

EFEITO DE LMM6 SOBRE A SÍNTESE DA PAREDE CELULAR DE *PARACOCCIDIOIDES BRASILIENSIS*

Gabriel Uliano Cerci, Caroline Franco Domingues, Gabriel Borges de Moraes,
Isis Regina Grenier Capoci, Érika Seki Kioshima Cotica
eskioshima@gmail.com

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências da Saúde/Maringá, PR.

CIÊNCIAS BIOLÓGICAS III – Microbiologia – Micologia

Palavras-chave: fungos; mecanismo de ação; antifúngicos.

RESUMO

A Paracoccidioidomicose (PCM) é micose endêmica na América Latina e o tratamento disponível tem limitações de toxicidade. O objetivo deste projeto foi avaliar o efeito de LMM6 sobre componentes de parede celular do *Paracoccidioides brasiliensis*, com foco na compreensão dos mecanismos de ação. A molécula não exerceu efeito significativo na transição dimórfica no protocolo avaliado. Nos ensaios dos perturbadores, os que obtiveram maior efeito junto com LMM6 foram os responsáveis por criarem um ambiente de estresse osmótico, Cloreto de sódio e SDS. Concluímos que outras concentrações de molécula poderão ser testadas e esses ensaios permitem oportunidades para pesquisas futuras.

INTRODUÇÃO

A OMS considera o micetoma, a cromoblastomicose (CBM) e a paracoccidioidomicose (PCM) como Doenças Tropicais Negligenciadas (DNTs) causadas por fungos desde 2020. Apesar de terem distribuição geográfica similar a outras DNTs, as doenças fúngicas recebem pouca atenção dos sistemas de saúde, resultando em falta de vigilância epidemiológica e avanços terapêuticos. A PCM, uma micose sistêmica endêmica na América Latina, é causada por fungos do gênero *Paracoccidioides spp.* Considerando-se que a maioria dos pacientes com PCM é proveniente de regiões rurais pobres ou da periferia, a sequela respiratória é um dos principais problemas clínicos e sócio-econômicos da doença. Apesar do problema social, esta doença não é de notificação obrigatória no Sistema Único de Saúde (SUS) no Brasil (Martinez R, 2015). Embora o tratamento da PCM alcance sucesso com as opções terapêuticas disponíveis, as limitações relacionadas à nefrotoxicidade, ao tratamento prolongado e à incapacidade de controlar as sequelas pulmonares são uma realidade preocupante. Pesquisas buscam medicamentos mais direcionados para encurtar o tratamento e reduzir efeitos colaterais, visando aprimorar a terapia da PCM. Este é o caso da LMM6 que já tem sua atividade antifúngica comprovada *in vitro* e *in vivo* para fungos, como o *Paracoccidioides brasiliensis* (Kioshima et al., 2018). Assim, o objetivo desse

trabalho foi avaliar o efeito de LMM6 sobre componentes de parede celular do *Paracoccidioides brasiliensis*, com foco na compreensão dos mecanismos de ação deste promissor candidato a antifúngico.

MATERIAIS E MÉTODOS

Ensaio de transição dimórfica

Células leveduriformes de Pb18 foram crescidas em meio sólido YPDmod pH 6,5 a 37°C por 3 a 4 dias e inoculadas em meio líquido, depois incubadas a 25°C por 6 dias para reversão completa de leveduras para micélio. Após a transição completa, as células foram centrifugadas a 3000 x g e lavadas com tampão PBS (pH 7,2). O micélio foi então, semeado em placas de 6 poços e LMM6 foi adicionada em diferentes concentrações. As amostras foram então monitoradas a cada 24 h em microscópio óptico.

Ensaio de suscetibilidade a agentes perturbadores da síntese da parede celular

A sensibilidade aos perturbadores de parede celular de *P. brasiliensis* foi investigada utilizando o ensaio de spots. Células de *P. brasiliensis* foram incubadas com LMM6 por 24 h a 37°C sob agitação constante. Cada cultura de levedura foi diluída (10, 50, 100 e 500 vezes) em YPDmod caldo e 20 µL de cada suspensão foi aplicado em meio YPDmod ágar suplementado com diferentes agentes perturbadores de parede celular: Vermelho congo (Congo Red) (2,5µM e 10µM), SDS (0,001%), Calcofluor White (1 µg/mL e 5 µg/mL), cloreto de sódio (150 mM) e menadiona (10 µM). As placas foram incubadas por 7 dias em estufa a 37°C. Após este período as placas foram fotografadas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As espécies fúngicas pertencentes ao gênero *Paracoccidioides* são conhecidamente termodimórficas, ou seja, são capazes de alternar entre a forma leveduriforme e a forma filamentosa dependendo da temperatura do ambiente onde estão. Na temperatura ambiente de 25°C, encontram-se na forma filamentosa que é a forma capaz de infectar o hospedeiro, já na temperatura de 37°C se encontram na forma leveduriforme. O ensaio de transição dimórfica se consiste em provocar a transição da forma leveduriforme para a forma filamentosa em ambiente laboratorial. Na realização do ensaio de transição dimórfica o processo padronizado foi suficiente para reverter a forma filamentosa para leveduriforme (figura 1).

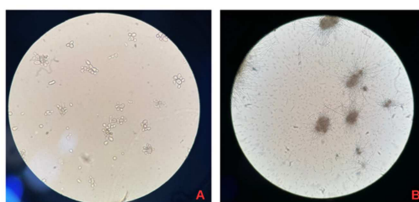


Figura 1: (A) *P. brasiliensis* na forma leveduriforme e (B) *P. brasiliensis* na forma filamentosa.

Após verificar que a transição foi bem-sucedida, o micélio foi semeado em uma placa de 6 poços com diferentes concentrações de LMM6 (figura 2).

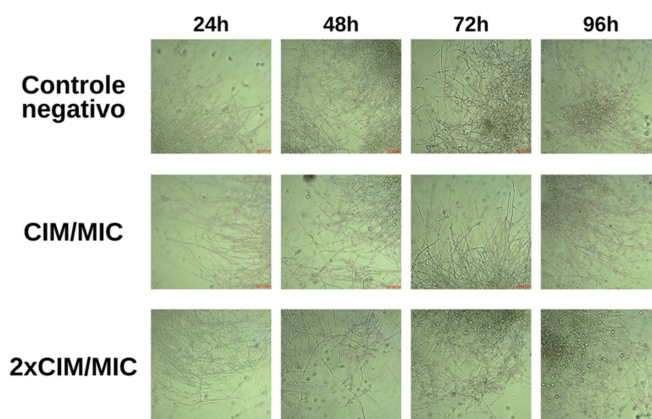


Figura 2: Resultados do ensaio de transição dimórfica de *P. brasiliensis* frente a diferentes concentrações de LMM6

CIM: concentração inibitória mínima de LMM6 (0,5 µg/ml). 2xCIM: concentração de 1,0 µg/ml de LMM6.

Não se observou diferenças significativas entre as concentrações testadas e o controle negativo, porém, mais testes são necessários para verificar a atividade de LMM6 na transição.

Para o ensaio de perturbadores de parede celular (figura 3), é possível analisar que no meio YPD (ausência de perturbadores) a molécula sozinha inibiu visualmente o crescimento do fungo, principalmente na concentração de 2X MIC, se comparado com o C+. Comparando o Calcofluor White nas diferentes concentrações, se observa que 250 µg/ml inibiu mais. Vermelho congo em nenhuma concentração apresentou diferença de crescimento fúngico na presença ou não da molécula. Entretanto, na presença de Cloreto de sódio (NaCl 150mM) e principalmente de SDS 0,001% a molécula conseguiu auxiliar na inibição do crescimento fúngico, em todas as concentrações testadas, destaque para 2xCIM. Menadiona 10 µM não demonstrou qualquer relação sinérgica com a molécula na inibição do crescimento fúngico. Neste experimento foi possível inferir que os estressores que obtiveram maior sucesso no estresse de parede foram os responsáveis por criarem um ambiente de estresse osmótico, Cloreto de sódio (NaCl 150mM) e SDS 0,001% (Ene et al., 2015).

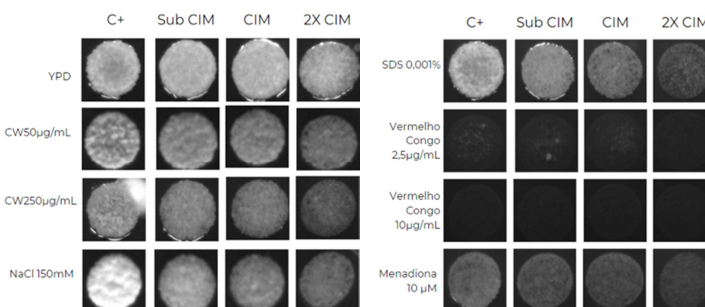


Figura 3: Comparativo entre os diferentes tipos de perturbadores na presença de LMM6. C+: controle positivo sem LMM6. SubCIM: concentração sub-inibitória de LMM6 (0,25 µg/ml). CIM: concentração inibitória mínima de LMM6 (0,5 µg/ml). 2xCIM: concentração de 1,0 µg/ml de LMM6.

Os perturbadores tradicionais da parede celular, como o Calcofluor White e o Vermelho congo, demonstraram efeitos diferentes no crescimento do fungo. Estudos anteriores sugerem que as células fúngicas respondem ao comprometimento da parede celular aumentando a síntese de quitina (Jung et al., 2017).

CONCLUSÕES

A análise detalhada e interpretação dos resultados revelaram que a molécula não interferiu na transição da forma filamentosa para leveduriforme. Além disso, no que se obteve com o ensaio dos perturbadores, os que tiveram resultados mais expressivos com a molécula foram o NaCl 150 mM e o SDS 0,001%. No entanto, é importante reconhecer as limitações inerentes a este estudo, outras concentrações de molécula poderão ser testadas e essas limitações sugerem oportunidades para pesquisas futuras.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos a Fundação Araucária e a UEM pelo apoio em todo o projeto.

REFERÊNCIAS

ENE, I. V. *et al.* Cell Wall Remodeling Enzymes Modulate Fungal Cell Wall Elasticity and Osmotic Stress Resistance. **mBio**, v. 6, n. 4, 28 set. 2015. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/mbio.00986-15> Acesso em: 25 agosto 2023.

JUNG, S.-I. *et al.* Yeast casein kinase 2 governs morphology, biofilm formation, cell wall integrity, and host cell damage of *Candida albicans*. **PLOS ONE**, v. 12, n. 11, p. e0187721, 6 nov. 2017. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0187721>. Acesso em: 20 junho 2023.

KIOSHIMA ES, SVIDZINSKI TIE, BONFIN-MENDONÇA PS, CAPOCI IRG, FARIA DR, SAKITA KM, *et al.* Composição farmacêutica baseada em compostos 1,3,4-oxadiazólicos e seu uso na preparação de medicamentos para tratamento de infecções sistêmicas. BR1020180090208. 03 maio 2018.

MARTINEZ, Roberto. Epidemiology of paracoccidioidomycosis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 57, p. 11-20, 2015. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rimtsp/a/3jzXqLy6HjV9KP5JwHfgCsj/?lang=en> Acesso em: 20 junho 2023.