

AVALIAÇÃO DOS FATORES DE VIRULÊNCIA EM *Cryptococcus gattii* APÓS TRATAMENTO COM NOVO TIAZOL

Caroline Miranda de Lima¹
Nívea Pereira de Sá²
Renata Barbosa de Oliveira³
Susana Johann⁴

RESUMO

A criptococose humana pode ocorrer como uma infecção primária ou oportunista e envolver diferentes órgãos do hospedeiro. Para o tratamento da criptococose são utilizados frequentemente os polienos e os azólicos, porém, mediante à emergência de linhagens resistentes, toxicidade e limitado número de fármacos disponíveis, faz-se necessária a pesquisa por novos fármacos antifúngicos. Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar a influência do tratamento com o tiazol RN104 nos fatores de virulência do fungo *Cryptococcus gattii*. Foram realizados ensaios *in vitro* e *in vivo* com esse composto tiazólico, o qual em estudos anteriores demonstrou ação antifúngica. No ensaio *in vitro* foi observado que o composto RN104 é capaz de aumentar a espessura da cápsula fúngica e diminuir a melanização. Além disso, esse tiazol teve ação nas células em biofilme e aumentou a fagocitose em macrófagos murinos. Importante ressaltar ainda, que o composto testado reduziu a carga fúngica no pulmão de camundongos. Sendo assim, os resultados obtidos indicam que o tiazol RN104 pode ser um potencial agente terapêutico para a criptococose, sendo capaz de agir diretamente sobre as leveduras, promover uma fagocitose eficiente e inibir importantes fatores de virulência de *C. gattii*.

PALAVRAS-CHAVE: Criptococose. Antifúngicos. Tiazol.

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Cryptococcus* é composto por leveduras capsuladas, sendo que *C. gattii* é considerado um dos principais agentes etiológicos da criptococose humana (CHAYAKULKEEREE; PERFECT, 2006). Essa doença se caracteriza por manifestações clínicas em sítios pulmonares, cutâneos e cerebrais, podendo ainda, progredir para o quadro mais grave da doença, a meningoencefalite (ROSSI *et al.*, 2016; NEGRONI, 2012).

A criptococose é uma infecção que apresenta distribuição mundial. Recentemente, um estudo revelou que 220.000 novos casos de meningite criptocócica ocorrem todo ano,

¹Caroline Miranda de Lima, Mestranda em Microbiologia pela UFMG, Belo Horizonte-MG, e-mail: carolinemiranda.bio@gmail.com

²Nívea Pereira de Sá, Doutora em Microbiologia pela UFMG, Belo Horizonte-MG, e-mail: niveasap@gmail.com

³Renata Barbosa de Oliveira, Pós-Doutora, Docente na Faculdade de Farmácia da UFMG, Belo Horizonte-MG, e-mail: renatab.ufmg@gmail.com

⁴Susana Johann, Pós-Doutora, Docente no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, Belo Horizonte-MG, e-mail: sjohann@icb.com.br

resultando em 181.000 mortes (RAJASINGHAM *et al.*, 2017). A infecção ocorre através da inalação de basidiósporos ou leveduras dessecadas que penetram o trato respiratório e alcançam o pulmão, local em que começam a se reproduzir e a invadir outros tecidos (MAY *et al.*, 2016). Essas células fúngicas podem ainda se disseminar através da corrente sanguínea para o cérebro (WILLIAMSON *et al.*, 2016).

Cryptococcus spp. apresenta uma ampla variedade de fatores de virulência, como cápsula polissacarídica, produção de melanina, capacidade de crescimento a 37°C e produção de enzimas (ALSPAUGH, 2015). Esses fatores podem modificar a resposta imune do hospedeiro e melhorar a sobrevivência do patógeno (VOELZ; MAY, 2010). Para o tratamento da criptococose são utilizados principalmente a anfotericina B e azólicos (PERFECT *et al.*, 2010). Contudo, há relatos de linhagens resistentes ao fluconazol e à anfotericina B (KWON-CHUNG *et al.*; 2014). Além disso, considera-se que a anfotericina B seja nefrotóxica e hepatotóxica (GULLO *et al.*, 2013).

Diante da emergência de linhagens resistentes, toxicidade dos antifúngicos e limitado número de fármacos disponíveis, novas pesquisas vêm tentando encontrar compostos com possível atividade antifúngica. Entre esses novos compostos estão os derivados tiazólicos (KHALIL *et al.*, 2015). Estudos anteriores demonstraram diversas vantagens dessas substâncias, como o efeito em novos alvos de ação, bem como, a possibilidade de combinação com outros fármacos, possibilitando maior espectro de atividade. Dessa maneira, o presente estudo tem por objetivo avaliar os fatores de virulência de *Cryptococcus gattii* após o tratamento com um novo composto tiazol.

2 METODOLOGIA

C. gattii. No presente trabalho foi utilizada uma linhagem clínica de *C. gattii* (L27/01) pertencente à Coleção de Culturas do Laboratório de Micologia, da Universidade Federal de Minas Gerais. As leveduras foram cultivadas em ágar Sabouraud dextrose por 48 horas em estufa a 37°C.

Composto tiazol. Inicialmente foi realizado um ensaio de microdiluição com a substância sintética RN104 que forneceu o valor de sua Concentração Inibitória Mínima (CIM).

Mensuração do tamanho da cápsula. Para análise do tamanho da cápsula, foi preparado um inóculo 1×10^5 células de *C. gattii* em meio RPMI, e adicionada a substância RN104 conforme o valor de CIM. Células não tratadas foram utilizadas como controle negativo, todos mantidos a 37°C por 48 horas. Após este período, preparou-se lâminas com a suspensão

de células e adicionou-se tinta nanquim para a visualização em microscópio óptico (AXIOPLAN, Carl Zeiss). A cápsula e o diâmetro de cinquenta células foram mensurados usando o programa ImageJ 1.40 g.

Produção de melanina. Preparou-se um meio contendo L-dopa acrescido do tiazol RN104, nas concentrações sub-CIM, 1x CIM, 2x CIM e 4x CIM. A seguir, as leveduras foram repicadas e, observou-se o crescimento nesse meio após 48 horas.

Formação de biofilme. Para a avaliação da atividade antifúngica em células aderidas em biofilme, utilizou-se o ensaio de redução com o sal de tetrazólio XTT, a fim de determinar a suscetibilidade das células sésseis.

Ensaio de fagocitose. Os macrófagos peritoneais foram obtidos de camundongos da linhagem C57/BL6. Para a verificação da fagocitose foram preparadas placas de 24 poços contendo uma lamínula circular e a quantidade de 3×10^5 macrófagos em cada poço. Os macrófagos foram tratados com o composto RN104 e as placas foram incubadas *overnight* em estufa com 5% CO² a 37°C. O índice fagocítico (IF%) foi determinado com base no número de células fagocíticas multiplicado pelo número de partículas fagocitadas.

Tratamento dos camundongos. Foi realizado um ensaio prévio para avaliar a atividade hemolítica em eritrócitos humanos. O composto RN104 não apresentou atividade hemolítica, e assim foi selecionado para os testes em modelo murino. Camundongos machos C57BL/6 foram infectados com 10^5 células de *C. gattii* e tratados com o tiazol RN104 nas concentrações de 10 e 50 mg/kg/dia. Após 15 dias os animais foram sacrificados, os pulmões foram retirados, macerados e plaqueados em meio ágar Sabouraud dextrose. A fim de avaliar a carga fúngica destes órgãos, as placas foram incubadas por 48 horas para contagem de colônias.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A mensuração da cápsula foi realizada após 48 horas do tratamento com o composto tiazólico. Após este período, as células foram coradas com tinta nanquim para análise microscópica. Foi possível verificar um aumento significativo na espessura da cápsula no grupo tratado com o tiazol RN104 comparado ao controle de células ($p < 0.05$). Além disso, o composto testado promoveu um aumento do englobamento das células fúngicas pelos macrófagos ($p < 0.001$). Em estudos anteriores foi observado que o aumento da cápsula está envolvido no processo de inibição da fagocitose (ZARAGOZA *et al.*, 2009). Contudo, em nosso trabalho verificamos que o composto RN104 foi capaz de induzir o aumento da cápsula fúngica e da

fagocitose. Assim, podemos perceber que apesar de ocorrer o aumento da cápsula fúngica, isto não dificultou a fagocitose pelos macrófagos.

No ensaio de melanina foi observado que o tratamento de *C. gattii* com o tiazol na concentração de 2x CIM foi capaz de reduzir a melanização das colônias. O composto RN104 apresentou ainda, atividade contra as células em biofilme, demonstrando uma redução significativa na quantidade de leveduras em relação ao controle de células sem tratamento ($p < 0.001$). Alguns trabalhos mostraram que a melanina em *C. gattii* confere proteção contra estresses ambientais, luz ultravioleta e radiação ionizante (EISENMAN; CASADEVALL, 2012). Acrescenta-se ainda, que a melanina tem influência na resistência aos antifúngicos, assim como as células fúngicas em biofilme (ALMEIDA *et al.*, 2015). Dessa forma, o composto testado apresenta uma grande vantagem, uma vez que é capaz de reduzir a melanização das colônias fúngicas, bem como, atuar sobre as células em biofilme.

Em relação ao ensaio *in vivo*, foi observada uma redução significativa da carga fúngica no pulmão no grupo tratado com o tiazol RN104 ($p < 0.05$). Já foi demonstrado que no pulmão as células de *Cryptococcus* podem se multiplicar e invadir outros tecidos, incluindo, o cérebro (MAY *et al.*, 2016). Assim, a redução da carga fúngica no pulmão, constitui outra importante ação do composto RN104 para o tratamento da criptococose.

4 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos indicam que o tiazol RN104 pode ser um potencial agente terapêutico para o tratamento da criptococose, sendo capaz de agir diretamente sobre as leveduras e também promover uma fagocitose eficiente e inibir importantes fatores de virulência de *C. gattii*. Destaca-se que são necessários maiores estudos para avaliar os mecanismos de ação e farmacocinética desse novo composto tiazol.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, F. et al. **Virulence-Associated Enzymes of *Cryptococcus neoformans***. Eukaryotic Cell. s.l. V. 1, 12 ed., p. 1173-1185, Dez. 2015.

ALSPAUGH, J.A. **Virulence mechanisms and *Cryptococcus neoformans* pathogenesis**. Fungal Genetics and Biology. s.l., V. 78, p. 55-58, Mai. 2015.

CHAYAKULKEEREE, M; PERFECT, J.R. **Cryptococcosis**. Infectious Diseases Clinics of North America. s.l. V.20, 3 ed., p. 507–544, Set. 2006.

EISENMAN, H.C.; CASADEVALL, A. **Synthesis and assembly of fungal melanin**. Applied Microbiology and Biotcnology. s.l. V. 93, 3 ed., p. 931-940, Fev. 2012.

GULLO, F. P. *et al.* **Cryptococcosis: epidemiology, fungal resistance, and new alternatives for treatment**. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Disease. s.l. V. 32, 11 ed., p. 1377–1391, Nov. 2013.

KHALIL, A. *et al.* **Design, synthesis, and biological evaluation of aminothiazole derivatives against the fungal pathogens *Histoplasma capsulatum* and *Cryptococcus neoformans***. Bioorganic & Medicinal Chemistry. s.l. V. 23, 3 ed., p. 532–547, Fev. 2015.

KWON-CHUNG, K. J. *et al.* ***Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*, the Etiologic Agents of Cryptococcosis**. Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine. s.l. V. 4, 7 ed., p. 019760, Jul. 2014.

MAY, R.C. *et al.* ***Cryptococcus*: from environmental saprophyte to global pathogen**. Nature Reviews Microbiology. s.l. V. 14, 2 ed., p. 106-117, Fev. 2016.

NEGRONI, R. M.D. **Cryptococcosis**. Clinics in Dermatology. s.l. V. 30, 6 ed., p. 599–609, Nov-Dez. 2012.

PERFECT, J. R. *et al.* **Clinical practice guidelines for the management of cryptococcal disease: 2010 update by the Infectious Diseases Society of America**. Clinical Infectious Diseases. s.l. V. 50, 3 ed., p. 291–322, Fev. 2010.

RAJASINGHAM, R. *et al.* **Global burden of disease of HIV-associated cryptococcal meningitis: an updated analysis**. The Lancet. Infectious Diseases. s.l. V. 17, 8 ed., p. 873-881, Ago. 2017.

ROSSI, S.A. *et al.* **Impact of Resistance to Fluconazole on Virulence and Morphological Aspects of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* Isolates.** *Frontiers in Microbiology*. s.l. V. 7, p. 153, Fev. 2016.

VOELZ, K.; MAY, R.C. **Cryptococcal Interactions with the Host Immune System.** *Eukaryotic Cell*. s.l. V. 9, 6 ed., p. 835–846, Jun. 2010.

WILLIAMSON, P.R. *et al.* **Cryptococcal meningitis: epidemiology, immunology, diagnosis and therapy.** *Nature Reviews Neurology*. s.l. V. 13, 1 ed., p. 13-24, Jan. 2017.

ZARAGOZA, O. *et al.* **The Capsule of the Fungal Pathogen *Cryptococcus neoformans*.** *Advances in Applied Microbiology*. s.l. V.68, c.4, p. 133-216, Mar. 2009.