

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA

LETÍCIA SERAFIM DA COSTA

**Efeito inibitório *in vitro* de um composto calcogenado na patogênese de
Cryptococcus gattii e no modelo murino de criptococose pulmonar**

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Microbiologia
do Instituto de Ciências Biomédicas
da Universidade de São Paulo para
obtenção do Título de Mestre em
Ciências (Microbiologia).

São Paulo

2023

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA

LETÍCIA SERAFIM DA COSTA

**Efeito inibitório *in vitro* de um composto calcogenado na patogênese de
Cryptococcus gattii e no modelo murino de criptococose pulmonar**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Mestre em Ciências (Microbiologia).

Área de concentração: Microbiologia

Orientadora: Profa. Dra. Kelly Ishida

Versão original

São Paulo

2023

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)

Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do Instituto de Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo

Ficha catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Da Costa, Letícia Serafim

Efeito inibitório *in vitro* de um composto calcogenado na patogênese de *Cryptococcus gattii* e no modelo murino de criptococose pulmonar / Letícia Serafim da Costa ; orientadora Kelly Ishida. - - São Paulo, 2023

83 p.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. *Cryptococcus*. 2. Morfotipos. 3. Virulência. 4. Antifúngicos. 5. Selênio. I. Ishida, Kelly, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Programa de Pós-Graduação em Microbiologia

Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo

Candidata: Letícia Serafim da Costa

Título da dissertação: Efeito inibitório *in vitro* de um composto calcogenado na patogênese de *Cryptococcus gattii* e no modelo murino de criptococose pulmonar

Orientadora: Profa. Dra. Kelly Ishida

A comissão julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada em ___ / ___ / ____, considerou a candidata:

() **Aprovada** () **Reprovada**

Examinador (a): Nome: _____

Assinatura: _____

Instituição: _____

Examinador (a): Nome: _____

Assinatura: _____

Instituição: _____

Examinador (a): Nome: _____

Assinatura: _____

Instituição: _____

Presidente: Nome: _____

Assinatura: _____

Instituição: _____

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Investigação do efeito inibitório in vitro de um composto calcogenado na patogênese de *Cryptococcus gattii* e no modelo murino de criptococose pulmonar", protocolada sob o CEUA nº 9090090621, sob a responsabilidade de **Kelly Ishida e equipe; Kelly Ishida; Letícia Serafim da Costa; Daniel Felipe Freitas de Jesus** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo) (CEUA-ICB/USP) na reunião de 17/09/2021.

We certify that the proposal "Investigation of in vitro inhibitory effect of a calcogenated compound in the pathogenesis of *Cryptococcus gattii* and in the murine model of pulmonary cryptococcosis", utilizing 65 Isogenics mice (65 males), protocol number CEUA 9090090621, under the responsibility of **Kelly Ishida and team; Kelly Ishida; Letícia Serafim da Costa; Daniel Felipe Freitas de Jesus** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Biomedical Sciences Institute (University of São Paulo) (CEUA-ICB/USP) in the meeting of 09/17/2021.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: **36 meses**

Depto/Setor: **Microbiologia**

Origem: **Biotério Central FMUSP**

Espécie: **Camundongos isogênicos**

sexo: **Machos**

Idade ou peso: **6 a 8 semanas**

Linhagem: **Balb/c**

N amostral: **65**

São Paulo, 19 de outubro de 2021



Profa. Dra. Luciane Valéria Sita
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo)



Prof. Dr. Francemilson Goulart da Silva
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo)



Uso de animais
para experimentação



DECLARAÇÃO

Declaramos para os devidos fins que

Letícia Serafim da Costa

participou do Curso “Uso de Animais em Experimentação” com carga horária total de 10 horas, em formato ensino a distância, realizado pela Comissão de Biotérios do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

São Paulo, 25 de maio de 2021
Comissão de Biotérios
ICB USP

Declaração de participação do curso
Biossegurança e Boas Práticas de Laboratório do ICB

Declaramos para os devidos fins que

Leticia Serafim da Costa

participou do Curso "Biossegurança e Boas Práticas de Laboratório do ICB", realizado pela Comissão Interna de Biossegurança do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, com carga horária total de 6 horas.

São Paulo, 19 de maio de 2021
Comissão Interna de Biossegurança
ICB USP



Declaro, para os devidos fins, que

Letícia Serafim da Costa

concluiu o Curso "Armazenamento, Manuseio e Descarte de Produtos Químicos", realizado no Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

São Paulo, 25 de maio de 2021
(Declaração válida por 5 anos)

Profa. Dra. Katiucia Batista da Silva Paiva
Presidente da Comissão de Segurança Química

Prof. Dr. Luis Carlos de Souza Ferreira
Diretor do ICB

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente, meus pais, Lucimar e Luciano, que sempre me apoiaram, me deram suporte e carinho, me possibilitando estudar e alcançar lugares que nunca imaginei chegar sempre sabendo que meu lar sempre estava aberto para quando eu precisasse voltar. A toda minha família, que mesmo de longe sempre torceu por mim, me acolheram quando preciso, me deram forças quando eu não tinha mais e comemoraram cada conquista que eu alcançava.

Agradeço também minha melhor amiga, Gabriela Castro, que há muitos anos tem sido minha maior fortaleza, me dando forças e estando comigo em cada trajetória da minha vida acadêmica e além. Que me socorreu quando eu não conseguia mais me ajudar, que me ajudou com tarefas chatas e formatações de trabalho, e que nunca, nunca me deixou sozinha. Sem você, eu jamais teria conseguido terminar o meu mestrado. As minhas amigas, Andressa, Alice, Hyasmin e Eduardo, que seja longe ou perto, sempre estiveram presentes nos meus dias mais felizes e nos mais difíceis também, fazendo o possível e o impossível pra me alegrar.

Á minha orientadora, Prof. Dra. Kelly Ishida que desde o primeiro contato me recebeu de braços abertos no meio de uma pandemia e desde então nunca parou de me ensinar. Agradeço principalmente por ter sido compreensiva e ter me auxiliado tanto mesmo quando eu não conseguia dar o meu melhor. Sou imensamente grata por toda orientação e incentivo que você me deu nesses 2 anos, e por não ter deixado eu desistir.

Aos colegas de laboratório: Bruna, Thayná, Cristina, Daniel, Vinícius, Marcela, Tatiana, Daniëlle, Murilo, Henrique e Marcello, por toda ajuda em experimentos e por serem companheiros nas horas de café, fofoca e risadas. Aos funcionários do departamento e da pós graduação, por toda ajuda burocrática e por sempre estarem disponíveis pra nos ajudar (e comer um bolo).

As minhas psicólogas e psiquiatras, que foram essenciais para que eu atravessasse os períodos mais difíceis da minha vida.

A USP, o ICB e o departamento de microbiologia, por abrirem as portas para que eu realizasse meu sonho de ser cientista.

E por fim, agradeço a todos que contribuíram de alguma forma para esse trabalho, e também, para a minha pessoa.

AGRADECIMENTO À INSTITUIÇÃO DE FOMENTO

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) (Código de Financiamento 001 – período de 01/06/2021 - 30/11/2023) pelo suporte financeiro na forma de bolsa de estudo durante o mestrado. Agradeço, também, à Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (Processo nº 2021/01279-5) pelo auxílio financeiro concedido. Por conta disso, a realização desse trabalho foi possível, contribuindo com a minha formação.

“I cheated death and I came back alive.”

- Lacuna Coil

RESUMO

COSTA, L. S. **Efeito inibitório *in vitro* de um composto calcogenado na patogênese de *Cryptococcus gattii* e no modelo murino de criptococose pulmonar.** 2023, 83 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Cryptococcus gattii é um dos agentes etiológicos da criptococose, uma micose que atinge inicialmente o pulmão do hospedeiro, podendo se disseminar para o sistema nervoso central, causando a meningite criptocócica. Dentre os fatores de virulência que influenciam no estabelecimento da infecção fúngica causada por *Cryptococcus* spp. destaca-se, principalmente, sua cápsula polissacarídica, produção de melanina, formação de células titãs e microcélulas e capacidade de formas biofilmes. Esses são alguns dos fatores responsáveis por conferir proteção aos fungos contra a ação dos mecanismos imunes do hospedeiro e, principalmente, dos antifúngicos utilizados atualmente. Com isso, o presente estudo visa avaliar a ação do composto de selênio LQA_78 sobre *C. gattii* e seus fatores de virulência. O composto apresentou atividade antifúngica sobre *C. gattii* R265, incluindo a linhagem tolerante a fluconazol (FLC) e isolados clínicos, com concentrações inibitórias entre de 2 a 64 µg/mL. As concentrações de 4x e 8x a CI₅₀ de LQA_78 apresentaram atividade fungicida sobre *C. gattii* R265 nas 12 h iniciais de exposição ao composto, promovendo extravasamento de DNA e proteínas. Se tratando de fatores de virulência, o composto foi capaz de aumentar a permeabilidade da cápsula das leveduras, bem como inibir o crescimento de células com cápsula aumentada e titãs (CI₅₀: 2 – 8 µg/ml). Células em dispersão do biofilme maduro tiveram seu crescimento inibido com o tratamento com LQA_78, porém o composto não demonstrou atividade sobre células sésseises do biofilme maduro. Foi observado também, que a presença do composto LQA_78 promoveu a inibição da produção da melanina pelas leveduras, bem como inibiu a atividade da enzima lacase do sobrenadante e das leveduras previamente cultivadas em meio indutor da enzima. No entanto, o composto não alterou as concentrações de componentes da parede celular do fungo. O tratamento com concentrações fungicidas de LQA_78 (16 e 32 µg/ml) diminuiu a permeabilidade da membrana mitocondrial e aumentou a produção de espécies reativas de oxigênio, sugerindo que o composto esteja causando danos nas leveduras de *C. gattii*. Em modelo invertebrado de *Galleria mellonella* o tratamento com LQA_78 reduziu a carga fúngica das larvas infectadas por *C. gattii* e aumentou o número de hemócitos total na hemolinfa.

Esse conjunto de dados demonstrou que o composto LQA_78 tem ação inibitória e fungicida sobre *C. gattii* destacando para a inibição fatores de virulência associadas à tolerância de leveduras de *C. gattii* durante a patogênese da criptococose. Por fim, esses dados demonstraram o potencial antifúngico do composto organoselênio como uma possível opção terapêutica contra a criptococose.

Palavras-chave: *Cryptococcus*, morfotipos, antifúngicos, virulência, selênio.

ABSTRACT

COSTA, L. S. ***In vitro* inhibitory effect of a calcogenated compound on the pathogenesis of *Cryptococcus gattii* and the murine model of pulmonary cryptococcosis.** 2023, 83 p. Dissertation (Master's Degree in Microbiology) – Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo.

Cryptococcus gattii is one of the etiologic agents of cryptococcosis, a mycosis that initially affects the lung of the host and may spread to the central nervous system, causing cryptococcal meningitis. Among the virulence factors that influence the establishment of the fungal infection caused by *Cryptococcus* spp., its polysaccharide capsule, melanin production, formation of titan cells and microcells, and the ability to form biofilms stand out. These are some of the factors responsible for protecting fungi against the action of the host's immune mechanisms and, especially, of the antifungals currently used. Thus, the present study aims to evaluate the action of the selenium compound LQA_78 on *C. gattii* and its virulence factors. The compound showed antifungal activity against *C. gattii* R265, including the fluconazole-tolerant strain and clinical isolates, with inhibitory concentrations ranging from 2 to 64 µg/ml. The concentrations of 4x and 8xIC₅₀ of LQA_78 showed fungicidal activity on *C. gattii* R265 in the first 12 h of exposure to the compound, promoting extravasation of DNA and proteins. When it came to virulence factors, the compound was able to increase the capsule permeability of yeasts, as well as inhibit the growth of cells with enlarged capsule and titans (CI₅₀: 2 – 8 µg/ml). Dispersed cells of the mature biofilm had their growth inhibited with the treatment with LQA_78, but the compound did not show activity on sessile cells of the mature biofilm. It was also observed that the presence of the compound LQA_78 promoted the inhibition of melanin production by yeasts, as well as inhibited the activity of the enzyme laccase of the supernatant and of the yeasts previously cultured in the enzyme inducing medium. However, the compound did not alter the concentrations of components of the fungal cell wall. Treatment with fungicidal concentrations of LQA_78 (16 and 32 µg/ml) decreased mitochondrial membrane permeability and increased the production of reactive oxygen species, suggesting that the compound is causing damage to *C. gattii* yeasts. In an invertebrate model of *Galleria mellonella*, treatment with LQA_78 reduced the fungal load of *C. gattii*-infected larvae and increased the number of total hemocytes in the hemolymph. This dataset demonstrates that the LQA_78 compound has inhibitory and

fungicidal action on *C. gattii*, highlighting the inhibition virulence factors associated with the tolerance of *C. gattii* yeasts during the pathogenesis of cryptococcosis. Finally, these data demonstrated the antifungal potential of the compound organoselenium as a possible therapeutic option against cryptococcosis.

Keywords: *Cryptococcus*, morphotypes, antifungals, virulence, selenium.