

AVALIAÇÃO DE QUITINA E MANANA PRESENTES NA PAREDE CELULAR DE *PARACOCCIDIOIDES BRASILIENSIS*

Gabriel Uliano Cerci (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Isis Regina Grenier Capoci (Coorientador), Érika Seki Kioshima Cotica (Orientador).
E-mail: eskcotica@uem.br

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências da Saúde / Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina / Maringá, PR.

Área e Subárea: Farmácia / Análise Toxicológica

Palavras-chave: parede celular; fungos; citometria de fluxo.

RESUMO

A patogênese da Paracoccidioidomicose envolve a capacidade de mudar sua morfologia micelial para forma leveduriforme, assim, escapar do sistema imune do hospedeiro. Tal fato depende de modificações dos componentes estruturais da parede celular do fungo, principalmente os polissacarídeos, quitina e manana. Desse modo, este trabalho avaliou modulação da quantidade de quitina e manana na parede celular de *Paracoccidioides brasiliensis* frente a LMM6, por citometria de fluxo, fornecendo detalhes sobre o mecanismo de ação possível candidato a um novo antifúngico. Os resultados mostraram uma ligeira redução da quantidade de manana, enquanto os níveis de quitina permaneceram inalterados. Estes resultados abrem novas perspectiva na busca por novas abordagens terapêuticas.

INTRODUÇÃO

A paracoccidioidomicose (PCM) é uma doença fúngica sistêmica prevalente na América Latina, especialmente no Brasil, causada por fungos do gênero *Paracoccidioides spp.*, sendo *P. brasiliensis* e *P. lutzii* os principais agentes. A infecção ocorre principalmente pela inalação de propágulos infecciosos presentes no solo, afetando sobretudo homens adultos envolvidos em atividades rurais. A incidência anual no Brasil é de cerca de 3.500 casos, com uma taxa de mortalidade de 2,2% (BRASIL, 2019). O tratamento apesar de disponível apresenta desafios como necessidade de tratamento por meses, efeitos adversos e resistência. A parede celular do fungo, composta por quitina e manana, desempenha um papel

crucial na virulência, permitindo que o fungo escape do sistema imunológico do hospedeiro (COCUCCI, S. M., et al 2013). Assim, novo fármacos que possam atuar modulando componentes da parede celular, pode ser promissor para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas contra a PCM. Assim, este trabalho objetivou avaliar a modulação da quantidade de quitina e manana na parede celular de *P. brasiliensis* após exposição ao LMM6, contribuindo para compreensão de mecanismo de ação.

MATERIAIS E MÉTODOS

Leveduras de *P. brasiliensis* (1×10^4 cels/ml) foram cultivadas em placas (24 poços) e incubadas por 6 dias com LMM6 (0,5µg/mL) em RPMI 1640 a 35°C. Posteriormente, levedura coletadas foram lavadas com PBS (pH 7,2). A determinação do oligômero de quitina foi realizada utilizando um marcador de aglutinina de gérmen de trigo (WGA) conjugado com FITC (Sigma-Aldrich, San Louis, MO, EUA) na concentração de 25 µg/mL em PBS (pH 7,2). Para a determinação de manana foi utilizado Concanavalina A conjugada com FITC (sonda produzida pela fusão do receptor de Dectina-1 humana com a porção Fc de IgG de camundongo) (Sigma-Aldrich, San Louis, MO, EUA) na concentração de 25 µg/mL em PBS (pH 7,2). As amostras foram incubadas por 1 hora, protegidas da luz e sob agitação (800 rpm). Posteriormente, as células coletadas foram lavadas três vezes com PBS (pH 7,2) e analisadas por citometria de fluxo (BD FACSCalibur™, Becton Dickinson) utilizando o canal de detecção FL-1. Cada amostra foi analisada em triplicata. Cerca de 10 mil eventos foram coletados e os gráficos de quantificação gerados com base no MFI (software BD CellQuest Pro, versão 2.4).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As células fúngicas respondem ao comprometimento da parede celular aumentando a síntese de quitina (JUNG et al., 2017), que tem um papel importante na resistência mecânica e na proteção contra agentes químicos e biológicos. Em fungos, a manana está localizada na camada externa da parede celular e é responsável pela proteção contra agentes hostis, como enzimas hidrolíticas e componentes do sistema imunológico do hospedeiro (COCUCCI, S. M., et al 2013).

De acordo com a análise dos histogramas, não encontramos diferença significativa para manana e quitina na composição da parede celular quando expostas a concentração de 0,05µg/mL de LMM6 (figura 1). No entanto, para a dosagem de manana, os valores das medianas (tabela 1) do grupo tratado com LMM6 apresenta uma diferença em relação ao grupo controle. Desta forma, concentrações mais

elevadas de LMM6 deverão ser testas para validar essa hipótese, evidenciando melhor este resultado. Já para quitina, a diferença no primeiro teste foi de 0,7113 entre os grupos marcados vivos e tratados e 4,4914 no segundo.

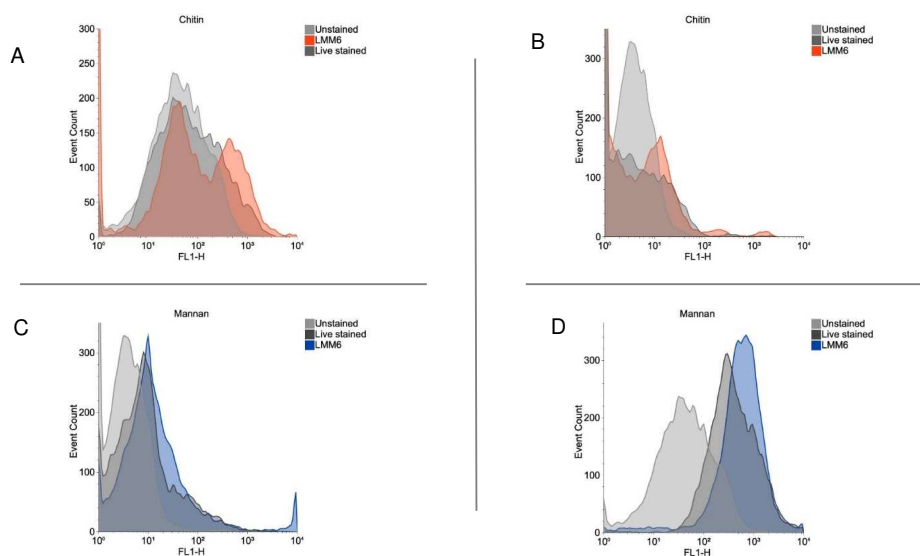


Figura 1 - Influência de LMM6 nos componentes da parede celular de *P. brasiliensis*. Marcação de quitina com Aglutinina de Germe de Trigo (WGA) conjugada com FITC em vermelho (teste 1 – (A) e teste 2 – (B)) e marcação de manana com Concanavalina A conjugada com FITC em azul (teste 1 – (C) e teste 2 – (D)). Cinza-claro grupo não tratado e não corado e cinza-escuro grupo vivo marcado.

Tabela 1 Valores das medianas de quitina e manana da parede celular de *P.*

	Manana	Quitina
Medianas do 1 teste	381,9717	2,1879
Grupo vivo e marcado		
Medianas do 1 teste	42,9351	1,4766
Grupo tratado e marcado		
Medianas do 2 teste	381,9717	64,9382
Grupo vivo e marcado		
Medianas do 2 teste	42,9351	69,4296
Grupo vivo e marcado		

A padronização da metodologia de quantificação dos dois polissacarídeos foi realizada com sucesso e a avaliação de quitina e manana na parede celular de *Paracoccidioides brasiliensis* após a exposição à molécula LMM6 revelou uma diminuição não significativa nos níveis de manana. Entretanto, é imprescindível reconhecer as limitações inerentes a este estudo, outras concentrações de molécula poderão ser testadas e essas limitações sugerem oportunidades para pesquisas futuras.

AGRADECIMENTOS

Ao laboratório de Micologia Médica da Universidade Estadual de Maringá (UEM) e às agências de fomento à educação - CNPq e Fundação Araucária.

REFERÊNCIAS

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Guia de Vigilância em Saúde: volume único. Brasília: Ministério da Saúde, 2019.

COCUCCI, S. M. et al. The cell wall of *Paracoccidioides brasiliensis*: current concepts and future perspectives in drug development. *Mycopathologia*, v. 175, n. 4, p. 311-318, 2013.

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.