

MODULAÇÃO DE BIOFILME FORMADO POR *Cryptococcus neoformans* A PARTIR DE MOLÉCULAS SINTETIZADAS

Maria Eduarda Krummenauer^{1,2}, Marilene Henning Vainstein².
¹Aluna de graduação em Farmácia - UFRGS; ²Centro de Biotecnologia, UFRGS

INTRODUÇÃO

Cryptococcus neoformans é um dos agentes etiológicos da criptococose: infecção que atinge o sistema nervoso central ocasionando a meningoencefalite. Estima-se que aproximadamente 200.000 mortes por ano decorram da meningite criptocócica (Rajasingham et al., 2017). Essa levedura apresenta fatores de virulência como: atividade ureolítica, produção de melanina e cápsula polissacarídica, a qual favorece a adesão em superfícies e a formação de biofilme. Biofilmes formados por *C. neoformans* são resistentes a agentes antimicrobianos e aos mecanismos de defesas do hospedeiro.

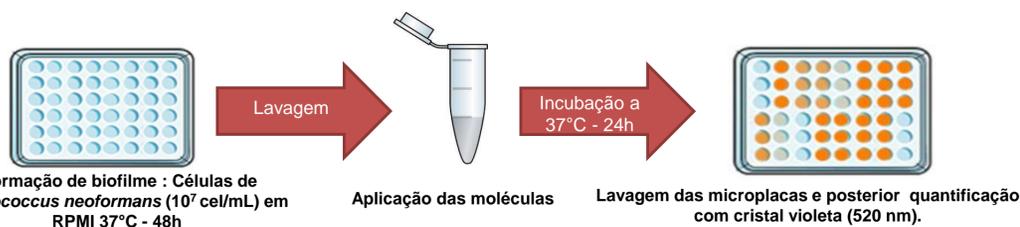
O tratamento padrão para a criptococose envolve a combinação de anfotericina B com 5-fluorocitosina (Krysan, 2015), porém esse recurso terapêutico apresenta disponibilidade limitada, alto custo e alta toxicidade.

MATERIAIS E MÉTODOS

Visando encontrar novas moléculas com atividade anti-*Cryptococcus*, foi realizada uma triagem inicial composta por 21 triterpenos, 12 quinolonas, 9 flavonóides e 10 benzoxazóis, totalizando 52 moléculas sintetizadas pelo Laboratório de Fitoquímica e Síntese Orgânica da UFRGS.

Linhagens: As seguintes linhagens de *C. neoformans* foram utilizadas: B3501 (sorotipo D) e H99 (sorotipo A).

Screening de erradicação de biofilme: O screening foi realizado empregando o método de cristal violeta com as moléculas ajustadas a 25 µM, conforme esquema abaixo:



Ensaio de concentração mínima de erradicação de biofilme (MBEC): O ensaio foi realizado em placas de 96 poços, com as concentrações ajustadas (fatoradas x 1,5) de 438 µM a 5 µM e adicionadas após a formação de biofilme. A quantificação foi realizada através do método de XTT. As microplacas foram incubadas a 37°C por 5h. A mudança de cor decorrente da metabolização do XTT até o derivado formazan foi medida utilizando leitor de microplacas (SpectraMax i3x) em 492nm.

Concentração Mínima Inibitória (MIC): Os testes de susceptibilidade foram realizados segundo protocolo estabelecido pelo "European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing" (EUCAST), específico para ensaios de determinação da concentração mínima inibitória de potenciais agentes antifúngicos para leveduras. As concentrações empregadas compreenderam a faixa de 194,6µM a 1,0µM.

Inibição de fatores de virulência: Para realizar testes de atividade antivirulência, a linhagem *C. neoformans* H99 foi tratada nas concentrações MIC x 0,25 e MIC x 0,5 nas seguintes condições:

Inibição de Urease: Incubação em caldo uréia a 37°C por 4 horas. A mudança da coloração do meio para rosa meio indica atividade ureolítica.

Efeito na cápsula: Incubação em meio indutor de cápsula (meio mínimo) em atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C por 72h. As células foram analisadas em microscópio óptico utilizando nanquim como contrastante.

Inibição de melanina: Inoculação em meio de cultivo indutor de melanização (L-DOPA) a 37°C por 72h.

RESULTADOS

Quatro moléculas apresentaram atividade anti-*Cryptococcus*. Três triterpenos (LAFIS 114, LAFIS 115, LAFIS 123) e um flavonóide (Brosimina B).

Suas respectivas concentrações mínimas inibitórias:

	MIC H99	MIC B3501
LAFIS 114	86,5 µM	38,4 µM
LAFIS 115	38,4 µM	25,6 µM
LAFIS 123	11,4 µM	11,4 µM
Brosimina B	> 194,6 µM	> 194,6 µM

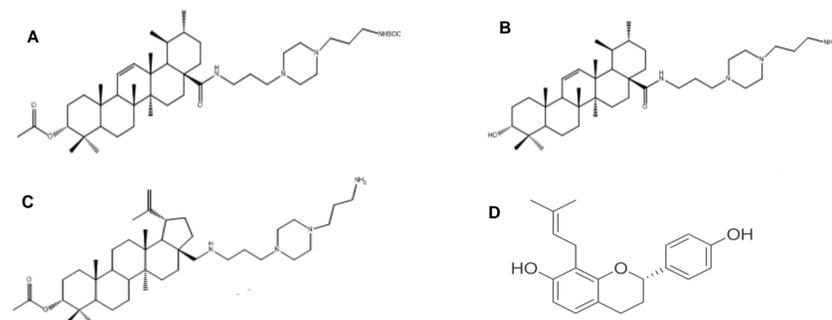


FIG 1: Estruturas químicas das moléculas (A) LAFIS 114 (B) LAFIS 115 (C) LAFIS 123 (D) Brosimina B

Ensaio de melanização realizado com MIC x 0,25 e MIC x 0,5:

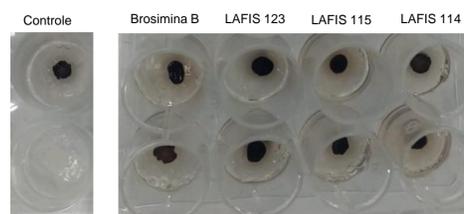


FIG 2 Ensaio de melanização: Microplaca com meio indutor de melanina (L-Dopa). Controle no lado esquerdo. No lado direito concentração de cima equivalente a cima MIC x 0,25 e em baixo MIC x 0,5.

Avaliação dos tratamentos na cápsula de *C. neoformans*.

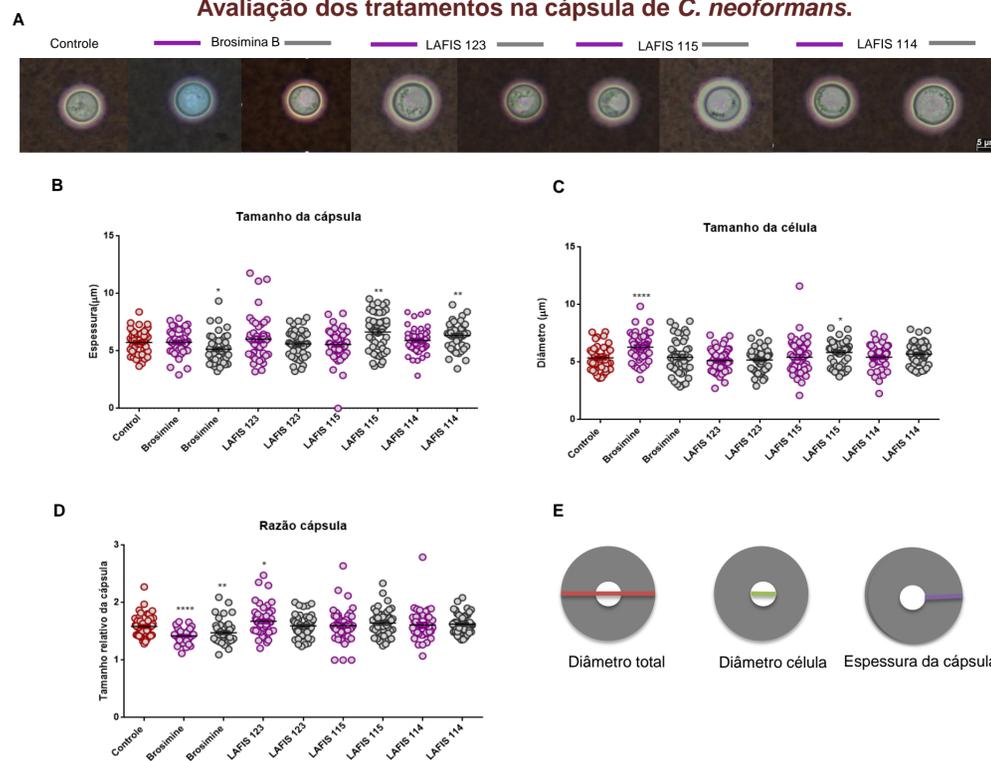


FIG 4 Ensaio de cápsula: (A) Imagens microscopia óptica. Concentração MIC x 0,25 (linha roxa); Concentração MIC x 0,5 (linha cinza) (B) Gráfico do diâmetro das células. Controle (vermelho); Concentração MIC x 0,25 (roxa); Concentração MIC x 0,5 (cinza) (C) Gráfico com medida da espessura da cápsula (D) Gráfico do diâmetro total pelo diâmetro da célula (tamanho relativo da cápsula) (E) Esquemas de medidas.

CONCLUSÕES

Foram identificadas quatro moléculas com atividades antifúngica e erradicação de biofilme formado por *Cryptococcus neoformans*. Nas concentrações avaliadas não foi encontrada atividade anti-virulência

PERSPECTIVAS

* Ensaios de testes antivirulência em diferentes concentrações, toxicidade das moléculas em *Galleria mellonella*, ensaio de sinergismo com outros antifúngicos e microscopia eletrônica de varredura.