesmo de reatores nucleares, conferindo radioproteção para o fungo no meio ambiente (DADACHOVA et al., 2008). A melanina pode ainda atuar na interferência da fagocitose, defesa contra radicais livres tóxicos produzidos pelo hospedeiro durante o processo infeccioso e na capacidade de difusão do fungo para outros tecidos a partir dos alvéolos pulmonares, o que caracteriza importante papel na disseminação sistêmica para o sistema nervoso central. Por estar inserida na parede fúngica, contribuindo para uma melhor estruturação da parede celular conferindo rigidez, células fúngicas melanizadas são mais resistentes à anfotericina B e caspofungina (COELHO; BOCCA; CASADEVALL, 2014).

A lacase de *C. neoformans* possui duas isoformas, uma abundantemente expressa na parede (Lac1) e a outra (Lac2) presente em grande quantidade no citoplasma. Apesar de

Lac1 desempenhar um papel fundamental na virulência, é necessária a atuação de ambas para contribuir de maneira sinérgica na infecção (MISSALL et al., 2005; POLACHECK; HEARING; KWON-CHUNG, 1982; PUKKILA-WORLEY et al., 2005). A enzima lacase, sobretudo Lac2, possui ainda atividade de oxidação do ferro, o que pode contribuir para um aumento da captação desse mineral dentro do fagossoma, facilitando a sobrevivência intracelular. Além disso, a enzima possui ainda um papel imunomodulador, aumentando a produção de prostaglandina E2 proveniente do ácido araquidônico extracelular (COELHO; BOCCA; CASADEVALL, 2014; ERB-DOWNWARD; HUFFNAGLE, 2007).

#### 2.2.3.3 Termotolerância a 37°C

A capacidade de crescimento à temperatura corpórea de mamíferos é um fator indispensável para o sucesso na patogênese de *Cryptococcus* spp. (ROBERT; CASADEVALL, 2009). Assim, as enzimas requeridas para a manutenção da termotolerância – como as proteínas do choque térmico (Hsp) – são também consideradas fatores de virulência. Nesta perspectiva, destaca-se a Hsp90, proteína que está relacionada com a capacidade de crescimento a 37°C em *Cryptococcus* spp. (COELHO; BOCCA; CASADEVALL, 2014; O'MEARA; COWEN, 2014; ROBERT; CASADEVALL, 2009).

A termotolerância apresentada pelo Complexo *Cryptococcus neoformans/C. gattii* pode destacar-se como relativamente mais importante frente aos demais fatores de virulência. Esse fato pode ser explicado levando em consideração que, embora outras espécies do gênero possam apresentar cápsula e melanina, estas se mostram incapazes de infectar mamíferos em condições experimentais (COELHO; BOCCA; CASADEVALL, 2014; GARCIA-SOLACHE et al., 2013; MCCLELLAND; BERNHARDT; CASADEVALL, 2006; PETTER et al., 2001).

#### 2.2.3.4 Produção de enzimas

A produção de enzimas por cepas do Complexo *Cryptococcus neoformans/C. gattii* também é considerada um importante fator de virulência. As principais enzimas produzidas pelo Complexo são proteases, fosfolipase e urease. Proteases são enzimas que catalisam a clivagem de ligações peptídicas resultando na digestão de proteínas, possibilitando uma maior aquisição de nutrientes. Também contribuem para invasão de tecidos do hospedeiro, colonização e, por conseguinte, estabelecimento da infecção (MA;

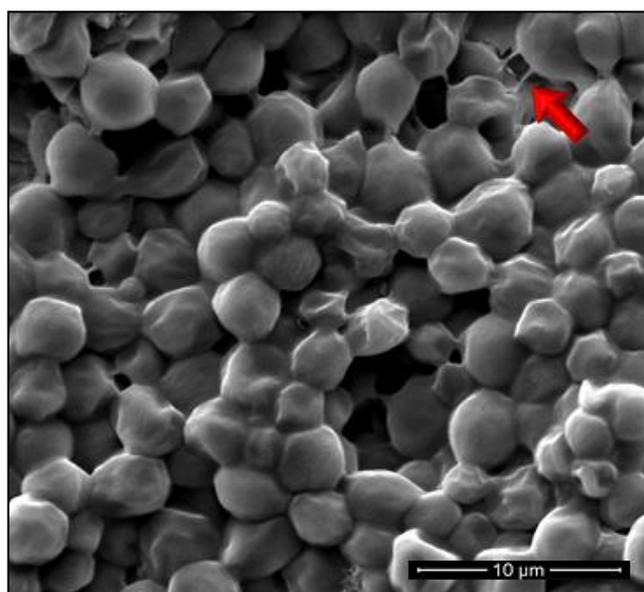
MAY, 2009). Atividade proteolítica de cepas clínicas e ambientais de *Cryptococcus* spp. já foi descrita, e os principais alvos dessas proteases são colágeno, elastina, fibrinogênio, imunoglobulinas e fatores do complemento (CHEN; BLANK; CASADEVALL, 1996). Toker e Casadevall (2002) propuseram em estudo que a replicação de *C. neoformans* no interior de macrófagos é acompanhada pela produção de proteases e fosfolipases que degradam a membrana fagossomal. Vidotto et al., (2005) detectaram produção de protease em 151 isolados de *Cryptococcus* spp. e Bien et al., (2009) evidenciaram a relevância da expressão de uma protease específica (Stp1) para a sobrevivência e virulência de *Cryptococcus* spp. frente aos derivados azólicos.

As fosfolipases produzidas pelo Complexo *Cryptococcus neoformans/C. gattii* também possuem papel fundamental na sobrevivência e virulência do fungo. Fosfolipases compreendem um grupo heterogêneo de enzimas que são capazes de hidrolisar éster de glicerofosfolipídeos resultando em degradação de fosfolipídeos de membrana das células hospedeiras, e conseqüentemente, desestabilizando a membrana levando a lise celular (MA; MAY, 2009). A fosfolipase B (Plb1) é a principal fosfolipase produzida por *C. neoformans*. Sua função tem sido relatada como um dos principais fatores que contribui para a sobrevivência intracelular da levedura em macrófagos. Plb1 promove lesão da membrana fagossomal, permitindo o acesso do fungo ao citoplasma e seus componentes, aumentando diretamente a aquisição de nutrientes (COELHO; BOCCA; CASADEVALL, 2014).

Em patógenos bacterianos, sabe-se que a produção de urease é considerada um importante fator de virulência. A urease catalisa a hidrólise de ureia em amônia e carbamato, resultando na alcalinização do meio circundante o que facilita a aquisição de nutrientes. Assim como em bactérias, os pesquisadores acreditam que a urease desempenha papel semelhante em *Cryptococcus* spp. Especula-se ainda que, além da função nutricional, a urease seja requerida para o rompimento de tecidos e da barreira hemato-encefálica favorecendo a disseminação do fungo, porém, os mecanismos envolvidos nesses processos não são esclarecidos (COELHO; BOCCA; CASADEVALL, 2014).

### 2.2.3.5 Biofilme

Biofilmes são comunidades microbianas dinâmicas, de estrutura tridimensional aderida a uma superfície biótica ou abiótica, cujas células encontram-se circundadas por uma matriz extracelular polimérica (Fig. 4). A matriz possui diversas características distintas, preservando a viabilidade celular, proporcionando desde a resistência à resposta imune do hospedeiro até a tolerância aos antifúngicos. A dinâmica de formação dos biofilmes possui etapas definidas de desenvolvimento como adesão, colonização, produção da matriz extracelular, maturação e dispersão. Essas etapas contribuem como mecanismos de resistência aos antifúngicos em biofilmes e são vistas como alvos para o desenvolvimento de estratégias de controle dessas estruturas (RAMAGE et al., 2012).



**Figura 4.** Imagem de microscopia eletrônica de varredura de um biofilme produzido por *Cryptococcus* spp. Aumento de 8.000 vezes. A seta vermelha evidencia a matriz extracelular. Fonte: próprio autor – CEMM/UFC (2014).

O fungo *C. neoformans* já foi relatado como um patógeno capaz de formar biofilme ativamente em diversos dispositivos protéticos, inclusive em válvulas e derivações cardíacas e fístulas de diálise (BACH, 1996; BANERJEE; GUPTA; VENUGOPAL, 1997; BRAUN et al., 1994; MARTINEZ; FRIES, 2010; WALSH et al., 1986). Dessa forma, a produção de biofilme pelo Complexo *Cryptococcus neoformans/C. gattii* é considerada um importante fator de virulência, sobretudo no que diz respeito à persistência da infecção, uma

vez que os biofilmes são mais resistentes à pressão do sistema imune e à terapia antifúngica, quando comparados às células planctônicas (GULLO et al., 2013).

Os mecanismos moleculares que conferem resistência às drogas em biofilmes fúngicos não foram completamente elucidados. Todavia, de maneira geral, os mecanismos envolvidos no fenômeno de resistência aos antifúngicos em biofilme são: aumento da densidade celular; estado fisiológico em que as células se encontram; a presença de células persistentes; a matriz exopolimérica; aumento da expressão de genes relacionados aos alvos das drogas e a resistência mediada por bomba de efluxo. Esses mecanismos têm sido cada vez mais investigados principalmente em espécies do gênero *Candida*, sobretudo *C. albicans*. No entanto, pesquisas com a mesma temática em biofilmes do Complexo *Cryptococcus neoformans/C. gattii* são escassas (RAMAGE et al., 2012).

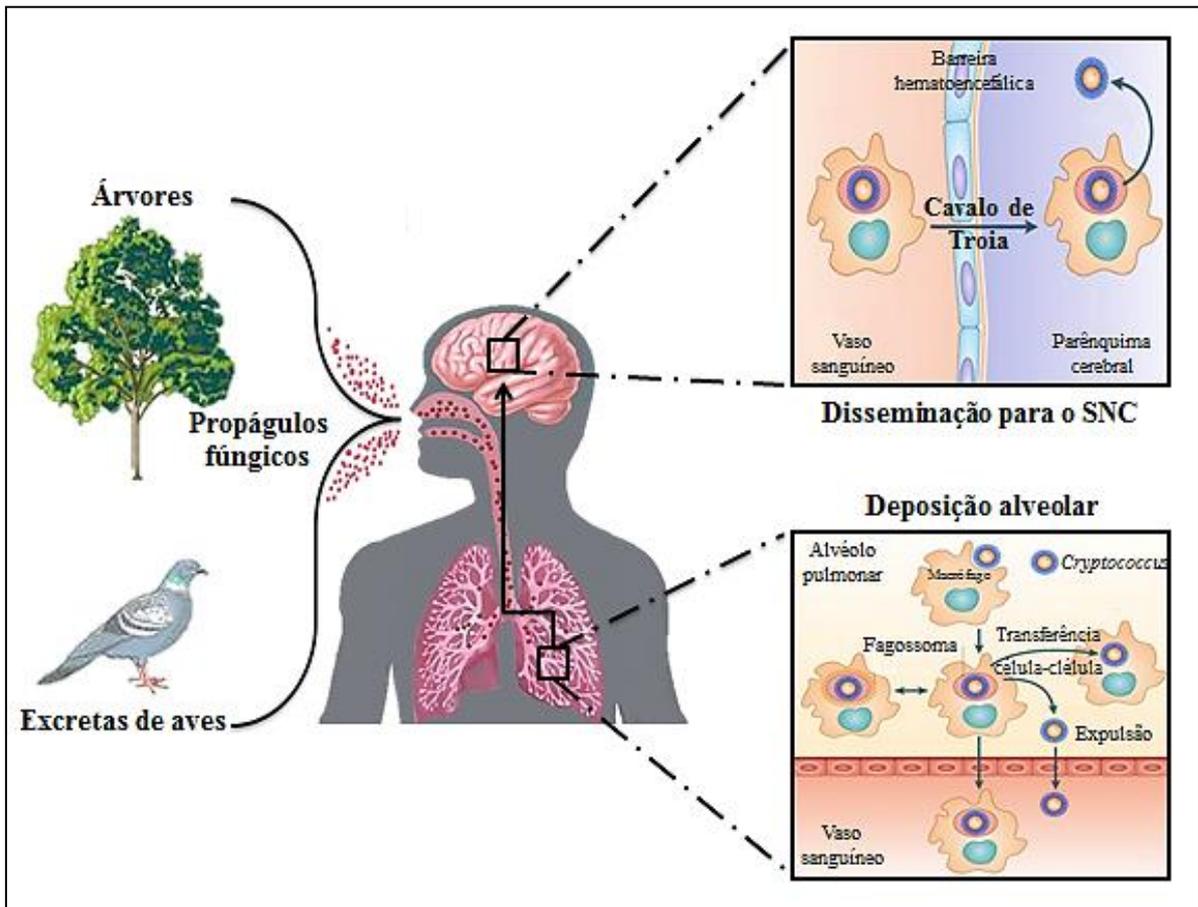
A matriz extracelular do biofilme, que pode corresponder até cerca de 85% de seu volume total, desempenha papel fundamental na proteção das células fúngicas contra a resposta imunológica do hospedeiro além de ser considerada um dos principais mecanismos de resistência aos antifúngicos. A matriz possui constituição química complexa, a qual pode funcionar como barreira físico-química, reduzindo a penetração do antifúngico. Acredita-se que os constituintes da matriz atuem também como quelantes das drogas, fazendo com que sejam necessárias concentrações mais elevadas dos fármacos para exercer efeito. Compreender os mecanismos envolvidos na síntese da matriz dos biofilmes é o ponto chave para o desenvolvimento de estratégias antifúngicas (RAMAGE et al., 2012).

A utilização de substâncias e drogas não convencionais antifúngicas como medida de controle *in vitro* de biofilmes produzido pelo Complexo *Cryptococcus neoformans/C. gattii* tem sido proposta por alguns autores. Cordeiro et al. (2013) demonstraram que as combinações das drogas inibidoras da síntese do folato, sulfametoxazol-trimetropim e sulfadiazina-pirimetamina inibiu o crescimento de células planctônicas, bem como biofilmes formados por *Cryptococcus*. Martinez et al. (2010) investigaram o uso da quitosana contra biofilmes de *C. neoformans*, demonstrando resultados satisfatórios. Nesse contexto, a busca de novas estratégias antifúngicas contra biofilmes do Complexo *Cryptococcus neoformans/C. gattii* é importante para o desenvolvimento de novas medidas terapêuticas.

### 2.3 CRIPTOCOCOSE: PATOGENIA, PRINCIPAIS FORMAS CLÍNICAS, DIAGNÓSTICO LABORATORIAL E EPIDEMIOLOGIA

A criptococose, anteriormente denominada tolurose, blastomicose europeia ou doença de Busse-Buschke, é uma micose sistêmica, oportunista e cosmopolita, causada predominantemente pelo Complexo *Cryptococcus neoformans/C. gattii* sendo considerada a mais incidente, dentre as micoses sistêmicas, em pacientes com aids (GULLO et al., 2013). Compreende duas entidades divergentes do ponto de vista clínico-epidemiológico: criptococose oportunista, causada preferencialmente por *C. neoformans* e a criptococose primária, a qual o agente etiológico é a espécie *C. gattii*, acometendo predominantemente, indivíduos aparentemente com sistema imune competente (KON et al., 2008).

A patogenia da infecção ocorre pela inalação de propágulos fúngicos, que se depositam nos alvéolos pulmonares, geralmente provenientes de fontes ambientais como fezes de pombos e madeira em decomposição. O contato entre as leveduras e as células de defesa, tais como células *natural killer*, linfócitos TCD4 e TCD8 e, sobretudo os macrófagos alveolares – considerados as principais células de defesa contra *Cryptococcus* spp. – deflagra uma resposta do tipo Th1 com intensa produção de fator de necrose tumoral, interferon- $\gamma$  e interleucinas. Em indivíduos imunocompetentes, a infecção geralmente é autolimitada ou pode tornar-se latente. Porém, em indivíduos imunocomprometidos, pode ocorrer lesão pulmonar e a infecção pode se disseminar para focos secundários como pele, ossos, rins e, sobretudo, para o sistema nervoso central. Acredita-se que a disseminação ocorra por um mecanismo do tipo “Cavalo de Troia”, no qual a levedura é carregada no interior dos macrófagos que conseguem ultrapassar a barreira hematoencefálica, causando meningoencefalite, geralmente de evolução grave e de curso fatal se não tratada (GULLO et al., 2013; KON et al., 2008). A figura 5 ilustra de forma esquemática as principais etapas da patogênese da criptococose.



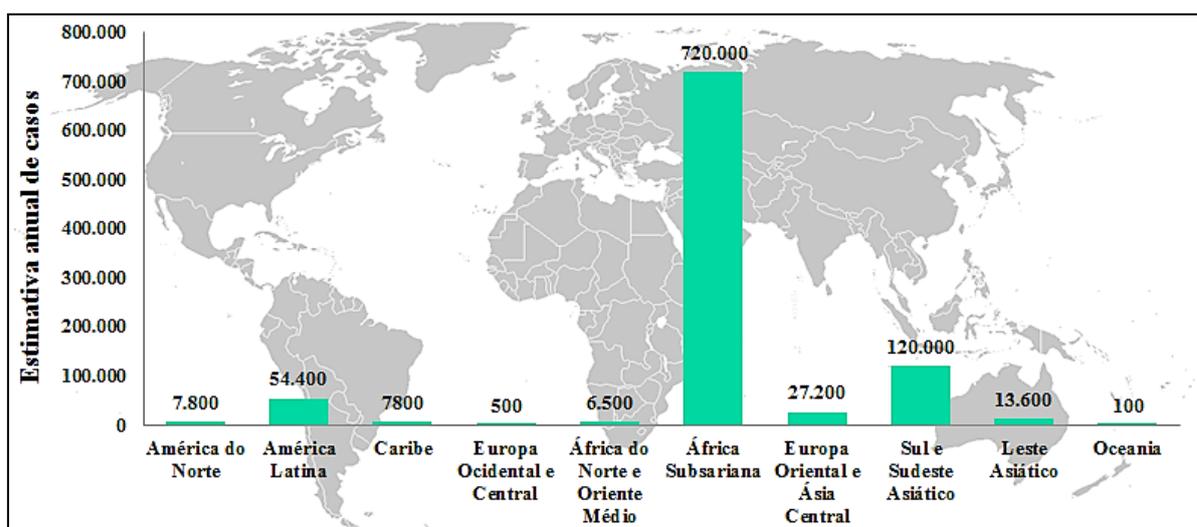
**Figura 5.** Principais etapas da patogênese da criptococose. SNC = sistema nervoso central. Baseado em Lin; Heitman (2006) e Kronstad et al., (2011).

Em 80% dos casos sintomáticos, a meningoencefalite é a forma clínica mais diagnosticada dos casos de criptococose independentemente se há concomitantemente acometimento pulmonar ou apenas a forma isolada. Pode apresentar-se sob a forma de lesões focais únicas ou múltiplas no sistema nervoso central, acarretando em meningite ou meningoencefalite aguda ou subaguda. Os sinais clínicos mais frequentes são cefaleia (76% dos casos) e febre (65% dos casos), seguidos de náuseas, vômitos, rigidez de nuca para comprometimento meníngeo e alteração de consciência, déficit de memória, linguagem e cognição para os casos de meningoencefalite. O padrão ouro para o diagnóstico da neurocriptococose é a cultura fúngica que geralmente é positiva em 89% dos pacientes não infectados pelo HIV e de 95 a 100% dos pacientes com aids. O exame direto a partir do líquido cefalorraquidiano – LCR corado com Tinta da China também auxilia no diagnóstico, mostrando-se positivo em até 50% dos casos nos pacientes HIV negativos e em até 80% de positividade nos pacientes com aids. Além desses exames, a pesquisa imunológica do

antígeno criptocócico no LCR é positiva em 90% dos casos de pacientes com aids (KON et al., 2008).

O comprometimento pulmonar na criptococose é a segunda forma clínica mais frequente após o envolvimento com o sistema nervoso central e acomete cerca de 30% dos indivíduos com aids. Geralmente apresenta-se como uma lesão nodular localizada, podendo ser assintomática em 1/3 dos casos ou levar à falência respiratória. Febre (26% dos casos) e tosse com expectoração mucoide (54% dos casos), ou com hemoptise (18% dos casos) são manifestações clínicas frequentes. Para o diagnóstico da criptococose pulmonar pode ser feita biópsia ou retirada cirúrgica do nódulo e exame histopatológico, exame direto corado pela Tinta da China, cultura do escarro, exame imunológico com pesquisa de antígeno criptocócico e exames radiológicos (KON et al., 2008).

A letalidade da neurocriptococose é estimada em 10% em países desenvolvidos chegando até 43% em países em desenvolvimento em um tempo médio de sobrevivência de 14 dias (KON et al., 2008). Uma pesquisa desenvolvida por Park et al. (2009) teve o intuito de realizar a primeira estimativa mundial de casos de meningite criptocócica, a forma mais grave da doença, associada com pacientes HIV positivo. Estimou-se que ocorrem anualmente cerca de 957.900 casos de neurocriptococose em todo o mundo – desses, 720.000 encontram-se na África Subariana – com aproximadamente 624.700 mortes (Fig. 6).



**Figura 6.** Estimativa anual de casos de meningite criptocócica em indivíduos HIV positivos ao redor do mundo. Baseado em Park et al., (2009).

No Brasil, acredita-se que a meningite criptocócica representa cerca de 6% das infecções oportunistas em pacientes com aids (LAZÉRA, 2004; LUGARINE et al., 2008;

PEREIRA; BARROS, 2012). Nas regiões sul, sudeste e centro-oeste, há uma predominância de criptococose por *C. neoformans*, enquanto a criptococose por *C. gattii* possui distribuição geográfica mais restrita às áreas de clima tropical e subtropical, notadamente nas regiões norte e nordeste. Vale ressaltar que, no Brasil, a criptococose por *C. gattii* possui uma das maiores taxas de prevalência da América do Sul, levando a crer que essa espécie parece ser endêmica na região nordeste do país (NISHIKAWA et al., 2003). Em estudo de Prado et al. (2009), que investigaram micoses sistêmicas como causa primária de morte em indivíduos com aids, a criptococose foi atribuída como *causa mortis* em 50,9% dos pacientes com aids cujo óbito foi associado a micoses sistêmicas. No entanto, dados epidemiológicos sobre a criptococose na região nordeste, em especial no Estado do Ceará, ainda são escassos.

#### 2.4 TRATAMENTO E RESISTÊNCIA AOS ANTIFÚNGICOS

O tratamento de escolha para a criptococose, assim como a maioria das micoses sistêmicas, faz uso da anfotericina B, um derivado poliênico fungicida. Inicia-se com uma fase de indução de curta duração, em média até duas semanas, com doses que variam de 0,5 – 1 mg/kg/dia. Por se tratar de uma droga altamente nefrotóxica, a anfotericina B é utilizada como uma dose de carga, a fim de garantir uma rápida eliminação das leveduras do LCR, e logo é substituída pelos derivados azólicos. Como alternativa, a anfotericina B pode ainda ser utilizada em associação com a fluocitosina, apresentando sinergismo farmacológico com doses entre 0,7 – 1 mg/kg/dia de anfotericina B + 100 mg/kg/dia de fluocitosina. No entanto, a fluocitosina apresenta elevado potencial mielotóxico e hepatotóxico. Dessa maneira, inicia-se uma fase de consolidação, na qual, são utilizados os derivados azólicos, fluconazol, itraconazol ou voriconazol, que são mais toleráveis pelos pacientes. Ambos possuem ação fungistática e são administrados nas doses entre 200 – 400 mg/kg/dia com duração de dois a três meses. Por fim, estabelece-se uma fase de manutenção com fluconazol com doses de 200 mg/kg/dia. A manutenção aplica-se para indivíduos assintomáticos ou com contagem de linfócitos CD4 > 200 células/mm<sup>3</sup> por até seis meses (GULLO et al., 2013; KON et al., 2008).

Todavia, podem ocorrer casos de falência terapêutica, que é caracterizada pela deterioração do estado clínico do paciente com manutenção de cultura positiva, seguido de manutenção de pressão intracraniana elevada, sinais e sintomas clínicos sem melhora, após duas semanas do início do tratamento ou ainda, recaída depois da terapia inicial (KON et al., 2008). Nesses casos, alguns autores sugerem o aumento da dose de fluconazol (800 até 2000

mg/dia) associado ou não com 5-fluocitosina. Em caso de insucesso terapêutico, é recomendado tratar novamente com anfotericina B, isolada ou em combinação com 5-fluocitosina e manutenção com 50 mg de anfotericina B três vezes por semana. No entanto, estudos indicam o desenvolvimento do fenômeno resistência fúngica a esses fármacos, o que justifica o interesse em desenvolver novas alternativas para o tratamento das micoses sistêmicas, sobretudo a criptococose (GULLO et al., 2013; KON et al., 2008).

Devido à importância do ergosterol como um dos alvos de azólicos e poliênicos – principais antifúngicos de uso clínico –, sabe-se que alterações nesse alvo acarretam em aumento na resistência aos antifúngicos, principalmente aos azólicos (PARKER et al., 2014). Os azólicos atuam por meio da inibição da enzima 14  $\alpha$ -demetilase, codificada pelo gene *ERG11*, que tem por função converter o precursor lanosterol em ergosterol, um esterol de membrana que proporciona estruturação à célula fúngica. Uma vez bloqueada a enzima, ocorre o acúmulo de esteróis tóxicos dentro da célula e depleção do ergosterol, inibindo o crescimento do fungo. Dessa maneira, a super-expressão ou mutação do gene *ERG11* culmina na alteração do ergosterol da membrana resultando no aumento da resistência aos azólicos e poliênicos (RAMAGE et al., 2012; XIE et al., 2014).

No tocante aos mecanismos de resistência mediados por bombas de efluxo, principalmente para os antifúngicos azólicos, pouco se sabe no gênero *Cryptococcus*. Em *C. albicans*, sabe-se que esse fenômeno ocorre basicamente por dois mecanismos principais: pelas bombas do tipo ABC (*ATP-binding cassette*) que são codificadas pelos genes *CDR1*, *CDR2*, *CDR3* e *CDR4*, sendo os dois primeiros, quando super-expressos, os principais responsáveis pela resistência a diversos azólicos e, as bombas do tipo MFS (*major facilitators superfamily*), codificadas pelo gene *MDR1*, as quais conferem resistência ao fluconazol. Bombas de efluxo são proteínas de membrana que atuam ativamente transportando substâncias pela membrana para fora da célula. Um aumento da expressão dos genes *CDR1*, *CDR2* e *MDR1* com respectivo aumento da atividade das bombas ABC e MFS acarretam na diminuição da concentração dos azólicos no interior celular, implicando no aumento da resistência a esses antifúngicos (KANAFANI; PERFECT, 2008; RAMAGE et al., 2012).

## 2.5 MODELOS EXPERIMENTAIS DE ESTUDO *in vivo*

A análise *in vivo* dos mecanismos celulares e moleculares envolvidos na interação de patógenos fúngicos com o hospedeiro é geralmente realizada com modelos de infecção experimental. Os principais modelos incluem rato, camundongo, coelho e porquinho da índia. Embora cada recurso citado seja considerado robusto, fornecendo informações valiosas acerca da interação parasita-hospedeiro, há muita divergência e particularidade em cada modelo (MA; MAY, 2009).

Dados da literatura mostram que os camundongos são mais susceptíveis à infecção experimental com *Cryptococcus* spp. quando comparados a ratos. Isso se deve ao fato das duas espécies apresentarem diferenças entre a função dos macrófagos alveolares. Em ratos, os macrófagos alveolares apresenta maior capacidade fagocítica, aumento da secreção de lisozima e maior resistência à lise na infecção intracelular (SHAO et al., 2005). Assim, os experimentos utilizando camundongos são mais frequentes. Dentre várias linhagens de camundongos existentes, cinco são mais empregados na pesquisa com *Cryptococcus* spp., são elas: BALB/c, C57B/6J, A/J, CBA/J e DBA/J. Variações consideráveis quanto à suscetibilidade frente à *Cryptococcus* spp. são observadas entre as linhagens (MA; MAY 2009). De maneira geral, a linhagem BALB/c, a mais estudada em modelo murino, demonstra-se mais resistente à *C. neoformans* e a evolução da doença é diretamente relacionada com a via de infecção. Quando infectados por via intranasal, a linhagem BALB/c é mais resistente comparada à infecção por via intravenosa. Essa resistência foi associada com uma resposta do tipo Th1, com aumento de IL-12, maior acúmulo de células CD4+ e CD8+ nos pulmões e produção de anticorpos elevada no estágio inicial da infecção (ZARAGOZA et al., 2007). Em contrapartida, as linhagens C57B/6J, A/J e CBA/J são as mais susceptíveis.

Devido às diferenças na susceptibilidade em murinos e às questões éticas subjacentes a experimentação com mamíferos, modelos experimentais alternativos utilizando invertebrados têm sido propostos. Neste cenário, destacam-se o nematódeo *C. elegans* (MYLONAKIS et al, 2002; TANG et al, 2005), a ameba *Dictyostelium discoideum* (STEENBERGEN et al., 2003) e os insetos *Drosophila melanogaster* (APIDIANAKIS et al., 2004) e *Galleria mellonella* (MYLONAKIS et al., 2005). Os experimentos utilizando *C. elegans* merecem destaque e têm sido amplamente utilizados em área médica. O silenciamento de genes específicos e de todo o genoma só são possíveis por meio do uso de interferência por RNA, uma técnica descoberta utilizando *C. elegans* como modelo. Ademais,

os prêmios Nobel de Medicina de 2002 e 2006 e o Nobel de Química em 2008 foram atribuídos a estudos realizados com esse nematódeo (PUKKILA-WORLEY et al., 2009).

Os estudos utilizando invertebrados têm se demonstrado promissores por vários motivos. As principais vantagens do uso desses organismos em detrimento aos modelos com mamíferos referem-se às desobrigações das questões éticas que balizam os experimentos com vertebrados, além da redução dos custos nas pesquisas. Além do mais, esses modelos permitem realizar diversas condições experimentais simultâneas acerca de novos mecanismos relacionados à gênese da doença. Além disso, sabe-se que vários genes de virulência envolvidos na infecção em mamíferos também desempenham papel fundamental na interação com esses organismos invertebrados (MA; MAY, 2009). Ademais, a interação entre *C. neoformans* e esses modelos sugere que os fatores de virulência importantes na patogênese da criptococose evoluem por meio de interações com organismos mais simples, como foi proposto por Steenbergen, Shuman e Casadevall (2001), em pesquisa envolvendo *Acanthamoeba castellanii*.

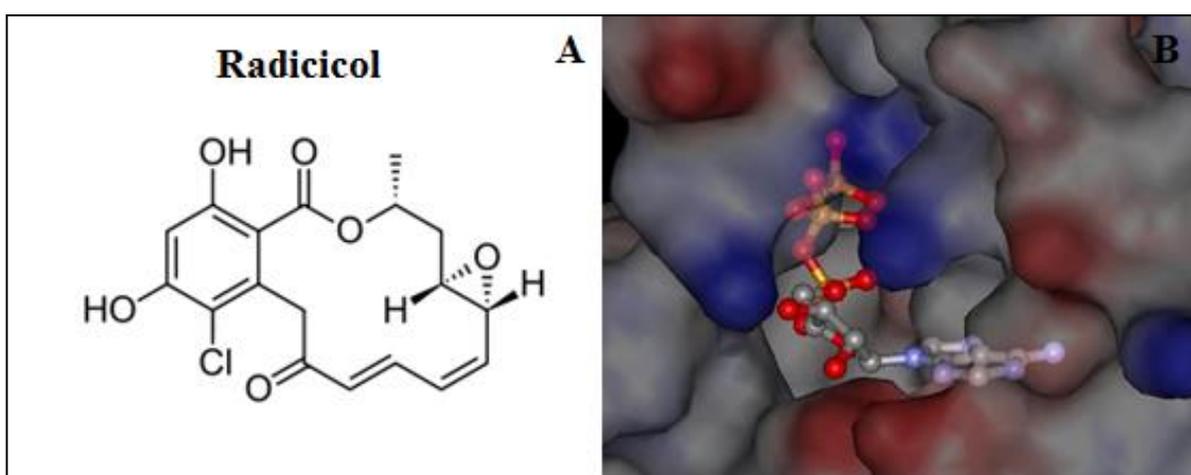
## 2.6 Hsp90 COMO UM POTENCIAL ALVO MOLECULAR TERAPÊUTICO

As proteínas Hsp são chaperoninas amplamente distribuídas nos seres vivos, tanto em organismos procariotos quanto nos eucariotos (BURNIE et al., 2006). Sua principal função é auxiliar outras proteínas a alcançarem sua conformação tridimensional, tornando-as ativas. Essas moléculas também são chamadas de proteínas de choque térmico (do inglês *heat shock proteins*), pois sua descoberta foi relacionada ao aumento de sua expressão durante o estresse térmico em experimentos realizados em *D. melanogaster* (FERRUCIO, 1962). No entanto, diversas situações podem induzir o seu aumento de expressão, como estresse nutricional, alterações de pH, desidratação, luz ultravioleta, angiogênese, carcinogênese, entre outros (BURNIE et al., 2006). Existem diversas classes de proteínas Hsp que são nomeadas de acordo com o seu peso molecular (por exemplo, a Hsp90 possui peso molecular de aproximadamente 90 kDa) e cada uma desempenha diferentes funções importantes nos mecanismos de sinalização celular (BURNIE et al., 2006; FIORI et al., 2012; LAMOTH et al., 2012; MAYER et al., 2012; TAMAYO et al., 2012).

Ultimamente, as proteínas Hsp têm sido cada vez mais estudadas na área médica. Diversos estudos comprovam que a Hsp90 é um alvo molecular promissor para o tratamento de várias formas de câncer e aterosclerose (LEE et al., 2012; MADRIGAL-MATUTE et al.,

2012; MIYATA et al., 2013; SCHMID; MULTHOFF, 2012; TAIPALE et al., 2010; WHITESELL et al., 2012). Tais estudos se baseiam no bloqueio das proteínas Hsp90 por meio de diferentes estratégias, tais como a utilização de anticorpos monoclonais, produção de mutantes para o gene responsável pela expressão de Hsp90 ou pelo emprego de fármacos que são capazes de inibir a ação ATPásica dessas proteínas, tais como a geldamicina e o radicicol, (BURNIE et al., 2006; FIORI et al., 2012; LAMOTH et al., 2012; MATTHEWS; BURNIE, 2005;MAYER et al., 2012; TAMAYO et al., 2012).

O radicicol (Fig. 7A) também conhecido como monorden, KF9-A, KF58332 e NSC294404, é um produto natural, de peso molecular de 364,77, fórmula química  $C_{18}H_{17}ClO_6$ , descoberto em 1953 e é isolado do fungo *Diheterospora chlamydosporia* (COOKSON et al., 2014). Possui propriedades antifúngicas, antiparasitárias, antitumorais e é conhecidamente capaz de inibir a ação ATPásica das Hsp90 (Fig. 7B), ligando-se ao domínio N-terminal da proteína com afinidade nanomolar. É comercializado sob a forma de um pó cristalino, solúvel em diluentes orgânicos e em DMSO, com solubilidade de aproximadamente 20 mg/mL e estabilidade de até dois anos se estocado a - 20°C (COOKSON et al., 2014). O potencial antifúngico do radicicol já foi investigado nos patógenos fúngicos *C. albicans* (COWEN et al., 2006), *Aspergillus* spp. (CHEN; LEWIS; KONTOYIANNIS, 2011) e *P. brasiliensis* (NICOLA et al., 2008). No entanto, não há relatos na literatura sobre o radicicol frente à *Cryptococcus* spp.



**Figura 7.** Estrutura química do radicicol e sítio alvo de ligação à Hsp90. (A) estrutura química do radicicol. (B) estrutura cristalográfica do sítio de ligação de ATP das Hsp90 – alvo do radicicol. Adaptado de Ali et al., (2006) e Winssinger e Barluenga (2006).

Diversos estudos comprovam a importância das Hsp também em patógenos fúngicos. Sabe-se que ocorre um aumento da expressão de proteínas Hsp em células de *Candida albicans* submetidas a diferentes tipos de estresse. Ao longo do tempo, os cientistas têm acumulado evidências de que a expressão dessas proteínas é necessária à morfogênese, transição micélio-levedura, conidiogênese, integridade da parede celular e sinalização celular em geral em diversos patógenos fúngicos, tais como *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. neoformans*, *Aspergillus fumigatus*, *Fusarium oxysporum*, *Trichophyton rubrum*, *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis* e *Paracoccidioides brasiliensis* (BURNIE et al., 2006; LAMOTH et al., 2012; TAMAYO et al., 2012).

Estudos comprovam a importância das proteínas Hsp fúngicas durante o processo infeccioso (DAI et al., 2012; SHAPIRO; COWEN, 2012; SHAPIRO; COWEN, 2010; SHAPIRO et al., 2009). Embora a maioria das pesquisas seja conduzida com espécies de *Candida*, sabe-se que em *C. neoformans* as proteínas Hsp12, Hsp60, Hsp70 e Hsp90 desempenham função fundamental na instalação e desenvolvimento da infecção (BURNIE et al., 2006). Acredita-se que em *C. neoformans* a Hsp90 atue na regulação dos receptores de ferormônio, especulando-se ainda que a Hsp90 produzida pelo *C. neoformans* está envolvida na transdução de sinal via Ras1 que controla o acasalamento, a diferenciação das hifas durante a fase filamentosa e a capacidade de crescer a 37°C (BURNIE et al., 2006). A via de sinalização celular Ras1 é necessária para a indução da transcrição de elementos mediada pelo ferormônio, ativando a cascata de sinalização MAP quinase e regulação da produção de AMPc, que resulta no controle da reprodução e fenômeno de termotolerância contribuindo para virulência fúngica (BURNIE et al., 2006; VERI; COWEN, 2014). Já foi comprovado que em *C. albicans*, as proteínas Hsp90 potencializam uma rápida evolução da resistência aos antifúngicos, sobretudo aos azólicos, bem como à equinocandinas, em células planctônicas e, também participam na dispersão e resistência aos antifúngicos em biofilme (COWEN et al., 2009; COWEN; LINDQUIST, 2005; ROBBINS et al., 2011; SINGH et al., 2009). Assim, tendo em vista a importância das Hsp, sobretudo a Hsp90, para a homeostase celular, seu papel como alvo molecular terapêutico é fundamental para o desenvolvimento de estratégias antifúngicas.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

- ✓ Investigar o efeito do bloqueio das proteínas Hsp90 do Complexo *Cryptococcus neoformans/C. gattii* frente à sensibilidade a antifúngicos *in vitro*, produção de fatores de virulência *in vitro* e virulência *in vivo*.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Investigar o efeito do bloqueio das proteínas Hsp90 do Complexo *C. neoformans/C. gattii* sobre a sensibilidade a antifúngicos *in vitro* em células planctônicas e sésseis;
- ✓ Caracterizar as cepas do Complexo *C. neoformans/C. gattii* mantidas na coleção de culturas do CEMM quanto à produção dos fatores de virulência cápsula, melanina e proteases;
- ✓ Analisar o efeito da inibição das proteínas Hsp90 do Complexo *C. neoformans/C. gattii* sobre a produção dos fatores de virulência supracitados; e
- ✓ Avaliar o efeito da inativação das proteínas Hsp90 do Complexo *C. neoformans/C. gattii* frente à virulência *in vivo* em modelo de infecção experimental utilizando *C. elegans*.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 LOCAL DE ESTUDO

Esse estudo foi conduzido no Centro Especializado em Micologia Médica (CEMM), Departamento de Patologia e Medicina Legal da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará (UFC).

### 4.2 MICRO-ORGANISMOS UTILIZADOS

Nesse estudo, foram empregados isolados clínicos e ambientais de *C. neoformans* (n=18) e *C. gattii* (n=12). Todas as cepas pertencem à Micoteca do CEMM, onde estão mantidas a 4°C em solução salina a 0,9%. As cepas foram repicadas em Ágar Semente de Níger, e armazenadas em estufa por 48 horas a 35°C para verificação da ausência de contaminação. A manutenção das cepas foi realizada com repiques em tubos de ensaio contendo Ágar Batata (Himedia®), as quais eram incubadas por 48 horas a 35°C antes de cada experimentação. O quadro 1 apresenta a relação das cepas empregadas na pesquisa, bem como suas características de identificação e origem de isolamento.

**Quadro 1:** Identificação, espécie, sorotipo, genótipo e origem de isolamento das cepas do Complexo *Cryptococcus neoformans*/*C. gattii* utilizadas no estudo.

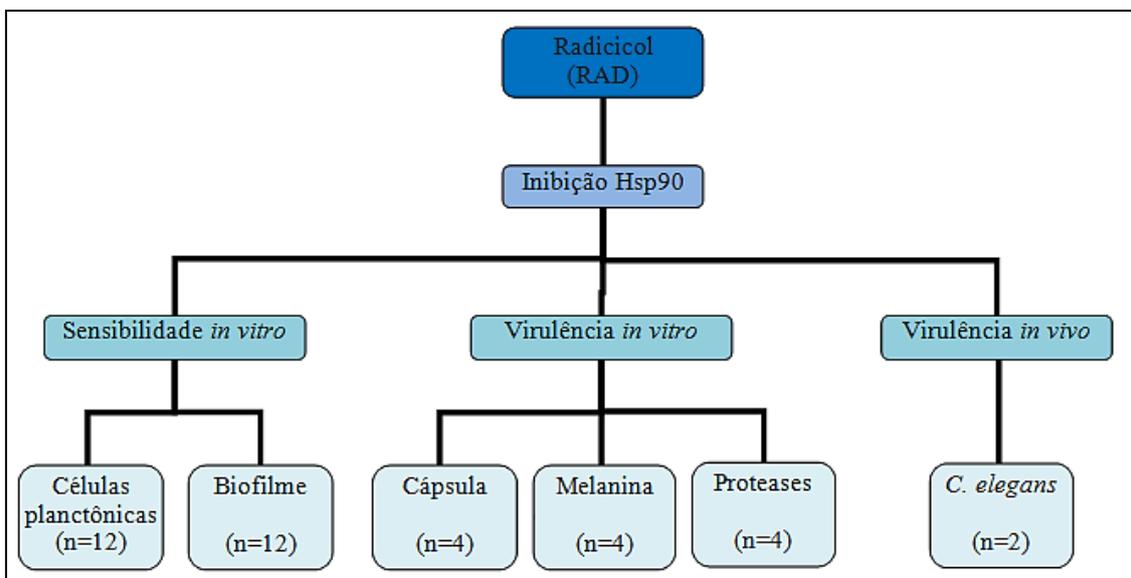
Cepas	Espécie fúngica	Sorotipo/ Genótipo	Origem de isolamento
CEMM 05-2-075	<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i>	A / VNI	Clínica
CEMM 05-2-076	<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i>	A / VNI	Clínica
CEMM 05-2-077	<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i>	AD / VNIII	Clínica
CEMM 05-2-078	<i>C. neoformans</i> var. <i>neoformans</i>	D / VNIV	Clínica
CEMM 05-1-050	<i>C. neoformans</i> var. <i>Grubii</i>	A / Nd	Clínica
CEMM 03-2-060	<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i>	A / Nd	Ambiental - excretas de pombos
CEMM 03-2-063	<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i>	A / Nd	Ambiental - excretas de pombos
CEMM 03-2-064	<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i>	A / Nd	Ambiental - excretas de pombos
CEMM 03-3-017	<i>C. neoformans</i>	Nd / Nd	Clínica
CEMM 05-1-071	<i>C. neoformans</i>	Nd / Nd	Nd
CEMM 05-1-068	<i>C. neoformans</i>	Nd / Nd	Nd
CEMM 02-2-141	<i>C. neoformans</i>	Nd / Nd	Nd
CEMM 03-2-075	<i>C. neoformans</i>	Nd / Nd	Ambiental
CEMM 03-2-085	<i>C. neoformans</i>	Nd / Nd	Nd
CEMM 03-6-028	<i>C. neoformans</i>	Nd / Nd	Clínica
CEMM 03-2-068	<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i>	A / Nd	Clínica – LCR
CEMM 05-1-067	<i>C. neoformans</i>	Nd / Nd	Nd
CEMM 05-1-074	<i>C. neoformans</i>	Nd / Nd	Nd
CEMM 05-2-079	<i>C. gattii</i>	B / VGI	Clínica
CEMM 05-2-080	<i>C. gattii</i>	B / VGII	Clínica
CEMM 05-2-081	<i>C. gattii</i>	B / VGIV	Ambiental
CEMM 05-2-082	<i>C. gattii</i>	B / VGIII	Clínica
CEMM 03-2-062	<i>C. gattii</i>	B / Nd	Clínica – LCR
CEMM 03-2-069	<i>C. gattii</i>	B / Nd	Clínica – Pele
CEMM 03-2-070	<i>C. gattii</i>	B / Nd	Clínica – LCR
CEMM 03-2-073	<i>C. gattii</i>	B / Nd	Clínica – LCR
CEMM 03-2-074	<i>C. gattii</i>	B / Nd	Ambiental - excretas de pombos
CEMM 05-3-028	<i>C. gattii</i>	Nd / Nd	Nd
CEMM 05-3-029	<i>C. gattii</i>	B / Nd	Clínica
CEMM 05-3-031	<i>C. gattii</i>	B / Nd	Clínica

Nd: não determinado; LCR: Líquido cefalorraquidiano.

### 4.3 DESENHO DO ESTUDO

No presente estudo, o bloqueio das proteínas Hsp90 foi realizado com o fármaco radicicol. A solução estoque foi diluída em solução de DMSO a 50% em água destilada estéril, com concentração final de 250 µg/mL. Alíquotas da solução estoque foram armazenadas a - 20°C até o momento do experimento. Analisou-se o efeito do radicicol isolado e combinado a antifúngicos frente a células planctônicas de *C. neoformans* e *C. gattii*, bem como ante a biofilmes de ambas as espécies. Para tanto, foram triadas as cepas que mostravam máxima produção de biofilme *in vitro* por meio dos testes do cristal violeta e XTT, descritos no item 4.4.2.1 (página 45).

A fim de investigar o efeito da inibição das Hsp90 sobre os fatores de virulência *in vitro*, inicialmente foi realizada uma triagem das cepas produtoras de cápsula, melanina e proteases, conforme descrito nos itens 4.5 (página 47), 4.6 (página 48) e 4.7 (página 49), respectivamente. Além disso, também foi investigada a virulência *in vivo* das cepas de *Cryptococcus* spp. em modelo de infecção experimental utilizando *C. elegans*. A figura 8 ilustra as principais etapas experimentais empregadas no estudo e a tabela 4 (Anexo A – página 90) contém a relação das cepas utilizadas nos experimentos frente à inibição das Hsp90.



**Figura 8.** Organograma das principais etapas experimentais do estudo. Os números entre parênteses representam a quantidade de cepas utilizadas em cada experimento na presença do radicicol.

#### 4.4 BLOQUEIO DAS Hsp90 SOBRE A SENSIBILIDADE A ANTIFÚNGICOS DO COMPLEXO *C. neoformans/C. gattii*

##### 4.4.1 Células planctônicas

O teste de sensibilidade das cepas do Complexo *C. neoformans/C. gattii* em crescimento planctônico foi realizado pela técnica de microdiluição em caldo, conforme o documento M27-A3 (CLSI, 2008). As drogas utilizadas foram anfotericina B (AMB), fluconazol (FLU), itraconazol (ITC) e voriconazol (VOR), bem como o radicicol (RAD). Os antifúngicos (ATF) foram testados nas concentrações preconizadas pelo documento citado anteriormente, com intervalos que variaram de 0,125 – 64 µg/mL para FLU e 0,0313 – 16 µg/mL para os demais antifúngicos. O RAD foi testado em concentrações que variaram de 0,0156 – 8 µg/mL (COWEN et al.; 2009). Os isolados foram previamente semeados em Ágar Batata e incubados a 35°C por 48 horas. Foi preparado um inóculo fúngico em solução salina estéril (0,9 % NaCl) ajustando a turbidez da suspensão à escala 0,5 de McFarland. A suspensão fúngica foi submetida à diluição de 1:50 e posteriormente 1:20 em meio RPMI-1640 tamponado com 0,165 M de MOPS a pH 7,0. Aliquotas de 100 µL do inóculo final foram adicionadas às placas já contendo 100 µL de RPMI-1640 suplementado das drogas, distribuídas em diluições seriadas. As placas foram incubadas a 35°C por 48 horas. As leituras dos pontos de corte das drogas foram determinadas de acordo com documento M27-A3. Para o RAD, o ponto de corte foi definido como a menor concentração capaz de inibir 100% do crescimento visível (COWEN et al., 2009).

Para a análise da interação entre os ATF e o RAD, foi adotada a metodologia de *Checkerboard* (tabuleiro de xadrez), com adaptações (JOHNSON et al., 2004; ODDS, 2003). Para cada cepa testada, foram combinadas as CIM correspondentes de todos os ATF e o RAD. Para a interpretação do teste, a concentração inibitória mínima de cada combinação (CIMsin) foi definida como as menores concentrações de cada droga em combinação capazes de causar uma redução proeminente do crescimento fúngico ( $\geq 50\%$ ) para os azólicos e 100% para AMB (NOONEY; MATTHEWS; BURNIE, 2005). A partir de então, a interação entre os compostos foi analisada por meio do cálculo do Índice da Concentração Inibitória Fracionária (FICI), definido pela soma das Concentrações Inibitórias Fracionadas (FIC)

para cada ATF, o qual corresponde à relação entre a CIM de cada ATF combinado com o RAD pela CIM do mesmo ATF testado isoladamente, como mostrado na fórmula a seguir:

$$FICI = \left[ \frac{\text{CIM RAD em combinação}}{\text{CIM RAD isolado}} \right] + \left[ \frac{\text{CIM ATF em combinação}}{\text{CIM ATF isolado}} \right]$$

Foram considerados os seguintes parâmetros:  $FICI \leq 0,5$ : Sinergismo,  $FICI > 4,0$ : Antagonismo e  $0,5 < FICI < 4,0$ : Sem interação (ODDS, 2003).

#### 4.4.2 Células associadas em biofilme

Inicialmente, foi realizada uma triagem por meio de ensaio de viabilidade e de coloração de biomassa a fim de detectar as melhores cepas produtoras de biofilme para serem empregadas nos testes com o RAD e os ATF, como descrito no item 4.4.2.1. O efeito do bloqueio das proteínas Hsp90 foi avaliado sobre a capacidade de formação de biofilme e sobre o biofilme formado pelas cepas de *Cryptococcus* spp.

##### 4.4.2.1 Bloqueio das Hsp90 frente à formação do biofilme

Para a avaliação frente à formação do biofilme adotou-se a metodologia estabelecida por Martinez e Casadevall (2006), com adaptações. Inicialmente, foi realizada uma triagem para detecção das melhores cepas a serem utilizadas no teste com o RAD e os ATF. Para tanto, as estirpes fúngicas foram cultivadas em Ágar Batata por 48 horas a 35°C. Decorrido esse tempo, as células foram suspensas em meio RPMI-1640 tamponado com MOPS, previamente ajustado o pH para 7,0, até atingir a turbidez correspondente à escala 4 de McFarland. Alíquotas de 200 µL dos inóculos foram incubadas nos poços das microplacas de 96 poços de fundo chato e incubadas por 48 horas a 35°C. Em seguida, foram feitas análises de viabilidade e produção de biomassa dos biofilmes.

A viabilidade dos biofilmes formados foi avaliada pela técnica colorimétrica de redução do XTT (2,3-bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-5-[(fenilamino)carbonil]-2H- hidróxido de tetrazólio), segundo Martinez e Casadevall (2006), com modificações.

O XTT (Sigma<sup>®</sup>) foi previamente preparado em uma solução com concentração final de 1 mg/mL. A solução foi esterilizada por filtração e estocada a - 20°C até o momento do uso. Adicionalmente, foi preparada uma solução de Menadiona (Sigma<sup>®</sup>) a 1 mM em acetona imediatamente antes de cada ensaio. Depois de 48 horas de incubação a 35°C sob agitação de 80 rpm, as placas contendo os biofilmes foram lavadas por duas vezes com PBS contendo Tween 20 (0,05% v/v) para a remoção de resíduos de células não aderidas. Em seguida, os poços das placas contendo os biofilmes foram preenchidos com uma solução contendo 50 µL de PBS estéril, 75 µL da solução de XTT e 6 µL da solução de Menadiona. Todo o processo foi realizado ao abrigo da luz direta. As placas foram incubadas a 35°C por 5 horas, também ao abrigo da luz. Após o período de incubação, a solução foi transferida para novas placas de microdiluição estéreis e realizada leitura em espectrofotômetro a 492 nm.

Para quantificação da biomassa dos biofilmes produzidos, utilizou-se a técnica colorimétrica com o Cristal Violeta (CV) segundo Peeters, Nelis e Coenye (2008), com adaptações. Decorrido o período de incubação, as placas foram lavadas como mencionado anteriormente e os biofilmes foram desidratados com metanol puro e as placas mantidas em temperatura ambiente. Os poços das placas foram preenchidos com 0,03% de CV por 20 minutos. Em seguida, as placas foram lavadas com água destilada e os biofilmes descoloridos pela adição de 200 µL de ácido acético a 33%. A absorbância foi mensurada em espectrofotômetro a 590 nm. Essa análise foi realizada apenas para a triagem das cepas a serem testadas frente ao RAD e os ATF.

As cepas selecionadas foram analisadas frente à formação dos biofilmes em presença do RAD e dos ATF. Para tanto, alíquotas de 100 µL de RPMI contendo os ATF e o RAD em concentrações duplicadas foi adicionado junto a 100 µL dos inóculos, como descrito anteriormente. Os ATF foram avaliados isoladamente nos valores de CIM ATF, 10 X CIM ATF e 50 X CIM ATF e combinados com o RAD nos valores de CIM RAD + CIM ATF e CIM RAD + 10 X CIM ATF, bem como o RAD isolado no valor de CIM. As placas foram incubadas por 48 horas a 35°C sob agitação de 80 rpm. A capacidade de inibição da formação dos biofilmes frente ao RAD e os ATF foi analisada apenas pelo ensaio do XTT e o resultado expresso em porcentagem de viabilidade em relação aos controles sem nenhum tratamento.

#### 4.4.2.2 Bloqueio das Hsp90 frente ao biofilme formado

A avaliação da atividade dos ATF combinados ou não com RAD sobre o biofilme formado também foi avaliada frente às mesmas cepas utilizadas no experimento ante à formação dos biofilmes, segundo Martinez e Casadevall (2006), com modificações. Os biofilmes foram formados a partir de inóculos previamente descritos no item 4.4.2.1. A partir dos inóculos feitos em RPMI-1640, 100 µL desses foram incubados nos poços de microplacas de 96 cavidades de fundo chato. Foram adicionados aos inóculos, 100 µL de meio RPMI-1640 puro e, as placas foram incubadas por 48 horas a 35°C sob agitação de 80 rpm. Depois da incubação, os sobrenadantes foram descartados, as placas foram lavadas por duas vezes com PBS contendo Tween 20 (0,05% v/v) para a remoção de resíduos de células não aderidas, e os poços foram novamente preenchidos com 200 µL de RPMI-1640 contendo os ATF e/ou RAD nas mesmas concentrações citadas no item 4.4.2.1. Depois de 48 horas de cultivo a 35°C sob agitação de 80 rpm, as placas foram lavadas e analisadas pela técnica de redução do XTT, conforme previamente descrito no item 4.4.2.1.

#### 4.5 BLOQUEIO DAS Hsp90 FRENTE À PRODUÇÃO DE CÁPSULA

A avaliação da produção de cápsula de *Cryptococcus* foi realizada segundo Frases et al. (2008) e Zaragoza e Casadevall (2004), com adaptações. Inicialmente, foi realizada uma triagem para detecção das melhores cepas a serem utilizadas no teste frente à inibição das Hsp90. Para tanto, as cepas foram repicadas em Ágar Batata por 48 horas a 35°C. Em seguida, as células foram ressuscitadas em solução salina (0,9% NaCl) até a escala 4 de McFarland. Alíquotas de 100 µL do inóculo foram transferidas para tubo de ensaio contendo 1 mL de meio indutor de cápsula (glicose 15 mM, MgSO<sub>4</sub> 10 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 29,4 mM, glicina 13 mM, tiamina-HCl 3 µM, pH 5,5) e os cultivos foram incubados por 48 horas a 35°C. Decorrido esse período, foram montadas lâminas com Tinta da China e observadas no microscópio ótico Olympus® BX53 em aumento de 400 X.

Para a triagem, as cepas foram consideradas como não produtoras (-) se não fosse evidenciada presença de cápsula em 10 células por campo de 10 campos aleatórios; fraca produtora (+) se > 1 e < 3 cepas apresentassem cápsula em 10 células

por campo de 10 campos aleatórios; moderada produtora (+ +) se > 3 e < 6 cepas apresentassem cápsula em 10 células por campo de 10 campos aleatórios; e forte produtora (+ + +) se > 6 a 10 cepas apresentassem cápsula em 10 células por campo de 10 campos aleatórios.

Para análise do bloqueio das Hsp90 frente à produção de cápsula foram escolhidas as cepas consideradas como fortes produtoras. Para tanto, as cepas foram estimuladas à produção de cápsula, como descrito anteriormente. Foram acrescidos 100 µL de RAD no valor de CIM isolado e em combinação com FLU, também no valor de CIM, junto ao meio indutor para cada cepa testada. O controle do experimento foi realizado sem a presença das drogas. Em seguida, lâminas foram preparadas com Tinta da China e observadas em microscopia ótica, com descrito previamente.

Com o auxílio do *software* Cellsens<sup>®</sup> 2011, foram mensurados os diâmetros das cápsulas de 50 células num total de 10 campos para cada amostra. O volume das cápsulas produzidas foi calculado pela fórmula a seguir:

$$\text{Volume da cápsula} = \underbrace{[(4\pi/3)(D_1/2)^3]}_A - \underbrace{[(4\pi/3)(D_2/2)^3]}_B$$

Sendo “A” considerado o diâmetro total da célula com a cápsula; “B”, o diâmetro do blastoconídio; “D<sub>1</sub>”, o diâmetro total da célula com a cápsula e “D<sub>2</sub>”, o diâmetro do blastoconídio (ZARAGOZA; CASADEVALL, 2004).

#### 4.6 BLOQUEIO DAS Hsp90 FRENTE À PRODUÇÃO DE MELANINA

Inicialmente foi realizada uma triagem para detecção das cepas produtoras de melanina a serem empregadas na análise do bloqueio das Hsp90, segundo Nardelli et al., (2005). As cepas foram repicadas em Ágar Batata por 48 horas a 35°C e em seguida, foi feito repique em meio Ágar Semente de Níger e as placas incubadas por 48 horas a 30°C. As cepas foram classificadas como produtoras de melanina se fosse evidenciada pigmentação de coloração castanho-marrom após o período de incubação, ou não produtoras, se ovesse ausência de pigmentação. Controle de qualidade do meio utilizado foi realizado com cepa de *C. albicans*.

Para análise do bloqueio das Hsp90 frente à capacidade de produção de melanina foi adotada a metodologia proposta por Pukkila-Worley et al. (2005), descrita em estudo de Ngamskulrungraj e Meyer (2009), com modificações. Foram incluídas no teste, cepas consideradas produtoras de melanina no experimento de triagem. Inicialmente, as cepas foram repicadas em Ágar Batata por 48 horas a 35°C. Em seguida, as células foram inoculadas em meio YEPD (glicose a 2%, peptona a 2% e de extrato de levedura a 1%) e reincubadas a 35°C por 24 h. Após a incubação, as células foram ressuspensas em solução salina (0,9% NaCl) até a escala 4 de McFarland. Desse inóculo, 100 µL foram semeados em 1700 µL de meio de indução de melanina (1% de glicose YNB – *Yeast Nitrogen Base* – sem aminoácidos e sem sulfato de amônio) contendo a CIM do RAD. Para indução da produção de melanina foi utilizado 200 µL de L-DOPA a 10 mM. Os tubos foram incubados por 48 horas a 30°C. Decorrido o tempo de incubação, os cultivos foram centrifugados a 3500 rpm por 5 minutos, e os sobrenadantes foram lidos em espectrofotômetro a 475 nm. Os controles do experimento foram constituídos pela ausência da L-DOPA (controle negativo) e presença de L-DOPA (controle positivo).

#### 4.7 BLOQUEIO DAS Hsp90 FRENTE À PRODUÇÃO DE PROTEASES

A detecção da produção de enzimas proteolíticas foi realizada conforme Charney e Tomarelli (1947), com modificações. Inicialmente, foi realizada uma triagem de detecção da produção de proteases a fim de determinar quais as cepas a serem utilizadas no experimento do bloqueio das Hsp90. Para tanto, as cepas foram repicadas em Ágar Batata por 48 horas a 35°C. Em seguida, as células foram ressuspensas em solução salina (0,9% NaCl) até a escala 0,5 de McFarland. Desse inóculo, 2 mL foram semeados em 20 mL de meio RPMI-1640 tamponado com MOPS (ácido morfolinopropanosulfônico a 0,165 M). Os tubos foram incubados durante cinco dias a 35°C sob agitação de 80 rpm. Passado esse período, alíquotas de 100 µL foram retiradas para semeio em placas contendo Ágar Batata para posterior contagem de Unidades Formadoras de Colônia (UFC) depois da incubação a 35°C durante 48 horas. Em seguida 1,5 mL dos cultivos foram centrifugados a 10.000 rpm durante 10 minutos. Alíquota de 1 mL de cada sobrenadante foi coletado e adicionado a 1 mL de uma solução de azoalbumina (0,3% diluída em uma solução de bicarbonato de sódio a 1%,

pH 8,3) e, em seguida, o volume final de 2 mL foi incubado em banho-maria a 37°C por 3 horas. Decorrido esse tempo, a reação enzimática foi parada com a adição de 8 mL de ácido tricloroacético a 5%. Alíquotas de 2 mL foram centrifugadas a 10000 rpm por 10 minutos e 1 mL do sobrenadante foi retirado e adicionado a 1 mL de uma solução de NaOH a 0,5 M. Após agitação em vórtex por 30 segundos, a solução foi lida em espectrofotômetro a 440 nm. Para a análise do bloqueio das proteínas Hsp90 frente à produção de proteases, foram selecionadas as cepas cuja atividade proteolítica apresentasse os maiores valores de Densidade Ótica (DO).

Para averiguar o efeito do bloqueio das Hsp90 ante a atividade proteolítica o RAD foi acrescido ao meio no valor de CIM isolado e em combinação com a CIM do FLU ou VOR para cada cepa testada. O branco da leitura do experimento foi realizado sem a inoculação dos micro-organismos e o controle negativo do teste foi feito na presença dos micro-organismos e ausência das drogas.

#### 4.8 BLOQUEIO DAS Hsp90 FRENTE À VIRULÊNCIA EM *Caenorhabditis elegans*

A avaliação *in vivo* sobre o efeito do bloqueio das proteínas Hsp90 foi investigada por meio de infecção experimental utilizando o nematódeo *C. elegans*, segundo os protocolos propostos por Breger et al. (2007) e Okoli et al. (2009), com adaptações. Nematódeos em estágio L4 foram previamente cultivados em meio NGM (*Nematode Growth Medium*) com *Escherichia coli* OP50. As cepas fúngicas de *C. neoformans* e *C. gattii* foram previamente cultivadas em meio Ágar BHI (*Brain Heart Infusion* – Himedia®) suplementado de 100 µg/mL de ciprofloxacina durante 48 horas a 35°C. Assim como cepa de *E. coli* OP50, também foi previamente crescida por 24 horas a 30°C em meio BHI sem antibiótico para servir de controle do experimento. Em seguida, os vermes foram transferidos, por lavagem com tampão M9, para as placas contendo os micro-organismos. Em seguida, as placas foram mantidas em temperatura de 25°C por 2 horas para que os nematódeos se alimentassem dos micro-organismos. Decorrido esse período, os nematódeos foram submetidos a três lavagens consecutivas em caldo BHI para retirada dos micro-organismos aderidos à cutícula. Passado esse processo, aproximadamente 50 vermes/poço foram transferidos para placas de microtitulação de seis poços contendo 1,5 mL de meio líquido composto por 79% de tampão M9, 20% de BHI, 10 µg/mL de colesterol diluído em etanol, 50 µg/mL de

ciprofloxacina. O RAD no valor de CIM isolado e em combinação com FLU, também no valor de CIM, foi adicionado aos poços. As placas foram incubadas por cinco dias a 25°C, sendo feita análise da viabilidade dos nematódeos nos tempos 0, 24, 48, 72 e 96 horas. Foram considerados mortos os animais que apresentavam estruturas fúngicas exteriorizando-se do pseudoceloma do nematódeo e/ou que não respondessem a estímulos mecânicos. Cada verme considerado morto era retirado do poço da placa ao longo do experimento, sendo estabelecida uma curva de sobrevivência ao final do teste (BREGER et al., 2007).

#### 4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram avaliados por ANOVA e as médias foram comparadas pelo pós-teste de Tukey. Para a curva de sobrevivência foi adotado o teste Kaplan-Meier, e os testes log-rank e Wilcoxon utilizados para detecção de diferença entre os grupos. O valor de  $p < 0,05$  foi considerado significativo para todas as avaliações. As análises estatísticas foram realizadas por meio do *software* GraphPad Prism<sup>®</sup> 5.0 (GraphPadSoftware, San Diego, CA, USA).

## 5 RESULTADOS

### 5.1 EFEITO DO BLOQUEIO DAS HSP90 SOBRE A SENSIBILIDADE A ANTIFÚNGICOS DO COMPLEXO *C. neoformans/C. gattii*

#### 5.1.1 Células planctônicas

A sensibilidade das células planctônicas do Complexo *Cryptococcus neoformans/C. gattii* frente ao RAD, à AMB e aos derivados azólicos está descrita na tabela 1, e a ocorrência de sinergismo entre as drogas está mostrada na tabela 2.

Observou-se que o RAD inibiu o crescimento das cepas do Complexo *Cryptococcus neoformans/C. gattii*, com valores de CIM que variaram de 0,5 a 2 µg/mL. Para AMB, um isolado apresentou resistência, com CIM de 2 µg/mL. Para ITC e VOR, não observou-se resistência em nenhum dos isolados. Entretanto, cinco de doze (5/12) isolados foram resistentes ao FLU, sendo quatro cepas (4/12) sensíveis-dose-dependentes, de acordo com a norma técnica M27-A3 (CLSI, 2008).

**Tabela 1.** Concentrações inibitórias mínimas (µg/mL) de radicicol, anfotericina B, itraconazol, voriconazol e fluconazol isolados, frente a células planctônicas do Complexo *Cryptococcus neoformans/C. gattii*.

Cepas	Espécie	Drogas isoladas				
		RAD	AMB	ITC	VOR	FLU
CEMM 05-1-071	<i>C. neoformans</i>	2	1	0,062	0,25	4
CEMM 05-2-076	<i>C. neoformans</i>	1,375	0,015	0,007	0,125	16
CEMM 03-2-063	<i>C. neoformans</i>	1	0,125	0,5	0,25	32
CEMM 05-2-077	<i>C. neoformans</i>	1,375	0,125	0,5	0,25	8
CEMM 05-1-050	<i>C. neoformans</i>	1,375	0,5	1	0,25	128
CEMM 03-2-060	<i>C. neoformans</i>	1,375	0,25	1	0,25	16
CEMM 05-2-079	<i>C. gattii</i>	0,5	0,062	0,007	0,25	64
CEMM 03-2-070	<i>C. gattii</i>	1,375	0,5	0,125	0,5	32
CEMM 03-2-074	<i>C. gattii</i>	1,375	1	1	0,5	64
CEMM 05-2-082	<i>C. gattii</i>	1,375	1	1	0,5	64
CEMM 03-2-069	<i>C. gattii</i>	2	1	0,25	0,5	8
CEMM 03-2-073	<i>C. gattii</i>	1,375	2	0,5	0,25	128

RAD: radicicol; AMB: anfotericina B; ITC: itraconazol; VOR: voriconazol; FLU: fluconazol.

Quanto ao teste de interação farmacológica, observou-se sinergismo em quatro cepas (4/12) para a combinação do RAD com a AMB, com diminuição de quatro vezes os valores de CIM para ambas as drogas.

Para ITC, a combinação com o RAD foi sinérgica em nove das doze (9/12) cepas testadas, sendo capaz de diminuir de oito até 64 vezes as CIM de ambas as drogas.

Já para FLU e VOR, foi observado sinergismo em onze das doze (11/12) cepas testadas, combinados com o RAD. Para FLU, também houve uma diminuição de oito até 64 vezes das CIM tanto do antifúngico quanto do RAD, modificando o perfil de sensibilidade de cepas resistentes ao FLU para sensíveis a esse antifúngico. Para VOR, foram observadas diminuições de oito a 32 vezes dos valores de CIM.

**Tabela 2.** Concentrações inibitórias mínimas ( $\mu\text{g/mL}$ ) do radicicol e antifúngicos em combinação, frente às células planctônicas do Complexo *Cryptococcus neoformans/C. gattii*.

Cepas	Espécie	Combinados		FICI	Resultado	Combinados		FICI	Resultado	Combinados		FICI	Resultado	Combinados		FICI	Resultado
		RAD	AMB			RAD	ITC			RAD	VOR			RAD	FLU		
CEMM 05-1-071	<i>C. neoformans</i>	>0,5	>0,25	>0,5	Sem interação	>0,5	>0,015	>0,5	Sem interação	>0,5	>0,062	>0,5	Sem interação	>0,5	>1	>0,5	Sem interação
CEMM 05-2-076	<i>C. neoformans</i>	>0,343	>0,003	>0,5	Sem interação	>0,343	>0,001	>0,5	Sem interação	0,171	0,015	0,249	<b>Sinergismo</b>	0,021	0,25	0,031	<b>Sinergismo</b>
CEMM 03-2-063	<i>C. neoformans</i>	>0,25	>0,5	>0,5	Sem interação	0,125	0,062	0,25	<b>Sinergismo</b>	0,125	0,031	0,249	<b>Sinergismo</b>	0,031	1	0,062	<b>Sinergismo</b>
CEMM 05-2-077	<i>C. neoformans</i>	>0,343	>0,031	>0,5	Sem interação	0,085	0,003	0,068	<b>Sinergismo</b>	0,085	0,015	0,124	<b>Sinergismo</b>	0,042	0,25	0,062	<b>Sinergismo</b>
CEMM 05-1-050	<i>C. neoformans</i>	>0,343	>0,125	>0,5	Sem interação	0,171	0,125	0,25	<b>Sinergismo</b>	0,171	0,031	0,25	<b>Sinergismo</b>	0,085	8	0,124	<b>Sinergismo</b>
CEMM 03-2-060	<i>C. neoformans</i>	0,343	0,062	0,499	<b>Sinergismo</b>	0,343	0,25	0,499	<b>Sinergismo</b>	0,171	0,031	0,25	<b>Sinergismo</b>	0,085	1	0,124	<b>Sinergismo</b>
CEMM 05-2-079	<i>C. gattii</i>	>0,125	>0,25	>0,5	Sem interação	>0,125	>0,001	>0,5	Sem interação	0,031	0,015	0,124	<b>Sinergismo</b>	0,007	1	0,031	<b>Sinergismo</b>
CEMM 03-2-070	<i>C. gattii</i>	>0,343	>0,5	>0,5	Sem interação	0,343	0,031	0,499	<b>Sinergismo</b>	0,171	0,062	0,25	<b>Sinergismo</b>	0,171	4	0,25	<b>Sinergismo</b>
CEMM 03-2-074	<i>C. gattii</i>	>0,343	>0,25	>0,5	Sem interação	0,042	0,062	0,092	<b>Sinergismo</b>	0,042	0,015	0,062	<b>Sinergismo</b>	0,021	1	0,031	<b>Sinergismo</b>
CEMM 05-2-082	<i>C. gattii</i>	0,343	0,25	0,499	<b>Sinergismo</b>	0,085	0,062	0,124	<b>Sinergismo</b>	0,171	0,062	0,249	<b>Sinergismo</b>	0,042	2	0,062	<b>Sinergismo</b>
CEMM 03-2-069	<i>C. gattii</i>	0,5	0,25	0,499	<b>Sinergismo</b>	0,031	0,003	0,031	<b>Sinergismo</b>	0,125	0,031	0,124	<b>Sinergismo</b>	0,25	1	0,25	<b>Sinergismo</b>
CEMM 03-2-073	<i>C. gattii</i>	0,343	0,5	0,499	<b>Sinergismo</b>	0,171	0,062	0,25	<b>Sinergismo</b>	0,171	0,031	0,25	<b>Sinergismo</b>	0,085	8	0,124	<b>Sinergismo</b>

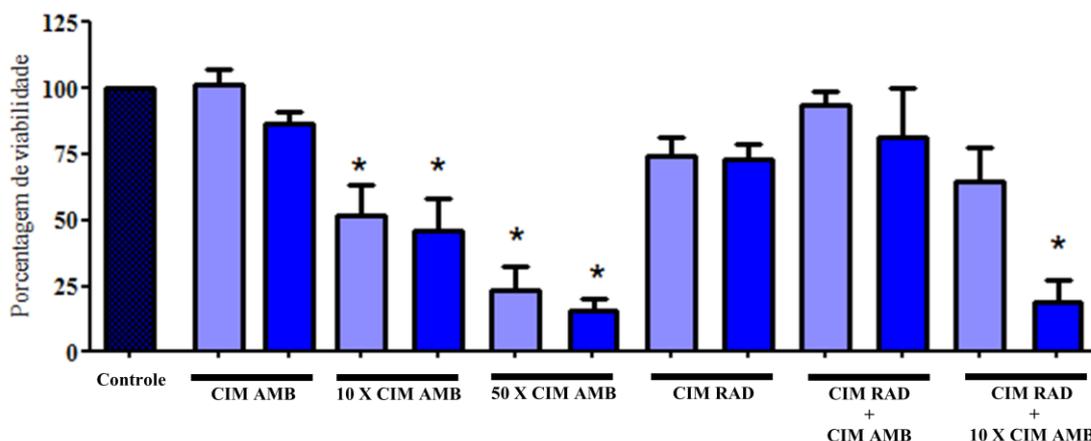
RAD: radicicol; AMB: anfotericina B; ITC: itraconazol; VOR: voriconazol; FLU: fluconazol; FICI: Índice da Concentração Inibitória Fracionária ( $\leq 0,5$ : Sinergismo;  $> 4,0$ : Antagonismo e  $0,5 < \text{FICI} < 4,0$ : Sem interação).

### 5.1.2 Células associadas em biofilme

#### 5.1.2.1 Efeito do bloqueio das Hsp90 frente à formação do biofilme

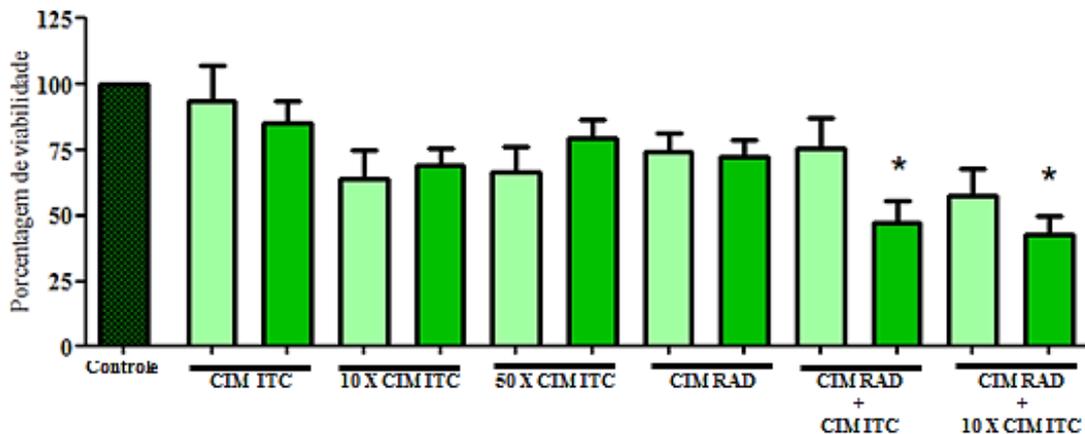
O efeito do bloqueio das Hsp90 sobre a capacidade de formação de biofilme pelo Complexo *Cryptococcus neoformans/C. gattii*, bem como a sensibilidade a diferentes concentrações de AMB, ITR, VOR e FLU e, a interação entre antifúngicos e o RAD estão mostrados nas figuras 9, 10, 11 e 12, respectivamente. De um modo geral, a combinação entre o RAD e todos os antifúngicos testados foi mais efetiva na inibição da formação de biofilme de *C. gattii* (média total: 57%) quando comparado a *C. neoformans* (média total: 73%). Para a espécie *C. neoformans*, a melhor combinação foi entre a CIM do RAD e 10 X CIM do FLU. Já para espécie *C. gattii*, as melhores combinações foram entre CIM RAD + 10 X CIM do VOR e 10 X CIM FLU.

O bloqueio das Hps90 não inibiu a formação de biofilme pelo Complexo *Cryptococcus neoformans/C. gattii* (Fig. 9). Observou-se que a AMB isolada, nos valores de 10 X CIM e 50 X CIM, reduziu a formação de biofilme para 51% e 23% para *C. neoformans* e para *C. gattii* 45% e 15%, respectivamente, quando comparada ao controle sem tratamento. Não observou-se diferença significativa entre essas duas concentrações de AMB isolada ( $p>0,05$ ). A combinação formada por CIM RAD e 10 X CIM AMB reduziu a formação de biofilme da espécie *C. gattii* para 18% ( $p<0,05$ ) comparada ao controle sem tratamento, entretanto, não apresentou diferença significativa com a mesma concentração de AMB isolada ( $p>0,05$ ).



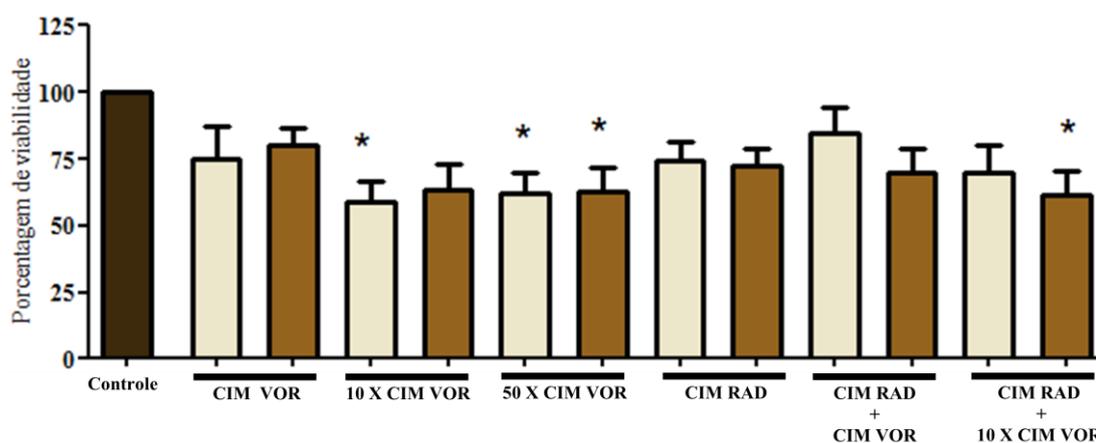
**Figura 9.** Efeito do bloqueio das Hsp90 pelo radicicol isolado e em combinação com anfotericina B sob a formação de biofilme pelo Complexo *Cryptococcus neoformans/C. gattii*. Barras azul claro – *C. neoformans* (n=6). Barras azul escuro – *C. gattii* (n=6). Os asteriscos representam diferença significativa em relação ao controle sem tratamento ( $p<0,05$ ).

A combinação formada por CIM RAD e CIM e 10 X CIM ITC reduziu significativamente a formação de biofilme da espécie *C. gattii* para 47% e 42%, respectivamente, quando comparada ao controle sem tratamento ( $p < 0,05$ ) (Fig.10). Não observou-se diminuição significativa da formação de biofilme pelo ITC isolado ( $p > 0,05$ ). Assim, a CIM do RAD potencializou o efeito inibitório do ITC, em ambas as concentrações combinadas com o RAD, sobre a formação de biofilme de *C. gattii* ( $p < 0,05$ ).



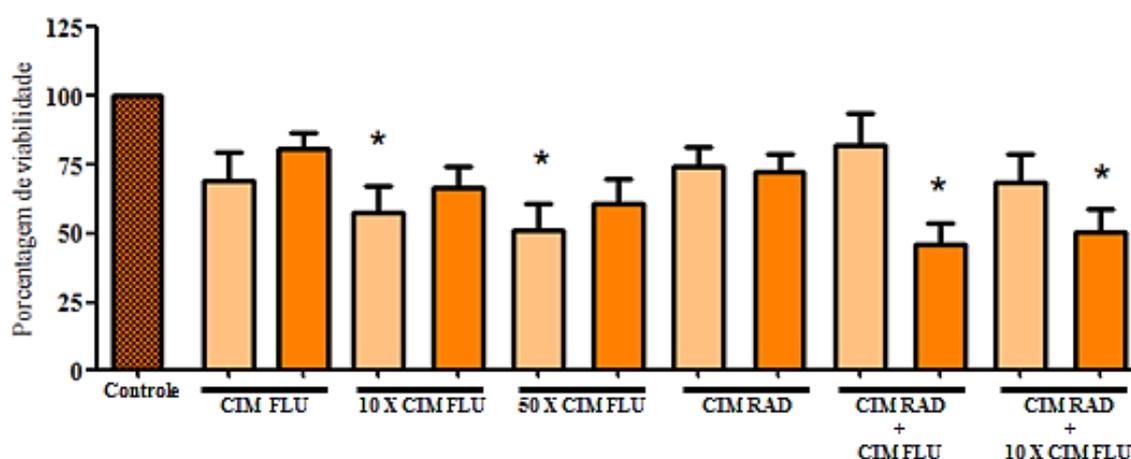
**Figura 10.** Efeito do bloqueio das Hsp90 pelo radicicol e em combinação com itraconazol sob a formação de biofilme pelo Complexo *Cryptococcus neoformans/C. gattii*. Barras verde claro – *C. neoformans* (n=6). Barras verde escuro – *C. gattii* (n=6). Os asteriscos representam diferença significativa em relação ao controle sem tratamento ( $p < 0,05$ ).

A figura 11 mostra que o VOR testado isoladamente nos valores de 50 X CIM diminuiu para 62% a formação de biofilme em ambas as espécies, quando comparada ao controle sem antifúngico ( $p < 0,05$ ). No valor de 10 X CIM isolada, o VOR reduziu a formação de biofilme de *C. neoformans* para 58% ( $p < 0,05$ ), mas não reduziu a formação de biofilme de *C. gattii* ( $p > 0,05$ ). A combinação formada por CIM RAD e 10 X CIM VOR reduziu a formação de biofilme de *C. gattii* para 61%, quando comparada ao controle sem tratamento ( $p < 0,05$ ) mostrando que a inibição das Hsp90 potencializou o efeito do VOR sobre a inibição da formação dos biofilmes produzidos por *C. gattii*.



**Figura 11.** Efeito do bloqueio das Hsp90 pelo radicicol e em combinação com voriconazol sob a formação de biofilme pelo Complexo *Cryptococcus neoformans/C. gattii*. Barras marrom claro – *C. neoformans* (n=6). Barras marrom escuro – *C. gattii* (n=6). Os asteriscos representam diferença significativa em relação ao controle sem tratamento ( $p < 0,05$ ).

A combinação formada por CIM RAD e CIM e 10 X CIM FLU reduziu significativamente a formação de biofilme da espécie *C. gattii* para 46% e 50%, respectivamente, quando comparados ao controle sem tratamento ( $p < 0,05$ ) (Fig. 12). Como observado para ITC, o RAD também potencializou o efeito inibitório do FLU sobre a formação de biofilme de *C. gattii* ( $p < 0,05$ ). Ainda, observou-se também que o tratamento com 10 X CIM e 50 X CIM do FLU isolado apresentou significância estatística frente à inibição da formação de biofilmes de *C. neoformans*, quando comparados ao controle, sem tratamento ( $p < 0,05$ ).

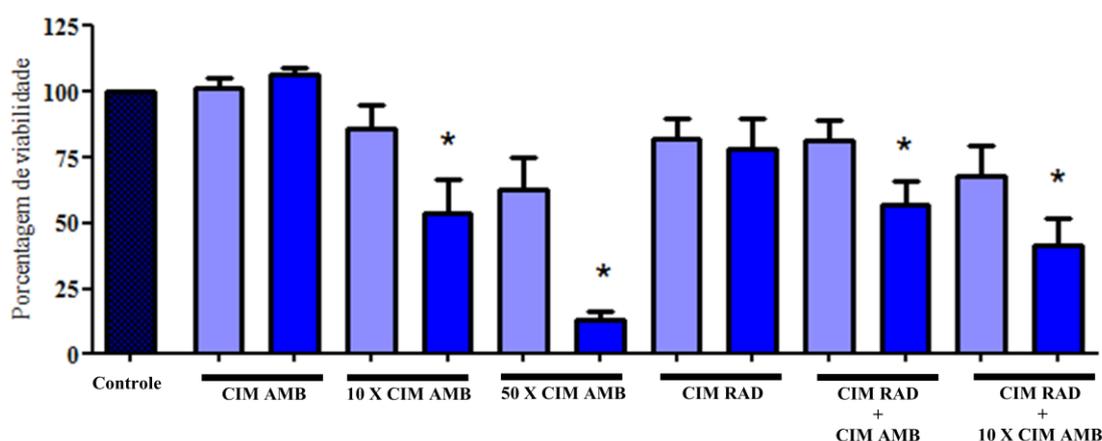


**Figura 12.** Efeito do bloqueio das Hsp90 pelo radicicol e em combinação com fluconazol sob a formação de biofilme pelo Complexo *Cryptococcus neoformans/C. gattii*. Barras laranja claro – *C. neoformans* (n=6). Barras laranja escuro – *C. gattii* (n=6). Os asteriscos representam diferença significativa em relação ao controle sem tratamento ( $p < 0,05$ ).

### 5.1.2.2 Efeito do bloqueio das Hsp90 frente ao biofilme formado

O efeito do bloqueio das Hsp90 sobre a redução da viabilidade dos biofilmes produzidos pelo Complexo *Cryptococcus neoformans/C. gattii*, bem como a sensibilidade dos biofilmes formados a diferentes concentrações de AMB, ITC, VOR e FLU e a interação entre os antifúngicos e o RAD estão mostrados nas figuras 13,14, 15 e 16, respectivamente.

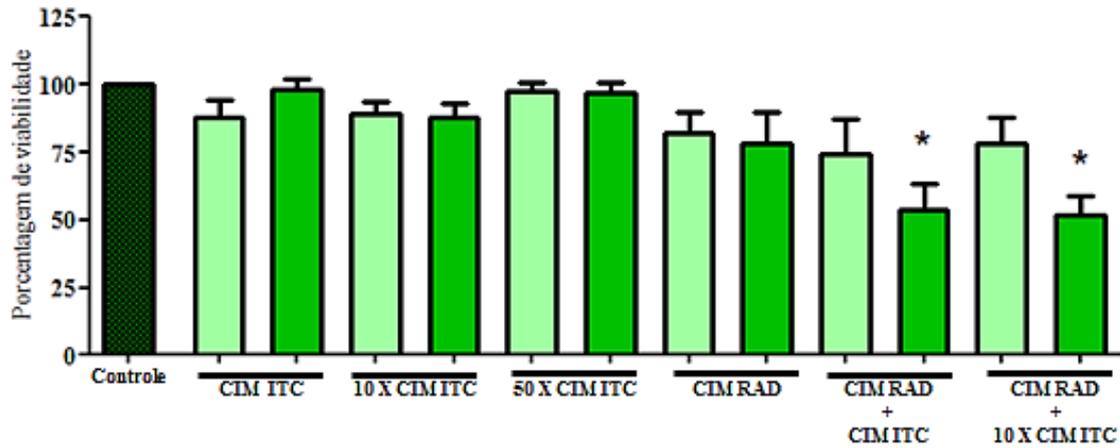
O bloqueio das Hps90 não diminuiu a viabilidade dos biofilmes formados por cepas do Complexo *Cryptococcus neoformans/C. gattii* ( $p < 0,05$ ) (Fig.13). Observou-se que a AMB isolada nos valores de 10 X CIM e 50 X CIM diminuiu a viabilidade dos biofilmes formados por *C. gattii* para 54% e 13%, respectivamente, quando comparados ao controle sem tratamento ( $p < 0,05$ ). A combinação da CIM do RAD com a CIM e com 10 X CIM de AMB reduziu significativamente a viabilidade dos biofilmes formados por *C. gattii*, em comparação com o controle sem tratamento ( $p < 0,05$ ). Isoladamente, a CIM AMB não diminuiu a viabilidade dos biofilmes de *C. gattii* ( $p > 0,05$ ). Entretanto, constatou-se que a CIM do RAD potencializou o efeito da CIM da AMB diminuindo em 34% a viabilidade dos biofilmes formados por *C. gattii*, em relação ao controle sem tratamento ( $p > 0,05$ ).



**Figura 13.** Efeito do bloqueio das Hsp90 pelo radicicol e em combinação com anfotericina B sobre a viabilidade dos biofilmes formados pelo Complexo *Cryptococcus neoformans/C. gattii*. Barras azul claro – *C. neoformans* (n=6). Barras azul escuro – *C. gattii* (n=6). Os asteriscos representam diferença significativa em relação ao controle sem tratamento ( $p < 0,05$ ).

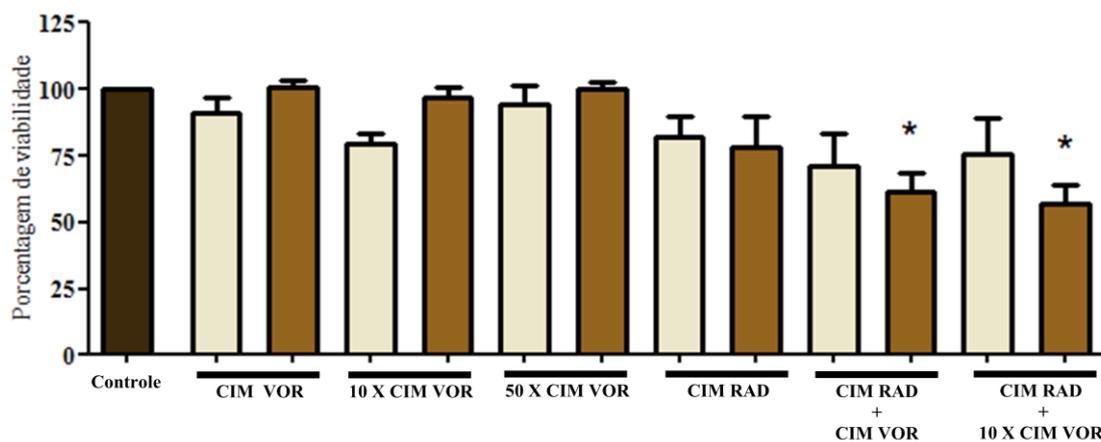
Nenhuma das concentrações de ITC testadas isoladamente diminuíram significativamente a viabilidade dos biofilmes formados pelo Complexo *Cryptococcus neoformans/C. gattii*, quando comparado ao controle sem tratamento ( $p < 0,05$ ). Entretanto, a combinação da CIM do RAD com a CIM e 10 X CIM do ITC reduziu a viabilidade dos

biofilmes formados por *C. gattii* para 53% e 51%, respectivamente, quando comparada ao controle sem tratamento ( $p < 0,05$ ) (Fig.14) mostrando que a inibição das Hsp90 potencializa o efeito inibitório do ITC em biofilmes formados dessa espécie.



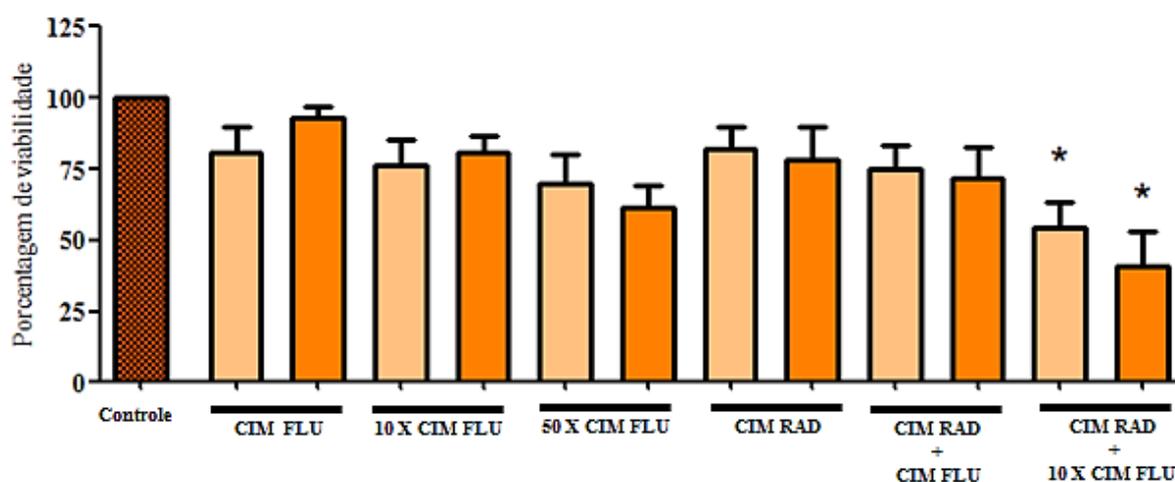
**Figura 14.** Efeito do bloqueio das Hsp90 pelo radicicol e em combinação com itraconazol sobre a viabilidade dos biofilmes formados pelo Complexo *Cryptococcus neoformans/C. gattii*. Barras verde claro – *C. neoformans* (n=6). Barras verde escuro – *C. gattii* (n=6). Os asteriscos representam diferença significativa em relação ao controle sem tratamento ( $p < 0,05$ ).

A combinação da CIM do RAD com a CIM e com 10 X CIM de VOR reduziu significativamente a viabilidade dos biofilmes formados por *C. gattii* para 61% e 57%, respectivamente, quando comparados ao controle sem tratamento ( $p < 0,05$ ) (Fig.15). Constatou-se que a CIM do RAD potencializou o efeito inibitório do VOR nas concentrações supracitadas ( $p < 0,05$ ), uma vez que os biofilmes tratados com o VOR isoladamente não apresentaram diferença significativa em relação ao controle nas concentrações testadas ( $p > 0,05$ ).



**Figura 15.** Efeito do bloqueio das Hsp90 pelo radicicol e em combinação com voriconazol sobre a viabilidade dos biofilmes formados pelo Complexo *Cryptococcus neoformans/C. gattii*. Barras marrom claro – *C. neoformans* (n=6). Barras marrom escuro – *C. gattii* (n=6). Os asteriscos representam diferença significativa em relação ao controle sem tratamento ( $p < 0,05$ ).

A combinação da CIM do RAD com 10 X CIM de FLU reduziu significativamente a viabilidade dos biofilmes formados pelo Complexo *Cryptococcus neoformans/C. gattii* para 54% e 40%, respectivamente, quando comparada ao controle sem tratamento ( $p < 0,05$ ) (Fig.16). Constatou-se que a CIM do RAD potencializou o efeito do FLU no valor de 10 X CIM ( $p < 0,05$ ), uma vez que, quando testado isoladamente, o FLU não diminuiu significativamente a viabilidade dos biofilmes formados em comparação ao controle ( $p > 0,05$ ).



**Figura 16.** Efeito do bloqueio das Hsp90 pelo radicicol e em combinação com fluconazol sobre a viabilidade dos biofilmes formados pelo Complexo *Cryptococcus neoformans/C. gattii*. Barras laranja claro – *C. neoformans* (n=6). Barras laranja escuro – *C. gattii* (n=6). Os asteriscos representam diferença significativa em relação ao controle sem tratamento ( $p < 0,05$ ).

## 5.2 PRODUÇÃO DE FATORES DE VIRULÊNCIA

Os resultados da detecção dos fatores de virulência – biofilme, cápsula, melanina, proteases – produzidos por cepas do Complexo *Cryptococcus neoformans/C. gattii* estão descritos na tabela 3.

A análise da produção de biofilme pelas cepas do Complexo *Cryptococcus neoformans/C. gattii* revelou que todas as cepas testadas produziram biofilmes. Na avaliação da viabilidade dos biofilmes utilizando ensaio com XTT, observou-se valores de densidade ótica (492 nm) que variaram de 0,053 a 1,737. Já para a quantificação de biomassa utilizando ensaio colorimétrico com CV, observou-se valores de densidade ótica (590 nm) que variaram de 0,253 a 0,969.

Quanto à produção de cápsula, as cepas foram classificadas como: Não produtora – duas de 30 cepas (2/30); Fraca produtora – 13 de 30 cepas (13/30); Moderada produtora – seis de 30 cepas (6/30); Forte produtora – nove de 30 cepas (9/30).

Referente à produção de proteases, as absorbâncias variaram de 0,000 a 0,044. Apenas uma entre 30 cepas (1/30) foi considerada não produtora de proteases, pois não foi possível detectar componentes capazes de absorver a luz em comprimento de onda de 440nm.

No tocante à produção de melanina, todas as cepas experimentadas produziram melanina em meio de cultura Ágar Níger após 48 horas de incubação a 30°C.

**Tabela 3.** Produção de fatores de virulência por cepas do Complexo *Cryptococcus neoformans/C. gattii*<sup>1</sup>.

Cepas	Espécie fúngica	Biofilmes*		Cápsula	Proteases*
		Viabilidade XTT	Biomassa CV		
CEMM 05-2-075	<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i>	Nt	Nt	-	0,012
CEMM 05-2-076	<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i>	1,276	0,369	++	0,022
CEMM 05-2-077	<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i>	1,410	Nt	++	0,013
CEMM 05-2-078	<i>C. neoformans</i> var. <i>neoformans</i>	Nt	Nt	+	0,001
CEMM 05-1-050	<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i>	0,931	Nt	+	0,007
CEMM 03-2-060	<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i>	1,399	0,765	+	0,001
CEMM 03-2-063	<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i>	1,737	0,344	+++	0,001
CEMM 03-2-064	<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i>	Nt	Nt	+++	0,001
CEMM 03-3-017	<i>C. neoformans</i>	Nt	Nt	+	0,003
CEMM 05-1-071	<i>C. neoformans</i>	1,155	0,969	++	0,001
CEMM 05-1-068	<i>C. neoformans</i>	0,173	0,384	+	0,001
CEMM 02-2-141	<i>C. neoformans</i>	Nt	Nt	++	0,002
CEMM 03-2-075	<i>C. neoformans</i>	0,189	0,313	+	0,001
CEMM 03-2-085	<i>C. neoformans</i>	0,462	0,254	+	0,001
CEMM 03-6-028	<i>C. neoformans</i>	0,120	0,569	+	0,003
CEMM 03-2-068	<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i>	0,078	0,378	+	0,001
CEMM 05-1-067	<i>C. neoformans</i>	0,263	0,382	+	0,002
CEMM 05-1-074	<i>C. neoformans</i>	0,053	0,333	+	0,002
CEMM 05-2-079	<i>C. gattii</i>	1,668	1,066	+++	0,044
CEMM 05-2-080	<i>C. gattii</i>	Nt	Nt	++	0
CEMM 05-2-081	<i>C. gattii</i>	Nt	Nt	+++	0,001
CEMM 05-2-082	<i>C. gattii</i>	1,806	Nt	+++	0,038
CEMM 03-2-062	<i>C. gattii</i>	0,376	0,306	+++	0,001
CEMM 03-2-069	<i>C. gattii</i>	1,537	0,520	+++	0,001
CEMM 03-2-070	<i>C. gattii</i>	1,372	0,591	+++	0,006
CEMM 03-2-073	<i>C. gattii</i>	1,716	0,573	-	0,003
CEMM 03-2-074	<i>C. gattii</i>	1,345	0,734	+++	0,002
CEMM 05-3-028	<i>C. gattii</i>	0,803	1,166	++	0,01
CEMM 05-3-029	<i>C. gattii</i>	0,586	1,236	+	0,001
CEMM 05-3-031	<i>C. gattii</i>	0,789	1,194	+	0,001

XTT – metodologia de quantificação de viabilidade dos biofilmes (Absorbância a 492 nm); CV – metodologia de quantificação de biomassa dos biofilmes por Cristal Violeta (Absorbância a 590 nm). Nt: não testado. - Não produtora; + Fraca produtora; ++ Moderada produtora; +++ Forte produtora; \* valor de densidade óptica.

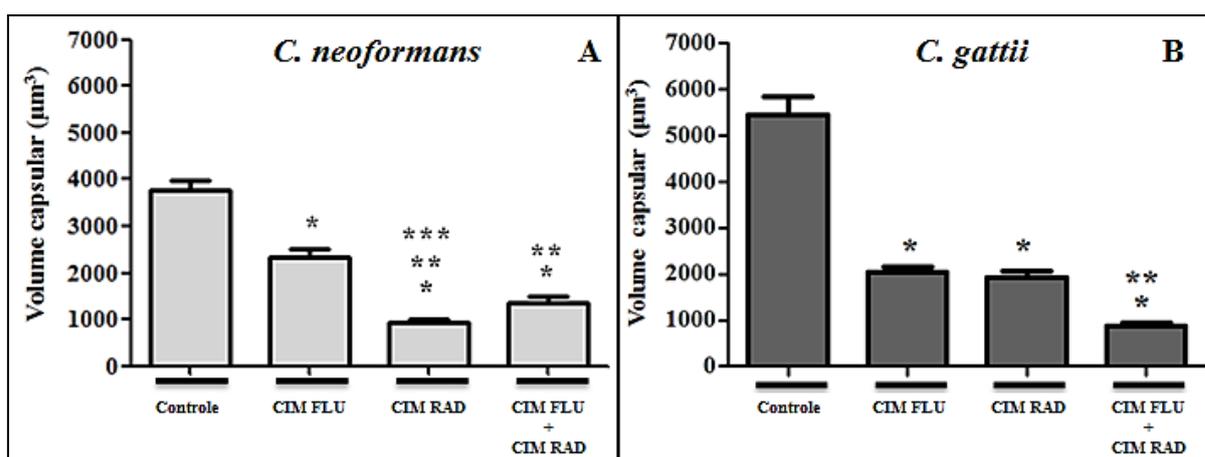
<sup>1</sup> Nota: todas as cepas testadas produziram melanina em meio Ágar Semente de Níger após 48 horas de incubação a 30°C.

### 5.3 EFEITO DO BLOQUEIO DAS Hsp90 FRENTE À PRODUÇÃO DE CÁPSULA

Os resultados obtidos quanto ao efeito do bloqueio das Hsp90 sob a produção de cápsula por cepas do Complexo *Cryptococcus neoformans/C. gattii* estão demonstrados na figura 17.

A análise dos resultados revela que ambas as condições testadas reduziram significativamente o volume da cápsula das cepas do Complexo *Cryptococcus neoformans/C. gattii* ( $p < 0,05$ ). Vale salientar que para os isolados da espécie *C. neoformans*, o RAD no valor de CIM foi mais eficiente do que a CIM do FLU testado isoladamente ou combinado com a CIM do RAD ( $p < 0,05$ ). Assim como a combinação entre CIM do FLU com a CIM do RAD foi mais efetiva quando comparado ao FLU testado isoladamente, mostrando que a inibição da Hsp90 potencializa o efeito do FLU ( $p < 0,05$ ).

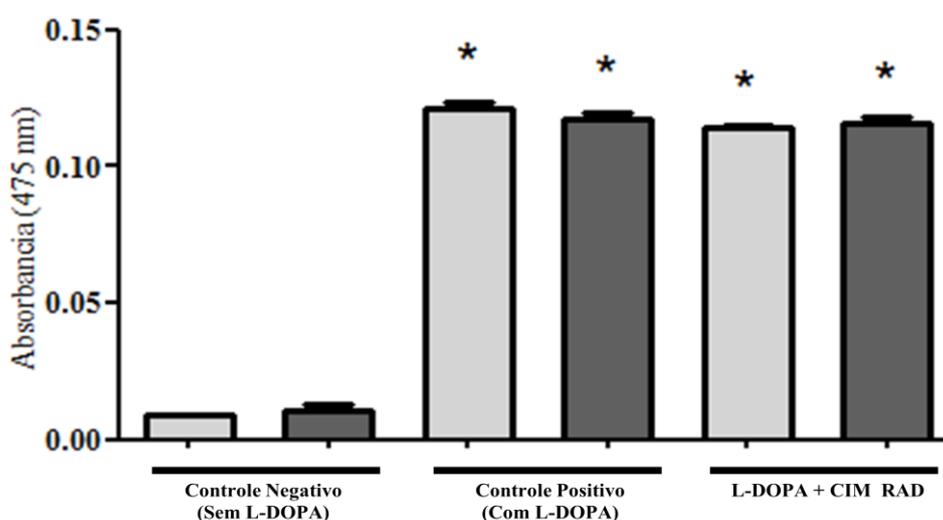
Constatou-se também que para as cepas da espécie *C. gattii* tanto a CIM do FLU isolado quanto a CIM do RAD testado isoladamente, reduziram significativamente o volume capsular quando comparado ao controle ( $p < 0,05$ ). Porém, não houve diferença estatística quando comparados, entre si, a CIM do FLU e a CIM do RAD isoladas ( $p > 0,05$ ). Cabe ressaltar que o bloqueio das Hsp90 pela CIM do RAD potencializou o efeito da CIM do FLU quando combinados, uma vez que apresentou significância estatística comparada à CIM do FLU testada isoladamente ( $p < 0,05$ ).



**Figura 17.** Produção de cápsula do Complexo *Cryptococcus neoformans/C. gattii* frente ao radicicol e ao fluconazol, isolados e em combinação. (A) Barras cinza claro – *C. neoformans* (n=2). (B) Barras cinza escuro – *C. gattii* (n=2). Os asteriscos representam diferença significativa entre as condições testadas comparadas ao controle e comparadas entre si ( $p < 0,05$ ).

#### 5.4 EFEITO DO BLOQUEIO DAS Hsp90 FRENTE À PRODUÇÃO DE MELANINA

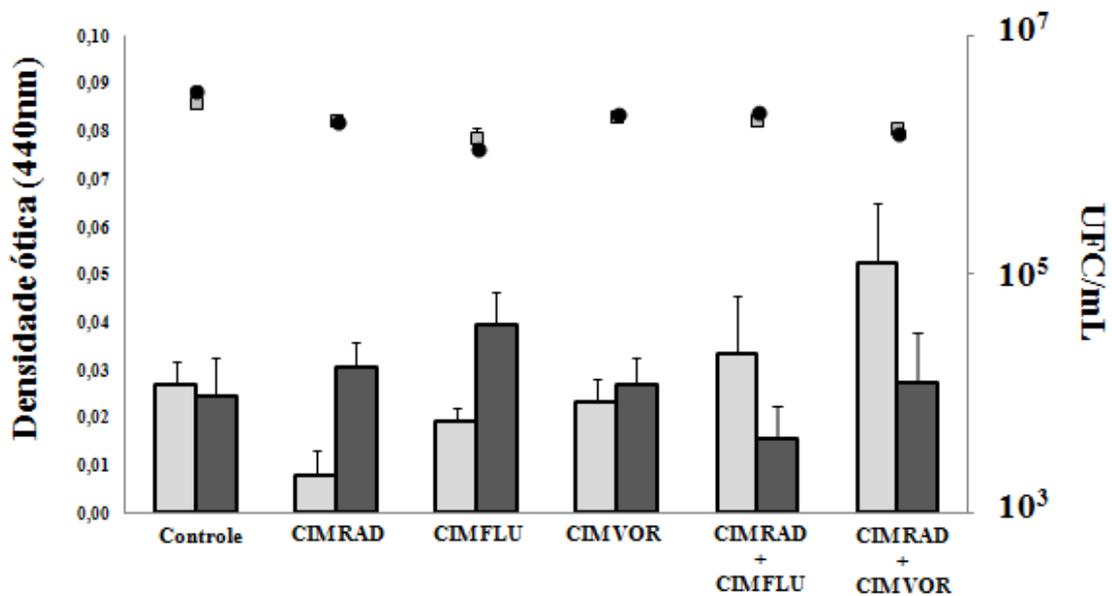
Todas as cepas do Complexo *Cryptococcus neoformans/C. gattii* testadas produziram melanina em presença de L-DOPA a 10 mM, quando comparada à produção em ausência de L-DOPA, conforme mostrado na figura 18 ( $p < 0,05$ ). O bloqueio das Hsp90 pela CIM RAD não apresentou diferença significativa em relação à produção de melanina quando comparada à ausência de tratamento com a CIM do RAD ( $p > 0,05$ ).



**Figura 18.** Produção de melanina por cepas do Complexo *Cryptococcus neoformans/C. gattii* ( $n=4$ ) em presença de radicicol. Barras cinza claro – *C. neoformans* ( $n=2$ ). Barras cinza escuro – *C. gattii* ( $n=2$ ). L-DOPA = 10 mM. Os asteriscos representam diferença estatística comparada ao controle negativo ( $p < 0,05$ ), mas não comparados entre si ( $p > 0,05$ ).

#### 5.5 EFEITO DO BLOQUEIO DAS Hsp90 FRENTE À PRODUÇÃO DE PROTEASES

Os dados obtidos para produção de proteases pelo Complexo *Cryptococcus neoformans/C. gattii* estão expressos na figura 19. Não houve diferença na produção de proteases por células tratadas com a CIM do RAD isolada ou combinada com os antifúngicos também nos valores de CIM ( $p > 0,05$ ).



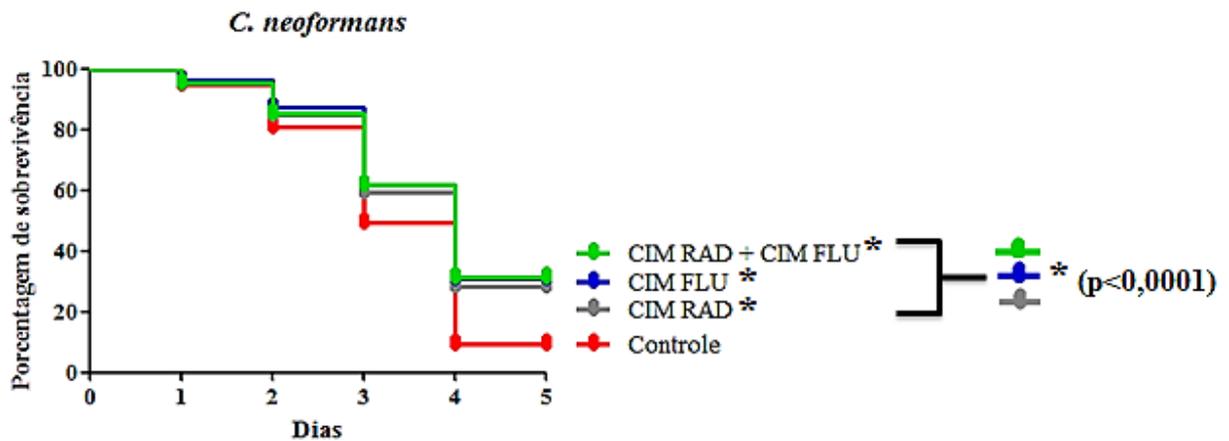
**Figura 19.** Produção de proteases e Unidades Formadoras de Colônia – UFC/mL do Complexo *Cryptococcus neoformans/C. gattii* frente ao radicicol e aos antifúngicos, isolados e em combinação. Barras cinza claro – *C. neoformans* (n=2). Barras cinza escuro – *C. gattii* (n=2).

### 5.6 EFEITO DO BLOQUEIO DAS Hsp90 FRENTE À VIRULÊNCIA EM *Caenorhabditis elegans*

Os resultados referentes ao efeito da inibição das proteínas Hsp90 ante a virulência *in vivo*, em modelo de infecção experimental utilizando *C. elegans*, por cepas do Complexo *Cryptococcus neoformans/C. gattii* estão expressos na figura 20 para *C. neoformans* e figura 21 para *C. gattii*.

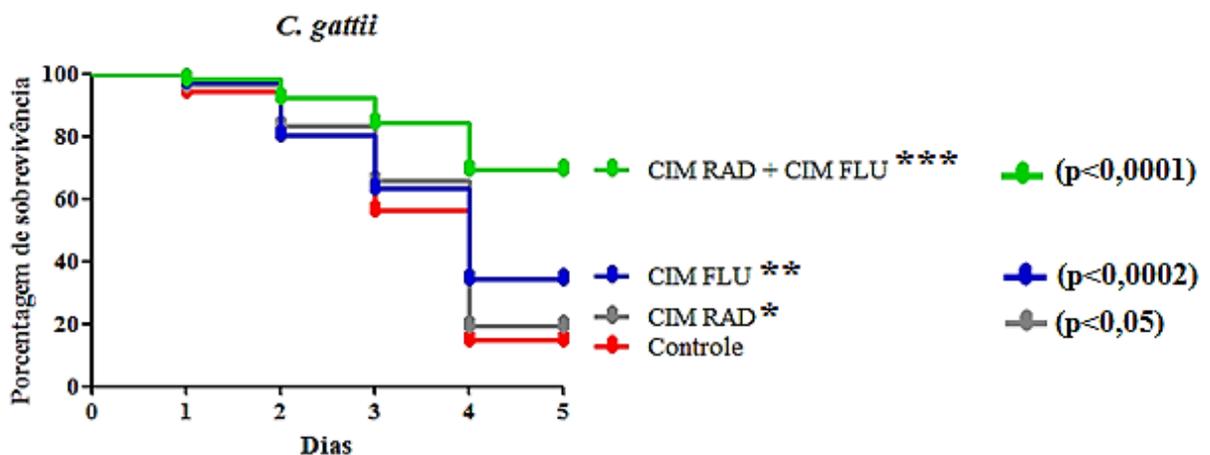
Para ambas as espécies, todos os tratamentos testados – CIM do RAD e CIM do FLU, isolados e em combinação, também no valor de CIM – foram capazes de reduzir significativamente ( $p < 0,0001$  a  $p < 0,05$ ) a virulência *in vivo* quando comparados ao controle sem tratamento.

Para *C. neoformans*, a análise dos dados demonstra que a virulência foi diminuída significativamente por ambos os tratamentos ( $p < 0,0001$ ). A CIM do RAD isolada, por si só, atenuou a virulência da levedura. No entanto, não observou-se diferença estatística entre as condições experimentais entre si ( $p > 0,05$ ), ou seja, utilizar o RAD isolado ou em combinação com o FLU, surtiu o mesmo efeito.



**Figura 20:** Efeito do bloqueio das Hsp90 frente à virulência de *C. neoformans* em modelo de infecção experimental utilizando *C. elegans* (n=1). Os asteriscos representam diferença significativa entre os tratamentos comparados ao controle sem tratamento ( $p < 0,0001$ ).

Quanto à *C. gattii*, os resultados mostraram-se mais promissores. Assim como para a espécie *C. neoformans*, todas as condições experimentadas diminuíram a virulência da levedura. Embora a CIM do RAD ( $p < 0,05$ ) tenha apresentado um p valor maior que e a CIM do FLU ( $p < 0,0002$ ), quando comparadas entre si, não há diferença estatística ( $p > 0,05$ ). Isso significa que o tratamento com a CIM do RAD ou com a CIM do FLU surtiram o mesmo efeito. Porém, quando combinadas as CIM do RAD e CIM do FLU, o efeito inibitório do FLU foi potencializado e a virulência ainda mais diminuída ( $p < 0,0001$ ).



**Figura 21:** Efeito do bloqueio das Hsp90 frente à virulência de *C. gattii* em modelo de infecção experimental utilizando *C. elegans* (n=1). Os asteriscos representam diferença significativa entre os tratamentos entre si e comparados ao controle sem tratamento ( $p < 0,0001$ ,  $p < 0,0002$  e  $p < 0,05$ ).

## 6 DISCUSSÃO

A criptococose é um sério problema de saúde pública mundial, acometendo, sobretudo, os indivíduos imunocomprometidos. Estima-se que ocorrem quase um milhão de casos anuais de meningite por *Cryptococcus* spp. associados à aids em todo o mundo. Desses, mais de 600.000 pessoas vêm à óbito em decorrência dessa doença (PARK et al., 2009). Embora a maioria das cepas de *Cryptococcus* spp. seja sensível aos antifúngicos de uso terapêutico, diversos estudos têm reportado isolados resistentes *in vitro*, além de falhas terapêuticas entre os pacientes com as formas graves da criptococose (CHEONG; MCCORMACK, 2013; GULLO et al., 2013; VARMA; KWON-CHUNG, 2010). Assim, a busca de novas alternativas de tratamento se faz necessário. Nessa perspectiva, esse é o primeiro estudo que investigou o efeito do bloqueio das proteínas Hsp90 frente à sensibilidade a antifúngicos, produção de fatores de virulência *in vitro* e virulência *in vivo* em cepas do Complexo *Cryptococcus neoformans/C. gattii*.

A primeira etapa desse estudo foi investigar a influência do bloqueio das Hsp90 sobre a sensibilidade *in vitro* de células planctônicas de *Cryptococcus* spp. Para tanto, foi determinada a CIM do RAD frente à *Cryptococcus* spp. constatando-se que o bloqueio das Hsp90 por meio do RAD inibiu em 100% o crescimento visível de *Cryptococcus* spp. com CIM que variaram de 0,5 – 2 µg/mL. Vale ressaltar que o RAD e a geldamicina possuem estruturas químicas distintas, porém inibem especificamente a função ATPásica das Hsp90 mimetizando a estrutura do difosfato de adenosina (ADP), se ligando ao sítio de ligação do ATP às Hsp90 com maior especificidade do que mesmo o ATP ou ADP (COWEN, 2008; ROE; PRODROMOU et al., 1999).

Embora não existam estudos sobre a atividade antifúngica do RAD frente à sensibilidade de *Cryptococcus* spp., sabe-se que esse fármaco possui ampla atividade antifúngica frente a diversos fungos. Os pesquisadores Ayer et al., (1980), Fujita et al., (1999), Cowen et al., (2006), Nicola et al., (2008), Chen, Lewis e Kontoyiannis, (2011) e Kang, Lee e Lee (2014) comprovaram o potencial antifúngico do RAD frente aos seguintes fungos: *C. albicans*, *P. brasiliensis*, *A. fumigatus*, *Fusarium avenaceum*, *Mucor flavus*, *Phycomyces blakesleeanus*, *Alternaria brassicae*, *A. panax*, *Colletotrichum graminicola*, *Ceratocystis minor*, *C. montia*, *C. ulmi*, *Leptosphaeria maculans*, *Endocronartium harknessii*, *Pythium debaryanum*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Coniophora puteana*, *Fomes pini*, *Merulius ambiguus*, *Schizophyllum commune*, *Botrytis cinérea* e *Rhizoctonia*

*solani*. Os autores constataram que além de inibir o crescimento fúngico, com concentração de até 50 µg/mL, o RAD é capaz de alterar a morfologia dos micélios, além de inibir a síntese de quitina prejudicando a biossíntese da parede celular. No entanto, as comparações devem ser feitas com cautela, uma vez que foram empregadas metodologias divergentes em todos os estudos supracitados.

Nooney, Matthews e Burnie (2005) investigaram o efeito do bloqueio *in vitro* das Hsp90 apenas na espécie *C. neoformans*. A inativação das Hsp90 foi realizada com o Mycograb<sup>®</sup>, um anticorpo monoclonal recombinante. Apesar de utilizar recurso diferente do empregado em nossa pesquisa, também observou-se inibição de crescimento de *C. neoformans*. No entanto, as CIM do Mycograb<sup>®</sup> foram bem mais elevadas, comparadas as CIM do RAD evidenciadas em nosso estudo, variando de 16 – 128 µg/mL, capazes de inibir apenas 50% do crescimento fúngico.

Sabe-se que em *C. albicans* (SHAPIRO et al., 2012) e *A. fumigatus* (LAMOTH et al., 2012), a inativação das Hsp90 também inibe o crescimento dessas espécies, além disso, modula a morfogênese fúngica, a virulência, o desenvolvimento de biofilmes e o fenômeno de resistência aos antifúngicos, sobretudo aos azólicos e equinocandinas, corroborando com os resultados da nossa pesquisa. Nesse contexto, a segunda etapa do presente estudo foi avaliar o papel das Hsp90 sobre a sensibilidade *in vitro* aos principais fármacos antifúngicos empregados no tratamento da criptococose: AMB, ITC, FLU e VOR. Para tanto, foi empregada a metodologia do *Checkerboard* ou tabuleiro de xadrez proposta por Odds et al., (2003).

Os resultados evidenciam que o bloqueio das Hsp90 potencializa o efeito dos antifúngicos, sendo os resultados mais promissores para os derivados azólicos, embora que para a AMB também tenha ocorrido sinergismo. Os fármacos que melhor interagiram com o RAD foram o FLU e o VOR. Além disso, para as combinações entre o RAD e o FLU ou ITC, observou-se redução de até 64 vezes nos valores de CIM de ambas as drogas antifúngicas após a combinação. Vale destacar que a combinação entre o RAD e o VOR, reduziu em até 32 vezes as CIM dessas drogas. Cabe salientar ainda que o bloqueio das Hsp90 aliado ao uso do FLU modificou o perfil de sensibilidade de cepas outrora resistentes, ou sensíveis-dose-dependente a esse fármaco, para sensíveis.

Nooney, Matthews e Burnie (2005) também exploraram a influência do bloqueio das Hsp90 frente à sensibilidade de *C. neoformans* à AMB e FLU pela técnica do tabuleiro de xadrez. Em seus resultados, também constatou-se sinergismo com os antifúngicos em questão

e o Mycograb<sup>®</sup>. No entanto a combinação entre o Mycograb<sup>®</sup> e a AMB foi melhor, do que quando combinado ao FLU, diferindo de nossos achados. Porém, vale ressaltar que a interpretação adotada por esses autores foi a proposta por Barchiesi et al., (2000) que classifica as interações farmacológicas em: sinérgica se o FICI for de 0,5, aditivo quando o FICI >0,5 a 1,0, indiferente se o FICI >1 a 2, e antagônica se o FICI >2. Assim, é importante destacar que essa interpretação difere da que foi empregada em nossa pesquisa estando a comparação entre os resultados sujeita a viés.

Já foi constatado em *S. cerevisiae* e em *C. albicans* que as proteínas Hsp90 potencializam a rápida evolução da resistência a antifúngicos, sobretudo às drogas azólicas, em especial ao FLU (COWEN; LINDQUIST, 2005). O mediador da resistência aos azólicos Hsp90-dependente é a calcineurina. Em fungos, a calcineurina regula a progressão do ciclo celular, morfogênese e virulência. A Hsp90 se liga a subunidade catalítica da calcineurina e a mantém ativa e estável. A ativação da calcineurina é necessária para a adaptação a várias pressões ambientais, incluindo o estresse exercido na membrana celular pelos azólicos. Ademais, a Hsp90 também regula respostas ao estresse na membrana que são fundamentais para a sobrevivência do fungo na presença de azólicos, favorecendo que as consequências fenotípicas de novas mutações de resistência ocorram (SHAPIRO et al., 2012).

Desse modo, a inibição das Hsp90 pelo RAD, potencializa o efeito dos azólicos, sobretudo o FLU em *Cryptococcus* spp. É provável que, assim como em *C. albicans* e *A. fumigatus*, em *Cryptococcus* spp. esse fenômeno também seja mediado via Hsp90-calcineurina, uma vez que cepas mutantes do Complexo *Cryptococcus neoformans/C. gattii* para a calcineurina exibem morfologia alterada a 37°C além de ocorrer ruptura da membrana, o que favorece a ação dos antifúngicos, em especial os azólicos (O'MEARA; COWEN, 2014).

Assim como em células planctônicas, as Hsp90 também desempenham papel fundamental em biofilmes fúngicos. Biofilmes microbianos são uma das principais causas de persistência em infecções humanas, pois são menos sensíveis à maioria dos medicamentos atualmente disponíveis. O que culmina em elevados índices de mortalidade (ROBBINS et al., 2011). Nessa perspectiva, a etapa subsequente do presente estudo foi investigar a influência do bloqueio das Hsp90 frente à sensibilidade *in vitro* de biofilmes produzidos por cepas do Complexo *Cryptococcus neoformans/C. gattii* ante ao RAD. Além disso, o efeito do bloqueio das Hsp90 sobre a sensibilidade aos antifúngicos em células sésseis, também foi investigado.

Poucos trabalhos investigaram estratégias de controle de biofilmes produzidos por *Cryptococcus* spp. incluindo a espécie *C. gattii*, de amostras clínicas e ambientais. Recentemente, nosso grupo investigou o papel da combinação das drogas inibidoras da síntese do folato, sulfametoxazol-trimetropim e sulfadiazina-pirimetamina frente a células planctônicas e biofilmes de estirpes do Complexo *Cryptococcus neoformans/C. gattii*, com resultados promissores (CORDEIRO et al., 2013). Constatou-se que os inativadores da síntese do folato inibiram o crescimento *in vitro* de células planctônicas, bem como impediram a formação do biofilme e biofilme formado por cepas do Complexo *Cryptococcus neoformans/C. gattii*. Martinez (2010) e Robertson, Wolf e Casadevall (2012), também investigaram estratégias de controle de biofilmes produzidos por *Cryptococcus* spp. utilizando quitosana e edta, respectivamente.

A presente pesquisa mostrou que apesar do bloqueio das Hsp90 pelo RAD isolado não ter impedido a formação de biofilmes de *Cryptococcus* spp. bem como não ter diminuído a atividade metabólica dos biofilmes formados, a inibição das Hsp90 potencializou o efeito dos antifúngicos, sobretudo, ante a *C. gattii*. Os resultados mostraram-se promissores frente à formação de biofilme e biofilme formado. Com exceção da combinação de RAD com AMB ante a formação do biofilme, todas as condições testadas reduziram significativamente a viabilidade dos biofilmes, dependendo da concentração utilizada em cada experimento.

Da mesma forma que o teste de interação farmacológica em células planctônicas, frente aos biofilmes os resultados mostraram-se mais promissores com os derivados azólicos, uma vez que a ação do ITC, FLU e VOR foi potencializada pela inibição das Hsp90, sobretudo para espécie *C. gattii*, em ambas as condições testadas do biofilme. Cabe enfatizar que o FLU foi a única droga antifúngica que teve seu efeito potencializado pelo bloqueio das Hsp90 frente à *C. neoformans*.

Robbis et al., (2011) investigaram o papel das Hsp90 frente à biofilmes produzidos por *C. albicans* e *A. fumigatus*. Os autores chegaram à conclusão de que as Hsp90 são reguladoras chave na dispersão do biofilme e no fenótipo de resistência aos antifúngicos em células sésseis. A depleção genética das Hsp90 reduz a formação e maturação *in vitro* dos biofilmes produzidos por *C. albicans* e a etapa de dispersão das células após a maturação dos biofilmes é prejudicada. Além disso, o comprometimento da ação das Hsp90 revoga a resistência, *in vitro* e *in vivo* em modelo de infecção de catéter venoso em ratos, dos biofilmes de *C. albicans* frente aos azólicos, e dos biofilmes de *A. fumigatus* frente à equinocandinas.

De maneira geral, dados disponíveis na literatura evidenciam que *C. neoformans* é mais sensível aos antifúngicos comparado à espécie *C. gattii* (CHONG et al., 2010; CHOWDHARY et al., 2011; TRILLES et al., 2004). No entanto, alguns trabalhos relatam que a sensibilidade aos antifúngicos nessas espécies é contraditória. Gomez-Lopez et al., (2008) analisaram a atividade de oito agentes antifúngicos frente a 23 isolados clínicos de *C. gattii* e compararam os perfis de sensibilidade com os de *C. neoformans*. A análise relevou que as estirpes de *C. gattii* foram mais sensíveis a anfotericina B e fluocitosina comparadas às cepas de *C. neoformans*. Os resultados de Trilles et al., (2004) que investigaram a sensibilidade de 57 isolados de *C. gattii* a nove agentes antifúngicos e, do mesmo modo, compararam com *C. neoformans*, também corroboram com esses achados. Chowdhary et al., (2011) também não encontraram diferenças na sensibilidade de 308 amostras clínicas e ambientais de ambas as espécies de *Cryptococcus* spp. frente à anfotericina B e flucitosina.

Dada a importância das Hsp90 para manutenção da virulência em patógenos fúngicos (SHAPIRO et al., 2012), nosso próximo passo foi investigar o efeito do bloqueio das Hsp90 frente a produção de fatores de virulência *in vitro* de cepas do Complexo *Cryptococcus neoformans/C. gattii*. Para tanto, três fatores de virulência foram escolhidos para realizar os experimentos, entre eles: a cápsula, notoriamente o principal fator de virulência produzido por *Cryptococcus* spp., a síntese de melanina e a produção de proteases.

A produção dos fatores de virulência supracitados também já foi investigada por outros pesquisadores e mostram que a síntese desses fatores *in vitro* é bastante variável, assim como foi evidenciado no presente estudo. Por isso, um número mais reduzido de cepas foi utilizado nos experimentos com o radicicol frente à virulência *in vitro* e *in vivo*. Zaragoza e Casadevall (2004) e Frases et al. (2008), exploraram a produção de cápsula de *C. neoformans*. Pukkila-Worley et al. (2005), Ngamskulrunroj e Meyer (2009) e Eisenman et al., (2011) avaliaram a síntese de melanina em *Cryptococcus* spp. E recentemente um estudo de nosso grupo realizado por Sidrim et al., (2012) averiguou a produção de cápsula, proteases e fosfolipases por cepas de *C. neoformans*. As pesquisas de Campos e Baroni (2010), Pessoa, Da Silva e Gomes (2012) e Barbosa Júnior et al., (2013), assim como o presente estudo são um dos únicos trabalhos que investigaram a atividade proteolítica na espécie *C. gattii*. Além disso, cabe ressaltar que esse é um dos trabalhos pioneiros, seguido do recente trabalho de Santos et al., (2014), que explorou a produção de cápsula por *C. gattii*.

O presente estudo relevou o papel das Hsp90 ante a produção de fatores de virulência por cepas de *Cryptococcus* spp. Constatou-se que o bloqueio das Hsp90 reduziu

significativamente o volume capsular de ambas as espécies. Embora a inibição das proteínas não tenha diminuído a produção de melanina e proteases.

Com base nos achados de interação sinérgica *in vitro* entre o RAD e o FLU, esse antifúngico foi escolhido para investigar a influência do bloqueio das Hsp90, frente à produção de cápsula. Notoriamente, a ação do FLU foi potencializada pela inibição das Hsp90 por meio do RAD. Pois ao se comparar o FLU testado isoladamente com o mesmo antifúngico testado em combinação com o RAD, o volume capsular foi significativamente diminuído em ambas as espécies de *Cryptococcus* spp. Curiosamente, para a espécie *C. neoformans*, o RAD testado isoladamente foi melhor do que quando combinado com o FLU.

Recentemente, um estudo de nosso grupo realizado por Sidrim et al., (2012) explorou o efeito das drogas inibidoras de protease, saquinavir, darunavir, ritonavir e indinavir sobre a espessura da cápsula produzida por *C. neoformans*, assim como no crescimento, atividade proteolítica e fosfolipásica. Em seus resultados, os autores constataram que os inibidores de protease não reduziram o crescimento de *C. neoformans*. No entanto, as drogas diminuíram significativamente a espessura das cápsulas e produção de proteases por *C. neoformans*. Esses achados corroboram com nossos resultados, embora a inibição das Hsp90 não tenha reduzido a produção de proteases por *Cryptococcus* spp.

Um dos primeiros estudos que investigou a influência do FLU sobre a cápsula de *C. gattii* foi publicado recentemente por Santos et al., (2014). Os autores evidenciaram que a redução da sensibilidade ao FLU prejudica a síntese de GXM, o principal constituinte capsular de *Cryptococcus* spp., mas não impede a montagem do polissacarídeo. Além disso, os principais genes relacionados com a cápsula, *CAP59* e *CAP64*, foram significativamente mais expressos em uma estirpe previamente cultivada em altas concentrações de FLU e que desenvolveu sensibilidade reduzida. Curiosamente, essa cepa que passou a apresentar esse fenótipo foi menos sensível ao tratamento e menos virulenta *in vivo* em modelo murino de infecção, além de reduzir a produção de lacase e urease. Do mesmo modo, a redução da sensibilidade ao FLU fez com que a cepa fosse mais fagocitada por macrófagos e prejudicou a disseminação para o sistema nervoso central em modelo murino. Por fim, a redução da sensibilidade ao FLU levou à diminuição da espessura da cápsula além de alterar suas propriedades físicas e estruturais.

Nesse contexto, dada a importância das Hsp90 para a resistência ao FLU em patógenos fúngicos (COWEN; LINDQUIST, 2005), a influência do FLU frente à síntese de cápsula em *C. gattii* (SANTOS et al., 2014), bem como a ação do FLU potencializada pela

inibição das Hsp90 evidenciada em nosso estudo ante a cápsula de *Cryptococcus* spp., conclui-se que as Hsp90 também são envolvidas na produção de cápsula do Complexo *Cryptococcus neoformans/C. gattii*.

Ainda sobre o papel das Hsp90 frente à virulência de cepas do Complexo *Cryptococcus neoformans/C. gattii*, exploramos o efeito do bloqueio das proteínas em modelo de infecção experimental utilizando *C. elegans*. Como evidenciado nos demais experimentos, a inibição das Hsp90 também reduziu a virulência *in vivo* de ambas as espécies de *Cryptococcus* spp. Testada isoladamente, a CIM do RAD aumentou a sobrevivência dos nematódeos em 18,67% frente à virulência de *C. neoformans* e 4,66% frente à *C. gattii*, comparados ao controle sem tratamento. Os resultados foram ainda melhores quando a inativação das Hsp90 foi aliada a utilização da CIM do FLU. Na ocasião, a viabilidade dos nematódeos passou para 31,39% (aumento de 21,94% da viabilidade) ante a infecção por *C. neoformans* e para 69,16% (aumento de 54,52% da viabilidade) quando infectados por *C. gattii*.

As Hsp90 são produzidas de maneira constitutiva a níveis basais e têm sua síntese aumentada em diversas condições de estresse. Além disso, são altamente conservadas em procariotos e eucariotos. Assim, os inibidores da ação ATPásica dessas proteínas possuem efeito inibitório contra diversos organismos. Bactérias como *Brucella suis*, *Campylobacter jejuni*, *Salmonella enterica*, *Helicobacter pylori* e *Listeria monocytogenes*, fungos como *C. albicans*, *A. fumigatus*, *H. capsulatum*, *C. immitis* e *P. brasiliensis* e os parasitas *Trypanosoma cruzi*, *Toxoplasma gondii*, *Plasmodium falciparum*, *Leishmania major*, *L. brasiliensis* e *Brugia pahangi* têm seu crescimento inibido pela inativação das Hsp90 (NECKERS, 2008). Diferentemente, as Hsp90 de *C. elegans* não são afetadas pela inibição com geldamicina (DAVID et al., 2003). Dessa maneira, é provável que o mesmo ocorra com o radicicol frente à *C. elegans*, justificando a metodologia empregada no presente estudo. Cabe salientar que são escassos os trabalhos que investigaram a virulência de *Cryptococcus* spp., sobretudo a espécie *C. gattii* em modelo de infecção experimental utilizando *C. elegans*, sendo o presente trabalho um dos pioneiros, sobretudo tendo as Hsp90 como alvo molecular.

Estudos utilizando *C. elegans* como modelo permitem a identificação de compostos que modulam as respostas imunitárias ou afetam fatores de virulência de fungos que são apenas expressos durante a infecção. Além disso, os compostos podem ser simultaneamente rastreados para eficácia antifúngica e toxicidade, além de fornecer

informações importantes da relação parasita-hospedeiro, inclusive, da resposta do sistema imune inato (PUKKILA-WORLEY et al., 2009).

O estudo de Mylonakis et al., (2002), um dos pioneiros que investigou a virulência de *C. neoformans* em *C. elegans*, evidenciou alta letalidade da levedura frente ao nematódeo. Além disso, a cápsula da levedura, bem como vários genes envolvidos na virulência em modelos utilizando mamíferos também contribuem para o aumento da virulência de *C. neoformans* em *C. elegans*. Esses genes foram associados a diversas vias de transdução de sinal (*GPI*, *PKA1*, *PKR1* e *RAS1*), além de aumento da produção de lacase (*LAC1*) e *mating type α*, que é sabidamente mais virulento do que o *mating type a* produzido por *Cryptococcus* spp. Assim, dada a importância das Hsp90 para a virulência em patógenos fúngicos, nossos achados corroboram com os resultados de Mylonakis et al., (2002), pois a inibição das Hsp90 reduziu a virulência das cepas do Complexo *Cryptococcus neoformans/C. gattii* *in vitro* e *in vivo* potencializando o efeito do FLU, configurando um dos principais resultados do nosso estudo.

Nesse contexto, o presente estudo mostrou que a inibição das Hsp90 por si só, utilizando o RAD, é capaz de inibir *in vitro* o crescimento planctônico de *Cryptococcus* spp. Adicionalmente, o bloqueio destas proteínas potencializa o efeito *in vitro* das principais drogas antifúngicas empregadas no tratamento da criptococose, sobretudo os azólicos, em especial o FLU. Assim como em células isoladas, a inibição das Hsp90 potencializa o efeito *in vitro* dos antifúngicos frente à formação de biofilmes e biofilmes formados de *Cryptococcus* spp., sobretudo para *C. gattii*. Cepas clínicas e ambientais de *Cryptococcus* spp. produzem cápsula, melanina e proteases *in vitro* e a inativação das Hsp90 diminui a virulência, além de potencializar o efeito do FLU *in vitro* e *in vivo* frente a isolados do Complexo *Cryptococcus neoformans/C. gattii*. Portanto, as Hsp90 são um importante alvo para o desenvolvimento de estratégias antifúngicas. Todavia, estudos mais aprofundados são necessários para melhor compreender o papel destas proteínas para o Complexo *Cryptococcus neoformans/C. gattii*.

## 7 CONCLUSÕES

- ✓ A inativação das Hsp90 inibe o crescimento planctônico *in vitro* de cepas do Complexo *Cryptococcus neoformans/C.gattii*.
- ✓ Anfotericina B, itraconazol, voriconazol e, sobretudo, fluconazol têm seu efeito inibitório *in vitro* potencializado pela inativação das Hsp90 em células planctônicas do Complexo *Cryptococcus neoformans/C.gattii*.
- ✓ O bloqueio das Hsp90 potencializa a inibição *in vitro* por antifúngicos frente à formação de biofilmes e biofilmes formados de cepas do Complexo *Cryptococcus neoformans/C.gattii*, sobretudo, para espécie *C. gattii*.
- ✓ A virulência *in vitro* de isolados do Complexo *Cryptococcus neoformans/C.gattii* é diminuída pela inativação das Hsp90 que potencializa a ação do fluconazol.
- ✓ A inibição das Hsp90 diminui a virulência *in vivo* em modelo de infecção experimental utilizando *C. elegans* e potencializa a ação do fluconazol frente a estirpes do Complexo *Cryptococcus neoformans/C. gattii*.
- ✓ As Hsp90 são um alvo molecular promissor para o desenvolvimento de estratégias antifúngicas frente o Complexo *Cryptococcus neoformans/C.gattii*.

## REFERÊNCIAS

- ADENIS, A. A.; AZNAR, C.; COUPPIÉ, P. Histoplasmosis in HIV-infected patients: a review of new developments and remaining gaps. **Curr Trop Med Rep**, v. 1, n. 28, p. 119-128, 2014.
- ALI, M. M. U.; ROE, S. M.; VAUGHAN, C. K.; MEYER, P.; PANARETOU, B.; PIPER, P. W.; PRODROMOU, C.; PEARL, L. H. Crystal structure of an Hsp90-nucleotide-p23/Sba1 closed chaperone complex. **Nature**, v. 20, n. 440, p. 1013-1017, 2006.
- ALMEIDA, F.; LACAZ, C. S. Micoose pelo *Cryptococcus neoformans*. Primeiro caso observado em São Paulo. **An Paulistas de Med e Cir**, v. 42, n. 385, 1941.
- ALMEIDA, F.; LACAZ, C. S.; SALLES, M. Blastomicose do tipo Busse-Buschke (granulomatose criptocócica, torulose). **An Fac Med Univ de São Paulo**, v. 20, n.115, 1944.
- APIDIANAKIS, Y.; RAHME, L. G.; HEITMAN, J.; AUSUBEL, F. M.; CALDERWOOD, S. B.; MYLONAKIS, E. Challenge of *Drosophila melanogaster* with *Cryptococcus neoformans* and role of the innate immune response. **Eukaryot Cell**, v. 3, p. 413-419, 2004.
- BACH, A. Central venous catheter infections. **Intensive Care Med**, v. 22, n. 6, p. 613, 1996.
- BANERJEE, U.; GUPTA, K.; VENUGOPAL, P. A case of prosthetic valve endocarditis caused by *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans*. **J Med Vet Mycol**, v. 35, n.2, p. 139-141, 1997.
- BARBOSA JÚNIOR, A. M.; SANTOS, B. F. O.; CARVALHO, E. O.; MÉLO, D. L. F. M, TRINDADE, R. C.; STOIANOFF, M. A R. Biological activity of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* from clinical and environmental isolates. **J Bras Patol Med Lab**, v. 49, n. 3, 2013.
- BARCIESE, F.; SHIMIZZI, A. M.; CASELLI, F.; NOVELLI, A.; FALLANI, S.; GIANNINI, D.; ARZENI, D.; DI CESARE, S.; DI FRANCESCO, L. F.; FORTUNA, M.; GIACOMETTI, A.; CARLE, F.; MAZZEI, T.; SCALISE, G. Interactions between Triazoles and Amphotericin B against *Cryptococcus neoformans*. **Antimicrob Agents Ch**, v. 44, n. 9, p. 2435-2441, 2000.
- BARNETT, J. A. A history of research on yeasts 14: medical yeast part 2, *Cryptococcus neoformans*. **Yeast**, v. 27, p. 875-904, 2010.
- BIEN, C. M.; CHANG, Y. C.; NES, W. D.; KWON-CHUNG, K. J.; ESPENSHADE, P. J. *Cryptococcus neoformans* Site-2 protease is required for virulence and survival in presence ofazole drugs. **Mol Microbiol**, v. 74, n. 3, p. 672-690, 2009.
- BOVERS, M.; HAGEN, F., BOEKHOUT, T. Diversity of the *Cryptococcus neoformans-Cryptococcus gattii* species complex. **Rev Iberoam Micol**, v. 25, p. 4-12, 2008.
- BRAUN, D. K.; JANSSEN, D. A.; MARCUS, J. R.; KAUFFMAN, C. A. Cryptococcal infection of a prosthetic dialysis fistula. **Am J Kidney Dis**, v. 24, n. 5, p. 864-867, 1994.

- BURNIE, J. P.; CARTER, T. L.; HODGETTS, S. J.; MATTHEWS. Fungal heat-shock proteins in human disease. **FEMS Microbiol Rev**, v. 30, p. 53-88, 2006.
- CALVO, B. M.; FISCHMAN, O.; CASTELO-FILHO, A. Detecção de antígeno del polisacárido capsular de *Cryptococcus neoformans* en patients con SIDA y neurocriptococosis en São Paulo, Brasil. **Rev Inst Med Trop**, v. 33, p. 485-490, 1991.
- CAMPOS, L. F.; BARONI, F. A. Isolados de *Cryptococcus neoformans*, *C. gattii* e *C. laurentii* produtores de protease e fosfolipase. **Rev Patol Trop**, v. 39, n. 2, 2010.
- CASADEVALL, A.; PERFECT, J. R. *Cryptococcus neoformans*. **J Antimicrob Chemother**, v. 44, n. 1, p. 139, 1998.
- CHANG, Y. C.; KWON-CHUNG, K. J. Complementation of a capsule-deficient mutation of *Cryptococcus neoformans* restores its virulence. **Mol Cell Biol**, v. 14, p. 4912-4919, 1994.
- CHARNEY, J.; TOMARELLI, R. M. A colorimetric method for the determination of proteolytic activity of duodenal juice. **J Biol Chem**, vol. 171, p. 501-505, 1947.
- CHEN, L. C.; BLANK, E. S.; CASADEVALL, A. Extracellular proteinase activity of *Cryptococcus neoformans*. **Clin Diagn Lab Immunol**, v. 3, p. 570-574, 1996.
- CHEN, S. C. A.; LEWIS, R. E.; KONTOYIANNIS, D. Direct effects on non-antifungal agents used in cancer chemotherapy and organ transplantation on the development and virulence of *Candida* and *Aspergillus* species. **Virulence**, v. 2, n. 4, p. 280-295, 2011.
- CHEE, H. Y.; LEE, B. K. Isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* (serotype A) from pigeon dropping in Seoul, Korea. **J Microbiol**, vol. 43, p. 469-472, 2005.
- CHONG, H. S.; DAGG, R.; MALIK, R.; CHEN, S.; CARTER, D. In Vitro Susceptibility of the Yeast Pathogen *Cryptococcus* to Fluconazole and Other Azoles Varies with Molecular Genotype. **J Clin Microbiol**, v. 48, n. 11, p. 4115-4120, 2010.
- CHOWDHARY, A.; RANDHAWA, H. S.; SUNDAR, G.; KATHURIA, S.; PRAKASH, A.; KHAN, Z.; SUN, S.; XU, J. In vitro antifungal susceptibility profiles and genotypes of 308 clinical and environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* and *Cryptococcus gattii* serotype B from north-western India. **J Med Microbiol**, v. 60, n. 7, p. 961-967, 2011.
- CHUCK, S. L.; SANDE, M. A. Infections with *Cryptococcus neoformans* in the acquired immunodeficiency syndrome. **N Engl J Med**, vol. 321, p. 794-799, 1989.
- CLAUSELL, D. T. Infecção primitiva do sistema nervoso central por *Tortdopsis neoformans* (*Torula histolytica*). **An Fac Med Pôrto Alegre**, vol.9, n. 10, 1949.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE - *Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts*. Approved Standard, 3rd ed. M27-A3. CLSI, Wayne, Pennsylvania, USA, 2008.

COELHO, C.; BOCCA, A. L.; CASADEVALL A. The intracellular life of *Cryptococcus neoformans*. **Annu Rev Pathol**, v. 9, p. 219-138, 2014.

COOKSON, R.; POVERLEIN, C.; LACHS, J.; BARRET, A. G. M. Synthetic Studies towards Radicicol Biomimetic Macrolactonization and Transannular Aromatization Reactions. **Eur J Org Chem**, n. 21, p. 4523-4535, 2014.

CORDEIRO, R. A.; MOURÃO, C. I.; ROCHA, M. F. G.; MARQUES, F. J. F.; TEIXEIRA, C. E. C.; MIRANDA, D. F. O.; NETO, L. V. P.; BRILHANTE, R. S. N.; BANDEIRA, T. J. P. G.; SIDRIM, J. J. C. Antifolates inhibit *Cryptococcus* biofilms and enhance susceptibility of planktonic cells to amphotericin B. **Eur J of Clin Microbiol**, v. 32, n. 4, p. 557-564, 2013.

CORDERO, R. J.; PONTES, B.; GUIMARÃES, A. J.; MARTINEZ, L. R.; RIVERA, J.; FRIES, B. C.; NIMRICHTER, L.; RODRIGUES, M. L.; VIANA, N. B.; CASADEVALL, A. Chronological aging is associated with biophysical and chemical changes in the capsule of *Cryptococcus neoformans*. **Infect Immun**, v. 79, n. 12, p. 4990-5000, 2011.

CORTEZ, J. M. Criptococose pulmonar. **An Paulistas de Med e Cir**, vol. 58, n. 315, 1949.

COWEN L. E.; CARPENTER, A. E.; MATANGKASOMBUK, O.; FINK, G.R.; LINDQUIST, S. Genetic architecture of Hsp90-dependent drug resistance. **Eukaryot Cell**, v. 5, p. 2184-2188, 2006.

COWEN, L. E.; LINDQUIST, S. Hsp90 potentiates the rapid evolution of new traits: drug resistance in diverse fungi. **Science**, v. 309, n. 5744, p. 2185-2189, 2005.

COWEN, L. E.; SHEENA, D. SINGH, S. D.; KOHLER, J. R.; COLLINS, C.; ZAAS, A. K.; SCHELL, W. A.; AZIZ, H.; MYLONAKIS, E.; PERFECT, J. R.; WHITESELL, L.; LINDQUIST, S. Harnessing Hsp90 function as a powerful, broadly effective therapeutic strategy for fungal infectious disease. **Current Issue**, v. 106, n. 8, 2009.

DADACHOVA, E.; BRYAN, R. A.; HOWELL, R. C.; SCHWEITZER, A. D.; AINSEN, P.; NOSANCHUCK, J. D.; CASADEVALL, A. The radioprotective properties of fungal melanin are a function of its chemical composition, stable radical presence and spatial arrangement. **Pigm Cell Melanoma R**, v. 21, n. 2, p. 192-199, 2008.

DAI, B.; WANG, Y.; LI, D.; XU, Y.; LIANG, R.; ZHAO, L.; CAO, Y.; JIA, J.; JIANG, Y. Hsp90 is involved in apoptosis of *Candida albicans* by regulating the calcineurin-caspase apoptotic pathway. **PLoS One**, v. 7, n. 9, 2012.

DAVID, C. L.; SMITH, H. E.; RAYNES, D. A.; PULCINI, E. J.; WHITESELL, L. Expression of a unique drug-resistant Hsp90 ortholog by the nematode *Caenorhabditis elegans*. **Cell Stress Chaperon**, v. 8, n. 1, p. 93-104, 2003.

DORE, G. J.; HOY, F. J.; MALLAL, S. A.; LI, Y.; MIJCH, A. M.; FRENCH, M. A.; Trends in incidence of AIDS illnesses in Australia from 1983 to 1994: the Australian AIDS cohort. **J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol**, vol. 16, p. 39-43, 1997.

EISENMAN, H. C.; CHOW, S. K.; TSÉ, K. K.; MCCLELLAND, E. E.; CASADEVALL, A. The effect of L-DOPA on *Cryptococcus neoformans* growth and gene expression. **Virulence**, v. 2, n. 4, p. 329-336, 2011.

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

EMMONS, C. W. Saprophytic sources of *Cryptococcus neoformans* associated with the pigeon (*Columba livia*). **Amer J of Hygiene**, v. 62, p. 227-232, 1955.

ERB-DOWNWARD, J. R.; HUFFNAGLE, G. B. *Cryptococcus neoformans* produces authentic prostaglandin E2 without a cyclooxygenase. **Eukaryot Cell**, v. 6, p. 346-350, 2007.

ESSER, K.; KURZAI, O. Human Fungal Pathogens. In: **The Mycota**. 2 ed. London: Springer, vol. 12, 2014. 298 p.

FERRUCIO, M. R. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. **Experientia**, v. 18, p. 571-573, 1962.

FIORI, A.; KUCHARÍKOVÁ, S.; GOVAERT, G.; CAMMUE, B. P. A.; THEVISSSEN, K.; DIJCK, P. V. The heat-induced molecular disaggregase Hsp104 of *Candida albicans* plays a role in biofilm formation and pathogenicity in a worm infection model. **Eukaryot Cell**, v. 11, n. 8, p. 1012-1020, 2012.

FRASES, S.; NIMRICHTER, L.; VIANA, N. B.; NAKOUZI, A.; CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* capsular polysaccharide and exopolysaccharide fractions manifest physical, chemical, and antigenic differences. **Eukaryot Cell**, v. 7, n. 2, p. 319-327, 2008.

FUJITA, K.; IREI, M.; PING, X.; TANIGUCHI, M. Antifungal activity of radicicol against *Mucor flavus* IFO 9560. **J Biosci Bioeng**, v. 88, n. 4, p. 380-386, 1999.

GARCIA-SOLACHE, M. A.; IZQUIERDO-GARCIA, D.; SMITH, C.; BERGMAN, A.; CASADEVALL, A. Fungal virulence in a lepidopteran model is an emergent property with deterministic features. **MBio**, v. 4, n. 4, p. 100-113, 2013.

GILES, S. S.; DAGENAIS, T. R.; BOTTS, M. R.; KELLER, N. P.; HULL, C. M. Elucidating the pathogenesis of spores from the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. **Infect Immun**, v. 77, p. 3491-3500, 2009.

GIORGI, D.; PUPO, P. P.; REIS, J. B.; LIMA, J. G. C. Tratamento da criptococose do sistema nervoso com a amphotericina B. **Arq Neuro-Psiquiat**, v. 17, p. 377-386, 1959.

GULLO, F. P.; ROSSI, S. A.; SARDI, J. C. O.; TEODORO, V. L. I.; MENDES-GIANNINI, M. J. S.; FUSCO-ALMEIDA, A. M. Cryptococcosis: epidemiology, fungal resistance, and new alternatives for treatment. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 32, n. 11, p. 1377-1391, 2013.

HAIJEH, R. A.; CONN, L. A.; STEPHENS, D. S.; BAUGHMAN, W.; HAMILL, R.; GRAVISS, E. Cryptococcosis: population-based multistate active surveillance and risk factors in human immunodeficiency virus-infected persons. Cryptococcal Active Surveillance Group. **J Infect Dis**, vol. 179, p. 449-454, 1999.

HARRIS, J. R.; GALANIS, E.; LOCKHART, S. R. *Cryptococcus gattii* Infections and Virulence, **Curr Fungal Infect Rep**, v. 8, p. 81-89, 2014.

HEITMAN, J.; KOZEL, T. R.; KWON-CHUNG, J. K.; PERFECT, J. R.; CASADEVALL, A. **Cryptococcus from human pathogen to model yeast**. 2. ed. Washington: ASM Press, 2011, 620 p.

JESUS, M. D.; 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**, v. 1, p. 500-508, 2010.

JOHNSON, M. D.; MACDOUGALL, C.; OSTROSKY-ZEICHNERO, L.; PERFECT, J. R.; REX, J. H. Combination antifungal therapy. **Antimicrob Agents Ch**, v. 48, p.693-715, 2004.

KANAFANI, Z. A.; PERFECT, J. R. Resistance to antifungal agents: mechanisms and clinical impact. **Clin Infect Dis**. v. 46, p. 120-128, 2008.

KANG, Y.; LEE, S. H.; LEE, J. Development of a Selective Medium for the Fungal Pathogen *Cylindrocarpon destructans* Using Radicol. **Plant Pathol J**, v. 30, n. 4, p. 432-436, 2014.

KOBAYASHI, C. C.; SOUZA, L. K.; FERNANDES, O. B.; BRITO, S. C.; SILVA, A. C.; SOUSA, E. D.; SILVA, M.; R. Characterization of *Cryptococcus neoformans* isolated from urban environmental sources in Goiânia, Goiás State, Brazil. **Rev Inst Med TropSao Paulo**, vol. 47, p. 203-207, 2005.

KON, A. S.; GRUMACH, A. S.; COLOMBO, A. L.; PENALVA, A. C. O.; WANKE, B.; TELLES, F. Q.; SEVERO, L. C.; ARANHA, L. F.; LAZÉRA, M. S.; RESENDE, M. R.; SALMITO, M. A.; SHIKANAI-YASUDA, M. A.; FERREIRA, M. S.; SILVA-VERGARA, M. L.; ANDRADE, N. M. P.; TRABASSO, P.; MENDES, R. P.; MARTINEZ, R.; PONZIO, V. Consenso em criptococose: 2008. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 41, n. 5, p. 524-544, 2008.

KRONSTAD, J. M.; 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. **Nat Rev Microbiol**, v. 9, p. 193-203, 2011.

KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W.; BOEKHOUT, T. *Cryptococcus*. In: **The yeasts: a taxonomic study**. 5. ed. New York: ACM Press, 2011. p. 1661-1662.

KWON-CHUNG, K. J., BENNETT, J. E. Distribution of alpha and a mating types of *Cryptococcus neoformans* among natural and clinical isolates. **Am J Epidemiol**, v. 108, p. 337-340, 1978.

- KWON-CHUNG, K. J., EDMAN, J. C., WICKES, B. L. Genetic association of mating types and virulence in *Cryptococcus neoformans*. **Infect Immun**, v. 60, p. 602-605, 1992.
- LACAZ, C. S.; RODRIGUES, M. C. Sorotipagem do *Cryptococcus neoformans*. **Rev bras Med**, v. 40, p. 297-300, 1983.
- LAMOTH, F.; PRAVEEN, R. J.; JARROD, R. F.; WILLIAM, J. S. Heat shock protein 90 is required for conidiation and cell wall integrity in *Aspergillus fumigatus*. **Eukaryot Cell**, v. 11, n. 11, p. 1324-1332, 2012.
- LAZERA, M. S.; CAVALCANTI, M. A. S.; TRILLES, L.; NISHIKAWA, M. M.; WANKE, B. *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*: evidence for a natural habitat related to decaying wood in pottery tree hollow. **Med Mycol**, 36, p. 119-122, 1998.
- LÁZERA, M. S.; PIRES, F. D. A.; CAMILLO-COURA, L. Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* in decaying wood forming hollows in living trees. **J Med Vet Mycol**, v. 34, p. 127-131, 1996.
- LÁZERA, M. S.; SALMITO, C. M. A.; LONDERO, A. T.; TRILLES, L.; NISHIKAWA, M. M.; WANKE, B. Possible primary ecological niche of *Cryptococcus neoformans*. **Med Mycol**, vol. 38, p. 379-383, 2000.
- LÁZERA, M. S.; WANKE, B.; NISHIKAWA, M. M. Isolation of both varieties of *Cryptococcus neoformans* from saprophytic sources in the City of Rio de Janeiro, Brazil. **J Med Vet Mycol**, vol. 31, p. 449-454, 1993.
- LEE, C. H.; HONG, H. M.; CHANG, Y. Y.; CHANG, W. W. Inhibition of heat shock protein (Hsp) 27 potentiates the suppressive effect of Hsp90 inhibitors in targeting breast cancer stem-like cells. **Biochimie**, v. 94, n. 6, p. 1382-1389, 2012.
- LIN, X.; HEITMAN, J. The biology of the *Cryptococcus neoformans* species complex. **Ann Rev Microbiol**, vol 60, p. 69-105, 2006.
- 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**, v. 174, n. 4, p. 2223-2238, 2005.
- LITVINTSEVA, A. P.; KESTENBAUM, L.; VILGALYS, R.; MITCHELL, T. G. Comparative analysis of environmental and clinical populations of *Cryptococcus neoformans*. **J Clin Microbiol**, v. 43, p. 556-564, 2005.
- LIU, G. Y.; NIZET, V. Color me bad: Microbial pigments as virulence factors. **Trends Microbiol**, v. 17, p. 406-413, 2009.
- LUGARINI, C.; GOEBEL, C. S.; CONDAS, L. A.; MURO, M. D.; DE FARIAS, M. R.; FERREIRA, F. M.; VAINSTEIN, M. H. *Cryptococcus neoformans* isolated from passerine and psittacine bird excreta in the State of Paraná, Brazil. **Mycopathologia**, v. 166, p. 61-69, 2008.

MA, H.; MAY, R. C. Virulence in *Cryptococcus* species. **Adv Appl Microbiol**, vol. 67, p. 131-190, 2009.

MADRIGAL-MATUTE, J.; FERNANDEZ-GARCIA, C. E.; GOMEZ-GUERRERO, C.; LOPEZ-FRANCO, O.; MUÑOZ-GARCIA, B.; EGIDO, J.; BLANCO-COLIO, L. M.; MARTIN-VENTURA, J. L. Hsp90 inhibition by 17-DMGA attenuates oxidative stress in experimental atherosclerosis. **Cardiovasc Res**, v. 95, p. 116-123, 2012.

MARTINEZ, L. R.; CASADEVALL, A. Susceptibility of *Cryptococcus neoformans* biofilms to antifungal agents in vitro. **Antimicrob Agents Ch**, v. 50, n. 3, p. 1021-1033, 2006.

MARTINEZ, L. R.; FRIES, B. C. Fungal biofilms: relevance in the setting of human disease. **Curr Fungal Infect Rep**, v. 4, n. 4, p. 266-275, 2010.

MARTINEZ, L. R.; MIHU, M. R.; HAN, G.; FRASES, S.; CORDERO, R. J.; CASADEVALL, A.; FRIEDMAN, J. M.; NOSANCHUK, J. D. The use of chitosan to damage *Cryptococcus neoformans* biofilms. **Biomaterials**, v. 31, n. 4, p. 669-679, 2010.

MATTHEWS, R. C.; BURNIE, J. P. Human recombinant antibody to Hsp90: a natural partner in combination therapy. **Curr Mol Med**, v. 5, n. 4, p. 403-411, 2005.

MAVES, R. C.; CRUM-CIANFLONE, N. Coccidioidomycosis: A Review. **Infet Dis Clin Prac**, v. 20, n. 1, p. 18-24, 2012.

MAYER, F. L.; WILSON, D.; JACOBSEN, I. D.; MIRAMÓM, P.; SLESIONA, S.; BOHOVYCH, I. M.; BROWN, A. J. P.; HUBE, B. Small but crucial: the novel small heat shock protein Hsp21 mediates stress adaptation and virulence in *Candida albicans*. **PLoS One**, v. 7, n. 6, p. 1-20, 2012.

MCCLELLAND, E. E.; BERNHARDT, P.; CASADEVALL, A. Estimating the relative contributions of virulence factors for pathogenic microbes. **Infect Immun**, v. 74, p. 1500-1504, 2006.

MERSHON-SHIER, K. L.; VASUTHASAWAT, A.; TAKAHASHI, K.; MORRISON, S. L.; BEENHOUWER, D. O. In vitro C3 deposition on *Cryptococcus* capsule occurs via multiple complement activation pathways. **Mol Immun**, v. 48, p. 2009-2018, 2011.

MEYER, W.; CASTAÑEDA, A.; JACKSON, S.; HUYNH, M.; CASTAÑEDA, E.; IBEROAMERICAN CRYPTOCOCCAL STUDY GROUP. Molecular typing of IberoAmerican *Cryptococcus neoformans* isolates. **Emerg Infect Dis**, v. 9, p. 189-195, 2003.

MEYER, W.; MARSZEWSKA, K.; AMIRMOSTOFIAN, M.; IGREJA, R.P.; HARDTKE, C.; METHLING, K.; VIVIANI, M. A.; CHINDAMPORN, A.; SUKROONGREUNG, S.; JOHN, M. A.; ELLIS, D. H.; SORREL, T. C. Molecular typing of global isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* by polymerase chain reaction fingerprinting and randomly amplified polymorphic DNA – a pilot study to standardize techniques on which to base a detailed epidemiological survey. **Electrophoresis**, v. 20, p. 1790-1799, 1999.

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. **Eukaryot Cell**, v. 4, n. 1, p. 202–208, 2005.

MIYATA, Y.; NAKAMOTO, H.; NECKERS, L. The therapeutic target hsp90 and cancer hallmarks. **Curr Pharm Des**, v. 19, n. 3, p. 347-365, 2013.

MYLONAKIS, E.; AUSUBEL, F. M.; PERFECT, J. R.; HEITMAN, J.; CALDERWOOD, S. B. Killing of *Caenorhabditis elegans* by *Cryptococcus neoformans* as a model of yeast pathogenesis. **Proc Natl Acad Sci**, v. 99, p. 15675-15680, 2002.

MYLONAKIS, E.; MORENO, R.; EL KHOURY, J. B.; IDNURM, A.; HEITMAN, J.; CALDERWOOD, S. B.; AUSUBEL, F. M.; DIENER, A. *Galleria mellonella* as a model system to study *Cryptococcus neoformans* pathogenesis. **Infect Immun**, v. 73, n. 7, p. 3842-3850, 2005.

NECKERS, L. Molecular Chaperones in Pathogen Virulence: Emerging New Targets for Therapy. **Cell Host Microbe**, v. 4, n. 6, p. 519-527, 2008.

NARDELLI, V.; PÉREZ, C.; MATA-ESSAYAG, S.; COLELLA, M. T.; ROSELLÓ, A.; HARTUNG, C. C.; LANDAETA, M. E.; OLAIZOLA, C.; MAGALDI, S. Identification of *Cryptococcus neoformans* isolates using Staib agar without creatinine. **Kasmera**, v. 33, n. 2, 2005.

NGAMSKULRUNGROJ, P.; MEYER, W. Melanin production at 37°C is linked to the high virulent *Cryptococcus gattii* Vancouver Island outbreak genotype VGIIa. **Australasian Mycologist**, v. 28, p. 9-14, 2009.

NICOLA, A. M.; ANDRADE, R. V.; DANTAS, A. S.; ANDRADE, A. A.; ARRAES, F. B. M.; FERNANDES, L.; SILVA-PEREIRA, I.; FELIPE, M. S. S. The stress responsive and morphologically regulated *hsp90* gene from *Paracoccidioides brasiliensis* is essential to cell viability. **BMC Microbiol**, v. 8, 2008.

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

NOONEY, L.; MATTHEWS, R. C.; BURNIE, J. P. Evaluation of Mycograb<sup>®</sup>, amphotecicin B, caspofungin and fluconazole in combination against *Cryptococcus neoformans* by checkerboard and time-kill methodologies. **Diagn Micr Infec Dis**, v. 51, p. 19-29, 2005.

ODDS, F. C. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. **J Antimicrob Chemoth**, v. 52, n. 1, 2003.

O'MEARA, T. R.; ALSPAUGH, J. A. The *Cryptococcus neoformans* capsule: a sword and a shield. **Clin Microbiol Rev**, v. 25, n. 3, 2012.

O'MEARA, T. R.; COWEN, L. E. Hsp90-dependent regulatory circuitry controlling temperature-dependent fungal development and virulence. **Cell Microbiol**, v. 16, n. 4, p. 473-481, 2014.

PARK, B. J.; WANNEMUEHLER, K. A.; MARSTON, B. J.; GOVENDER, N.; PAPPAS, P. G.; CHILLER, T. M. Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. **AIDS**, v. 23, n. 4, p. 525-530, 2009.

PARKER, J. E.; WARRILOW, A. G.; PRICE, C. L.; MULLIS, J. G.; KELLY, D. E.; KELLY, S. L. Resistance to antifungals that target CYP51. **J Chem Biol**, v. 7, n. 4, p. 143-161, 2014.

PEDROSO, R. S.; FERREIRA, J. C.; CANDIDO, R. C. The isolation and characterization of virulence factors of *Cryptococcus* spp. from saprophytic sources in the city of Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil. **Microbiol Res**, v. 164, p. 221-227, 2009.

PEETERS, E.; NELIS, H. J.; COENYE, T. Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grow in microtiter plates. **J Microbiol Methods**, v. 72, p. 157-165, 2008.

PEREIRA, T. C. D.; BARROS, R. A. M. *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*: perspectivas sobre a eco-epidemiologia e novos nichos ecológicos. **FACIDER**, v. 1, n. 1, 2012.

PESSOA, C. C. B.; DA SILVA, S. H. M.; GOMES, F. S. Produção de fatores de virulência *in vitro* por isolados de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* de origem clínica em Belém, Estado do Pará, Brasil. **Rev Pan-Amaz Saúde**, v. 3, n. 2, p. 59-65, 2012.

PETTER, R.; KANG, B. S.; BOEKHOUT, T.; DAVIS, B. J.; KWON-CHUNG, K. J. A survey of heterobasidiomycetous yeasts for the presence of the genes homologous to virulence factors of *Filobasidiella neoformans*, CNLAC1 and CAP59. **Microbiology**, v. 147, n. 8, p. 2029-2036, 2001.

POLACHECK, I.; HEARING, V. J.; KWON-CHUNG, K. J. Biochemical studies of phenoloxidase and utilization of catecholamines in *Cryptococcus neoformans*. **J Bacteriol**, v. 150, n. 3, p. 1212-1220, 1982.

PRADO, M.; SILVA, M. B.; LAURENTI, R.; TRAVASSOS, L. R.; TABORDA, C. P. Mortality due to systemic mycoses as a primary cause of death or in association with AIDS in Brazil: a review from 1996 to 2006. **Mem I Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 513-521, 2009.

PUKKILA-WORLEY, R.; GERRARD, Q. D.; KRAUS, P. R.; BOILY, M. J.; DAVIS, M. J.; GILES, S. S.; COX, G. M.; HEITMAN, J.; ASPAUGH, J. A. Transcriptional network of multiple capsule and melanin genes governed by the *Cryptococcus neoformans* cyclic AMP cascade. **Eukaryot Cell**, v. 4, n. 1, 2005.

PUKKILA-WORLEY, R.; HOLSON, E.; WAGNER, F.; MYLONAKIS, E. Antifungal drug discovery through the study of invertebrate model hosts. **Curr Med Chem**, v. 16, n. 13, p. 1588-1595, 2009.

RADAMÉS, C. J. B.; BRUNO, P.; FRASES, S.; NAKOUZI, A.; NIMRICHTER, L.; RODRIGUES, M. L.; VIANA, N. B.; CASADEVALL, A. Antibody binding to *Cryptococcus neoformans* impairs budding by altering capsular mechanical properties. **J Immunol**, v. 190, n.1, p. 317-323, 2013.

RAKESH, V.; SCHWEITZER, A. D.; ZARAGOZA, O.; BRYAN, R.; WONG, K.; DATTA, A.; CASADEVALL, A.; DADACHOVA, E. Finite-element model of interaction between fungal polysaccharide and monoclonal antibody in the capsule of *Cryptococcus neoformans*. **J Phys Chem B**, v. 112, p. 8514-8522, 2008.

RAMAGE, G.; RAJENDRAN, R.; SHERRY, L.; WILLIAMS, C. Fungal biofilms resistance. **Int J Microbiol**, v. 2012, 2012.

ROBERT, V. A.; CASADEVALL, A. Vertebrate endothermy restricts most fungi as potential pathogens. **J Infect Dis**, v. 200, p. 1623-1626, 2009.

ROBBINS, N.; UPPULURI, P.; NETT, J.; RAJENDRAN, R.; RAMAGE, G.; LOPEZ-RIBOT, J. L.; ANDES, D.; COWEN, L. Hsp90 governs dispersion and drug resistance of biofilms. **Plos Pathog**, v. 7, n.9, 2011.

ROBERTSON, E. J.; WOLF, J. M.; CASADEVALL, A. EDTA inhibits biofilm formation, extracellular vesicular secretion, and shedding of the capsular polysaccharide glucuronoxylomannan by *Cryptococcus neoformans*. **Appl Environ Microbiol**, v. 78, n. 22, p. 7977-7984, 2012.

ROE, S. M.; C. PRODRAMOU.; O'BRIEN, R.; LADBURY, J. E.; PIPER, P. W.; PEARL, L. H. Structural basis for inhibition of the Hsp90 molecular chaperone by the antitumor antibiotics radicicol and geldanamycin. **J Med Chem**, v. 42, n. 2, p. 260-266, 1999.

SANTOS, J. R. A.; HOLANDA, R. A.; FRASES, S.; BRAVIM, M.; ARAUJO, G. S.; SANTOS, P. C.; COSTA, M. C.; RIBEIRO, M. J. A.; FERREIRA, G. F.; BALTAZAR, L. M.; MIRANDA, A. S.; OLIVEIRA, D. B.; SANTOS, C. M. A.; FONTES, A. C. L.; GOUVEIA, L. F.; RESENDE-STOIANOFF, M. A.; ABRAHÃO, J. S.; TEIXEIRA, A. L.; PAIXÃO, T. A.; SOUZA, D. G.; SANTOS, D. A. Fluconazole Alters the Polysaccharide Capsule of *Cryptococcus gattii* and Leads to Distinct Behaviors in Murine Cryptococcosis. **Plos One**, v. 9, n. 11, 2014.

SCHMID, T. E.; MULTHOFF, G. Radiation-induced stress proteins - the role of heat shock proteins (HSP) in anti-tumor responses. **Curr Med Chem**, v. 19, n. 12, p. 1765-1770, 2012.

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

SHAPIRO, R. S.; COWEN, L. E. Coupling temperature sensing and development: Hsp90 regulates morphogenetic signalling in *Candida albicans*. **Virulence**, v. 1, n. 1, 2010.

SHAPIRO, R. S.; COWEN, L. E. Thermal control of microbial development and virulence: molecular mechanisms of microbial temperature sensing. **MBio**, v. 3, n. 5, 2012.

SHAPIRO, R. S.; UPPULURI, P.; ZAAS, A. K.; COLLINS, C.; SENN, H.; PERFECT, J. R.; HEITMAN, J.; COWEN, L. E. Hsp90 orchestrates temperature-dependent *Candida albicans* morphogenesis via Ras1-PKA signaling. **Curr Biol**, v. 19, n. 8, 2009.

SHAPIRO, R. S.; ZAAS, A. K.; BETANCOURT-QUIROZ, M.; PERFECT, J. R.; COWEN, L. E. The Hsp90 Co-Chaperone Sgt1 Governs *Candida albicans* Morphogenesis and Drug Resistance. **Plos One**, vol. 7, n. 9, 2012.

SHAW, C. E., KAPIKA, L. Production of diagnostic pigment by phenoloxidase activity of *Cryptococcus neoformans*. **Appl Microbiol**, v. 24, p. 824-830, 1972.

SIDRIM, J. J. C.; PERDIGÃO-NETO, L. V.; CORDEIRO, R. A.; BRILHANTE, R. S. N.; LEITE, J. J. G.; TEIXEIRA, C. E. C.; MONTEIRO, A. J.; FREITAS, R. M. F.; RIBEIRO, J. F.; MESQUITA, J. L. R.; GONÇALVES, M. V. F.; ROCHA, M. F. G. Viral proteases, inhibitors affect the production of virulence factors in *Cryptococcus neoformans*. **Can J Microbiol**, v. 58, p. 932-936, 2012.

SINGH, S. D.; ROBBINS, N.; ZAAS, A. K.; SCHELL, W. A.; PERFECT, J. R.; COWEN, L. E. Hsp90 governs echinocandin resistance in the pathogenic yeast *Candida albicans* via calcineurin. **Plos Pathogens**, v. 5, n. 7, 2009.

SORRELL, T. C. et al. Concordance of clinical and environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* by random amplification of polymorphic DNA analysis and PCR fingerprinting. **J Clin Microbiol**, v. 34, p. 1253-60, 1996.

STEENBERGEN, J. N.; NOSANCHUK, J. D.; MALLIARIS, S. D.; CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* virulence is enhanced after growth in the genetically malleable host *Dictyostelium discoideum*. **Infect Immun**, v. 71, p. 4862-4872, 2003.

STEENBERGEN, J. N.; SHUMAN, H. A.; CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* interactions with amoebae suggest an explanation for its virulence and intracellular pathogenic strategy in macrophages. **Proc Natl Acad Sci USA**, vol. 98, n. 26, p. 15245-15250, 2001.

STONE, N. R. H.; BIBANC, T. Therapy of AIDS-related cryptococcal meningitis. **Curr Treat Options Infect Dis**, v. 6, p. 294-308, 2014.

TAIPALE, M.; JAROSZ, D. F.; LINDQUIST, S. Hsp90 at the hub of protein homeostasis: emerging mechanistic insights. **Nat Rev Mol Cell Bio**, v. 11, n. 7, p. 515-528, 2010.

TAMAYO, D.; MUÑOZ, J. F.; TORRES, I.; ALMEIDA, A. J.; RESTREPO, A.; MECEWEN, J. G.; HERNÁNDEZ, O. Involvement of the 90 kDa heat shock protein during adaptation of *Paracoccidioides brasiliensis* to different environmental conditions. **Fungal Genet Biol**, 2012.

TANG, R. J.; BREGER, J.; IDNURM, A.; GERIK, K. J.; LODGE, J. K.; HEITMAN, J.; CALDERWOOD, S. B.; MYLONAKIS, E. *Cryptococcus neoformans* gene involved in mammalian pathogenesis identified by a *Caenorhabditis elegans* progeny-based approach. **Infect Immun**, v. 73, p. 8219-8225, 2005.

TRILLES, L.; TORRES, B. F.; LÁZERA, M. S.; WANKE, B.; GUARRO, J. In Vitro Antifungal Susceptibility of *Cryptococcus gattii*. **J Clin Microbiol**, v. 42, n. 10, p. 4815-4817, 2004.

TUCKER, S. C.; CASADEVALL, A. Replication of *Cryptococcus neoformans* in macrophages is accompanied by phagosomal permeabilization and accumulation of vesicles containing polysaccharide in the cytoplasm. **Proc Natl Acad Sci**, v. 99, p. 3165-3170, 2002.

VAISHNAV, V. V.; BACON, B. E.; O'NEIL, M.; CHERNIAK, R. Structural characterization of the galactoxylomannan of *Cryptococcus neoformans* Cap67. **Carbohydr Res**, v. 306, n. 1-2, p. 315-330, 1998.

VARMA, A.; KWON-CHUNG, K. J. Heteroresistance of *Cryptococcus gattii* to fluconazole. **Antimicrob Agents Ch**, v. 54, n. 6, p. 2303-2311, 2010.

VECCHIARELLI, A.; PERICOLINI, E.; GABRIELLI, E.; KENNO, S.; PERITO, S.; CENCI, E.; MONARI, C. Elucidating the immunological function of the *Cryptococcus neoformans* capsule. **Future Microbiol**, v. 8, n. 9, p. 1107-1116, 2013.

VELAGAPUDI, R.; HSUEH, Y. P.; GEUNES-BOYER, S.; WRIGHT, J. R.; HEITMAN, J. Spores as infectious propagules of *Cryptococcus neoformans*. **Infect Immun**, v. 77, p. 4345-4355, 2009.

VERI, A.; COWEN, L. E. Progress and prospects for targeting Hsp90 to treat fungal infections. **Parasitology**, v. 141, p. 1127-1137, 2014.

VIDOTTO, V.; MELHEM, M.; PUKINSAS, S.; AOKI, S.; CARRARA, C.; PUGLIESE, A. Extracellular enzymatic activity and serotype of *Cryptococcus neoformans* strains isolated from AIDS patients in Brazil. **Rev Iberoam Micol**, v. 22, p. 29-33, 2005.

WALSH, T. J.; SCHLEGEL, R.; MOODDY, M. M.; COSTERTON, J. W.; SALCMAN, M. Ventriculoatrial shunt infection due to *Cryptococcus neoformans*: an ultrastructural and quantitative microbiological study. **Neurosurgery**, v. 18, p. 373-375, 1986.

WANG, Y.; CASADEVALL, A. Decreased susceptibility of melanized *Cryptococcus neoformans* to UV light. **Appl Environ Microbiol**, v. 60, p. 3864-3866, 1994a.

WANG, Y.; CASADEVALL, A. Growth of *Cryptococcus neoformans* in presence of L-dopa decreases its susceptibility to amphotericin B. **Antimicrob Agents Ch**, v. 38, p. 2648-2650, 1994b.

WANG, Y.; CASADEVALL, A. Susceptibility of melanized and nonmelanized *Cryptococcus neoformans* to nitrogen- and oxygen-derived oxidants. **Infect Immun**, v. 62, p. 3004-3007, 1994c.

WHITESELL, L.; SANTAGATA, S.; NU, L. Inhibiting Hsp90 to treat cancer: a strategy in evolution. **Curr Mol Med**, v. 12, n. 9, p. 1108-1124, 2012.

WINSSINGER, N.; BARLUENGA, S. Chemistry and biology of resorcylic acid lactones. **Chem Commun**, v. 7, n. 1, p. 22-36, 2006.

XIE, J. L.; POLVI, E. J.; SHEKHAR-GUTURJA, T.; COWEN, L. E. Elucidating drug resistance in human fungal pathogens. **Future Microbiol**, v. 9, n. 4, p. 523-542, 2014.

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

ZARAGOZA, O.; CASADEVALL, A. Experimental modulation of capsule size in *Cryptococcus neoformans*. **Biol Proced**, v. 6, n. 1, p. 10-15, 2004.

ZARAGOZA, O.; RODRIGUES, M. L.; DE JESUS, M.; FRASES, S.; DADACHOVA, E.; CASADEVALL. The capsule of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. **Adv Appl Microbiol**, 68, 133-216, 2009.

## APÊNDICE A – PRODUÇÃO CIENTÍFICA AO LONGO DO MESTRADO

1. “Inibição da Hsp90 aumenta a sensibilidade de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* a antifúngicos de uso terapêutico”. Autores: Evangelista, A. J. J.; Marques, F. J. F.; Franco, J. S.; Sidrim, J. J. C.; Cordeiro, R. A. Premiado como o melhor trabalho da área Medicina I durante o VII Encontro de Pesquisa e Pós-Graduação da Universidade Federal do Ceará.
2. “Caracterização dos biofilmes produzidos por *Trichosporon inkin*”. Autores: Serpa, R.; Evangelista, A. J. J.; Franco, J. S.; Sidrim, J. J. C.; Cordeiro, R. A. Premiado como o melhor trabalho da área Ciências Biológicas III durante o VII Encontro de Pesquisa e Pós-Graduação da Universidade Federal do Ceará.
3. “Inhibitory activity of isoniazide and ethionamide against *Cryptococcus* biofilms”. Autores: Cordeiro, R. A.; Serpa, R.; Marques, F. J. F.; Melo, C. V. S.; Evangelista, A. J. J.; Mota, V. F.; Brilhante, R. S. N.; Bandeira, T. J. P. G.; Rocha, M. F. G.; Sidrim, J. J. C. Artigo publicado no periódico *Canadian Journal of Microbiology*. Fator de impacto 1,221, Qualis B2 – Medicina I. DOI 10.1139/cjm-2015-0230.
4. “*Trichosporon inkin* biofilms produce extracellular proteases and exhibit resistance to antifungals”. Autores: Cordeiro, R. A.; Serpa, R.; Alexandre, C. F.; Marques, F. J. F.; Melo, C. V. S.; Franco, J.; Evangelista, A. J. J.; Camargo, Z. P.; Brilhante, R. S. N.; Rocha, M. F. G.; Moreira, J. L. B.; Bandeira, T. J. P. G.; Sidrim, J. J. Artigo publicado no periódico *Journal of Medical Microbiology*. Fator de impacto 2,248, Qualis B1 – Medicina I. DOI 10.1099/jmm.0.000159.
5. “Inhibition of heat shock protein 90 enhances the susceptibility to antifungals and reduces the virulence of *Cryptococcus neoformans*/*C. gattii* species complex”. Autores: Cordeiro, R. A.; Evangelista, A. J. J.; Serpa, R.; Marques, F. J. F.; Melo, C. V. S.; Oliveira, J. S.; Franco, J. S.; Alencar, L. P. A.; Bandeira, T. J. P. G.; Brilhante, R. S. N.; Sidrim, J. J. C.; Rocha, M. F. G. Manuscrito submetido ao periódico *Microbiology*. Fator de impacto 2.557, Qualis A2 – Medicina I.
6. “Synthesis and inhibitory effect of isoniazid-derived hydrazones against *Coccidioides posadasii*”. Autores: Cordeiro, R. A.; Melo, C. V. S.; Marques, F. J. F.; Serpa, R.; Evangelista, A. J. J.; Caetano, E. P.; Mafezoli, J.; Bandeira, T. J. P. G.; Rocha, M. F. G.; Sidrim, J. J. C. Manuscrito submetido ao periódico *Applied Microbiology and Biotechnology*. Fator de impacto 3,811, Qualis B1 – Ciências Biológicas III.

## ANEXO A – CEPAS UTILIZADAS NOS TESTES FRENTE À INIBIÇÃO DAS Hsp90

**Tabela 4.** Relação das cepas utilizadas nos testes de sensibilidade e virulência frente à inibição das Hsp90.

Cepas	Espécie fúngica	Sensibilidade		Virulência			
		Planctônica	Biofilmes	Cápsula	Melanina	Proteases	<i>C. elegans</i>
CEMM 05-2-076	<i>C. neoformans</i>	X	X			X	
CEMM 05-2-077	<i>C. neoformans</i>	X	X		X	X	
CEMM 05-1-050	<i>C. neoformans</i>	X	X	X	X		
CEMM 03-2-060	<i>C. neoformans</i>	X	X				
CEMM 03-2-063	<i>C. neoformans</i>	X	X				
CEMM 05-1-071	<i>C. neoformans</i>	X	X	X			
CEMM 05-2-079	<i>C. gattii</i>	X	X	X	X	X	X
CEMM 05-2-082	<i>C. gattii</i>	X	X			X	
CEMM 03-2-069	<i>C. gattii</i>	X	X				
CEMM 03-2-070	<i>C. gattii</i>	X	X	X	X		
CEMM 03-2-073	<i>C. gattii</i>	X	X				X
CEMM 03-2-074	<i>C. gattii</i>	X	X				

O “X” representa a escolha das cepas que foram utilizadas para cada experimento frente à inibição das Hsp90.