

**Tiossemicarbazida derivada do canfeno como novo inibidor de
Paracoccidioides brasiliensis: eficiência na inibição de crescimento e baixa
toxicidade em células humanas**

Symone Vitoriano da Conceição CASTRO; Ludmila Bringel PIRES; Cecília Maria Alves de OLIVEIRA, Aliny Pereira LIMA, Elisangela de Paula Silveira LACERDA, Célia Maria de Almeida SOARES e Maristela PEREIRA
Instituto de Ciências Biológicas

Programa de Pós-Graduação em Biologia

symone_vitoriano@hotmail.com

Palavras chave: *Paracoccidioides brasiliensis*; tiossemicarbazida derivada do canfeno; inibição; MTT

Introdução

A paracoccidioidomicose (PCM) é uma micose humana sistêmica granulomatosa, cujo agente etiológico é o fungo *Paracoccidioides brasiliensis*. A PCM é uma doença endêmica de grande interesse para os países da América Latina, representando um importante problema de Saúde Pública devido ao seu alto potencial incapacitante e à quantidade de mortes prematuras que provoca (Shikanai-Yasuda *et al.*, 2006).

O tratamento da PCM apresenta opções terapêuticas consideradas potentes, contudo, continuam surgindo isolados resistentes ou multi-resistentes (Hanh *et al.*, 2003). Dessa forma, vários problemas relacionados a agentes antifúngicos disponíveis comercialmente estão sendo evidenciados (Ruhnke *et al.*, 1994). Estudos demonstram a eficácia do uso de plantas no tratamento e na cura de enfermidades. Diversas plantas oferecem uma enorme fonte potencial para novos agentes quimioterapêuticos. Pequenas moléculas de origem natural são empregadas como fármacos ou protótipos de fármacos (Wilson & Danishefsky, 2006). Neste contexto, os terpenos assumem papel de destaque devido à sua disponibilidade no mercado nacional (Silva Santos *et al.*, 2006). A tiossemicarbazida, terpeno derivado do canfeno, inibe o crescimento de *Trichophyton mentagrophytes* causando danos a estrutura da parede celular ou interferindo na sua formação durante o processo de divisão celular, crescimento ou morfogênese (Yamaguchi *et al.*, 2009).

O presente trabalho avalia a capacidade inibitória de tiossemicarbazida derivada do canfeno sobre o crescimento e diferenciação do fungo patogênico humano *P. brasiliensis* através de ensaios *in vitro*. Em adição, analisa a toxicidade do composto sobre células humanas.

Materiais e métodos

Síntese da tiossemicarbazida

As tiossemicarbazidas derivadas dos terpenos foram preparadas a partir da síntese do derivado terpênico isotiocianato, obtido de forma simples, utilizando-se a reação de adição direta de HNCS às duplas ligações. O isotiocianato terpênico foi transformado na respectiva tiossemicarbazida pela reação com hidrazina.

Microrganismo e cultura de células

O fungo utilizado foi *P. brasiliensis*, isolado *Pb* 01 (ATCC MYA 826). Para a realização dos testes, o cultivo das células leveduriformes foi feito em meio sólido Fava Netto pelo período de 7 dias, à 36°C. Após esse período, as células foram transferidas e cultivadas em meio Mc Veigh Morton (MMcM) líquido (RESTREPO e JIMÉNEZ, 1980).

Determinação do IC₅₀

A determinação do IC₅₀ foi realizada de acordo com o método da macrodiluição descrito no *Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI) M27-A2 (2005)* com modificações. Foi inoculado inicialmente 4×10^6 cél/ml de *P. brasiliensis* em meio líquido MMcM suplementado com o inibidor nas concentrações: 9 ug/ml, 18 ug/ml, 36 ug/ml e 72 ug/ml. Controle negativo foi feito em ausência do inibidor. A solução estoque do inibidor foi preparada em dimetilsulfóxido (DMSO) e água, a partir do qual as diluições foram preparadas. A cultura foi incubada a 36°C por 10 dias e leituras diárias foram realizadas em espectrofotômetro (530 nm) para determinação do crescimento celular.

Teste de sensibilidade em placas

O teste de sensibilidade em placas foi realizado em meio Fava Netto semi sólido, suplementado com tiossemicarbazida derivada do canfeno às concentrações 9 ug/ml, 18 ug/ml, 36 ug/ml e 72 ug/ml. Placas de controle negativo foram preparadas na ausência do inibidor. Foram inoculadas amostras de 10^5 , 10^6 e 10^7 células em cada placa. As placas foram incubadas por 7 dias a 36°C e fotografadas.

Teste de diferenciação micélio/levedura

O teste de diferenciação micélio/levedura foi realizado em meio MMcM líquido. Células tratadas e não tratadas tiveram sua temperatura de cultivo modificada de 23°C para 36°C para permitir a transição de micélio para levedura. As células foram previamente crescidas em meio líquido por 18 h antes do tratamento e mudança da temperatura de incubação. O tratamento teve a duração de 10 dias.

Linhagem celular e Cultivo

Para os ensaios biológicos foi utilizada a linhagem celular MRC-5 (Fibroblasto de pulmão humano). As células foram mantidas em cultura a 37°C, 5%CO₂ em meio DMEM suplementado com 10% de soro bovino fetal, 2 mM L-Gln, 100IU/mL de penicilina e 100µg/mL de estreptomicina segundo protocolo estabelecido pela *American Type Culture Collection* (ATCC, Rockville, MD, EUA).

Ensaio de viabilidade celular pelo método de redução do MTT

Para avaliar a atividade citotóxica de tiossemicarbazida derivada do canfeno foi utilizado o método colorimétrico de redução do MTT 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)2,5-Difenil Brometo de Tetrazolium). Para o teste, 5×10^5 de células s foram semeadas em microplacas de 96 poços na ausência ou presença do composto e incubadas em estufa a 37°C com atmosfera contendo 5% de CO₂. Ao final do período de incubação, foi adicionado aos poços de cultivo celular 10 µL de MTT na concentração de 5 mg.mL⁻¹, e após 3 h de incubação com o MTT, foram acrescentados 50 µL SDS. A quantificação da densidade óptica (DO) foi medida em espectrofotômetro. A porcentagem de viabilidade celular foi determinada.

Resultados e Discussão

Tiossemicarbazida derivada do canfeno foi avaliada quanto à capacidade inibitória de crescimento celular de *P. brasiliensis*. O macroensaio de determinação do IC₅₀ do inibidor foi realizado (Figura 1). De acordo com os resultados obtidos, o composto testado demonstrou uma inibição do crescimento de células leveduriformes de *P. brasiliensis* de modo dose-dependente. Os cálculos determinaram que 18 µg/ml inibe 50% do crescimento celular. Tais dados estão de acordo com os resultados mostrados na Figura 2 que demonstra a inibição do crescimento celular em placa no meio Fava Netto.

Sabe-se que a capacidade de alteração morfológica é um importante mecanismo de virulência e patogenicidade de *P. brasiliensis*. O dimorfismo é considerado um mecanismo de defesa importante para a adaptação do fungo às condições adversas do hospedeiro humano, a invasão dos tecidos e ao estabelecimento da doença (SAN-BLAS *et al.*; 2002). O estímulo ambiental determinante na transição entre as formas de micélio e levedura em *P. brasiliensis* é a temperatura, sendo que além deste, fatores nutricionais também podem interferir no processo de diferenciação do patógeno. (VILLAR *et al.*, 1988). Desta forma, realizamos teste de diferenciação para avaliar as possíveis mudanças morfológicas causadas pela ação do inibidor. Células de micélio de *P. brasiliensis* foram expostas à diferentes concentrações de tiossemicarbazida derivada do canfeno, cultivadas à temperatura de 36°C e analisadas em microscópio óptico por 10 dias (Figura 3A). A contagem do aparecimento de leveduras no decorrer dos dias (Figura 3B) demonstra que tiossemicarbazida derivada do canfeno não influencia o processo de transição micélio/levedura do fungo *P. brasiliensis*. A maior concentração testada (72 ug/ml) inibe o processo de diferenciação, contudo de forma não significativa (Figura 3B).

Para o ensaio de MTT nenhuma diferença significativamente estatística foi encontrada entre o material experimental e o grupo controle. Tiossemicarbazida derivada do canfeno não inibiu a viabilidade celular. Estes resultados são expressos por meio da porcentagem de viabilidade dos tratados e grupo controle (Figura 4). As concentrações testadas no método de MTT são as mesmas dos ensaios anteriores. O IC₅₀ deste composto em células de fibroblasto de pulmão humano é acima da concentração de 72 ug/ml, a maior concentração testada.

Conclusão

Tiossemicarbazida derivada do canfeno foi sistematicamente identificada neste estudo como um composto inibidor do crescimento de *P. brasiliensis*, sendo seu IC₅₀ de 18 ug/ml. O composto demonstra ainda não ser tóxico para células humanas, mesmo em altas concentrações. Estes resultados podem servir como ponto de partida para a seleção de um agente adequado como protótipo a antifúngico. Estudos sobre o transcriptoma do fungo em presença da droga estão sendo realizados para determinação de seu mecanismo de ação.

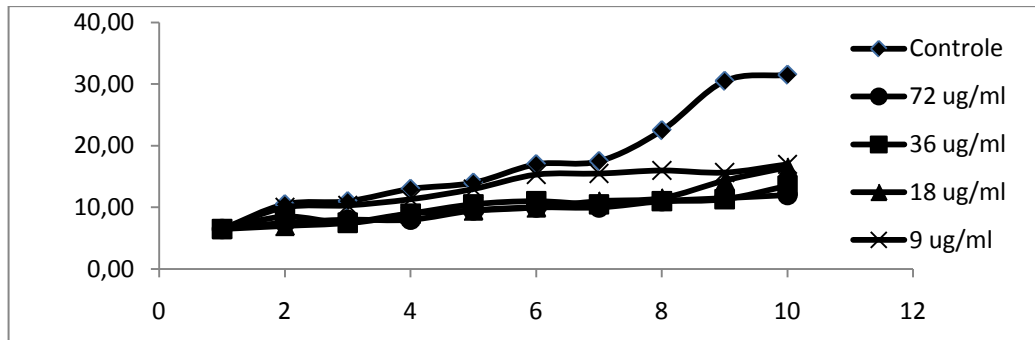


Figura 1: Efeito de tiossemicarbazida derivada do canfeno contra o crescimento de células leveduriformes de *P. brasiliensis*.

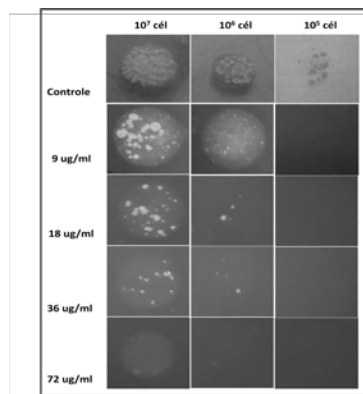
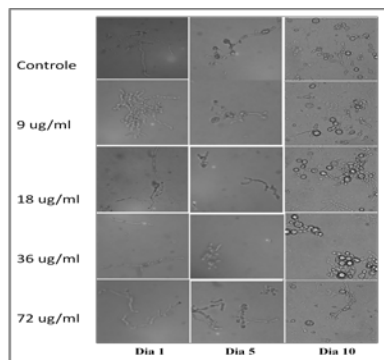


Figura 2: Efeito de tiossemicarbazida derivada do canfeno no crescimento celular da levedura de *P. brasiliensis*.

A)



B)

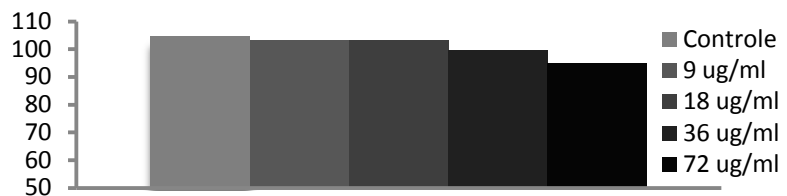


Figura 3: Efeito de tiossemicarbazida derivada do canfeno no processo de diferenciação micélio/levedura. A morfologia celular foi observada em microscópio óptico (A) e o aparecimento de leveduras foi mensurado pela contagem das células leveduriformes nos tratamentos e no controle em câmara de Neubauer (B).

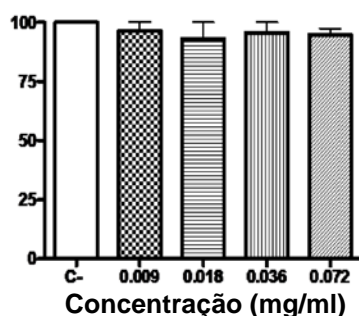


Figura 4 – Viabilidade celular (%) da linhagem celular MRC5 de fibroblasto de pulmão humano na presença de tiossemicarbazida derivada do canfeno. O controle negativo foi realizado em ausência do inibidor.

Referências

Hahn, R. C.; *et al.* (2003) Disseminated paracoccidioidomycosis: correlation between clinical and *in vitro* resistance to ketoconazole e trimethoprim sulphamethoxazole. **Mycoses**, v. 46, p. 403-407..

Restrepo, A.; Jiménez, B. (1980) Growth of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast phase in a chemically defined culture medium. **Journal of Clinical Microbiology**. 12: 279-281. 1980.

San-Blas, G.; Niño-Vega, G.; Iturriaga, T. (2002). *Paracoccidioides brasiliensis* and paracoccidioidomycosis: molecular approaches to morphogenesis, diagnosis, epidemiology, taxonomy and genetics. **Med. Mycol.** 40:225-242.

Santos, G.D., Ferri, P.H., Santos, C.S., Silva, M.R.R., Bao, S.N., Soares, C.M.A., Pereira, M. (2007) Oenothelin B from the Brazilian Cerrado plant *Eugenia uniflora* inhibits 1,3- β -glucan synthase transcript accumulation and induces hallmark changes in the morphology of the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **Medical Mycology**. 45:609-618.

Shikanai-Yasuda, M. A.; *et al.* (2006) Consenso em Paracoccidioidomicose. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 3, p. 297-310.

Villar, L. A.; Salazar, M. E. & Restrepo, A. (1988). Morphological study of a variant of *Paracoccidioides brasiliensis* that exists in the yeast form at room temperature. **J Med Vet Mycol** 26(5): 269-276.

Wilson RA & Danishefsky SJ (2006) Small molecules natural products in the discovery of therapeutic agents: the synthesis connection. **Journal of Organic Chemistry**, 71:8329-8351.

Yamaguchi U.M., Silva APB, Nakamura TU, Filho BPD, Silva CC, Nakamura CV (2009) Effects of a thiosemicarbazide camphene derivative on Trichophyton mentagrophytes. **Molecules** 14:1796-1807.