TIOREDOXINA REDUTASE COMO ALVO PARA SELEÇÃO DE COMPOSTOS COM ATIVIDADE ANTIFÚNGICA CONTRA OS AGENTES DAS DERMATOMICOSE

Lenisa Vieira Vilegas (PIBIC/CNPq/FA/Uem), Érika Seki Kioshima Cotica (Orientador), e-mail: lenisavilegas@hotmail.com.

Universidade Estadual de Maringá / Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina/ Maringá, PR.

Microbiologia - Micologia

Palavras-chave: dermatófitos, suscetibilidade à antifúngicos, tioredoxina redutase

Resumo:

As dermatomicoses tem afetado cerca de 20% da população mundial. Embora não representem risco de morte, são consideradas problemas de saúde pública, pois afetam a qualidade de vida dos indivíduos. Desta forma o presente trabalho teve como objetivo principal avaliar o perfil de susceptibilidade frente a um novo composto selecionado métodos *in silico*, de fungos isolados de pacientes atendidos no Laboratório de Ensino e Pesquisa em Análises Clínicas (LEPAC), Setor Micologia Clínica da Universidade Estadual de Maringá (UEM). Estes fungos apresentam-se conservados em Micoteca e após a reativação foram realizados os ensaios de suscetibilidade *in vitro* frente aos agentes antifúngicos: Fluconazol, Terbinafina, Itraconazol e ao composto Mol11, conforme o documento CLSI M38-A2 e a concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada visualmente. A CIM das 37 amostras avaliadas variou de ≤0,125 a ≥64 µg/ml para o fluconazol (*T. rubrum* ≤0,125 a ≥64 µg/ml; *T. mentagrophytes* ≤0,125 a ≥64 µg/ml; *Trichophyton verrucosum* 2µg/ml; *M. canis ≤0,125* e 32). Para o Itraconazol a variação foi de: 0,125 a 16 µg/ml (*T. rubrum* 0,125 a 16 µg/ml; *T. mentagrophytes* ≤0,0625 a 16 µg/ml; *Trichophyton verrucosum* 0,25µg/ml; *M. canis* ≤0,125 e 32). Para o novo composto apenas dois isolados apresentaram, sendo que destas o *M. canis* apresentou maior suscetibilidade do que a amostra de *T. mentagrophytes.* Desta forma, embora este composto apresente resultados promissores para as leveduras para fungos filamentosos ainda são necessárias otimização para o desenvolvimento de um antifúngico de amplo espectro.

Introdução

Dentre as dermatomicoses, a onicomicose tem merecido destaque uma vez que sua prevalência mundial é estimada em 2-8% e representa 50% das patologias que acometem as unhas. É importante ressaltar que embora não representem risco de morte, são consideradas problemas de saúde pública, pois algumas delas são altamente contagiosas e principalmente, afetam a qualidade de vida dos indivíduos. Adicionalmente, tem se observado grande limitação para tratamento desta dermatomicose, devido à baixa biodisponibilidade dos antifúngicos na unha, da qual depende o sucesso deste tratamento. Além disso, o longo tratamento acaba por desencorajar os pacientes (Gupta et al. 2010). Além disso, os antifúngicos atualmente disponíveis apresentam uma gama de efeitos adversos, que podem levar os pacientes a interromper o tratamento devido às condições de comorbidade que geralmente estão associadas às onicomicoses (Carrillo et al., 2010).

Dentre os agentes antifúngicos disponíveis para o tratamento das dermatomicoses estão as alilamina, triazóis, imidazóis e griseofulvina. A escolha do tratamento tópico ou sistêmico deve ser norteada pela extensão e o local da infecção, pelo agente etiológico e pelas condições do paciente que receberá o tratamento. Desta forma, a busca por terapias alternativas e/ou desenvolvimento antifúngicos mais específicos tem se tornado cada vez mais imperiosa. Metodologias *in silico* têm contribuído com processo de desenvolvimento de fármacos utilizando como alvo, preferencialmente, enzimas que fazem parte apenas de rotas metabólicas dos patógenos, o que as confere a propriedade de toxicidade seletiva. Recentemente em nosso laboratório, por meio de análises *in silico* foram selecionados dois compostos que interagem com a tioredoxina reductase de diversos fungos patogênicos e que apresentaram atividade antifúngica contra importantes fungos causadores de infecções sistêmicas. Desta forma, considerando os dados de alta prevalência das dermatofitoses em nossa região e a necessidade de novas alternativas terapêuticas, o presente trabalho tem como objetivo principal avaliar o perfil de susceptibilidade dos agentes das dermatomicoses frente a uma das moléculas selecionadas por varredura virtual.

Materiais e métodos

Os fungos da Micoteca do Laboratório de Micologia Médica-LEPAC foram reativados antes dos experimentos, sendo cultivados em ágar batata

dextrose a 25°C, de 10 a 15 dias para obtenção do inóculo que foi preparado em solução salina 0,85% (5 x 10^4 conídios/mL). Em seguida foi realizado os testes de suscetibilidade in vitro aos compostos selecionados, a Terbinafina, o Itraconazol e o Fluconazol determinando *a* concentração inibitória mínima (CIM) para substancia pelo método de microdiluição em caldo, incubadas a 35°C, por 96h e a CIM foi determinada visualmente, seguindo as normas de padronização preconizadas pelo *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2010), publicadas no documento M-27A4, para leveduras e M38 para fungos filamentosos. Já para Mol11 a leitura foi realizada em 24hs, por se tratar de um novo composto, que não conhecemos a estabilidade. Em cada placa serão incluídos controles: negativo, positivo e uma levedura de referência *C. parapsilosis* (ATCC 22019).

Resultados e Discussão

Dentre os pacientes atendidos no LEPAC/UEM, destaca-se uma maior ocorrência de onicomicoses (70,28%), corroborando os estudos epidemiológicos já publicados. Os etiológicos das dermatomicoses mais frequentemente isolados foram *T. rubrum* (50,46%), *T. mentagrohytes* (27,03%), *Microsporum canis* (10,81%) e *Trichophyton verrucosum* (2,70%). Os resultados apresentados na **Tabela 1** aponta o perfil de suscetibilidade frente aos antifúngicos mais utilizados na clínica: Fluconazol, Itraconazol, Terbinafina.

Tabela 1: Perfil de suscetibilidade dos isolados clínicos frente aos antifúngicos e composto selecionado.

	Fluconazol (µg/mL)	**Itraconazol (µg/mL)**	**Terbinafina (µg/mL)**	**Mol 11 (µg/mL)**
TR 13	≥64	16	0,031	≥256
TR32	4	0,25	0,015	≥256
TR37	4	1	0,015	≥256
TM2	0,25	0,50	0,031	≥256
TM4	4	16	0,015	16
TM11	16	1	0,015	≥256
MC5	8	≥32	0,015	128

Considerando que os testes de sensibilidade *in vitro* desempenham um importante papel, não somente na detecção de resistência, mas podem contribuir de maneira efetiva no direcionamento do tratamento e avaliação de potenciais novos antifúngicos. Neste estudo, para as 37 amostras analisadas, a CIM variou de ≤0,125 a ≥64 µg/ml para o fluconazol (*T. rubrum* ≤0,125 a ≥64 µg/ml; *T. mentagrophytes* ≤0,125 a ≥64 µg/ml; *Trichophyton verrucosum* 2µg/ml; *M. canis ≤0,125* e 32). Para o Itraconazol a variação foi de: 0,125 a 16 µg/ml (*T. rubrum* 0,125 a 16 µg/ml; *T. mentagrophytes* ≤0,0625 a 16 µg/ml; *Trichophyton verrucosum* 0,25µg/ml; *M. canis* ≤0,125 e 32). Análises de suscetibilidade frente ao composto mol11, apenas duas amostras apresentaram resposta frente ao composto na leitura de 24 horas, sendo que destas o *T. mentagrophytes* apresentou maior suscetibilidade do que a amostra de *M. canis.*

Conclusões

Embora esta molécula apresente resultados promissores contra diversas leveduras patogênicas, para fungos filamentosos seu perfil de atividade se restringe a alguns isolados clínicos. Desta forma, considerando que este composto é apenas um *hit*, modificações químicas deverão ser realizadas, a fim de otimizar a atividade antifúngica desta molécula com intuito de ampliar o espectro de ação de modo que possam atuar em diversos fungos patogênicos humanos.

Agradecimentos

CNPq, CAPES e Fundação Araucária

Referências

GUPTA, AK, Uro M, Cooper EA. Onychomycosis therapy: past, present, future. J Drugs Dermatol. 2010. 9:1109-13.

CARRILLO MUÑOZ, AJ, TurTur C, Hernandez Molina JM, Santos P, Cardenes D, Giusiano G. Antifúngicos disponibles para el tratamiento de lasmicosisungueales. Rev Iberoam Micol 2010; 27: 49-56

CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). 2010. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. Approved standard. NCCLS document M38-A., Villanova, Pa.