



Seleção e caracterização fenotípica de cepas de *Trypanosoma cruzi* resistentes ao ravuconazole para estudos de modos de ação de fármacos

Francianny Estéfany dos Santos Mendonça

Adriana Corrêa, Benedito Santos, Lúcio de Freitas Júnior

Carolina Borsoi Moraes

Faculdade de Ciências Farmacêuticas/Universidade de São Paulo

fmendonca01@usp.br

Objetivos

A resistência a fármacos é um relevante problema clínico em doenças infecciosas. Nesse contexto, o clone YH10-R de *Trypanosoma cruzi*, resistente a ravuconazole, pode ser um importante recurso laboratorial para estudos de resistência e de mecanismos de ação de novos candidatos a fármacos para a doença de Chagas. Buscamos estabelecer o cultivo das formas epimastigotas e tripomastigotas deste clone de *T. cruzi*, além de averiguar a continuidade do genótipo mutante e do fenótipo resistente conforme previsto na literatura. A partir disso, o clone pode ser utilizado como ferramenta de controle na triagem fenotípica de novos compostos, de modo que sejam identificados os potenciais inibidores da biossíntese de ergosterol, e seja avaliada a possível despriorização dos mesmos, tendo em vista a falha terapêutica deste modo de ação no tratamento da doença de Chagas.

Métodos e Procedimentos

A forma epimastigota dos clones YH10-R, YH10-S e YH10-LT foram cultivadas a 28 °C

em meio LIT, enquanto a célula LLC-MK2 e as formas tripomastigotas foram cultivadas em meio DMEM baixa glicose a 37 °C, ambos os meios foram suplementados com soro fetal bovino. A obtenção da forma tripomastigota a partir da epimastigota foi executada em dois protocolos simultâneos de metaciclogênese: em meio Grace's (protocolo modificado do Heise et al., 1996, JBC) e em meio bifásico envolvendo os meios LIT e ágar-sangue (Rodríguez Durán et al., 2021). Em ambos, os *T. cruzi* são incubados a 28 °C em repouso por no mínimo 14 dias, com inspeções visuais regulares utilizando lâminas coradas com Giemsa para identificar a presença de metacíclicos. Também foi realizada a extração do DNA genômico e amplificação do gene *TcCyp51* por PCR com os primers descritos na tabela 1. Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em géis de agarose a 1,5%, e sequenciados. Algumas culturas de células LLC-MK2 infectadas com YH10-R foram mantidas sob pressão de 500 nM de ravuconazol a fim de analisar indiretamente o efeito na viabilidade do *T. cruzi*. O fenótipo de resistência a ravuconazol foi avaliado por ensaio de High Content Screening em células infectadas conforme descrito (Franco et al., 2019).

Tabela 1: sequências dos primers utilizados no PCR

Primer	Sequência (5' - 3')
<i>TcCyp51Forward</i>	ATG TTC ATT GAA GCC ATT GTA TTG
<i>TcCyp51Reverse</i>	TCA CGA GGG CAA TTT CTT C

Resultados

Foi observado que a metaciclologênese em meio LIT/ágar-sangue bifásico teve uma melhor eficiência em relação a incubação em meio Grace's. Isso porque no primeiro método, no 12º dia, 35% dos parasitas já estavam na forma metacíclica, enquanto no outro no 21º dia, somente 3%. A mutação T297M, presente em uma porção específica do gene *TcCyp51*, não foi identificada no sequenciamento, devido a uma possível falha no processo de amplificação do gene. Apesar da variabilidade observada nas curvas do ensaio, sobretudo na população de células hospedeiras, os compostos azólicos não demonstraram atividade antiparasitária frente ao clone YH10-R. Esse resultado é consistente com o perfil histórico desses compostos em testes anteriores do laboratório e reforça a manutenção do fenótipo resistente.

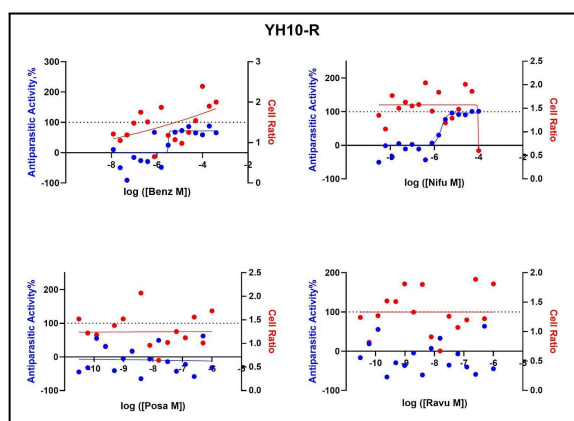


Figura 1: Curvas dose-resposta para compostos antiparasitários de referência em YH10-R

Tabela 2: Valores de EC₅₀ e CC₅₀ dos compostos antiparasitários testados no clone YH10-R

Fármaco	EC ₅₀	CC ₅₀
Benznidazole	3,3 µM	> 400 µM
Nifurtimox	2,1 µM	100,9 µM
Posaconazole	> 1 µM	> 1 µM
Ravuconazole	> 1 µM	> 1 µM

Conclusões

O sequenciamento e o ensaio fenotípico ainda estão em processo de repetição. No entanto, o clone YH10-R foi restabelecido com êxito no laboratório. Ademais, o recente método de metaciclologênese em meio bifásico testado se provou inovador e eficiente, podendo ser adotado como um novo padrão laboratorial. Assim, o objetivo de empregar o clone YH10-R como ferramenta, no intuito de contribuir para o aperfeiçoamento da cascata de triagem para novos candidatos a fármacos antichagásicos, foi iniciado e apresenta perspectivas de consolidação.

A autora declara não haver conflito de interesses.

Agradecimentos

Agradecemos ao CNPq e à DNDi pelo financiamento do projeto.

Referências

- Franco CH et al. Int J Parasitol Drugs Drug Resist. 2020.
 Franco CH et al. Trop Med Infect Dis. 2019.
 Moraes CB et al. Sci Rep. 2014.
 Rodríguez Durán J et al. STAR Protoc. 2021.