

DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DE DIFERENTES AGENTES ANTIMICROBIANOS CONTRA LEVEDURAS DE *Paracoccidioides brasiliensis*

David Aciole Barbosa¹; Daniela Leite Jabes²; Luiz R. Nunes³

Estudante do Curso de Ciências Biológicas; aciole.d@gmail.com¹

Professora da Universidade de Mogi das Cruzes; danielajabes@umc.br²

Professor da Universidade de Mogi das Cruzes; nunes1212@gmail.com³

Área do Conhecimento: Genética Molecular de Microrganismos

Palavras-chave: *Paracoccidioides brasiliensis*; MIC; Tioridazina; Itraconazol; Teluranas

INTRODUÇÃO

O fungo *Paracoccidioides brasiliensis* é dimórfico e o causador de uma micose sistêmica crônica, a paracoccidioidomicose (PCM), doença que se dá por inalação de propágulos fúngicos. Do total de casos informados no mundo, 80% são do Brasil, onde a PCM está em primeiro lugar em fatalidades por micoses sistêmicas e na oitava posição dentre as doenças predominantemente crônicas, considerando males infecciosos e parasitários. O índice de mortes pela PCM pode variar de 2% a 23% nas regiões de endemismo, podendo alcançar 30% quando a AIDS está associada à micose (COUTINHO *et al.*, 2002). Para o tratamento da PCM em humanos estão incluídas as sulfonamidas (sulfametoxazol-trimetoprim), os derivados imidazólicos (itraconazol, cetoconazol, fluconazol) e os polienos (anfotericina B). De acordo com a necessidade e com a evolução clínica de cada paciente, essas drogas são ministradas isoladamente ou então associadas (VISBAL *et al.*, 2005). O período de terapia suficiente para atingir a cura é sempre longo e está diretamente relacionado aos sérios transtornos dos efeitos colaterais que apresentam os pacientes, como lesões em rins e fígado, devido ao alto poder nefro e hepatóxico destas drogas, independentemente das suas classes farmacológicas (SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 2006). A resistência dos fungos a drogas é uma barreira que impede de forma acentuada o sucesso do tratamento farmacológico tradicional no combate às micoses sistêmicas e incentiva a investigação da atividade antimicrobiana de diferentes compostos, em especial quando estes compostos agem de maneira distinta dos antifúngicos convencionais (VITALE *et al.*, 2007). Nesse sentido, o projeto aqui proposto destinou-se a realizar a metodologia de microdiluição em caldo para determinar as Concentrações Inibitórias Mínimas (CIMS ou MICs) de novos compostos bioativos sobre leveduras do *P. brasiliensis*. Foram estudados, inicialmente, quatro compostos: RF-27, RF-28 e GDS-05 pertencentes à categoria das Teluranas e Tioridazina (TR), pertencente à categoria das Fenotiazinas. Além disso, experimentos foram destinados também a estudar possíveis efeitos sinérgicos entre Itraconazol e Nicomicina em combinação com as novas drogas citadas anteriormente.

OBJETIVOS

O objetivo do projeto aqui apresentado é determinar a sensibilidade de *Paracoccidioides brasiliensis*, isolado 18, frente às teluranas RF-27, RF-28 e GDS-05 e à Tioridazina, a partir de ensaios para determinação da concentração inibitória mínima, conforme metodologia descrita no documento M27-A2 (2002) - *Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para Determinação da Sensibilidade de Leveduras à*

Terapia Antifúngica: Norma aprovada - do NCCLS (NCCLS, 2002). Além disso, pretende-se verificar se ocorre sinergismo entre estas drogas e antifúngicos conhecidos, a saber, Itraconazol e Nicomicina.

METODOLOGIA

Microplacas de 96 poços de fundo em “U” foram incubadas a 36°C, adicionando 100 µL de inóculo de microorganismo e 100 µL das diluições dos agentes antifúngicos em cada poço. Uma coluna de poços foi utilizada como controle de crescimento, adicionando 100 µL do inóculo a 100 µL do meio de cultura, e outro como controle de esterilidade do meio de cultura, adicionando-se apenas 200 µL do meio de cultura RPMI-1640 com 2% de glicose. Foram produzidas séries de soluções de uso com dez diluições 1:2 de cada droga utilizada; teluranas RF-07, RF-28 e GDS-05 e para tioridazina. As soluções foram feitas partindo de soluções estoque de concentração 100 X maior que a maior concentração final de droga na placa de microdiluição, no caso de drogas dissolvidas em DMSO (dimetilsulfóxido); para drogas solúveis em água, as soluções estoque foram preparadas 10 X concentradas em relação à concentração final. Visando a confiabilidade nos resultados, foi utilizado Itraconazol, cujas MICs já foram descritas para *P. brasiliensis*. Esta droga foi também submetida a testes em combinação com Tioridazina. A solução padrão de pré-inóculo foi produzida coletando 5 colônias isoladas de aproximadamente 5 mm do pré-inóculo de Pb18 e suspendendo-as em 5 mL de solução salina 0,145 M (0,85% NaCl). A densidade da suspensão foi ajustada em espectrofotômetro (Ultrospec 2100 Pro, Amersham Biosciences) adicionando solução salina (quando necessário) até obter transmitância equivalente ao de uma solução padrão de turbidez de sulfato de bário McFarland 0,5 (0,5 mL de BaCl₂ 0,048 M, 99,5 mL de H₂SO₄ 0,18 M); a 530 nm, a transmitância deve equivaler a 0,08 a 0,10, o que corresponde a 1x10⁶ a 5x10⁶ células por mL. Em seguida, foi produzida solução de uso diluindo a 1:50 a suspensão padrão obtida na D.O.₅₃₀ adequada, seguida de diluição 1:20 em meio RPMI-1640 2% glicose para se obter inóculo 2X concentrado, que é diluído 1:1 quando somado a droga diluída em meio de cultura na placa, resultando em 0,5x10³ a 2,5x10³ células por mL. As microplacas foram incubadas por 48 horas e após isso adicionou-se 20 µL do corante de viabilidade celular *Alamar Blue* (DAL 1100, Life Technologies®), como descrito por Paula e Silva e colaboradores (2013). Esta modificação auxilia a leitura dos pontos finais de MIC, pois o corante é composto por resazurina, com coloração azul não fluorescente, que é reduzido a resorufina, adquirindo cor vermelho fluorescente ao adentrar células viáveis. O tempo total de incubação, a 36°C, foi de 15 dias (CRUZ *et al.*, 2012).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A sensibilidade *in vitro* do isolado 18 de *Paracoccidioides brasiliensis* foi verificada através de experimentos de MICs para a telurana RF-07, RF-28 e GDS-05, e para o composto fenotiazínico tioridazina (TR). Testes também foram realizados para os antifúngicos itraconazol (ITRA) e nicomicina Z (NICO). A média da MIC para o itraconazol foi 0,24 µg/mL, o que está dentro dos intervalos de MIC encontrados na literatura para esta droga na literatura, a saber, 0,0009 a 1 µg/ml para o gênero *Paracoccidioides* (HAHN e HAMDAN, 2000). Para Tioridazina, a média de MIC foi de 6,25 µg/mL (15,3 µM). Testes baseados em curva de crescimento feitos em nosso laboratório mostraram que valores próximos (4 µg/mL=10 µM) inibiram acentuadamente o crescimento de Pb18, estabelecendo uma concordância entre estas metodologias distintas. Além disso, a MIC está abaixo da concentração plasmática tóxica (0,3 a 7 µM), viabilizando o possível uso clínico também para a PCM (WINEK

et al., 2001). Nicomicina Z não inibiu o crescimento do Pb18 mesmo na maior concentração usada, 64 µg/mL, assim como para outros fungos patogênicos, embora não haja dados de MIC para nicomicina Z sobre *P. brasiliensis*. Cabe destacar que nicomicina Z tem MIC menor quando combinada a outros antifúngicos, inclusive aqueles usados no tratamento clássico da PCM. (GANESAN *et al.*, 2004). Portanto novos testes de combinação com nicomicina sobre *Paracoccidioides brasiliensis* serão conduzidos. A MIC da telurana RF-28 foi 7,23 µg/mL (20 µM), não há MIC de Pb18 na literatura com esse composto. Comparamos nossos resultados com a curva de crescimento realizada e descrita em um trabalho de mestrado recente desenvolvido em nosso laboratório. Esses dados também apontam valores em torno de 20 µM como sendo a dose letal para esse composto, o que demonstra coincidência entre as duas técnicas distintas. A telurana RF-07 teve MIC de 4,3 µg/mL (10 µM). Também não há MIC desta droga, mas segundo um estudo recente do nosso laboratório, 2,13 µg/mL (5 µM) da droga causou diminuição no crescimento de Pb18 em experimentos de curva de crescimento. Dessa forma, a realização de novos experimentos será importante para complementar os dados até agora obtidos acerca da sensibilidade de *Paracoccidioides brasiliensis* a este composto. A GDS-05 não causou inibição visível de crescimento do Pb18 nas concentrações testadas. No entanto, trabalhos recentes em nosso laboratório com metodologia diferente (curvas de crescimento) mostraram queda do crescimento de maneira dose-dependente para as concentrações de 0,92 µg/mL (2 µM), 2,3 µg/mL (5 µM), 6,7 µg/mL (15 µM) e 9,2 µg/mL (20 µM) da droga. Portanto, novos experimentos serão conduzidos visando maior compreensão das atividades da GDS-05. Em conjunto, os dados aqui apresentados caracterizam informações novas para drogas como no caso das teluranas, como também destacam o potencial que poderá existir na interação entre TR e itraconazol, uma droga usada com frequência contra PCM em humanos.

CONCLUSÕES

Determinamos a MIC para as drogas testadas a partir da média entre os resultados ao longo dos ensaios: tioridazina: 6,25 µg/mL (15,6 µM); RF-28: 7,23 µg/mL (20 µM). RF-07: 4,3 µg/mL (10 µM); itraconazol+1,17 µg/mL (2,5 µM) de TR: 0,062 µg/mL; itraconazol+2,35 µg/mL (5 µM) de TR: 0,17 µg/mL. A MIC de itraconazol, usado como controle, estava dentro do esperado, 0,24 µg/mL. Para nicomicina Z e GDS-05 não foi possível determinar MIC com as modificações aqui usadas. Nesse sentido, novos testes e possíveis adaptações deverão ser realizados no futuro para determinar a MIC desses compostos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- COUTINHO, Z. F.; SILVA, D.; LAZÉRA, M.; PETRI, PETRI, V.; OLIVEIRA, R. M.; SABROZA, P. C.; WANKE, B. Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980-1995), *Cad Saúde Pública*, v. 18, n. 5, p. 1441-1454, 2002.
- CRUZ, R. C.; WERNECK, S. M. C.; OLIVEIRA, C. S.; SANTOS, P. C.; SOARES, B. M.; SANTOS, D. A.; CISALPINO, P. S. Influence of different media, incubation times, and temperatures for determining the MICs of seven antifungal agents against *Paracoccidioides brasiliensis* by microdilution. *J Clin Microbiol*, v. 51, n. 2, p. 436-443, 2013.
- GANESAN, L.T.; MANAVATHU, E.K.; CUTRIGHT, J.L.; ALANGADEN G.J.; CHANDRASEKAR, P.H. *In-vitro* activity of nikkomycin Z alone and in combination

with polyenes, triazoles or echinocandins against *Aspergillus fumigatus*. **Clin Microbiol Infect**, v. 10, n. 11, 2004.

HAHN, R. C.; HAMDAN, J. S. *In vitro* susceptibilities of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast form to antifungal drugs. **Mycoses**, v. 43, n. 11-12, p. 403-407, 2000.

NCCLS. Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica das Leveduras; Norma Aprovada. 2 ed. Norma M27-A2 do NCCLS. **NCCLS**, v.22, n 15, Pennsylvania, Estados Unidos, 2002.

PAULA E SILVA, A. D.; OLIVEIRA, H. C.; SILVA, J. F.; SANGALLI-LEITE, F.; SCORZONI, L.; FUSCO-ALMEIDA, A. M.; MENDES-GIANNINI, M. J. S. Microplate alamarblue assay for *Paracoccidioides* susceptibility testing. **J Clin Microbiol**, v. 51, n. 4, p. 1250-1252, 2013.

SHIKANAI-YASUDA, M. A.; TELLES FILHO, F. Q.; MENDES, R. P.; COLOMBO, A. L.; MORETTI, M. L. Consenso em paracoccidioidomicose. **Rev Soc Bras Méd Trop**, v. 39, n. 3, p. 297-310, 2006.

VISBAL, G.; SAN-BLAS, G.; MURGICH, J.; FRANCO, H. *Paracoccidioides brasiliensis*, paracoccidioidomycosis, and antifungal antibiotics, **Curr Drug Targets Infect Disord**, v. 5, n. 3, p. 211-226, 2005.

VITALE, R. G.; AFELTRA, J.; MEIS, J. F. G.; VERWEIJ, P. E. Activity and post antifungal effect of chlorpromazine and trifluoperazine against *Aspergillus*, *Scedosporium* and zygomycetes, **Mycoses**, v. 50, p. 270-276, 2007.

WINEK, C. L.; WAHBA, W. W.; WINEK, C. L. Jr. BALZER, T. W. Drug and chemical blood-level data. **Forensic Sci Int**, v. 122, n. 2, p. 107-23, 2001.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq pelas bolsas 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.