



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CEILÂNDIA
CURSO DE FARMÁCIA**

HIGOR DE OLIVEIRA QUEIROZ

**PROSPECÇÃO DE ATIVIDADE ANTIFÚNGICA EM EXTRATOS DE
Acanthamoeba castellanii.**

BRASÍLIA, 2023

HIGOR DE OLIVEIRA QUEIROZ

**PROSPECÇÃO DE ATIVIDADE ANTIFÚNGICA EM EXTRATOS DE
Acanthamoeba castellanii.**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado como requisito parcial para
obtenção do grau de Farmacêutico,
Faculdade de Ceilândia, Universidade de
Brasília.

Orientadora: Profa. Dra. Patricia Albuquerque de Andrade Nicola

Co-orientadora: Profa. Dra. Izabel Cristina Rodrigues da Silva

BRASÍLIA, 2023

HIGOR DE OLIVEIRA QUEIROZ

**PROSPECÇÃO DE ATIVIDADE ANTIFÚNGICA EM EXTRATOS DE
Acanthamoeba castellanii.**

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Dra. Patricia Albuquerque de Andrade Nicola
(Universidade de Brasília)

Co-orientadora: Profa. Dra. Izabel Cristina Rodrigues da Silva
(Universidade de Brasília)

Dr. Jhones do Nascimento Dias
(Universidade Federal do Delta do Parnaíba)

M.Sc Thalita Kellen Silva Pinheiro
(Universidade de Brasília)

BRASÍLIA, 2023

Resumo

Introdução: Micoses sistêmicas são motivo de preocupação em decorrência do aumento de sua frequência, no Brasil e em todo o mundo, frente às escassas e limitadas opções terapêuticas, muitas vezes tóxicas, de alto custo e já ineficazes devido à resistência adquirida pelos patógenos. Nesse sentido, há uma necessidade emergente de novas moléculas com potencial antifúngico capazes de substituir e/ou complementar as terapêuticas já existentes. Com base em estudos prévios do nosso grupo, observamos que amebas de solo podem utilizar outros mecanismos, em adição à fagocitose, para matar fungos. Dessa maneira, decidimos investigar se extratos da ameba de solo *Acanthamoeba castellanii* poderiam fornecer moléculas com potencial atividade antifúngica. **Objetivo:** Testar a atividade antifúngica do sobrenadante e do lisado bruto dessa ameba (suspensão celular lisada), bem como das frações polares e apolares, de culturas de *A. castellanii* contra fungos patogênicos, dentre os quais *Cryptococcus neoformans* (linhagem H99), *Cryptococcus gattii* (linhagem R265), *Paracoccidioides brasiliensis* (linhagem Pb18) e *Paracoccidioides lutzii* (linhagem Pb01). **Métodos:** Crescimento de células de *A. castellanii* em garrafas de cultivo em meio PYG. Coleta do sobrenadante, lavagem e coleta das células que foram submetidas à lise por sonicação. Extração de lipídios pelo método de Bligh and Dye para separação de extratos polares e apolares. Cultivo dos diferentes fungos segundo protocolos já bem estabelecidos. Testes de avaliação de atividade antifúngica, seguindo protocolos de microdiluição em caldo propostos pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), M27-A3, com algumas modificações. Experimentos realizados em placas de 96 poços, visando à determinação de atividade inibitória dos extratos. **Resultados:** Resultados evidenciaram o efeito inibitório da suspensão celular lisada contra *Paracoccidioides* spp., numa diluição de 1:8 do extrato bruto, mas não foi observado efeito inibitório contra *Cryptococcus* spp. Nos testes com as frações, usamos apenas *C. neoformans*, mas tivemos problemas para ressuspender os extratos apolares em concentrações não inibitórias de dimetilsufóxido (DMSO). Infelizmente não conseguimos resultados conclusivos dos ensaios com *P. brasiliensis*, uma vez que tivemos problemas no cultivo dos fungos. **Conclusão:** A princípio os sobrenadantes das amebas, nem os extratos brutos induziram inibição no crescimento de *C. neoformans* ou *C. gattii*. Observamos uma inibição do crescimento de *P.*

brasiliensis e *P. lutzii* na presença do extrato bruto, mas outros testes precisam ser concluídos para confirmarmos se essa atividade estaria em frações polares ou apolares do extrato.

Palavras-chave: *Paracoccidioides* spp.; *Cryptococcus* spp.; amebas; *Acanthamoeba castellanii*; prospecção de moléculas com atividade antifúngica.

Abstract

Introduction: Systemic mycoses are a cause for concern due to the increase in their frequency, in Brazil and around the world, given the scarce and limited therapeutic options, which are often toxic, high-cost and already ineffective due to the resistance acquired by the pathogens. In this sense, there is an emerging need for new molecules with antifungal potential capable of replacing and/or complementing existing therapies. Based on previous studies by our group, we observed that soil amoebas can use other mechanisms, in addition to phagocytosis, to kill fungi. Therefore, we decided to investigate whether extracts from the soil amoeba *Acanthamoeba castellanii* could provide molecules with potential antifungal activity. **Objective:** Test the antifungal activity of the supernatant and crude lysate of this amoeba and lysed cell suspension, as well as the polar and nonpolar fractions, of *A. castellanii* cultures against pathogenic fungi, including *Cryptococcus neoformans* (strain H99), *Cryptococcus gattii* (strain R265), *Paracoccidioides brasiliensis* (strain Pb18) and *Paracoccidioides lutzii* (strain Pb01). **Methods:** Growth *A. castellanii* cells in culture bottles in PYG medium. Collection of the supernatant, washing and collection of cells that were subjected to lysis by sonication. Lipid extraction using the Bligh and Dye method for separation of polar and nonpolar extracts. Cultivation of different fungi according to well-established protocols. Antifungal activity evaluation tests, following broth microdilution protocols proposed by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), M27-A3, with some modifications. Experiments carried out in 96-well plates, aiming to determine the inhibitory activity of the extracts. **Results:** Results showed the inhibitory effect of the lysed cell suspension against *Paracoccidioides* spp., in a 1:8 dilution of the crude extract, but no inhibitory effect was observed against *Cryptococcus* spp. In testing the fractions, we used only *C. neoformans*, but we had problems resuspending the nonpolar extracts in non-inhibitory concentrations of dimethyl sulfoxide (DMSO). Unfortunately, we were unable to obtain conclusive results from the tests with *P. brasiliensis*, as we had problems cultivating the fungi. **Conclusion:** In principle, the amoeba supernatants nor the crude extracts induced inhibition in the growth of *C. neoformans* or *C. gattii*. We observed an inhibition of the growth of *P. brasiliensis* and *P. lutzii* in the presence of the crude extract, but other tests need to be completed to confirm whether this activity would be in polar or nonpolar fractions of the extract.

Keywords: *Paracoccidioides* spp.; *Cryptococcus* spp.; amoebas; *Acanthamoeba castellanii*; prospecting for molecules with antifungal activity.

Lista de Ilustrações

Figuras

Figura 1 – Avaliação da atividade antifúngica de lisado de <i>A. castellanii</i> contra linhagem Pb18	27
Figura 2 – Avaliação da atividade antifúngica de lisado de <i>A. castellanii</i> contra linhagem Pb01	27
Figura 3 – Avaliação da atividade antifúngica de lisado de <i>A. castellanii</i> contra linhagem H99	28
Figura 4 – Avaliação da atividade antifúngica de lisado de <i>A. castellanii</i> contra linhagem R265	28
Figura 5 – Avaliação da atividade antifúngica do extrato polar de <i>A. castellanii</i> contra linhagem H99	29
Figura 6 – Avaliação da atividade antifúngica do extrato apolar de <i>A. castellanii</i> , em concentração de 10% de DMSO, contra linhagem H99	29
Figura 7 – Avaliação da atividade antifúngica do extrato apolar de <i>A. castellanii</i> , em concentração de 5% de DMSO, contra linhagem H99	30
Figura 8 – Avaliação da atividade antifúngica do extrato apolar a 1 mg/mL de <i>A. castellanii</i> contra H99	30
Figura 9 – Avaliação da atividade antifúngica do extrato apolar a 10 mg/mL de <i>A. castellanii</i> contra H99	31

Sumário

1. Introdução	8
1.1. Fungos	8
1.1.1. <i>Cryptococcus</i> spp. e criptococose	9
1.1.2. <i>Paracoccidioides</i> spp. e paracoccidioidomicose	10
1.2. Micoses sistêmicas e antifúngicos	11
1.3. <i>Acanthamoeba castellanii</i>	12
2. Justificativa	13
3. Objetivos	14
3.1. Objetivo geral	14
3.2. Objetivo específico	14
4. Artigo	14
5. Referências Bibliográficas	34

1. Introdução

1.1. Fungos

Fungos são organismos eucariotos, multicelulares – à exceção das leveduras – pertencentes ao reino *Fungi*. São quimio-heterotróficos, alimentando-se por absorção, e, em grande maioria, são aeróbios ou anaeróbios facultativos, com alguns raros exemplos conhecidos de anaeróbios. Ademais, reproduzem-se por esporos sexuais ou assexuais (TORTORA, 2017; MURRAY, 2022).

As estruturas vegetativas, ou colônias, desses organismos envolve, para fungos filamentosos, formação de hifas, enormes filamentos conectados de células, que se dividem em porção vegetativa, responsável pela obtenção de nutrientes, e reprodutiva, também chamada aérea, já que se projeta acima da superfície sobre a qual o fungo se desenvolve, sustentando os esporos reprodutivos. Estes podendo ser assexuais, provenientes das hifas, os quais se tornam organismos idênticos aos parentais quando germinados, e sexuais, que ocorre em menor frequência e é resultado da fusão de núcleos de duas linhagens de mesma espécie, apresentando, portanto, características genéticas variadas. Quando em condições favoráveis, essas hifas formam uma massa visível a olho nu, denominada micélio (ZAITZ, 2010).

As leveduras, por outro lado, são unicelulares e não filamentosas, geralmente esféricas ou ovais. Sua reprodução se dá por brotamento, a partir do surgimento de brotos da célula parental – podendo-se gerar até 24 células-filhas – ou por fissão, quando a célula parental produz duas células-filhas iguais. Grande parte dessas leveduras possuem a característica de serem anaeróbias facultativas: na presença de oxigênio, metabolizam o carboidrato formando dióxido de carbono (CO₂) e água; na ausência, realizam a fermentação, produzindo CO₂ e etanol como produtos (BRASIL, 2013).

Há, ainda, fungos que exibem, em seu ciclo de vida, dimorfismo, isso é, as duas formas acima citadas de crescimento. Dessa maneira, podem crescer tanto na forma de fungos filamentosos, produzindo hifas aéreas e vegetativas, quanto leveduriforme, reproduzindo-se por brotamento. Tendem a ser patogênicos, e essa característica depende de fatores como temperatura – a 37°C, o fungo apresenta forma de levedura, e a 25°C, forma de bolor – e concentração de CO₂ (MURRAY, 2022).

Pelo pH de desenvolvimento próximo a 5, a resistência à pressão osmótica, a proliferação em locais pouco úmidos e a capacidade de metabolizarem carboidratos complexos (como a lignina, da madeira), são encontrados em diversos locais, sendo de muita importância. Assim, embora apenas 200, das mais de 100 mil espécies conhecidas sejam patogênicas aos seres humanos, a incidência de importantes infecções fúngicas – micoses – tem se elevado nos últimos anos. Nesse cenário, são impulsoras de preocupação as micoses sistêmicas, infecções profundas não transmissíveis as quais podem afetar vários órgãos e tecidos, causadas principalmente por fungos de solos, mediante a inalação de esporos – motivo pelo qual normalmente se inicia nos pulmões (TORTORA, 2017).

1.1.1. *Cryptococcus* spp. e criptococose

Cryptococcus é um gênero de fungos basidiomicetos – produzem esporos sexuais chamados basídios (TORTORA, 2017) – que compreende mais de 30 espécies distribuídas no ambiente. Destas, apenas duas são conhecidas por causarem doenças em humanos: *C. gattii*, historicamente associado a pacientes imunocompetentes, causando especialmente infecções pulmonares, e *C. neoformans*, mais comum e atrelado principalmente a meningoencefalites em imunocomprometidos (Maziarz & Perfect, 2016 e Gushiken *et al.*, 2021).

C. neoformans é sabidamente distribuído em todo o globo, sendo encontrado, sobretudo no solo, em árvores e em excrementos de aves, enquanto *C. gattii*, antes supostamente restrito a regiões tropicais e subtropicais associado a eucaliptos, tem sido identificado, por meio de testes moleculares em outras áreas ao redor do mundo, desde a década de 1990 (Gushiken *et al.*, 2021). A distinção dessas duas espécies, anteriormente dada pela diferença na estrutura da cápsula polissacarídica, foi recentemente reformulada a partir de testes moleculares os quais revelaram heterogenicidade genética e propuseram sete novas espécies e quatro clados híbridos (Gushiken *et al.*, 2021).

Denomina-se criptococose a doença de relevância global provocada pelas leveduras das espécies supracitadas e, embora *C. neoformans* tenha sido descrito primeiramente no final do século 19, foi somente na década de 1970 que as infecções se tornaram alvo de preocupação, com até 1 milhão de novos casos anualmente, dos quais se pode atribuir grande parte da morbimortalidade aos pacientes HIV positivos e com AIDS (Maziarz & Perfect, 2016). As complicações mais comuns da doença

envolvem a infecção dos pulmões e do Sistema Nervoso Central (SNC), sendo a meningite criptocócica a mais grave e, apesar dos avanços no diagnóstico e no tratamento da criptococose, bem como o aumento da disponibilidade e do sucesso no tratamento de antirretrovirais, a incidência e a mortalidade dessa doença permanecem altas (Maziarz & Perfect, 2016 e Gushiken *et al.*, 2021).

1.1.2. *Paracoccidioides* spp. e paracoccidioidomicose

Paracoccidioides é um outro gênero de importância médica, sobretudo no Brasil, pertencente ao filo Ascomycota, cujos fungos, descritos como termodimórficos, apresentam crescimento micelial de 22° a 24° C, exibindo hifas septadas finas, clamidósporos ocasionais e conídios, e leveduriforme, entre 36° a 37° C, de brotamento múltiplo (Gioconda SAN-BLAS & Felipe SAN-BLAS, 1977; Cordova LA, Torres J., 2022). Seu desenvolvimento se dá especialmente no solo de regiões úmidas, com temperaturas amenas, com presença de florestas e rios, e sua infecção é, característica e frequentemente, relatada em áreas de cultivo de café e tabaco (Cordova LA, Torres J., 2022).

Até 2005, somente se tinha conhecimento da espécie *P. brasiliensis*, assim nomeado por Floriano Paulo de Almeida, em 1930, após descrições e relatos de casos clínicos pretéritos (Cordova LA, Torres J., 2022). Em 2006, quatro variantes foram reveladas por meio de estudos genéticos de Matute *et al.* e, em 2009, Teixeira e outros descreveram a nova espécie *Paracoccidioides lutzii*, na região centro-oeste do Brasil. Turissini *et al.* (2017) propuseram nova classificação para o *P. brasiliensis* a partir das variantes, compreendendo quatro novas espécies, as quais foram confirmadas em 2020, quando de estudos de sequenciamento do genoma inteiro (Peçanha, P.M *et al.*, 2022).

Paracoccidioidomicose é como se denomina a doença causada pelas espécies supracitadas, endêmicas nas Américas Central e, principalmente, do Sul, cujo início se dá pela inalação de conídios ou fragmentos de micélios presentes no solo os quais chegam aos alvéolos pulmonares, convertendo-se à fase leveduriforme e podendo se espalhar por todo o organismo (Santos, L. A. *et al.*, 2020; Cordova LA, Torres J., 2022).

A doença dispõe de duas apresentações: aguda, que atinge, sobretudo, a população mais jovem, sem distinção de sexo, evoluindo de maneira mais rápida; e crônica, atingindo especialmente indivíduos do sexo masculino – devido ao efeito

protetor do estrogênio feminino (Peçanha, P.M *et al.*, 2022) –, com um período de latência que pode chegar a 40 anos, segundos relatos documentados – por isso, milhares de pessoas podem estar infectadas, sem necessariamente manifestarem os sintomas da doença (Santos, L. A. *et al.*, 2020).

O Brasil é responsável por 80% dos casos registrados em todo o mundo, todavia, com incidência entre um e quatro novos casos a cada 100 mil habitantes anualmente, à exceção da região norte, de colonização mais recente, cuja incidência varia entre nove e 40 novos casos a cada 100 mil habitantes, dados que coadunam com o aumento da mortalidade somente nessa região, em contraponto ao decréscimo registrado no restante do País. A nível de exemplificação dessa discrepância, o estado do Paraná que contabilizava entre 3 e 4,29 por milhões de habitantes entre as décadas de 80 e 95, apresentou redução para 1,27 entre os anos de 2007 e 2020; em contrapartida, o estado nortenho de Rondônia, que, no mesmo período, apresentava mortalidade de 3,65, entre os anos de 2002 e 2004, atingiu uma taxa de 8,2 por milhão de habitantes (Peçanha, P.M *et al.*, 2022).

1.2. Micoses sistêmicas e antifúngicos

Essas micoses, cujos fungos causadores são alvos de atenção deste estudo, e outras não mencionadas, são motivos de preocupação em decorrência da sua frequência, que tem aumentado em todo o mundo. Influenciam para esse cenário os hospedeiros imunocomprometidos, incluindo pacientes submetidos a transplante de medula óssea e órgãos sólidos, pacientes em tratamento com quimioterapia citotóxica para doenças neoplásicas e aqueles com imunodeficiências primárias ou adquiridas, como a AIDS; o advento de tecnologias médicas, com técnicas e procedimentos mais invasivos; bem como o incremento populacional em regiões endêmicas, além das migrações turísticas (Tirado-Sánchez *et al.*, 2020; Hernández e Martinez, 2018; T.J. Walsh, A.H. Groll, 1999).

Ademais, somam-se a isso fatores climáticos e ambientais, que, nos últimos anos têm se modificado em resposta à interferência humana. Assim, sugere-se uma relação, mesmo que sutil entre desastres naturais e o posterior acréscimo de micoses endêmicas, em virtude, sobremaneira, da aerossolização e espalhamento de esporos pelo movimento do substrato; ou ainda do aumento da umidade, em decorrência de enchentes e inundações, proporcionando um ambiente favorável ao desenvolvimento desses organismos e, conseqüentemente, à elevação de endotoxinas ou outros

compostos voláteis secretados, ligados a comprometimento do sistema respiratório e outras complicações (Hernández e Martinez, 2018).

Em contrapartida, pelas poucas classes de antifúngicos disponíveis (polienos, azóis, equinocandinas e flucitosina) perpassam problemas relacionados ao mecanismo de ação e à resistência. A respeito do primeiro caso, pode-se salientar (1) a intensa toxicidade dos polienos, pois atuam ligando-se ao ergosterol, o que provoca efeitos no colesterol presente em células humanas; (2) as perigosas interações com o sistema enzimático CYP450, além de eventos hepatotóxicos importantes relacionados à classe do azóis, os quais são inibidores da síntese de ergosterol; (3) a restrição à forma intravenosa das equinocandinas, que, por outro lado, têm poucas interações significativas e parecem ter toxicidade mais tolerável, além de atuarem inibindo a parede celular fúngica, estrutura não presente em humanos; e (4) a ação da flucitosina, que é inibidora da síntese de ácido nucleico, podendo causar supressão importante da medula óssea (Van Daele *et al.*, 2019).

Outrossim, a resistência antifúngica às drogas de escolha perpassa todas as classes supracitadas, limitando, muitas vezes, a terapia, que já conta com poucas opções. Várias condições contribuem para esse cenário, dentre as quais a condição do hospedeiro, quando imunossuprimido, a medicação de maneira profilática e empírica, em decorrência do desenvolvimento de drogas menos tóxicas (embora essa crescente resistência seja observada mesmo em pacientes em tratamentos prévios, segundo Van Daele *et al.*) e a utilização de fungicidas agrícolas os quais, ao que parece, têm impulsionado resistência adquirida aos medicamentos em espécies de *Aspergillus*. Os mecanismos moleculares que causam resistência aos medicamentos ocorrem naturalmente em espécies menos suscetíveis e são adquiridos em cepas de organismos suscetíveis e incluem alterações na interação droga-alvo, redução da droga mediada por transportadores de efluxo e barreiras de permeabilidade associadas a biofilmes (DS Perlin *et al.*, 2017).

1.3. *Acanthamoeba castellanii*

São organismos de vida livre encontrados em solos e águas, cujo ciclo de vida se dá em dois estágios, um trofozoístico, de tamanho médio entre 25 e 40 µm, em que a célula está metabolicamente ativa, alimentando-se de bactérias e fungos, reproduzindo-se (fissão binária) e se locomovendo pela emissão de pseudópodes; e outro cístico, medindo de 13 a 20 µm de diâmetro, quando as condições ambientais

desfavoráveis forçam a redução do metabolismo e a célula entra em latência, na forma de cisto, formado por dupla parede (Ribeiro, N., 2017).

Em virtude de estudos pretéritos os quais visavam à compreensão dos mecanismos de patogenicidade de *Cryptococcus*, *Paracoccidioides* e outros, evidenciou-se a interação desses fungos com amebas de vida livre, fornecendo indícios comprovadores da hipótese de que a coexistência das saprófitas de solo com as amebas impulsionaram evolução da virulência dessas espécies, cujas características fenotípicas adquiridas permitem não apenas o escape às amebas, mas também o escape às defesas imunológicas dos mamíferos; e demonstrando a habilidade de amebas de solo de matarem células fúngicas, mesmo na ausência de internalização. (Albuquerque, P. *et al.*, 2019; Chrisman, C. J. *et al.*, 2011).

Nesse sentido, é razoável pensar que, com uma história coevolutiva longa, as amebas possam ter desenvolvido estratégias melhores para lidar com células fúngicas do que os mamíferos, uma vez que interações entre grupos de organismos, como amebas e fungos, levam à pressão seletiva e à evolução (Nicola *et al.*, 2019).

2. Justificativa

Vivencia-se, atualmente, uma elevação significativa na incidência de doenças fúngicas humanas e nas taxas de mortalidade e morbidade a elas associadas, devendo-se esse crescimento, em parte, ao aumento no número de pacientes imunocomprometidos, como HIV positivos, ou submetidos a transplantes ou outros tratamentos imunossupressores; ademais, colaboram, também, para esse cenário mudanças ambientais, como desmatamento e aquecimento global (Hernandez e Martinez, 2018).

Em contrapartida, existe, ainda, um número limitado de classes de antifúngicos, muitas desses apresentando alto custo e baixa toxicidade seletiva, frente a um incremento no número de micoses sistêmicas de cepas com resistência natural ou adquirida aos antifúngicos disponíveis (Nicola *et al.*, 2019).

A relevância do trabalho está, então, atrelada à necessidade do estudo de novos compostos capazes de frear a atual conjuntura, de nível de preocupação não somente nacional, mas mundial.

Ademais, experimentos anteriores de microdiluição em caldo, realizados a partir dos protocolos do Clinical and Laboratory Standards Institute, com algumas

modificações, demonstraram o efeito inibitório dos extratos celulares desses protozoários, demandando continuidade nos estudos.

3. Objetivos

3.1. Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho foi testar a atividade antifúngica do extrato celular de *Acanthamoeba castellanii*, bem como as frações polar e apolar desse extrato, a fim de se determinar efeito inibitório para algumas espécies de fungos patogênicos de interesse médico.

3.2. Objetivos específicos

Desenvolveu-se a atividade com os seguintes objetivos específicos:

- 1) cultivar e coletar após confluência extrato celular de *Acanthamoeba castellanii*;
- 2) submeter, após ressuspensão em solução salina, extrato coletado à lise celular por sonicação;
- 3) realizar separação de frações polares e apolares do extrato, pelo método de extração de lipídios de Bligh and Dyer;
- 4) testar os efeitos da suspensão de lisado celular, bem como dos extratos polares e apolares no crescimento de diferentes linhagens de *Cryptococcus* spp e *Paracoccidioides* spp., para se determinar Concentração Inibitória Mínima (CIM).

4. Artigo

PROSPECÇÃO DE ATIVIDADE ANTIFÚNGICA EM EXTRATOS DE *Acanthamoeba castellanii*.

Higor de Oliveira Queiroz^{1*}, Patricia Albuquerque de Andrade Nicola^{2**}

¹Graduando de Farmácia, Faculdade de Ceilândia, Universidade de Brasília, Distrito Federal, Brasil.

²Professora adjunta da Faculdade de Ceilândia, Programas de Pós-Graduação em Medicina Tropical, Patologia Molecular e Biologia Microbiana, Universidade de Brasília, Distrito Federal, Brasil.

* e-mail: higoroqueiroz@gmail.com

** Autor correspondente: palbuquerque@unb.br

Abstract

Introduction: Systemic mycoses are a cause for concern due to the increase in their frequency, in Brazil and around the world, given the scarce and limited therapeutic options, which are often toxic, high-cost and already ineffective due to the resistance acquired by the pathogens. In this sense, there is an emerging need for new molecules with antifungal potential capable of replacing and/or complementing existing therapies. Based on previous studies by our group, we observed that soil amoebas can use other mechanisms, in addition to phagocytosis, to kill fungi. Therefore, we decided to investigate whether extracts from the soil amoeba *Acanthamoeba castellanii* could provide molecules with potential antifungal activity. **Objective:** Test the antifungal activity of the supernatant and crude lysate of this amoeba and lysed cell suspension, as well as the polar and nonpolar fractions, of *A. castellanii* cultures against pathogenic fungi, including *Cryptococcus neoformans* (strain H99), *Cryptococcus gattii* (strain R265), *Paracoccidioides brasiliensis* (strain Pb18) and *Paracoccidioides lutzii* (strain Pb01). **Methods:** Growth *A. castellanii* cells in culture bottles in PYG medium. Collection of the supernatant, washing and collection of cells that were subjected to lysis by sonication. Lipid extraction using the Bligh and Dye method for separation of polar and nonpolar extracts. Cultivation of different fungi according to well-established protocols. Antifungal activity evaluation tests, following broth microdilution protocols proposed by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), M27-A3, with some modifications. Experiments carried out in 96-well plates, aiming to determine the inhibitory activity of the extracts. **Results:** Results showed the inhibitory effect of the lysed cell suspension against *Paracoccidioides* spp., in a 1:8 dilution of the crude extract, but no inhibitory effect was observed against *Cryptococcus* spp. In testing the fractions, we used only *C. neoformans*, but we had problems resuspending the nonpolar extracts in non-inhibitory concentrations of dimethyl sulfoxide (DMSO). Unfortunately, we were unable to obtain conclusive results from the tests with *P. brasiliensis*, as we had problems cultivating the fungi. **Conclusion:** In principle, the amoeba supernatants nor the crude extracts induced inhibition in the growth of *C.*

neoformans or *C. gattii*. We observed an inhibition of the growth of *P. brasiliensis* and *P. lutzii* in the presence of the crude extract, but other tests need to be completed to confirm whether this activity would be in polar or nonpolar fractions of the extract.

Keywords: *Paracoccidioides* spp.; *Cryptococcus* spp.; amoebas; *Acanthamoeba castellanii*; prospecting for molecules with antifungal activity.

Resumo

Introdução: Micoses sistêmicas são motivo de preocupação em decorrência do aumento de sua frequência, no Brasil e em todo o mundo, frente às escassas e limitadas opções terapêuticas, muitas vezes tóxicas, de alto custo e já ineficazes devido à resistência adquirida pelos patógenos. Nesse sentido, há uma necessidade emergente de novas moléculas com potencial antifúngico capazes de substituir e/ou complementar as terapêuticas já existentes. Com base em estudos prévios do nosso grupo, observamos que amebas de solo podem utilizar outros mecanismos, em adição à fagocitose, para matar fungos. Dessa maneira, decidimos investigar se extratos da ameba de solo *Acanthamoeba castellanii* poderiam fornecer moléculas com potencial atividade antifúngica. **Objetivo:** Testar a atividade antifúngica do sobrenadante e do lisado bruto dessa ameba (suspensão celular lisada), bem como das frações polares e apolares, de culturas de *A. castellanii* contra fungos patogênicos, dentre os quais *Cryptococcus neoformans* (linhagem H99), *Cryptococcus gattii* (linhagem R265), *Paracoccidioides brasiliensis* (linhagem Pb18) e *Paracoccidioides lutzii* (linhagem Pb01). **Métodos:** Crescimento de células de *A. castellanii* em garrafas de cultivo em meio PYG. Coleta do sobrenadante, lavagem e coleta das células que foram submetidas à lise por sonicação. Extração de lipídios pelo método de Bligh and Dye para separação de extratos polares e apolares. Cultivo dos diferentes fungos segundo protocolos já bem estabelecidos. Testes de avaliação de atividade antifúngica, seguindo protocolos de microdiluição em caldo propostos pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), M27-A3, com algumas modificações. Experimentos realizados em placas de 96 poços, visando à determinação de atividade inibitória dos extratos. **Resultados:** Resultados evidenciaram o efeito inibitório da suspensão celular lisada contra *Paracoccidioides* spp., numa diluição de 1:8 do extrato bruto, mas não foi observado efeito inibitório contra *Cryptococcus* spp. Nos testes com as frações,

usamos apenas *C. neoformans*, mas tivemos problemas para ressuspender os extratos apolares em concentrações não inibitórias de dimetilsulfóxido (DMSO). Infelizmente não conseguimos resultados conclusivos dos ensaios com *P. brasiliensis*, uma vez que tivemos problemas no cultivo dos fungos. **Conclusão:** A princípio os sobrenadantes das amebas, nem os extratos brutos induziram inibição no crescimento de *C. neoformans* ou *C. gattii*. Observamos uma inibição do crescimento de *P. brasiliensis* e *P. lutzii* na presença do extrato bruto, mas outros testes precisam ser concluídos para confirmarmos se essa atividade estaria em frações polares ou apolares do extrato.

Palavras-chave: *Paracoccidioides* spp.; *Cryptococcus* spp.; amebas; *Acanthamoeba castellanii*; prospecção de moléculas com atividade antifúngica.

1. Introdução

Micoses sistêmicas, cujos fungos causadores são alvos de atenção deste estudo, são motivos de preocupação em decorrência da sua frequência, que tem aumentado em todo o mundo. Influenciam para esse cenário os hospedeiros imunocomprometidos, incluindo pacientes submetidos a transplante de medula óssea e órgãos sólidos, pacientes em tratamento com quimioterapia citotóxica para doenças neoplásicas e aqueles com imunodeficiências primárias ou adquiridas, como a AIDS; o advento de tecnologias médicas, com técnicas e procedimentos mais invasivos; bem como o incremento populacional em regiões endêmicas, além das migrações turísticas [21; 9; 25].

Somam-se a isso, ainda, fatores climáticos e ambientais, que, nos últimos anos, têm se modificado em resposta à interferência humana. Assim, sugere-se uma relação, mesmo que sutil, entre desastres naturais e o posterior acréscimo de casos de micoses endêmicas, pela aerossolização e espalhamento de esporos pelo movimento do substrato; ou pelo aumento da umidade, em decorrência de enchentes e inundações [9].

Cryptococcus é um gênero de fungos basidiomicetos – produzem esporos sexuais chamados basídios [22] – que compreende mais de 30 espécies distribuídas no ambiente. Destas, apenas duas são conhecidas por causarem doenças – criptococose – em humanos: *C. gattii*, historicamente associado a pacientes imunocompetentes, causando especialmente infecções pulmonares, e *C.*

neoformans, mais comum e atrelado principalmente a meningoencefalites em imunocomprometidos [8;2].

Paracoccidioides é um outro gênero de importância médica, sobretudo no Brasil, pertencente ao filo Ascomycota, cujos fungos, descritos como termodimórficos, apresentam crescimento micelial de 22° a 24° C e leveduriforme, entre 36° a 37° C [18;6]. Seu desenvolvimento se dá especialmente no solo de regiões úmidas, com temperaturas amenas, com presença de florestas e rios, e sua infecção é, característica e frequentemente, relatada em áreas de cultivo de café e tabaco [6]. Paracoccidioidomicose é a doença causada por essas espécies endêmicas nas Américas Central e, principalmente, do Sul, com início pela inalação de conídios ou fragmentos de micélios presentes no solo os quais chegam aos alvéolos pulmonares, convertendo-se à fase leveduriforme e podendo se espalhar por todo o organismo [19;6].

Em contrapartida, as poucas classes de antifúngicos disponíveis possuem problemas relacionados ao mecanismo de ação e à resistência. Podem-se salientar a intensa toxicidade dos polienos, pois atuam ligando-se ao ergosterol, o que provoca efeitos no colesterol presente em células humanas, as perigosas interações com o sistema enzimático CYP450, além de eventos hepatotóxicos importantes relacionados à classe do azóis, os quais são inibidores da síntese de ergosterol e a ação da flucitosina, que é inibidora da síntese de ácido nucleico, podendo causar supressão importante da medula óssea [22].

Ademais, a resistência antifúngica às drogas de escolha perpassa todas as classes supracitadas, limitando, muitas vezes, a terapia, que já conta com poucas opções. Várias condições contribuem para esse cenário, dentre as quais a condição do hospedeiro, quando imunossuprimido, e a medicação de maneira profilática e empírica, em decorrência do desenvolvimento de drogas menos tóxicas (embora essa crescente resistência seja observada mesmo em pacientes em tratamentos prévios, segundo Van Daele *et al.*, 2019). Os mecanismos moleculares que causam resistência aos medicamentos ocorrem naturalmente em espécies menos suscetíveis e são adquiridos em cepas de organismos suscetíveis e incluem alterações na interação droga-alvo, redução da droga mediada por transportadores de efluxo e barreiras de permeabilidade associadas a biofilmes [15].

Nesse sentido, há uma necessidade emergente da prospecção de novas moléculas com potencial antifúngico capazes de substituir e/ou complementar as

terapêuticas já existentes. Pelas evidências de interação com outros seres, especialmente no solo, onde são encontrados fungos de interesse, protozoários do gênero *Acanthamoeba* spp. são importantes alvos de estudo, destacando-se, nessa linha de pesquisa, células de *Acanthamoeba castellanii* pelas várias semelhanças com fagócitos humanos, como macrófagos [4]. São organismos de vida livre encontrados em solos e águas, cujo ciclo de vida se dá em dois estágios, um trofozoístico, de tamanho médio entre 25 e 40 μm , em que a célula está metabolicamente ativa, alimentando-se de bactérias e fungos, reproduzindo-se (fissão binária) e se locomovendo pela emissão de pseudópodes; e outro cístico, medindo de 13 a 20 μm de diâmetro, quando as condições ambientais desfavoráveis forçam a redução do metabolismo e a célula entra em latência, na forma de cisto, formado por dupla parede [16].

Nessa senda, em virtude de estudos pretéritos os quais visavam à compreensão dos mecanismos de patogenicidade de *Cryptococcus*, *Paracoccidioides* e outros, evidenciou-se a interação desses fungos com amebas de vida livre, fornecendo indícios comprovadores da hipótese de que a coexistência das saprófitas de solo com as amebas impulsionaram evolução da virulência dessas espécies, cujas características fenotípicas adquiridas permitem não apenas o escape às amebas, mas também o escape às defesas imunológicas dos mamíferos; além de demonstrar a habilidade de amebas de solo de matarem células fúngicas, mesmo na ausência de internalização [1;4].

2. Materiais e Métodos

2.1. Cultivo, manutenção e coleta das células de *Acanthamoeba castellanii*

A. castellanii 30234 (American Type Culture Collection – ATCC, Manassas, VA, USA) foi cultivada em garrafas de cultura celular de 50 e 250 mL, de maneira axênica, em meio PYG (Proteose Peptona – Levedo – Glicose) – 2% proteose peptona, 0.1% extrato de levedura, 1.8% glicose, 0.1% citrato de sódio di-hidratado, 2.5 mM Na_2HPO_4 , 2.5 mM KH_2PO_4 , 4 mM MgSO_4 , 400 μM CaCl_2 e 50 μM $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$ –, o qual era semanalmente trocado, em estufa à temperatura ambiente [1].

Após a observação e constatação microscópica da confluência, as células eram descoladas, com leves batidas contra a garrafa, coletadas, centrifugadas a 1200 g por

5 minutos, para separação do sobrenadante, lavadas em solução salina e congeladas para uso posterior.

Para ensaios diretamente com o extrato celular, o sedimento coletado era submetido à lise celular por meio de sonicação (QSonica), por 1 minuto e 30 segundos, sob energia de 1279 J e temperatura de 20° C.

2.2. Cultivo e manutenção dos fungos

O cultivo de *Cryptococcus* se dá em meio Sabouraud dextrose ágar, em placas de Petri, as quais, depois de 48 horas de incubação a 30°, são armazenadas em refrigeradores (4°C), para uso posterior. Foram utilizadas, para os experimentos, as linhagens R265 (*Cryptococcus gattii*) e H99 (*Cryptococcus neoformans*).

Paracoccidioides são recultivados semanalmente em tubos contendo meio GPY – 2% glicose m/v, 1% peptona m/v, 0.5% extrato de levedura m/v e 2% ágar m/v – e estocados em estufa a 37°C [1]. Os testes foram feitos com as linhagens Pb01 (*Paracoccidioides lutzii*) e Pb18 (*Paracoccidioides brasiliensis*).

2.3. Preparação para os ensaios

Para os ensaios com *Cryptococcus*, é necessário crescer as células 24 horas antes, realizando-se o inóculo de uma colônia isolada em 10 mL de caldo Sauborad dextrose contidos em tubo de ensaio de 50 mL, o qual é levado à incubadora a 37° sob agitação. Passado o tempo, realiza-se a centrifugação a 1200 g por 5 minutos, descarta-se o sobrenadante e lavam-se as células em solução salina (PBS) por duas vezes.

Após contagem em hemocitômetro (Câmara de Neubauer), realizando-se diluição se necessário, as células eram ressuspensas em meio RPMI-1640 (Rosewell Park Memorie Institute; Sigma) na quantidade a ser utilizada para o experimento, a fim de se obter, ao final, uma concentração de 10^4 células/ mL por poço [7].

As células de *Paracoccidioides* spp., por sua vez, eram coletadas diretamente dos tubos e ressuspensas em água estéril ou PBS. Após contagem com o corante de viabilidade Floxina B (Sigma-Aldrich), o qual cora as células mortas, o mesmo procedimento de adequação de densidade das células, em RPMI, era realizado [1].

2.4. Extração Lipídica

Para alcance de resultados mais detalhados, foi realizado, também, o fracionamento de extratos celulares em fração polar e fração apolar, por meio do método de Bligh and Dyer [3]: em um tubo de ensaio de 50 mL, contendo sedimento celular de *A. castellanii*, adicionam-se 7,5 mL de uma mistura 1:2 (v/v) de clorofórmio e metanol, submetendo à agitação em vórtex por 15 minutos; em seguida, adicionam-se 2,5 mL de clorofórmio, novamente sob agitação por 1 minuto, e, por fim, 2,5 mL de água, agitando por mais 1 minuto. Após, centrifuga-se por 5 minutos, a 200 g, obtendo-se uma fase superior, polar, e, separada por uma interfase, uma fase inferior, apolar, que, cuidadosamente, eram coletadas e transferidas para tubos identificados.

Os tubos eram deixados abertos, com alguma proteção a fim de evitar partículas, sobre a bancada para a secagem do solvente e obtenção somente do sedimento de interesse. Visando à acurácia dos resultados, realizou-se, previamente, a pesagem de alguns tubos, os quais foram novamente pesados após completa secagem do solvente, para se determinar a massa extraída ao final e definir, após ressuspensão, a concentração para os ensaios.

Extratos polares eram ressuspensos em água e os apolares, em DMSO (dimetilsufóxido), composto orgânico, cuja fórmula (C_2H_6SO) lhe confere propriedade anfipática e, portanto, ideal para solubilizar substâncias apolares.

2.5. Ensaios e concentração dos extratos

Os ensaios de verificação da atividade antifúngica foram realizados de acordo com protocolos de microdiluição em caldo estabelecidos pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), M27-A3 [5], com algumas modificações, conforme de Souza-Silva *et al.*, 2018 [7]. O controle utilizado para todas as linhagens testadas foi Anfotericina B, na concentração inicial de 16 µg/mL ou 8 µg/mL.

A microdiluição era feita em placa de poliestireno de 96 poços, de modo a conter 100 µL, finalmente, por poço, sendo 50 µL do controle ou do extrato analisado e 50 µL do inóculo fúngico.

2.5.1. Lisado celular e fração polar do extrato de *A. castellanii*

Para os ensaios com os extratos lisados não fracionados e com a fração polar, inicialmente, na primeira linha, adicionavam-se 100 µL e, em série, diluía-se à metade da quantidade anterior com a água adicionada às outras linhas, até a linha G. Após a

diluição, descartavam-se os 50 µL finais. O mesmo protocolo era aplicado para o controle com AmB.

Não foram realizados testes da fração polar com linhagens de *Paracoccidioides*, uma vez que não se constatou atividade inibitória em experimento com espécies *C. gattii* e *C. neoformans*.

2.5.2. Fração apolar do extrato de *A. castellanii*

Nos ensaios com a fração apolar, com a finalidade de se manter a concentração de DMSO constante em todos os poços, a diluição, com as concentrações pré-definidas a partir de cálculos, do extrato, do solubilizante e da água era realizada em microtubos para cada linha e só então, individualmente, adicionada aos poços, uma vez que a microdiluição seriada com água alteraria, também, a concentração de dimetilsufóxido, o que poderia gerar dúvidas quanto aos resultados.

Para ensaios com concentrações conhecidas do extrato apolar, em mg/ml, realizou-se, previamente a pesagem de tubos de ensaio em balança analítica com cinco casas decimais, pensando-se novamente esses tubos após a completa secagem do solvente utilizado na extração. Posteriormente, esses extratos foram ressuspensos em quantidade de DMSO pré-definida, de modo a obter, após as diluições já mencionadas, microtubos contendo extrato na concentração de 1 mg/mL e 10 mg/mL, com DMSO a 1%.

2.6. Adequação de dimetilsufóxido

Experimentos paralelos com as linhagens fúngicas utilizadas não foram realizados, a fim de definir concentrações seguras as quais não provocassem incertezas em caso de resultados positivos.

Foram realizados ensaios com concentração de DMSO 10% e 5% na ressuspensão do extrato apolar, em testes com linhagem H99 – *C. neoformans*. No primeiro caso, evidenciou-se a ação proveniente do orgânico (figuras 6 e 7); na concentração de 5%, não houve controle que evidenciasse o efeito do solvente, no entanto, há evidências de que essa quantidade inibe em 50% o crescimento dessa cepa [17].

Ensaios posteriores foram corrigidos, padronizando a concentração do solubilizante a 1%, ainda que algumas evidências demonstrem que essa margem

pode ser maior, como é o caso do estudo de Rahul Nayak & Jianping Xu, 2010, com concentração de DMSO a 3% em testes com a cepa H99 [17].

2.7. Incubação e leitura de resultados

As placas eram incubadas a 37°C, sob agitação de 200 rpm, por 48 horas. A análise do resultado da inibição de *Cryptococcus* spp. se dava pela observação do fundo das placas: a turbidez, como nos controles de crescimento, indica resultado negativo para tal concentração; a limpidez, como nos controles em branco e positivo, resultado positivo.

Para as linhagens de *Paracoccidioides* spp., passadas essas 48 horas, era preciso adicionar, em cada poço, 10 µL de resazurina 0,01% (Sigma) – um indicador de oxirredução que permite identificar o crescimento fúngico –, e incubar por mais 24 horas, totalizando 72 horas. Após, realizava-se a leitura: poços azuis indicavam o não crescimento, enquanto os roxos e rosas indicavam pouco e muito crescimento, respectivamente.

3. Resultados e discussão

3.1. *Paracoccidioides* spp.

Nos testes realizados com Pb18 e Pb01, a suspensão de células lisadas de *A. castellanii*, inibiu o crescimento de ambas as linhagens a partir da diluição de 1:8 (figuras 1 e 2).

Testes dessas linhagens com a fração polar do extrato de *A. castellanii* não foram incluídos devido ao não crescimento fúngico nos ensaios, incluindo os controles de crescimento, por motivo não descoberto.

3.2. *Cryptococcus* spp.

Não se observou inibição da suspensão de células lisadas de *A. castellanii* contra linhagens R265 e H99 (figuras 3 e 4).

Os experimentos que se seguiram somente com as frações dos extratos foram realizados somente com H99 e, inicialmente, foi descartada o efeito da fração polar (figura 5).

Quando dos experimentos com a fração apolar, somente se observou inibição em experimentos iniciais, em que não se havia estabelecido a concentração dos

extratos apolares, em mg/mL, e com concentrações mais altas de DMSO. A inibição ocorreu a partir da diluição de 1:128 da fração apolar (figura 6 e 7).

Constatou-se claro efeito inibitório desse solvente pela visualização do controle de DMSO a 10% acrescido de inóculo, no entanto, pela falta desse controle em extratos contendo 5% do orgânico, não foi possível estabelecer se a inibição foi proveniente da sua concentração. Ao se buscar na literatura, encontrou-se evidência, em estudo de também de microdiluição em caldo para se avaliar efeito da combinação de fluconazol e sertralina, com testes preliminares com DMSO, de que este foi capaz de inibir em 50% o crescimento de H99 quando nessa concentração – 5% [17].

Nos ensaios com concentrações conhecidas do extrato apolar, na faixa de 1 mg/mL a 0,0625 mg/mL (figura 8) e de 10 mg/mL a 0,625 mg/mL (figura 9), não houve inibição.

4. Discussão

É pertinente mencionar, primeiramente, o estudo prévio, publicado em 2019 por Patrícia Albuquerque e colaboradores [1] demonstrando a interação dessa ameba com fungos saprófitas, que instigou a hipótese norteadora desta publicação. O estudo constata, a partir de ensaios de interação com visualização em microscopia eletrônica, leveduras de Pb18 e Pb01, espécies também utilizadas neste estudo, em interação com culturas axênicas de *A. castellanii*, internalizadas e mortas pelas amebas, sugerindo que esses protozários poderiam secretar alguma substância tóxica aos fungos, mesmo na ausência de internalização.

No entanto, não há, na literatura, estudos de avaliação da suscetibilidade de *Paracoccidioides* spp. em extratos de *Acanthamoeba castellanii*, a fim de comparar resultados e métodos.

Em se tratando de novos compostos antifúngicos, há uma quantidade razoável de estudos que indicam atividade inibitória sobretudo de extratos vegetais. É o caso, por exemplo, dos resultados de Kaila P Medina-Alarcón (2020) a respeito da atividade de 2-hidróxichalcona carregada em nanoemulsão contra gêneros de *Paracoccidioides*, com *range* entre 0,06 µg/mL e 0,48 µg/mL [13] e do estudo de avaliação da atividade de liriodenina, um alcaloide isolado das mais variadas famílias de plantas, para o qual se observou- um MIC de 31,2 µg/mL (considerando a faixa de 500 a 0,97 µg/mL) ante 0,5 µg/mL da Anfotericina B contra Pb18 [24].

Ainda no espectro dos extratos vegetais, há, também, interessantes resultados de inibição das linhagens de *Cryptococcus*: Zhun Li *et al.*, em resultados publicados em 2022, destacaram a surpreendente atividade inibitória de alicina, gerada pela reação catalítica entre aliína e aliinase extraídas do alho, contra H99, com um MIC de 2 µg/mL [11]; outro estudo, de 2018, evidencia, também por método de microdiluição em caldo, a atividade antifúngica do elagitanino punicalagina, extraído da folha de *Lafoensia pacari* A.St.-Hil (Lythraceae) – planta pertencente à flora do Cerrado, muito utilizada na medicina popular – contra isolados do complexo *C. neoformans* (resultados apontam faixa de inibição entre 0.5 a 4.0 µg/mL) [20].

Apesar das diferenças entre os métodos, os extratos prospectados e as hipóteses norteadoras para cada projeto, todos esses estudos enfatizam a necessidade de prospecção de novas opções terapêuticas a essas micoses sistêmicas, buscando-se na natureza moléculas que possam substituir e/ou complementar opções já existentes.

Já no que diz respeito a estudos que demonstrem a interação de protozoários, especialmente de amebas, com outros microrganismos, é válido elucubrar as considerações de Matthias Leippe *et al* (1999) sobre moléculas efetoras da atividade fagocítica de protozoárias ameboides. No *paper*, faz-se um apanhado, a partir de estudo com *Entamoeba histolytica*, dos polipeptídeos antimicrobianos e citolíticos caracterizados em nível molecular os quais degradam microrganismos, especialmente bactérias, demonstrando similaridades com a imunidade inata dos humanos [11].

Ainda sobre a atividade antimicrobiana desses protozoários, Zanditenas, E. *et al*, em 2023, desenvolveram um estudo cujo objetivo foi avaliar a atividade também de *E. histolytica* contra o biofilme de enterobactérias, pela ação de cisteína proteinases (CPs). Acerca do biofilme, sabe-se que é um mecanismo patogênico e de resistência importante e, por isso, o estudo traz dados promitentes para o cenário atual [26].

Outros dois notáveis estudos – utilizando *Acanthamoeba castellanii*, a mesma que é foco neste projeto – podem ser ressaltados, considerando, ainda, além da demonstração da importante atividade de amebas contra outros micróbios, a preocupação cada vez mais presente com a resistência das bactérias aos tratamentos atuais.

Assim, em 2014, uma pesquisa evidenciou propriedades bactericidas de *A. castellanii* bactericidas contra *Staphylococcus aureus* resistente à metilicina (MRSA),

com quase 100% de taxa de mortalidade, embora tenha apresentado efeitos limitados contra *Enterococcus faecalis* resistente à vancomicina (VRE) e outras cepas [10]. Da mesma forma, Sevval Maral Ozcan e Zuhail Zeybek, em estudo publicado em 2021, apontaram uma eficiência de 78,36% de inibição da cepa ATCC de *A. castellanii* contra a cepa MRSA ATCC 43300 [14].

Diante do exposto, é inegável o potencial desses protozoários, sobretudo de *A. castellanii*, em contribuir para o desenvolvimento de novas opções terapêuticas frente à resistência fúngica e bacteriana aos tratamentos vigentes, a partir da observação do comportamento desses microrganismos e da aplicação de testes os quais comprovarão – ou não – as hipóteses diversas que podem surgir.

5. Conclusão

Os resultados demonstraram, mesmo que sutilmente, atividade antifúngica dos extratos de *A. castellanii* contra as linhagens testadas de *Paracoccidioides* spp., mas evidenciam a necessidade de resultados mais claros, a partir de testes mais acurados. Isso se estende também às linhagens de *Cryptococcus* spp., embora para estas as evidências sejam menos claras da inibição, ao menos nas concentrações testadas.

Demandam-se testes confirmatórios, a partir, principalmente, do estabelecimento de protocolos mais robustos para a continuidade dos estudos, a fim de apresentar resultados mais factuais.

Espera-se, sobretudo, que este estudo seja norte para projetos vindouros deste ou de outros grupos.

5. Conflito de interesses

Não há conflito de interesses neste estudo.

6. Agradecimentos

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a todos os colaboradores do Laboratório de Biologia Molecular do Instituto de Biologia da Universidade de Brasília.

Lisado de *Acanthamoeba castellanii* contra Pb18

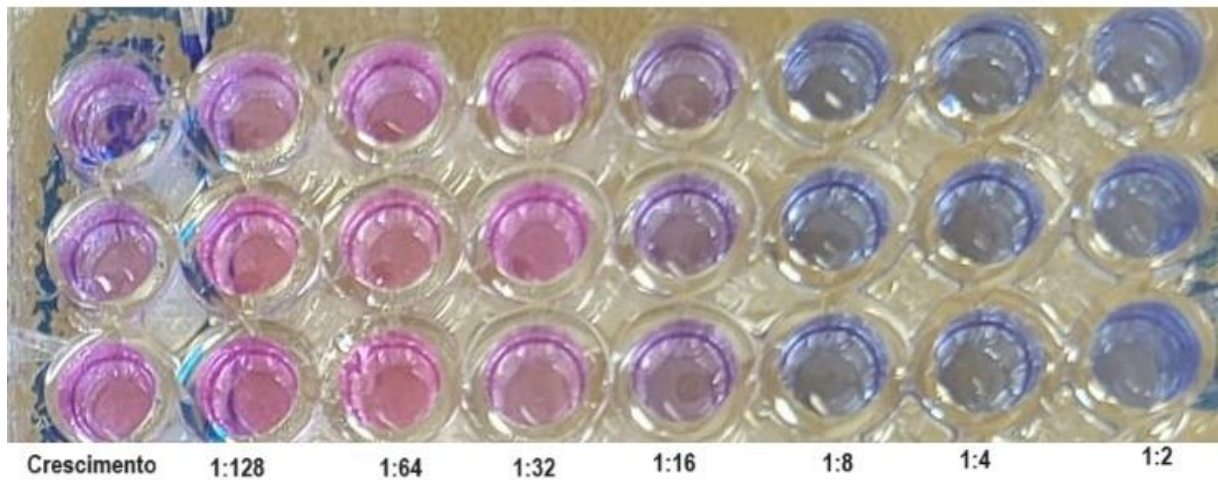


Figura 1. Avaliação da atividade antifúngica de lisado de *A. Castellanii* contra Pb18: a cor azul evidencia a inibição, enquanto a rosa demonstra muito crescimento e roxa, pouco. Constata-se inibição do lisado a partir de 8 vezes do extrato de amebas.

Lisado de *Acanthamoeba castellanii* contra Pb01

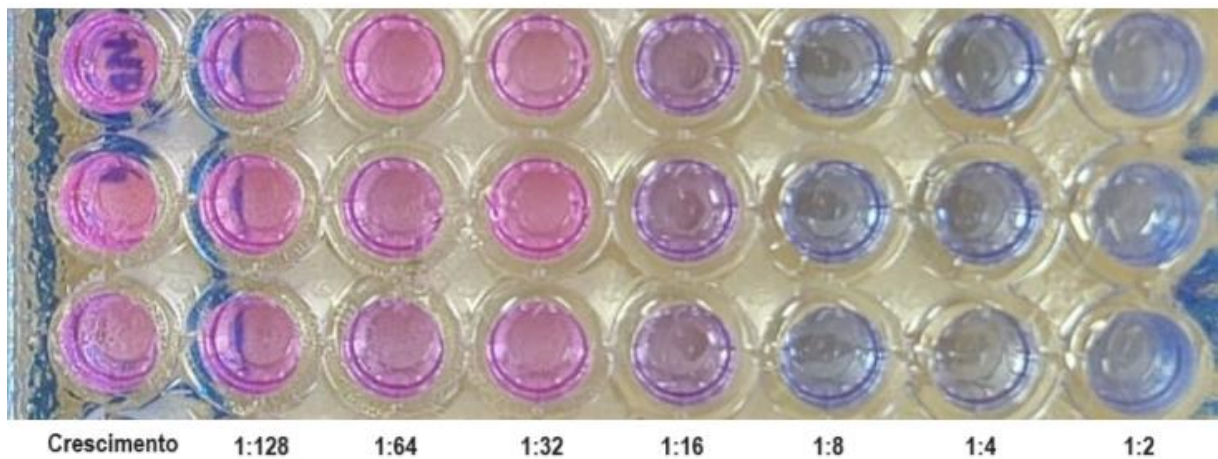


Figura 2. Avaliação da atividade antifúngica de lisado de *A. Castellanii* contra Pb01: a cor azul evidencia a inibição, enquanto a rosa demonstra muito crescimento e roxa, pouco. Constata-se inibição do lisado a partir de 8 vezes do extrato de amebas.

Lisado de *Acanthamoeba castellanii* contra H99

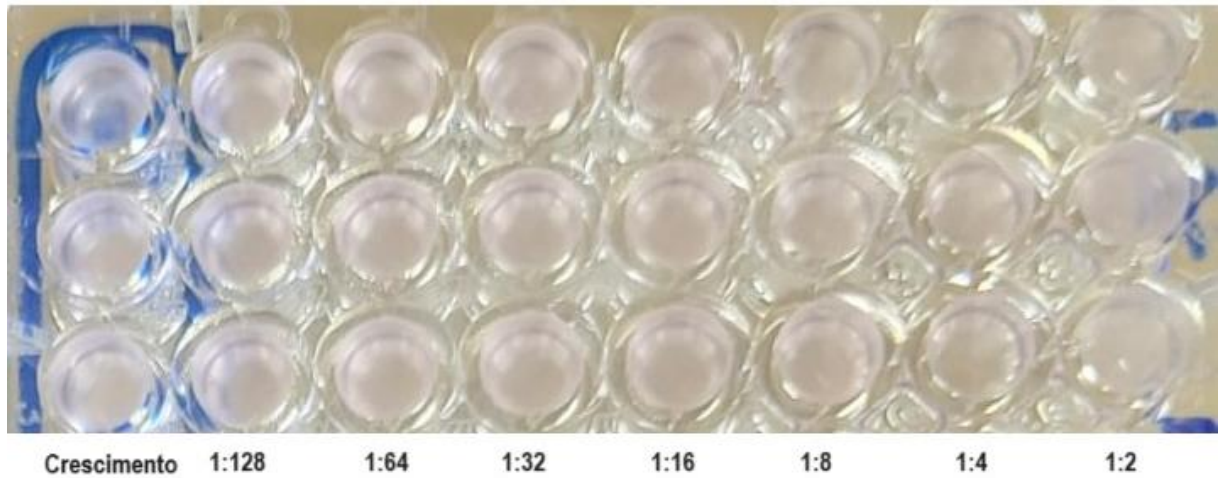


Figura 3. Avaliação da atividade antifúngica de lisado de *A. Castellanii* contra H99: não houve inibição do lisado para essa espécie.

Lisado de *Acanthamoeba castellanii* contra R265

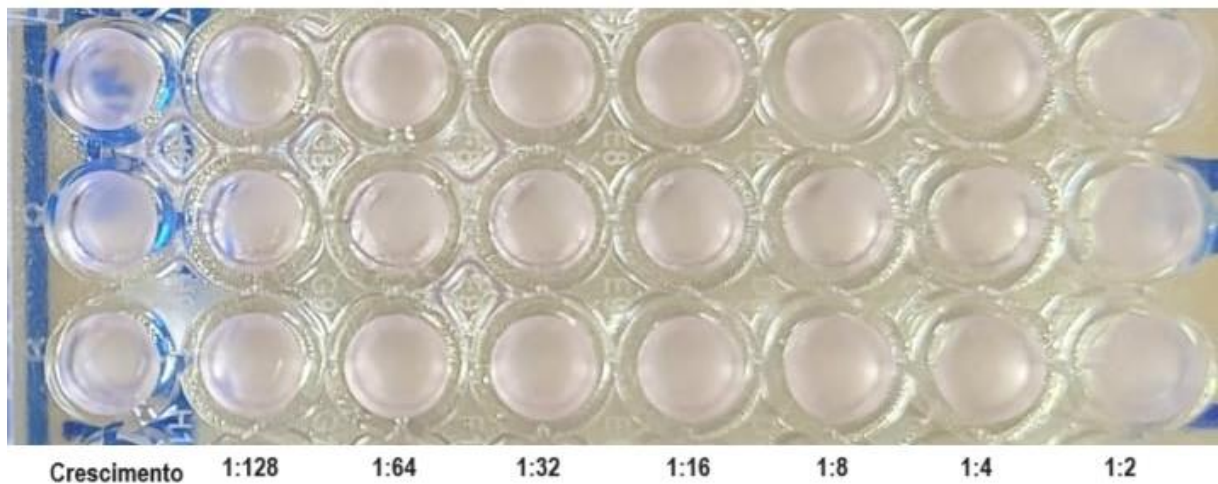


Figura 4. Avaliação da atividade antifúngica de lisado de *A. Castellanii* contra R265: não houve inibição do lisado para essa espécie.

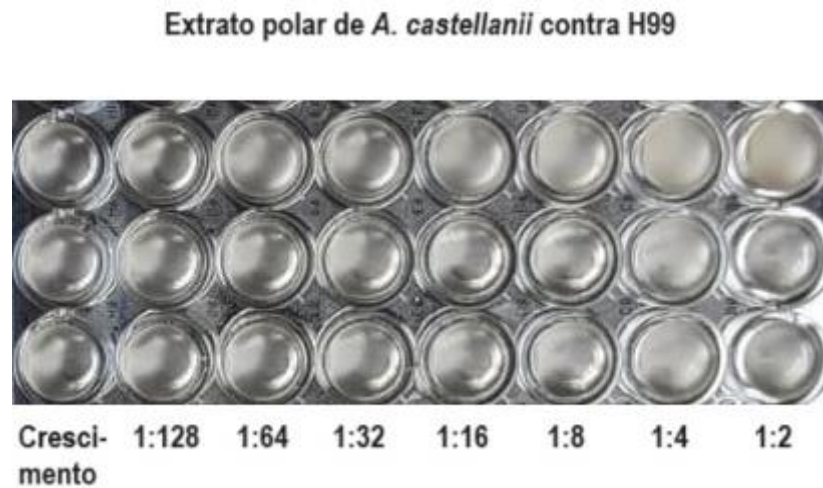


Figura 5. Avaliação da atividade antifúngica do extrato polar de *A. castellanii* contra H99: não houve inibição.

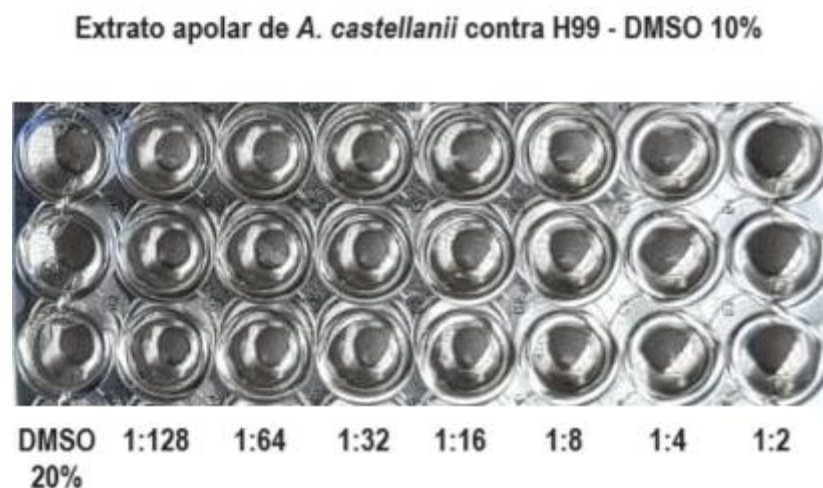


Figura 6. Avaliação da atividade antifúngica do extrato apolar de *A. Castellanii*, em concentração de 10% de DMSO, contra H99: há inibição, mas o extrato está diluído em concentrações tóxicas de DMSO (vide controle DMSO 10% na figura 7).



Figura 7. Avaliação da atividade antifúngica do extrato apolar de *A. Castellanii*, em concentração de 5% de DMSO, contra H99: há inibição, mas o extrato está diluído em concentração em que o DMSO pode apresentar atividade. Não foi feito controle de DMSO a 5%

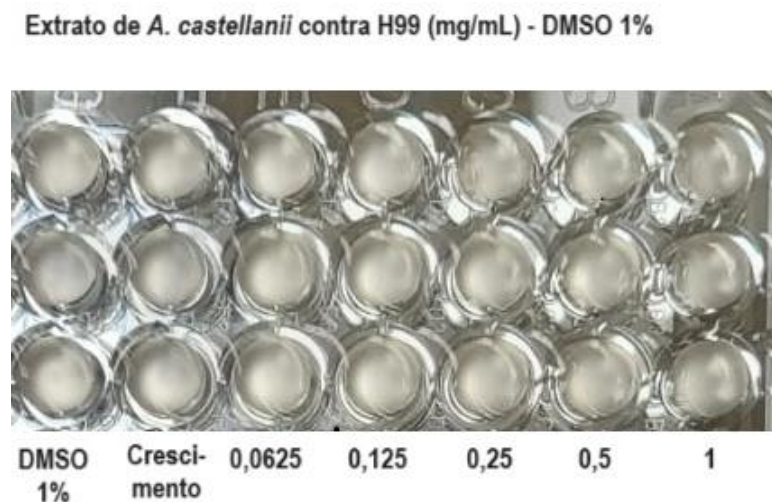


Figura 8. Avaliação da atividade antifúngica do extrato apolar de *A. castellanii* contra H99: concentração inicial de 1 mg/mL. Não houve inibição do extrato apolar nesse *range*.



Figura 9. Avaliação da atividade antifúngica do extrato apolar de *A. castellanii* contra H99: concentração inicial de 10 mg/mL Não houve inibição do extrato apolar nesse range de 10 a 0,625 mg/mL.

Referências

1. Albuquerque P, Nicola AM, Magnabosco DAG, Derengowski LdS, Crisóstomo LS, et al. (2019) **A hidden battle in the dirt: Soil amoebae interactions with *Paracoccidioides* spp.** PLOS Neglected Tropical Diseases 13(10): e0007742. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007742>.
2. Alexis C. Gushiken, Kapil K. Saharia, John W. Baddley. 2021. **Cryptococcosis.** **Infectious Disease Clinics of North America**, 35 (2), 493-514: <https://doi.org/10.1016/j.idc.2021.03.012>.
3. Bligh EG, Dyer WJ. **A rapid method of total lipid extraction and purification.** Can J Biochem Physiol. 1959; 37:911–7.
4. Chrisman, C.J., et al. (2011). **Phospholipids trigger *Cryptococcus neoformans* capsular enlargement during interactions with amoebae and macrophages.** PLoS Pathog 7, e1002047.
5. CLSI (2008). **Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts.** In CLSI standard M27-A3 (Wayne, PA, USA: Clinical and Laboratory Standards Institute).

6. Cordova LA, Torres J. **Paracoccidioidomycosis**. [Updated 2022 Sep 19]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK563188/>. Acesso em 30 de jun. 2023.
7. de-Souza-Silva, C.M., Guilhelmelli, F., Zamith-Miranda, D., de Oliveira, M.A., Nosanchuk, J.D., Silva-Pereira, I., and Albuquerque, P. (2018). **Broth Microdilution In Vitro Screening: An Easy and Fast Method to Detect New Antifungal Compounds**. J Vis Exp.
8. Eileen K. Maziarz, John R. Perfect. 2016. **Cryptococcosis**. **Infectious Disease Clinics of North America**. Vol. 30, Issue 1, 179-206: <https://doi.org/10.1016/j.idc.2015.10.006>.
9. Hernandez, H., & Martinez, L. R. (2018). **Relationship of environmental disturbances and the infectious potential of fungi**. Microbiology, 164(3), 233–241. doi:10.1099/mic.0.000620
10. Iqbal, J., Siddiqui, R. & Khan, N.A. **Acanthamoeba and bacteria produce antimicrobials to target their counterpart**. *Parasites Vectors* 7, 56 (2014). <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-56>
11. Li Z, Li Z, Yang J, Lu C, Li Y, Luo Y, Cong F, Shi R, Wang Z, Chen H, Li X, Yang J, and Ye F (2022) **Allicin shows antifungal efficacy against Cryptococcus neoformans by blocking the fungal cell membrane**. Front. Microbiol. 13:1012516. doi: 10.3389/fmicb.2022.1012516
12. Matthias Leippe, **Antimicrobial and cytolytic polypeptides of amoeboid protozoa - effector molecules of primitive phagocytes**. Developmental & Comparative Immunology, Volume 23, Issues 4–5, 1999, Pages 267-279, ISSN 0145-305X. [https://doi.org/10.1016/S0145-305X\(99\)00010-5](https://doi.org/10.1016/S0145-305X(99)00010-5).
13. Medina-Alarcón, K. P., L Singulani, J. de, Dutra, L. A., S Pitanguí, N. de, Pereira-da-Silva, M. A., dos Santos, M. B., ... Fusco-Almeida, A. M. (2020). **Antifungal activity of 2'-hydroxychalcone loaded in nanoemulsion against Paracoccidioides spp.** *Future Microbiology*. doi:10.2217/fmb-2019-0095
14. Özcan, Ş.M.; Zeybek, Z. **The Effect of Cell-Free Supernatants of Free-Living Amoeba against Some Staphylococcus Bacteria: First Findings from Turkey**. European Journal of Biology, v. 80, n. 1, p. 29-34, 2021.
15. Perlin, D. S., Rautemaa-Richardson, R., & Alastruey-Izquierdo, A. (2017). **The global problem of antifungal resistance: prevalence, mechanisms, and**

- management.** The Lancet Infectious Diseases, 17(12), e383–e392. doi:10.1016/s1473-3099(17)30316-x
16. RIBEIRO, Nicole Sartori. **Modulação da homeostase de zinco em *Acanthamoeba castellanii* como uma possível estratégia antifúngica.** 2017. Dissertação (Biologia Celular e Molecular). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
 17. Rahul Nayak & Jianping Xu (2010) **Efeitos de combinações de cloridrato de sertralina e fluconazol em *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*,** Mycology, 1:2, 99-105, DOI:[10.1080/21501203.2010.487054](https://doi.org/10.1080/21501203.2010.487054)
 18. San-Blas, G., & San-Blas, F. (1977). **Paracoccidioides brasiliensis: Cell wall structure and virulence.** Mycopathologia, 62(2), 77–86. doi:10.1007/bf01259396
 19. Santos, L. A., Grisolia, J. C., Burger, E., de Araujo Paula, F. B., Dias, A. L. T., & Malaquias, L. C. C. (2020). **Virulence factors of Paracoccidioides brasiliensis as therapeutic targets: a review.** Antonie van Leeuwenhoek. doi:10.1007/s10482-019-01382-5.
 20. Silva, T. C., Zara, A. L. de S. A., Sá, F. A. da S., Bara, M. T. F., Ávila, R. I. de., Costa, C. R., Valadares, M. C., Santos, A. S. dos ., Freitas, V. A. Q., & Silva, M. do R. R.. (2018). **Antifungal potential of punicalagin against *Cryptococcus neoformans* species complex.** Revista Do Instituto De Medicina Tropical De São Paulo, 60, e60. <https://doi.org/10.1590/S1678-9946201860060>
 21. Tirado-Sánchez A, González GM, Bonifaz A. 2020. **Endemic mycoses: epidemiology and diagnostic strategies.** Expert Rev Anti Infect Ther.; 18(11): 1105-1117. doi:10.1080/14787210.2020.1792774.
 22. TORTORA, Gerard J.; FUNKE, Berdell R.; CASE, Christine L. **Microbiologia.** Grupo A, 2017. E-book. ISBN 9788582713549. Disponível em: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/#/books/9788582713549/>. Acesso em: 28 jun. 2023.
 23. Van Daele R, Spriet I, Wauters J, et al. 2019. **Antifungal drugs: What brings the future?** Med Mycol; 57(Supplement_3):S328-S343. doi:10.1093/mmy/myz01
 24. Vinche, A. D. L., de-la-Cruz-Chacón, I., González-Esquinca, A. R., Silva, J. de F. da., Ferreira, G., Santos, D. C. dos., Garces, H. G., Oliveira, D. V. M. de., Marçon, C., Cavalcante, R. de S., & Mendes, R. P.. (2020). **Antifungal activity of liriodenine on agents of systemic mycoses, with emphasis on the genus**

Paracoccidioides. Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases, 26, e20200023. <https://doi.org/10.1590/1678-9199-JVATITD-2020-0023>

25. Walsh, T. J., & Groll, A. H. (1999). **Emerging fungal pathogens: evolving challenges to immunocompromised patients for the twenty-first century**. Transplant Infectious Disease, 1(4), 247–261. doi:10.1034/j.1399-3062.1999.010404.x
26. Zanditenas, E., Trebicz-Geffen, M., Kolli, D. *et al.* **Digestive exophagy of biofilms by intestinal amoeba and its impact on stress tolerance and cytotoxicity**. *npj Biofilms Microbiomes* 9, 77 (2023). <https://doi.org/10.1038/s41522-023-00444-x>

5. Referências Bibliográficas

Albuquerque P, Nicola AM, Magnabosco DAG, Derengowski LdS, Crisóstomo LS, et al. (2019) **A hidden battle in the dirt: Soil amoebae interactions with Paracoccidioides spp.** PLOS Neglected Tropical Diseases 13(10): e0007742. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007742>.

Albuquerque P, Nicola AM, Nieves E, et al. **Quorum sensing-mediated, cell density-dependent regulation of growth and virulence in Cryptococcus neoformans**. mBio. 2013;5(1):e00986-13. Published 2013 Dec 31. doi:10.1128/mBio.00986-13

Alexis C. Gushiken, Kapil K. Saharia, John W. Baddley. 2021. **Cryptococcosis**. **Infectious Disease Clinics of North America**, 35 (2), 493-514: <https://doi.org/10.1016/j.idc.2021.03.012>.

Bligh EG, Dyer WJ. **A rapid method of total lipid extraction and purification**. Can J Biochem Physiol. 1959; 37:911–7.

Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde**. Módulo 8: Detecção e identificação de fungos de importância médica /Agência Nacional de Vigilância Sanitária. – Brasília: Anvisa, 2013. 46p.: il.9 volumes. ISBN

Chrisman, C.J., et al. (2011). **Phospholipids trigger *Cryptococcus neoformans* capsular enlargement during interactions with amoebae and macrophages.** PLoS Pathog 7, e1002047.

CLSI (2008). **Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts.** In CLSI standard M27-A3 (Wayne, PA, USA: Clinical and Laboratory Standards Institute).

Cordova LA, Torres J. **Paracoccidioidomycosis.** [Updated 2022 Sep 19]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK563188/>. Acesso em 30 de jun. 2023.

de-Souza-Silva, C.M., Guilhelmelli, F., Zamith-Miranda, D., de Oliveira, M.A., Nosanchuk, J.D., Silva-Pereira, I., and Albuquerque, P. (2018). **Broth Microdilution In Vitro Screening: An Easy and Fast Method to Detect New Antifungal Compounds.** J Vis Exp.

Eileen K. Maziarz, John R. Perfect. 2016. **Cryptococcosis. Infectious Disease Clinics of North America.** Vol. 30, Issue 1, 179-206: <https://doi.org/10.1016/j.idc.2015.10.006>.

Hernandez, H., & Martinez, L. R. (2018). **Relationship of environmental disturbances and the infectious potential of fungi.** Microbiology, 164(3), 233–241. doi:10.1099/mic.0.000620

Iqbal, J., Siddiqui, R. & Khan, N.A. ***Acanthamoeba* and bacteria produce antimicrobials to target their counterpart.** *Parasites Vectors* 7, 56 (2014). <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-56>

Li Z, Li Z, Yang J, Lu C, Li Y, Luo Y, Cong F, Shi R, Wang Z, Chen H, Li X, Yang J, and Ye F (2022) **Allicin shows antifungal efficacy against *Cryptococcus neoformans* by blocking the fungal cell membrane.** Front. Microbiol. 13:1012516. doi: 10.3389/fmicb.2022.1012516

Matthias Leippe, **Antimicrobial and cytolytic polypeptides of amoeboid protozoa - effector molecules of primitive phagocytes.** Developmental & Comparative Immunology, Volume 23, Issues 4–5, 1999, Pages 267-279, ISSN 0145-305X. [https://doi.org/10.1016/S0145-305X\(99\)00010-5](https://doi.org/10.1016/S0145-305X(99)00010-5).

Medina-Alarcón, K. P., L Singulani, J. de, Dutra, L. A., S Pitangui, N. de, Pereira-da-Silva, M. A., dos Santos, M. B., ... Fusco-Almeida, A. M. (2020). ***Antifungal activity of 2'-hydroxychalcone loaded in nanoemulsion against Paracoccidioides spp.*** *Future Microbiology*. doi:10.2217/fmb-2019-0095

MURRAY, Patrick R.; ROSENTHAL, Ken S.; PFALLER, Michael A. **Microbiologia Médica**. Grupo GEN, 2022. *E-book*. ISBN 9788595159662. Disponível em: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/#/books/9788595159662/>. Acesso em: 21 dez. 2023.

Özcan, Ş.M.; Zeybek, Z. **The Effect of Cell-Free Supernatants of Free-Living Amoeba against Some Staphylococcus Bacteria: First Findings from Turkey**. *European Journal of Biology*, v. 80, n. 1, p. 29-34, 2021.

Nicola AM, Albuquerque P, Paes HC, et al. 2019. **Antifungal drugs: New insights in research & development**. *Pharmacol Ther.*; 195:21-38. doi:10.1016/j.pharmthera.2018.10.008

Peçanha, Paulo Mendes, Paula Massaroni Peçanha-Pietrobon, Tânia Regina Grão-Velloso, Marcos Rosa Júnior, Aloísio Falqueto, and Sarah Santos Gonçalves. 2022. **Paracoccidioidomycosis: What We Know and What Is New in Epidemiology, Diagnosis, and Treatment**. *Journal of Fungi* 8 (10): 1098. <https://doi.org/10.3390/jof8101098>.

Perlin, D. S., Rautemaa-Richardson, R., & Alastruey-Izquierdo, A. (2017). **The global problem of antifungal resistance: prevalence, mechanisms, and management**. *The Lancet Infectious Diseases*, 17(12), e383–e392. doi:10.1016/s1473-3099(17)30316-x

RIBEIRO, Nicole Sartori. **Modulação da homeostase de zinco em Acanthamoeba castellanii como uma possível estratégia antifúngica**. 2017. Dissertação (Biologia Celular e Molecular). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

Rahul Nayak & Jianping Xu (2010) **Efeitos de combinações de cloridrato de sertralina e fluconazol em *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii***, *Mycology*, 1:2, 99-105, DOI:[10.1080/21501203.2010.487054](https://doi.org/10.1080/21501203.2010.487054)

San-Blas, G., & San-Blas, F. (1977). **Paracoccidioides brasiliensis: Cell wall structure and virulence.** *Mycopathologia*, 62(2), 77–86. doi:10.1007/bf01259396

Santos, L. A., Grisolia, J. C., Burger, E., de Araujo Paula, F. B., Dias, A. L. T., & Malaquias, L. C. C. (2020). **Virulence factors of Paracoccidioides brasiliensis as therapeutic targets: a review.** *Antonie van Leeuwenhoek*. doi:10.1007/s10482-019-01382-5.

Silva, T. C., Zara, A. L. de S. A., Sá, F. A. da S., Bara, M. T. F., Ávila, R. I. de., Costa, C. R., Valadares, M. C., Santos, A. S. dos ., Freitas, V. A. Q., & Silva, M. do R. R.. (2018). **Antifungal potential of punicalagin against Cryptococcus neoformans species complex.** *Revista Do Instituto De Medicina Tropical De São Paulo*, 60, e60. <https://doi.org/10.1590/S1678-9946201860060>

Tirado-Sánchez A, González GM, Bonifaz A. 2020. **Endemic mycoses: epidemiology and diagnostic strategies.** *Expert Rev Anti Infect Ther.*; 18(11): 1105-1117. doi:10.1080/14787210.2020.1792774.

TORTORA, Gerard J.; FUNKE, Berdell R.; CASE, Christine L. **Microbiologia.** Grupo A, 2017. E-book. ISBN 9788582713549. Disponível em: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/#/books/9788582713549/>. Acesso em: 28 jun. 2023.

Van Daele R, Spriet I, Wauters J, et al. 2019. **Antifungal drugs: What brings the future?** *Med Mycol*; 57(Supplement_3):S328-S343. doi:10.1093/mmy/myz01

Vinche, A. D. L., de- la-Cruz-Chacón, I., González-Esquinca, A. R., Silva, J. de F. da., Ferreira, G., Santos, D. C. dos., Garces, H. G., Oliveira, D. V. M. de., Marçon, C., Cavalcante, R. de S., & Mendes, R. P.. (2020). **Antifungal activity of liriodenine on agents of systemic mycoses, with emphasis on the genus Paracoccidioides.** *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, 26, e20200023. <https://doi.org/10.1590/1678-9199-JVATITD-2020-0023>

Walsh, T. J., & Groll, A. H. (1999). **Emerging fungal pathogens: evolving challenges to immunocompromised patients for the twenty-first century.** *Transplant Infectious Disease*, 1(4), 247–261. doi:10.1034/j.1399-3062.1999.010404.x

ZAITS, Clarisse. **Compêndio de Micologia Médica, 2ª edição**. Grupo GEN, 2010. *E-book*. ISBN 978-85-277-1962-9. Disponível em: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/#/books/978-85-277-1962-9/>. Acesso em: 21 dez. 2023.

Zanditenas, E., Trebicz-Geffen, M., Kolli, D. *et al.* **Digestive exophagy of biofilms by intestinal amoeba and its impact on stress tolerance and cytotoxicity**. *npj Biofilms Microbiomes* **9**, 77 (2023). <https://doi.org/10.1038/s41522-023-00444-x>