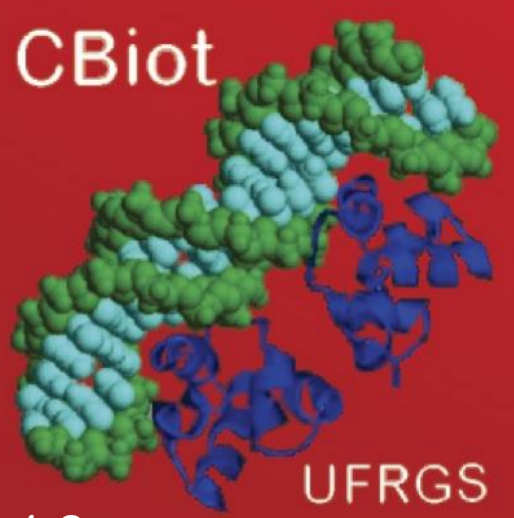


Estratégias biotecnológicas para o reposicionamento de fármacos como alternative terapêutica para a criptococose



Natália Kronbauer de Oliveira¹, Livia Kmetzsch Rosa e Silva^{1,2}.

¹ Centro de Biotecnologia e ² Departamento de Biologia Molecular e Biotecnologia - Instituto de Biociências, UFRGS.



INTRODUÇÃO

Cryptococcus neoformans é uma levedura responsável pelo desenvolvimento da meningite criptocócica. O tratamento padrão para a meningite criptocócica é a utilização de anfotericina B, seguida de uma terapia de manutenção longa com fluconazol. Com o problema emergente da resistência a esses antifúngicos, o reposicionamento de fármacos já utilizados na clínica, que podem exercer também atividade fungicida, são uma alternativa promissora para o controle das infecções fúngicas emergentes. Fungos patogênicos utilizam sistemas de sinalização para adaptação ao hospedeiro. A via de sinalização mediada por calcineurina em *C. neoformans* controla o desenvolvimento a 37° C, *mating*, frutificação monocariótica, resposta a estresse, e virulência. A presença de cálcio é fundamental para a ativação desta via de sinalização. Mutantes nulos para dois transportadores vacuolares de cálcio (*Vcx1* e *Pmc1*) demonstraram ter virulência atenuada. Neste contexto, a avaliação e utilização de fármacos com mecanismo de ação baseado no bloqueio de canais de cálcio pode representar uma alternativa terapêutica para o tratamento da criptococose.

MATERIAIS E MÉTODOS

As células das linhagens H99 (selvagem), mutante nulo *pmc1*, mutante nulo *vcx1*, duplo mutante nulo *pmc1vcx1* e linhagem complementada *pmc1:PMC1* foram cultivadas em meio YPD (2% glicose, 2% peptona, 1% extrato de levedura). Colônias foram inoculadas em YPD líquido e incubadas a 37°C por 18 horas a 150 rotações por minuto (rpm) para ensaios *in vitro*. Os fármacos utilizados foram selecionados baseados no seu mecanismo de ação de bloqueio de canais de cálcio.

A avaliação da sensibilidade das linhagens selvagem e mutantes de *C. neoformans* aos fármacos de interesse foram realizadas em meio RPMI nas concentrações de 10µM, 20µM, 30µM e 40µM para H99 e na concentração de 20µM para os mutantes. As células foram adicionadas em uma concentração de 1,25x10⁵ células/mL e incubadas por 48 horas a 37°C. Após esse período, as absorbâncias foram determinadas a 600nm. Ensaios subsequentes de sensibilidade a amiodarone foram realizados com as concentrações de 5µM, 10µM, 15µM, 20µM, 25µM, 30µM e 40µM do fármaco, nas mesmas condições descritas acima.

Uma diluição em série foi realizada com a linhagem selvagem H99 e as linhagens mutantes em meio YPD sólido (2% glicose, 2% peptona, 1% extrato de levedura e 1,5% ágar). A concentração inicial foi de 1x10⁷ células/mL, com quatro diluições seriadas de 1:10 subsequentes. As concentrações de amiodarone e nifedipina testadas foram de 30µM, 40µM e 100µM.

RESULTADOS

Seis fármacos foram selecionados baseado em seu mecanismo de ação e nas interações medicamentosas que apresentavam com fluconazol, sendo eles amiodarone, nifedipine, sotalol, amlodipine, verapamil e diltiazem.

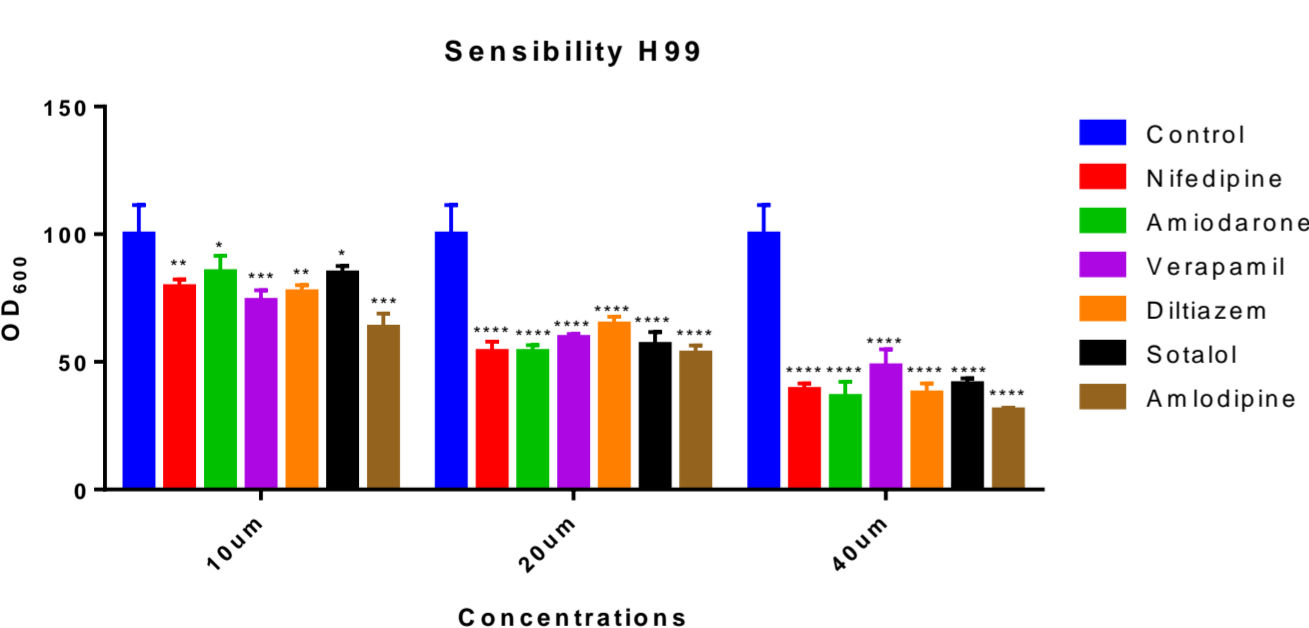


Fig 1: Teste de sensibilidade da linhagem selvagem H99 em meio RPMI na presença de fármacos selecionados. Análise estatística por one-way ANOVA. * - p<0.05; ** - p<0.01; *** - p<0.001; **** - p<0.0001.

Para as linhagens mutantes, o fármaco amiodarone demonstrou uma inibição acentuada do crescimento da levedura na linhagem *pmc1* e na linhagem duplo mutante *pmc1vcx1*. Já para o fármaco nifedipine, não foi possível observar uma diferença significativa no crescimento das leveduras em relação ao controle sem fármaco (Fig. 2).

Estes seis fármacos pré-selecionados foram utilizados em teste de sensibilidade utilizando células da linhagem selvagem H99. Foi observado que todos os fármacos demonstraram uma diminuição de crescimento das células em relação ao controle, com um efeito dose dependente (Fig. 1).

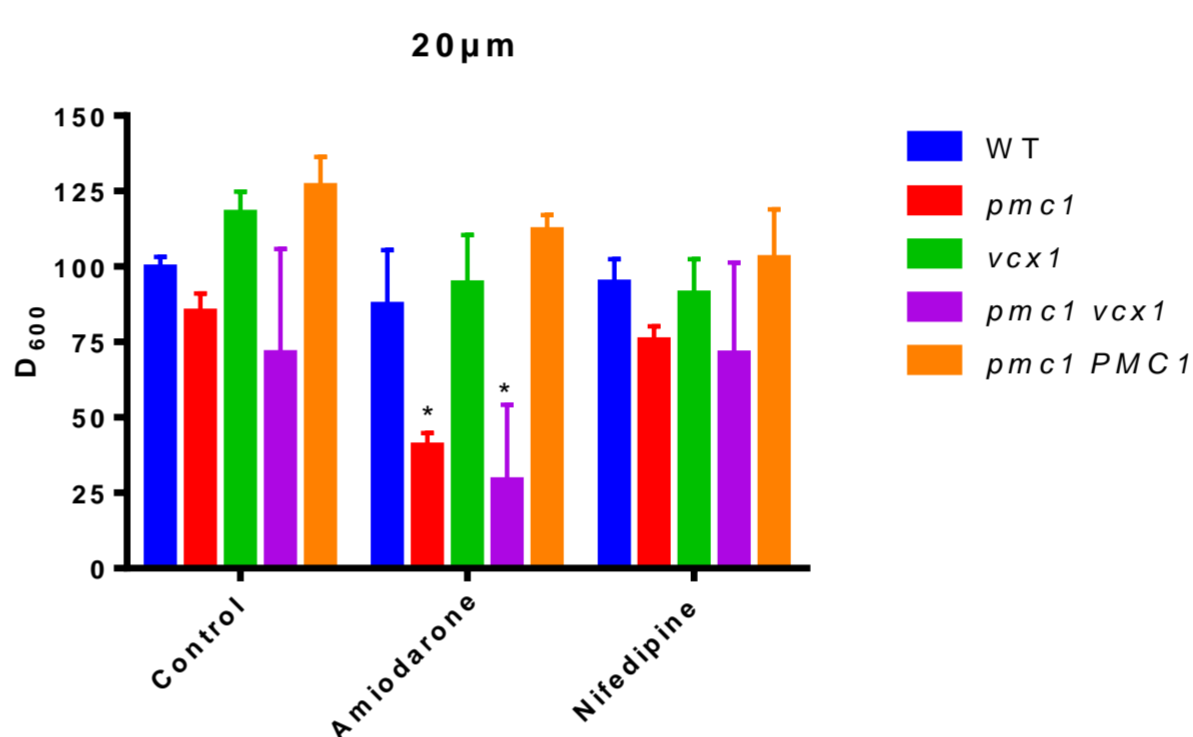


Fig. 2: Teste de sensibilidade da linhagem selvagem H99 e das linhagens mutantes *pmc1*, *vcx1*, *pmc1vcx1* e *pmc1:PMC1* em meio RPMI, na presença dos fármacos amiodarone ou nifedipine. Análise estatística por one-way ANOVA. * - p<0.05; ** - p<0.01; *** - p<0.001; **** - p<0.0001.

Ensaios posteriores de sensibilidade foram realizados com concentrações crescentes do fármaco amiodarone (Fig 3). Foi possível observar, para as linhagens mutantes *pmc1* e *pmc1vcx1*, um efeito acentuado de redução de crescimento a partir de 5µM do referido fármaco.

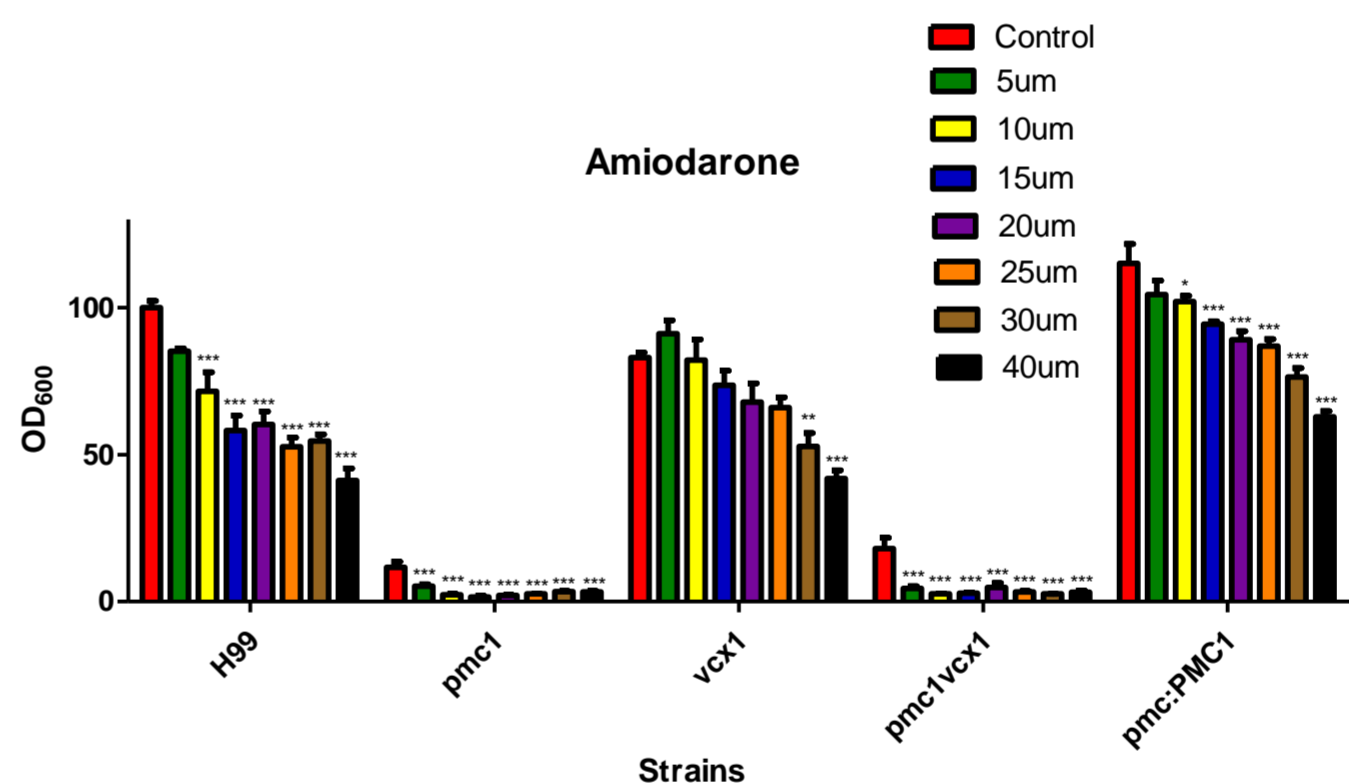


Fig 3: Teste de sensibilidade a amiodarone utilizando as linhagens selvagem H99 e mutantes *pmc1*, *vcx1*, *pmc1vcx1* e *pmc1:PMC1* em meio RPMI. Análise estatística por one-way ANOVA. * - p<0.05; ** - p<0.01; *** - p<0.001; **** - p<0.0001.

Ensaio de diluição seriada utilizando as linhagens selvagem e mutantes em meio sólido demonstrou uma diminuição acentuada do crescimento das colônias a partir de 1x10⁶ células das linhagens *pmc1* e *pmc1vcx1*, e a partir de 1x10⁴ células para as linhagens H99, *vcx1* e *pmc1:PMC1*, para o fármaco amiodarone. Para nifedipine, o efeito na diminuição do crescimento foi menor, sendo perceptível nas linhagens *pmc1* e *pmc1vcx1* (Fig. 4).

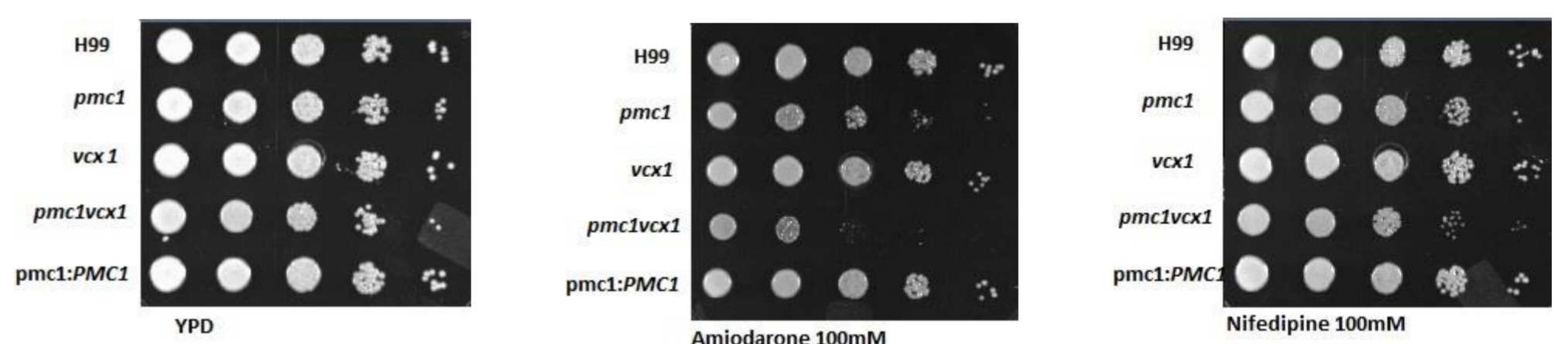


Fig. 4: Ensaio de diluição em série em meio sólido na presença dos fármacos amiodarone ou nifedipine. Foram utilizadas a linhagem selvagem H99, e as linhagens mutantes *pmc1*, *vcx1*, *pmc1vcx1* e *pmc1:PMC1*, conforme indicado.

PERSPECTIVAS

- Determinar a concentração de cálcio intracelular em células de H99 e mutantes *pmc1*, *vcx1*, *pmc1vcx1* e *pmc1:PMC1*, na presença dos fármacos selecionados.
- Realizar extração de RNA de células de *C. neoformans* expostas aos fármacos de interesse.
- Avaliar por RT-qPCR a expressão de genes relacionados a via de sinalização mediada por cálcio-calcineurina em células de *C. neoformans* expostas aos fármacos de interesse.