

## **ESTUDO DOS EFEITOS DE TIORIDAZINA E TELURANAS (RF-07, RF-28 E GDS-05) EM LEVEDURAS DE *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* H99**

Tábata Hiromi Usuginu<sup>1</sup>; Regina Costa de Oliveira<sup>2</sup>; Luiz R. Nunes<sup>3</sup>; Daniela Leite Jabes<sup>4</sup>

Estudante do Curso de Farmácia; tabatahiromi@hotmail.com<sup>1</sup>

Orientadora do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade de Mogi das Cruzes; reginaco@umc.br<sup>2</sup>

Orientador do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade de Mogi das Cruzes; nunes1212@gmail.com<sup>3</sup>

Orientadora do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade de Mogi das Cruzes; danielajabes@umc.br<sup>4</sup>

Área do Conhecimento: Genética Molecular de Microrganismos

Palavras-chave: *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* H99; CFW; qPCR; Tioridazina; Teluranas

### **INTRODUÇÃO**

Leveduras do gênero *Cryptococcus* apresentam ampla distribuição no ambiente e podem ser encontrados no ar, solo, excretas de aves, água e troncos de árvores. A criptococose é uma micose sistêmica causada por fungos leveduriformes do gênero *Cryptococcus* que acometem humanos e animais, causando principalmente alterações no trato respiratório e sistema nervoso central (SNC). A criptococose acomete principalmente pessoas imunocompetentes, como pacientes portadores de HIV, portadores de doenças imunossupressivas, e preferencialmente acomete o SNC, provocando a meningoencefalite criptocócica. *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* H99 é o isolado utilizado frequentemente nos estudos de virulência, uma vez que é mais patogênica do que variedade *neoformans* e globalmente, é a que causa grande maioria das doenças, incluindo mais de 99% das infecções em pacientes com AIDS e mais de 95% nas pessoas em geral (RSBMT, 2008). O tratamento padrão da criptococose se dá pela combinação de Anfotericina B com Flucitosina durante 2 semanas (terapia de indução), seguidas por oito semanas de consolidação com fluconazol ou itraconazol (RSBMT, 2008; SOUZA *et al.*, 2005). A resistência às drogas, poliênicos e azóis é menos frequente em *Cryptococcus*, porém alguns autores relataram, em cepas isoladas obtidas de pacientes que evoluíram para meningoencefalites, o desenvolvimento de resistência a Anfotericina B (SOUZA *et al.*, 2005). Fenotiazinas são fármacos antipsicóticos que podem ser utilizadas pelas suas potentes propriedades antieméticas e sedativas e uma das principais é a Tioridazina (TR) (PENILDON, 2010). Fenotiazinas em geral, e especialmente a TR, têm se mostrado eficientes na atividade antimicrobiana tanto *in vitro* como *in vivo* contra uma variedade de microrganismos patogênicos, incluindo fungos, protozoários e bactérias (AMARAL *et al.*, 2001). Experimentos conduzidos pelo nosso grupo de pesquisa revelaram que a TR apresenta atividade antimicrobiana *in vitro* contra leveduras de *P. brasiliensis*, causador da PCM, em concentrações micromolares. Além disso, estudos de expressão gênica em larga escala mostraram que esse composto é capaz de induzir uma profunda alteração no

transcriptoma do fungo, modulando a expressão de pelo menos 1800 genes. A avaliação desses genes revelou que a TR inibe a modulação daqueles relacionados a uma via fundamental para a viabilidade do fungo, denominada via de Sinalização da Integridade da Parede Celular (via CWI – Cell Wall Integrity signalling pathway) (FUCHS e MYLONAKIS, 2009), impedindo a produção dos principais polissacarídeos estruturais da parede celular (quitina e glucana). O uso de substâncias organometálicas como agentes biologicamente ativos é bem documentado na literatura. Estudos preliminares, realizados com diversos compostos derivados de Telúrio (IV), se mostraram promissores quanto à sua aplicabilidade como agentes terapêuticos, uma vez que apresentam propriedades biológicas extremamente interessantes, agindo, por exemplo, como imunomoduladores (SREDNI *et al.*, 1987), inibidores seletivos de cisteíno-proteases (ALBECK *et al.*, 1998) e potencializadores da ação de alguns quimioterápicos, como o Taxol (SREDNI *et al.*, 1990). Além disso, verificou-se que algumas organoteluranas apresentam atividades antimicrobianas contra microorganismos responsáveis por diversas doenças em seres humanos, como leishmaniose, malária, doença de Chagas e poliovirose (VIEIRA *et al.*, 2011; EL CHAMY MALUF *et al.*, 2016). Nesse sentido, sabe-se que tanto a Tioridazina quanto as teluranas possuem atividades antimicrobianas tanto *in vitro* como *in vivo* contra uma variedade de microrganismos patogênicos.

## OBJETIVOS

O objetivo do projeto foi determinar a sensibilidade *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* H99 frente à Tioridazina (TR) e às Teluranas RF-07, RF-28 e GDS-05, a partir da avaliação de densidade ótica e ensaios para determinação da concentração inibitória mínima (MIC). Além disso, o projeto visava verificar se a TR afeta a parede celular por meio do tratamento das células fúngicas com o fluoróforo Calcofluor White (CFW), além de analisar, através de ensaios de qPCR, os níveis de expressão dos genes relacionados a via CWI, além daqueles relacionados a biossíntese de quitina e glucanas em leveduras de *C. neoformans* var. *grubii* H99 tratadas com TR.

## METODOLOGIA

O cultivo *Cryptococcus neoformans* foi realizado em aproximadamente 50 mL de YDP Modificado líquido com uma alçada a partir de um cultivado em meio YPD sólido e mantido em um agitador orbital (120 rpm) a 35°C, durante 12 horas. Após isso, leu-se a D.O.<sub>600</sub> e ajustou-se a densidade ótica para 0,6, realizando leituras de D.O.<sub>600</sub> a cada hora. Essas culturas foram submetidas ao crescimento em meio líquido contendo Tioridazina, TR, na concentrações entre 10 µM a 75 µM, além das teluranas RF-07, RF-28 e GDS-0, nas concentrações entre 15 µM a 60 µM. Para os experimentos de determinação da concentração inibitória mínima (MIC), foram seguidas as recomendações padronizadas pelo documento M27-A2 (2002) do NCCLS. As concentrações utilizadas foram entre 120 µM a 0,234 µM. Após 72h de incubação a 35°C, foi realizada leitura em espectrofotômetro de placa (Synergy H1 Multi-Mode Reader, Biotek) a D.O.<sub>530</sub>. Para a análise de conteúdo de quitina, leveduras de *C. neoformans* var. *grubii* H99 (D.O.<sub>600</sub> = 0,6) foram cultivadas sob as mesmas condições descritas acima na presença de 30µM e 50 µM de TR. Em seguida, as células tratadas conforme recomendado por Rolli e colaboradores (2009), coradas com 2 µg/mL de Calcofluor White (CFW) (Sigma-Aldrich) durante 5 min, a 36 °C e a emissão de fluorescência foi então quantificada em espectrofluorímetro Hitachi F-4500 (Hitachi High Technologies Co.), utilizando 360/440 nm emissão/excitação, respectivamente. As amostras foram também centrifugadas e congeladas em nitrogênio líquido e

encaminhadas para extração de RNA total, utilizando o Mini Kit RNeasy da QIAGEN®. O cDNA foi sintetizado segundo recomendação do fabricante: Superscript II RT (200 U/μL – Invitrogen). O cDNA foi purificado em Microcon YM-30 (Millipore). Cada qPCR foi realizada em triplicata, sendo constituída de: 100 ng de cada cDNA, 100 nM de cada primer (Forward e Reverse) e 10 μL de SYBR Green PCR Master Mix 2x® (Applied Biosystems). O gene que codifica a actina foi utilizado como normalizador. As amplificações foram realizadas em aparelho ABI Prism® 7500 Real time PCR System (Applied Biosystems®), nas condições indicadas pelo fabricante.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na presença de TR, leveduras de *C. neoformans* var. *grubii* H99 se mostraram sensíveis e tiveram seu crescimento comprometido na presença da droga, com total inibição do crescimento com 30,52 μg/mL (75 μM). Dados semelhantes foram observados em leveduras de *P. brasiliensis* tratadas com 20,35 μg/mL (50 μM) de TR. A MIC ficou em torno de 24,42 μg/mL (60 μM). Resultados com *P. brasiliensis* revelaram MIC aproximadamente 6,5 vezes menor (3,76 μg/mL - 9,23 μM). Os dados aqui apresentados, obtidos por duas metodologias distintas, são promissores no que diz respeito ao possível uso da droga para o tratamento da criptococose, uma vez que o fungo teve seu crescimento reprimido em concentrações micromolares. A análise sobre o conteúdo de quitina na parede celular *C. neoformans* var. *grubii* H99 tratadas com TR nas concentrações de 30 μM e 50 μM (concentrações não letais) foram realizados para verificar se a TR apresenta efeito semelhante ao observado sobre leveduras de *P. brasiliensis*. Como resultado, não foi observada diminuição do teor de quitina de forma dose-dependente pelo tratamento com CFW, sendo necessário uma abordagem alternativa para quantificar o teor de quitina em leveduras de *C. neoformans*. Os dados referentes aos experimentos de expressão gênica foram conduzidos de maneira a verificar se a TR poderia agir de forma semelhante ao verificado em *P. brasiliensis*, tratado com TR, inibindo os principais genes responsáveis pela ativação da via CWI, além da síntese de quitina, α-glucana e β-glucana de maneira dose-dependente. Nossos dados revelaram sub-regulação de ~7x na concentração de 30 μM e de ~ 10x com doses de 50 μM de TR para a modulação do gene quitina sintase 6. No entanto, os demais genes (WSC, Rho 1, α e β glucana sintase) não apresentaram padrão semelhante, pois a modulação foi sutil (variando 1 ou 2x em relação ao controle). Dessa forma, os dados aqui gerados sugerem um enfraquecimento da parede pela droga por inibição da produção de quitina, uma vez que o fungo está apresentando o crescimento afetado na presença da droga e doses de 50 μM foram capazes de sub-regular em 10 x o perfil de expressão do gene. Porém, ainda não foi possível verificar se a via CWI está envolvida nesse processo. Os ensaios realizados com as teluranas RF-07, RF-28 e GDS-05 em curvas de crescimento nas concentrações de 15 μM, 30 μM e 60 μM mostraram efeitos variados para cada composto. Para a RF-07, a concentração letal foi de 60 μM. Efeito semelhante foi observado para a RF-28. Surpreendentemente, a GDS-05 não apresentou efeito sobre as células de *C. neoformans* var. *grubii* H99 mesmo na maior concentração testada (60 μM). Nos experimentos de concentração inibitória mínima, foi possível determinar a MIC para RF-07 de 1,612 μg/mL (3,75 μM). Os valores são 2,5 vezes menores do que os que foram verificados em *P. brasiliensis* (4,3 μg/mL = 10 μM) pelo nosso grupo de pesquisa. Não foi possível determinar a MIC para a RF-28 e GDS-05, uma vez que houve crescimento mesmo na maior dose testada (~ 50 μg/mL, 120 μM).

## CONCLUSÕES

Os estudos realizados com *C. neoformans* var. *grubii* H99 exposto a TR, tanto em ensaios por meio de curvas de crescimento [75  $\mu$ M (30,52  $\mu$ g/mL)], quanto em ensaios de MIC [60  $\mu$ M (24,42  $\mu$ g/mL)], demonstraram a inibição de seu crescimento, como verificado em *Paracoccidioides brasiliensis* [50  $\mu$ M (20,35  $\mu$ g/mL) em curva de crescimento e MIC [9,23  $\mu$ M (3,76  $\mu$ g/mL)]. Os estudos realizados com *C. neoformans* var. *grubii* H99 expostos as teluranas revelaram que RF-28 e GDS-05 não foram capazes de afetar o crescimento do fungo em MIC, mas para RF-28 houve uma diminuição sutil em curva de crescimento, o mesmo também não pode ser visto para GDS-05. Já para a RF-07, houve um valor de inibição de 60  $\mu$ M (25,79  $\mu$ g/mL) em curva de crescimento; e para a MIC de 3,75  $\mu$ M (1,612  $\mu$ g/mL), A análise do teor de quitina através do CFW não revelou variação no teor de quitina nas condições testadas. No entanto, os dados de análise de expressão gênica por qPCR revelaram que o gene quitina sintase 6 se encontra sub-regulação  $\sim 7x$  para a concentração de 30  $\mu$ M e de  $\sim 10x$  para de 50  $\mu$ M em relação ao controle. A variação de expressão gênica para os principais genes responsáveis pela ativação da via CWI e biossíntese de quitina e glucanas foi muito sutil. Dessa maneira, os dados coletados até o momento indicam que a presença da TR pode inibir a produção de quitina, importante componente da parede celular de *C. neoformans* e essencial para a manutenção das suas células. Porém, os dados ainda são inconclusivos quanto a participação da via CWI nesse processo, bem como aqueles responsivos à via, como glucanas ( $\alpha$  e  $\beta$ ). Experimentos adicionais serão realizados de maneira a esclarecer o mecanismo pelo qual a TR afeta o crescimento de *C. neoformans*. Os dados obtidos com a RF-07 e TR são promissores, uma vez que os valores de MIC e curvas de crescimento parecem ser compatíveis com um possível tratamento para a criptococose (doses micromolares).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBECK, A.; WEITMAN, H.; SREDNI, B.; ALBECK, M. Tellurium Compounds: Selective Inhibition of Cysteine Proteases and Model Reaction with Thiols. **Inorg. Chem.** v.37, 1704-1712, 1998.
- AMARAL, L.; KRISTIANSEN, J. E.; VIVEIROS, M.; ATOUGUIA, J. Activity of phenothiazines against antibiotic-resistant Mycobacterium tuberculosis: a review supporting further studies that may elucidate the potential use of thioridazine as antituberculosis therapy. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 47, p. 505-511, 2001
- EL CHAMY MALUF, S.; MELO, P. M.; VAROTTI, F. P.; GAZARNI, M. L.; CUNHA, R. L.; CARMONA, A. K. Hypervalent organotellurium compounds as inhibitors of *P. falciparum* calcium-dependent cysteine proteases. **Parasitol. Int.**, v. 65, n. 1, p. 20-22, 2016.
- FUCHS, B. B.; MYLONAKIS, E. Our paths might cross: the role of the fungal cell wall integrity pathway in stress response and cross talk with other stress response pathways. **Eukaryot. Cell**, v. 8, n. 11, p. 1616-25, 2009.
- NCCLS. Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica das Leveduras; Norma Aprovada. 2ª ed. Norma M27-A2 do NCCLS. **NCCLS**, v.22, n 15, Pennsylvania, Estados Unidos, 2002.
- PENILDON, S. **Farmacologia**. 8ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.

ROLLI, E.; RAGNI, E.; CALDERON, J.; PORELLO, S.; FASCIO, U.; POPOLO, L. Immobilization of the Glycosylphosphatidylinositol-anchored Gas1 Protein into the chitin ring and septum is required for proper morphogenesis in yeast. **Molecular Biology of the Cell**, v. 20, p. 4856-4870, 2009.

RSBMT - REVISTA DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MEDICINA TROPICAL. **Consenso em Criptococose**. 41 (5): 524-544, SET-OUT/2008.

SOUZA, L. K. H.; FERNANDES, O. F. L.; KOBAYASHI, C. C. B.; PASSOS, X. S.; COSTA, C. R.; LEMOS, J. A.; SOUZA-JÚNIOR, A. H.; SILVA, M. R. R. Antifungal susceptibility of clinical and environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* in Goiânia city, Goiás, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**. 47 (5): 253-256, September-October, 2005

SREDNI, B.; CASPI, R.; KLEIN, A.; KALECHMAN, Y.; DANZIGER, Y.; BENYA'AKOV, M.; TAMARI, T.; SHALIT, F.; ALBECK, M. A new immunomodulating compound (AS-101) with potential therapeutic application. **Nature**, v. 330, n. 6144, p. 173-176, 1987.

SREDNI, B.; KALECHMAN, Y.; SHALIT, F.; ALBECK, M. Synergism between AS101 and PMA in lymphokine production. **Immunology**, v. 69, p. 110-116, 1990.

VIEIRA, C. S.; ALMEIDA, D. B.; DE THOMAZ, A. A.; MENNA-BARRETO, R. F.; DOS SANTOS-MALLET, J. R.; CESAR, C. L.; GOMES, S. A.; FEDER, D. Studying nanotoxic effects of CdTe quantum dots in *Trypanosoma cruzi*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.106, p. 158-165, 2011.

#### **AGRADECIMENTOS**

**AO CNPQ PELA BOLSA DE ESTUDO, À FAPESP PELO APOIO FINANCEIRO NO DESENVOLVIMENTO DO PROJETO, A FAEP E A UMC PELA OPORTUNIDADE DA REALIZAÇÃO DO TRABALHO, E AOS AMIGOS, COLEGAS E PROFESSORES PELO INCENTIVO E PELO APRENDIZADO.**