

Avaliação de potencial atividade antifúngica de amiodarona em *Cryptococcus neoformans*

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 das leveduras responsáveis pelo desenvolvimento da meningite criptocócica, importante infecção oportunística em imunocomprometidos, a qual corresponde à terceira complicação neurológica mais comum em portadores do vírus HIV. O tratamento padrão com anfotericina B e fluconazol é efetivo em 50% a 80% dos casos, sendo a sua toxicidade e o desenvolvimento de resistência problemas recorrentes. A via de sinalização mediada por Ca²⁺-calcineurina é fundamental para *C. neoformans* e mutantes nulos para dois transportadores dessa via (Pmc1 e Vcx1) demonstraram virulência atenuada. Assim, destaca-se a necessidade pela busca de novos alvos e fármacos para o tratamento da meningite criptocócica. A reposição de fármacos já utilizados na clínica, que demonstram atividade antifúngica, como a amiodarona e outros bloqueadores de canais de cálcio, mostram-se promissores.

RESULTADOS

Tabela 1: Fármacos bloqueadores de canais de cálcio selecionados para avaliação de potencial atividade antifúngica

Fármaco	Tratamento	Mecanismo de ação	Barreira hematoencefálica
Amiodarone	Arritmias	Bloqueador de canais de cálcio tipo T	+
Verapamil	Hipertensão e angina	Bloqueador de canais de cálcio tipo L	+
Diltiazem	Hipertensão e angina	Bloqueador de canais de cálcio tipo L	+

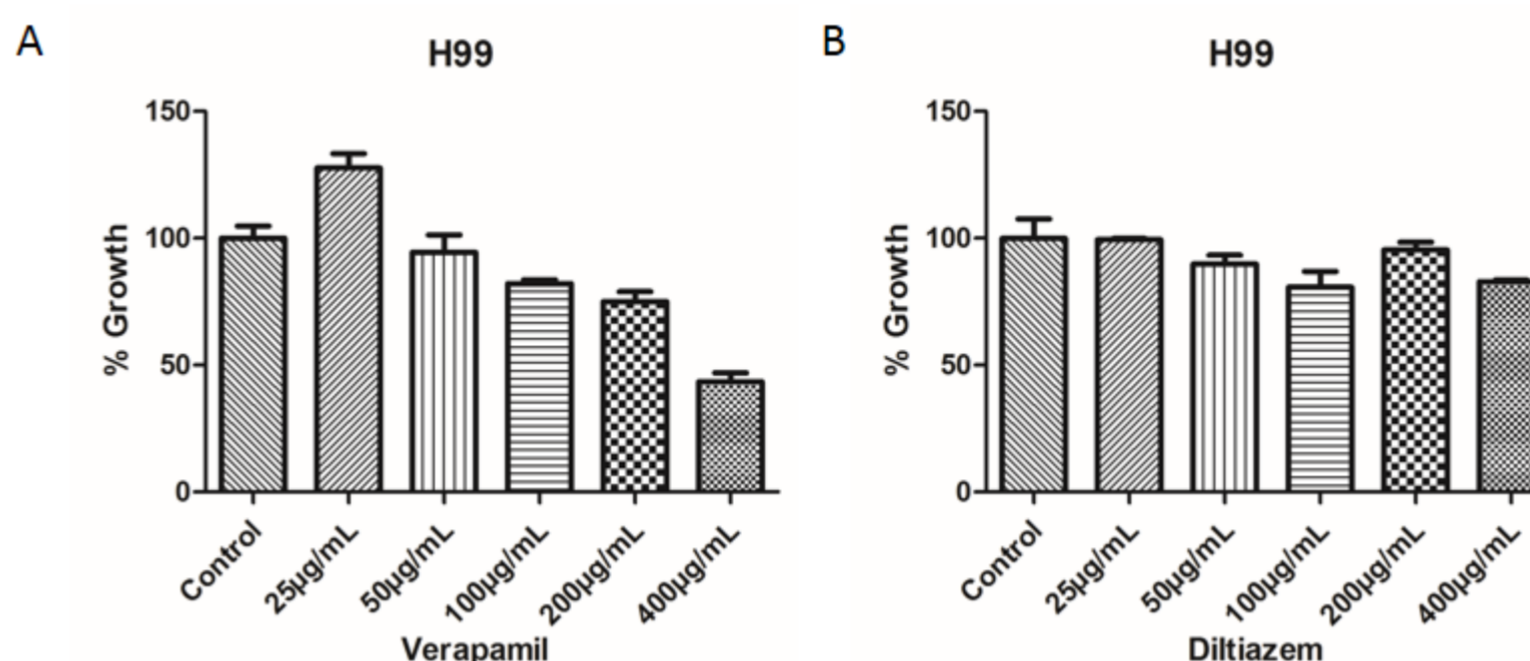


Fig. 2: Sensibilidade de linhagens de *C. neoformans* a fármacos bloqueadores de canais de cálcio. Os cultivos foram realizados em meio RPMI-1640, a 37 °C por 48 horas, na ausência ou presença de fármaco (25 µg/mL a 400 µg/mL) com subsequente leitura de OD a 600nm para avaliar crescimento celular. (A) Sensibilidade da linhagem selvagem H99 ao fármaco verapamil. (B) Sensibilidade da linhagem selvagem H99 ao fármaco diltiazem.

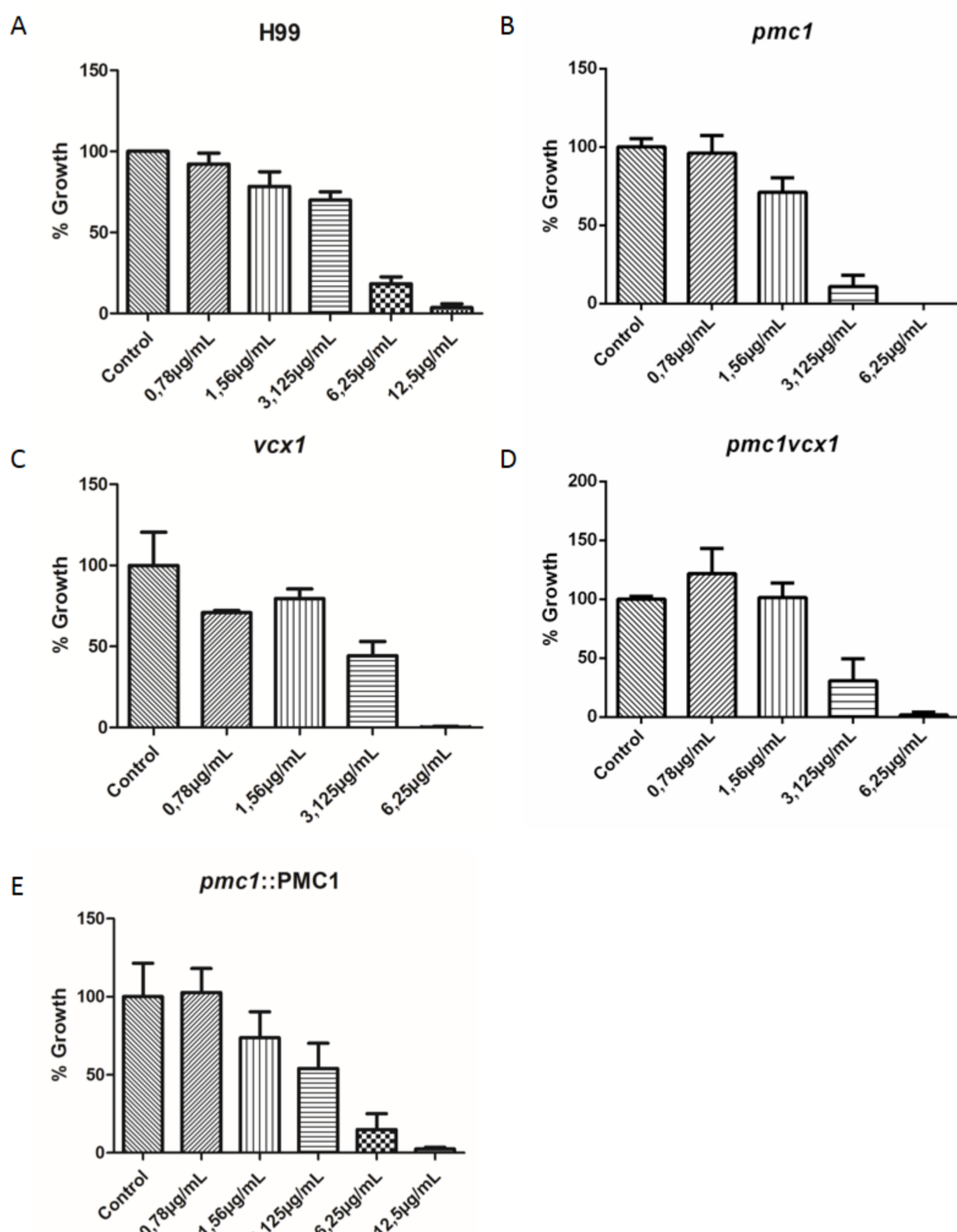


Fig. 1: Determinação de concentração inibitória mínima (MIC) de amiodarona para linhagens de *C. neoformans*. Os cultivos foram realizados em meio RPMI-1640, a 37 °C, por 48 horas, na ausência ou presença de amiodarona (0,78 a 12,5 µg/mL) com subsequente leitura de OD a 600nm para avaliar crescimento celular. (A) Linhagem selvagem H99. (B) Linhagem mutante *pmc1*. (C) Linhagem mutante *vcx1*. (D) Linhagem mutante *pmc1vcx1*. (E) Linhagem complementada *pmc1::PMC1*.

CONCLUSÃO

Em suma, neste estudo foi demonstrada a eficácia do fármaco amiodarona contra linhagens de *C. neoformans* e seu efeito sinérgico com fluconazol, *in vitro*. Mais estudos serão realizados para avaliar o efeito dessa combinação em modelos de infecção *in vivo*. Esses dados reforçam a possibilidade deste fármaco ser utilizado na clínica combinado com fluconazol, abrindo novas possibilidades de tratamento para a meningite criptocócica.

Tabela 2: Teste de interação entre fármacos

Linhagem	MIC ^a		MIC ^a combinação		FIC index	Interpretação ^b
	AMD	FLC	AMD	FLC		
H99	12,5	0,5	3,125	0,25	0,75	Sinérgico
pmc1	6,25	0,5	1,56	0,25	0,75	Sinérgico
vcx1	6,25	0,5	3,125	0,125	0,75	Sinérgico
pmc1vcx1	6,25	0,5	1,56	0,25	0,75	Sinérgico
pmc1::PMC1	12,5	0,5	3,125	0,25	0,75	Sinérgico

a Valores em µg/mL

b (Te Dorsthorst *et al.*, 2002)

Abreviações: AMD – amiodarona; FLC – fluconazol

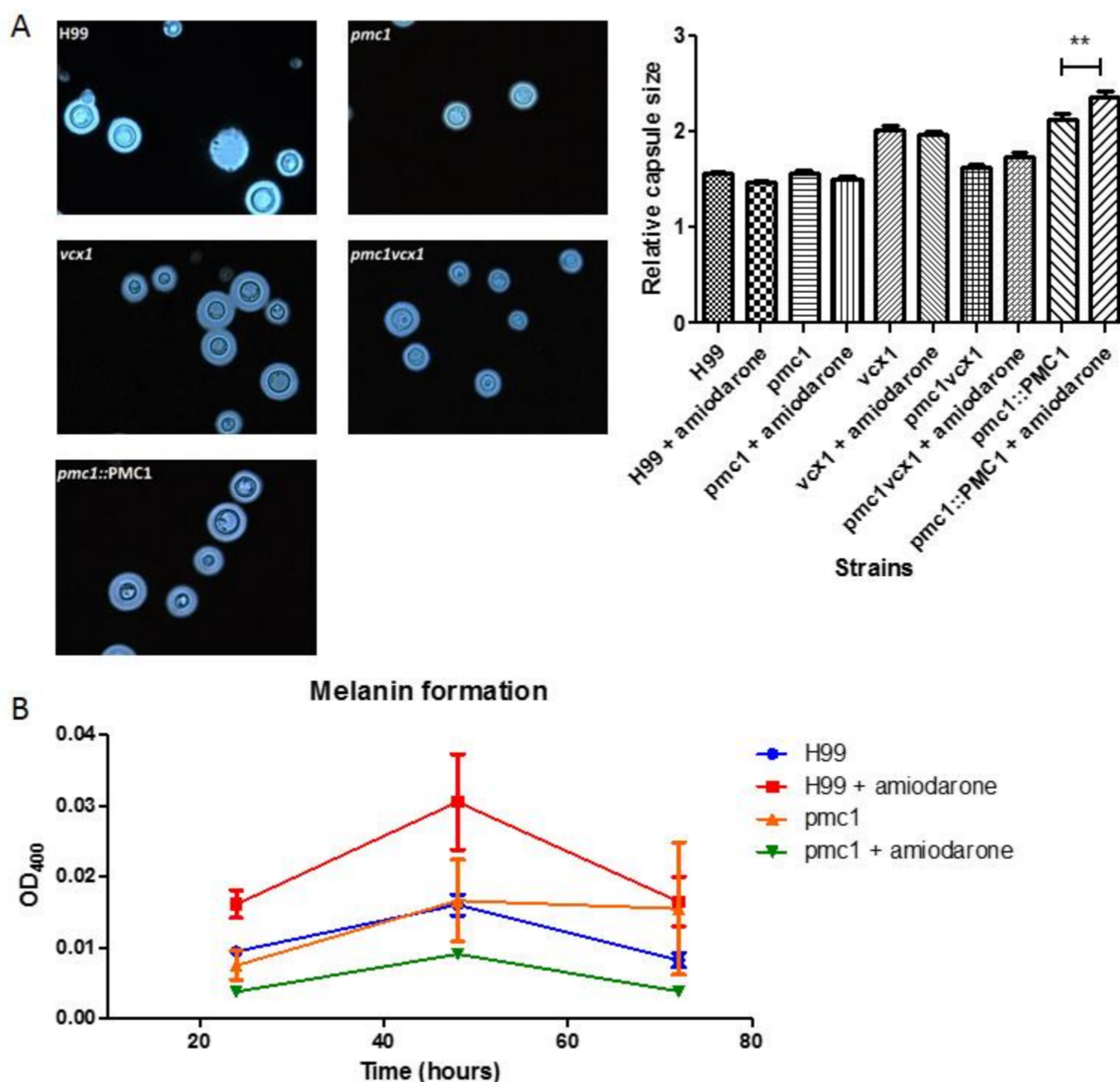


Fig. 3: Amiodarona não afeta características fenotípicas de *C. neoformans*. (A) Determinação da medida da cápsula polissacarídica em condições indutoras de cápsula (meio mínimo, 37 °C, 5% CO₂), na presença ou ausência de 1,56 µg/mL de amiodarona e subsequente contracoloração com *India Ink*: ** P < 0.01. (B) Produção de melanina em meio asparagina livre de glicose, suplementado com L-DOPA, na presença ou ausência de 1,56 µg/mL de amiodarona. Incubação à 37 °C, 200 rpm por até 72 horas e subsequente leitura de OD a 400 nm.

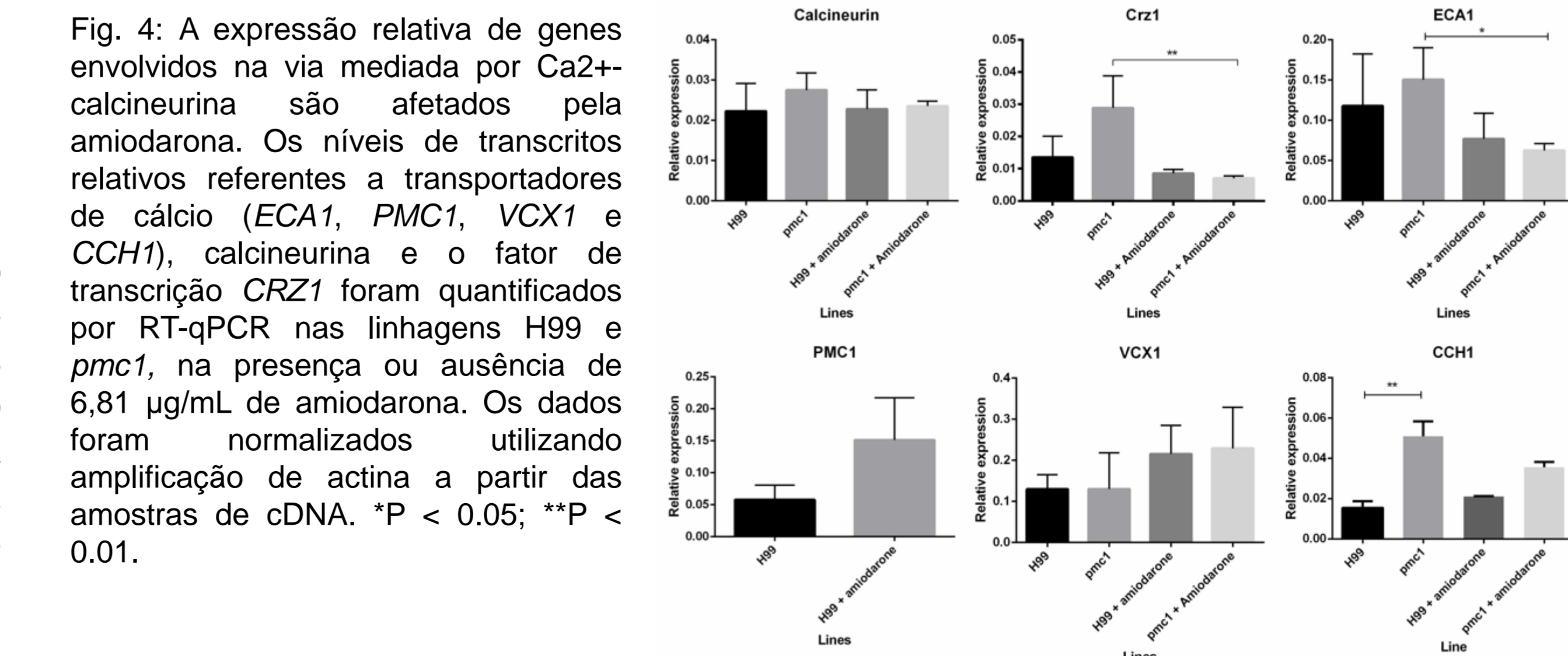


Fig. 4: A expressão relativa de genes envolvidos na via mediada por Ca²⁺-calcineurina são afetados pela amiodarona. Os níveis de transcritos referentes a transportadores de cálcio (*ECA1*, *PMC1*, *VCX1* e *CCH1*), calcineurina e o fator de transcrição *CRZ1* foram quantificados por RT-qPCR nas linhagens H99 e *pmc1*, na presença ou ausência de 6,81 µg/mL de amiodarona. Os dados foram normalizados utilizando amplificação de actina a partir das amostras de cDNA. *P < 0.05; **P < 0.01.