



AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA IN VITRO E IN VIVO DE COMPOSTOS SELECIONADOS POR VARREDURA VIRTUAL CONTRA O ALVO TIOREDOXINA REDUTASE DE CANDIDA

Amanda Sayuri Moreira Watanabe (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Daniella Renata Faria (PBF/UEM), Terezinha I. E. Svidzinski (Co-orientador), Érika Seki Kioshima Cotica (Orientador)
e-mail:sayuri.amw@gmail.com

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências Biológicas e da Saúde/Maringá, PR

Microbiologia / Micologia

Palavras-chave: *Candida albicans*, resistência antifúngica, *small molecules*.

Resumo:

As infecções fúngicas invasivas (IFIs) têm emergido como problema de saúde pública em todo o mundo, uma vez que aumenta a morbidade e mortalidade. Entre os fungos envolvidos nas IHF destacam-se as espécies de *Candida*, sendo a *Candida albicans* a espécie ainda mais prevalente. Devido as poucas opções terapêuticas e o surgimento de resistência aos antifúngicos utilizados na prática clínica, a busca por terapias alternativas e/ou desenvolvimento de novas drogas mais específicas tem se tornado imperiosa. Os avanços nas técnicas computacionais tem habilitado métodos *in silico* que permitem a rápida varredura virtual de grandes bibliotecas de *small molecules* que podem ser compradas e/ou sintetizadas, e avaliadas experimentalmente, acelerando a identificação e otimização destas possíveis novas drogas.

Introdução

A incidência de infecções hospitalares por fungos (IHF) tem aumentado nas últimas décadas e representam um grave problema de saúde pública resultando alta morbidade e mortalidade. Entre os fungos envolvidos nas IHF destacam-se as espécies de *Candida*, sendo *Candida albicans* a espécie





mais prevalente (DOI AM et al., 2016). Devido as poucas opções terapêuticas e o surgimento de resistência aos antifúngicos utilizados na prática clínica (CANTÓN E et al., 2011), a busca por terapias alternativas e/ou desenvolvimento de novas drogas mais específicas tem se tornado imperiosa. Os avanços nas técnicas computacionais tem habilitado métodos *in silico* que permitem a rápida varredura virtual de grandes bibliotecas de *small molecules* que podem ser compradas e/ou sintetizadas, e avaliadas experimentalmente, acelerando a identificação e otimização destas possíveis novas drogas (KAIRYS V et al., 2006). Por meio de varredura virtual, foram selecionados previamente no laboratório de Micologia Médica, dois compostos (LMM5 e LMM11) que interagem possivelmente bloqueando a tioredoxina redutase (TRR1) de *C. albicans*. Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo principal avaliar a atividade antifúngica *in vitro* e *in vivo* de dois compostos selecionados por varredura virtual.

Materiais e métodos

A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada para LMM5 e LMM11 pelo método de microdiluição em caldo, seguindo o *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2008), documento M-27A3, com modificações para os novos compostos. LMM5 e LMM11 foram diluídos em RPMI-1640 (Gibco®) com concentrações variando de 512 a 0.5 µg/mL e leitura após 48 horas de incubação à 35°C. Adicionalmente, foi realizado a concentração fungicida mínima (CFM), no qual alíquotas do teste de microdiluição foram transferidas para uma placa de SDA e incubadas à 37°C, 24h. Para os ensaios *in vivo* utilizando o modelo experimental de Candidíase Sistêmica foram utilizados camundongos fêmeas (Balb/c) que foram infectados pela via endovenosa (E.V) com *C. albicans* (5×10^5 leveduras). Após 3 horas da infecção, os animais foram separados em 4 grupos (LMM5, LMM11, fluconazol e controle - PBS) e tratados com 5mgkg^{-1} dos compostos acima mencionados, 2x/dia por 5 dias, via intraperitoneal. Ao final do período de tratamento, os animais foram eutanasiados e os órgãos (rim e baço) recolhidos para determinação da carga fúngica (UFC/g de tecido).

Resultados e Discussão

Os resultados do teste de susceptibilidade *in vitro* aos compostos selecionados são mostrados na Figura 1, na qual é possível observar que maioria dos isolados clínicos testados, tiveram valores de CIM variando





entre 32 a 64 $\mu\text{g/mL}$ para ambas *small molecules*. Os resultados demonstram ainda que, a CIM para LMM11 variou menos (32 a 64 $\mu\text{g/mL}$) e foi mais efetiva em concentrações menores quando comparado a LMM5 (4 a >128 $\mu\text{g/mL}$). Os resultados de CFM mostraram uma redução significativa da viabilidade das células fúngica em relação ao controle positivo. A CFM para LMM5 foi de 32 $\mu\text{g/mL}$ (12,5%), 64 $\mu\text{g/mL}$ (18,75%), 128 $\mu\text{g/mL}$ (37,5%) e > 128 $\mu\text{g/mL}$ (31,25%) para os isolados clínicos. Já para LMM11, a CFM foi de 32 $\mu\text{g/mL}$ (6,25%), 64 $\mu\text{g/mL}$ (87,5%) e 128 $\mu\text{g/mL}$ (6,25%). Estes resultados sugerem que os compostos LMM5 e LMM11 apresentam perfil fungistático. A figura 2 apresenta os resultados *in vivo* que apontam que os dois compostos selecionados apresentaram redução significativa da carga fúngica (UFC) nos órgãos alvos - rins e baço ($p < 0,05$). O composto LMM11 apresentou um melhor desempenho no qual apontou uma maior capacidade em reduzir a UFC em relação à LMM5.

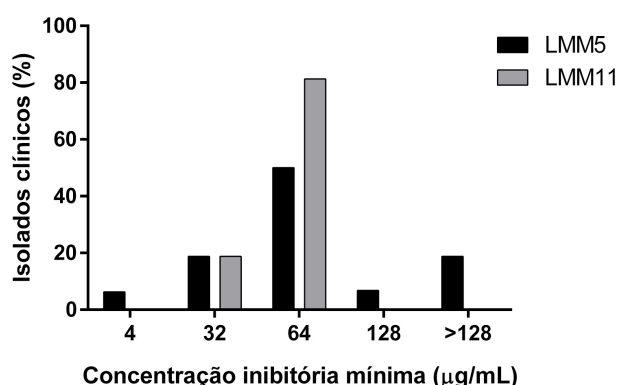


Figura 1 - Frequência dos isolados clínicos de *Candida albicans* referente às Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) encontradas para as *small molecules* LMM5 e LMM11. As CIM variaram de 4 a >128 $\mu\text{g/mL}$ para LMM5 e de 32 a 64 $\mu\text{g/mL}$ para LMM11.

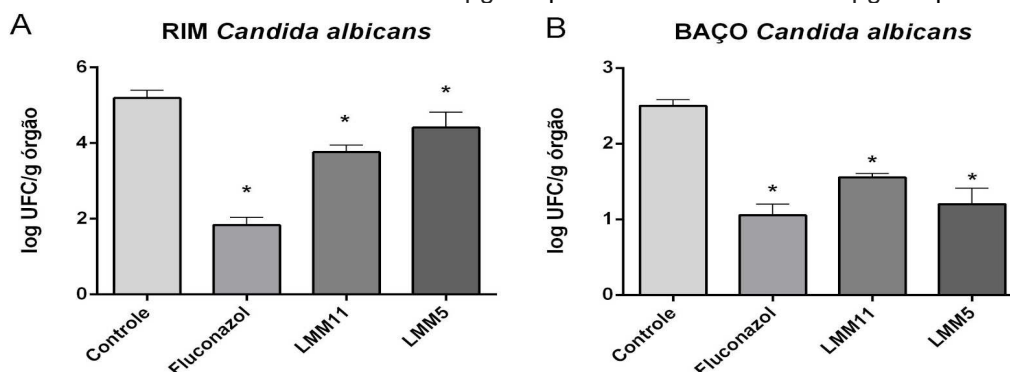




Figura 2 – Representação da carga fúngica (Log₁₀ CFU/g órgão) dos grupos LMM11, LMM5, fluconazol e controle nos órgãos alvo rim (A) e baço (B).

Conclusões

Com aumento da resistência às drogas antifúngicas convencionais, é relevante a possibilidade de novas moléculas poderem atuar no contexto das infecções fúngicas causadas por *C. albicans*. Nesse sentido, LMM11 e LMM5 mostraram ação promissora, com importante redução do crescimento fúngico *in vitro* e *in vivo*.

Agradecimentos

Agradeço ao CNPq, Fundação Araucária, UEM e professoras por possibilitarem a realização deste projeto.

Referências

CANTÓN E; et al. **Prospective multicenter study of the epidemiology, molecular identification, and antifungal susceptibility of *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* isolated from patients with candidemia.** Antimicrob Agents Chemother, v. 55, n. 12, p. 5590-6, dec, 2011.

DOI AM; et al. **Epidemiology and Microbiologic Characterization of Nosocomial Candidemia from a Brazilian National Surveillance Program.** PLoS Onev, v. 11, n. 1, jan, 2016.

KAIRYS V; FERNANDES MX; GILSON MK. **Screening drug-like compounds by docking to homology models: a systematic study.** J Chem Inf Model, v. 46, n. 1, p. 365-79, jan/feb, 2006.

WAYNE, PA. **Reference Method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast.** Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), v. 3, n. 28, 2008.

