



## RAPAMICINA NO TRATAMENTO DA CANDIDÍASE SISTÊMICA: UMA REVISÃO

BRENDA OLIVEIRA DE ABREU; PAULA CHRISTINA SOUZA SILVA

### RESUMO

Os casos de candidíase sistêmica têm aumentado no mundo, chegando a quarta maior causa de infecções em unidades de terapia intensiva em países desenvolvidos. Entre os motivos para isso, estão a demora no diagnóstico que envolve a sintomatologia semelhante a sepse bacteriana e a baixa disponibilidade de antifúngicos que é agravada pelo surgimento de cepas resistentes aos azóis, principal classe de antifúngico para infecções por *Candida sp.* Os fungos do gênero *Candida* estão presentes na microbiota do corpo humano e se tornam virulentos quando encontram as condições propícias, como queda na imunidade ou quando é levado ao interior do corpo por sondas ou cateteres. A rapamicina (RAPA) é uma droga que inibe a proteína mTOR presente em células eucariontes, amplamente utilizada como imunossupressor e para redizer as chances de rejeição pós transplante de órgão. A atividade antifúngica da RAPA para *Candida sp.* começou a ser estudada em 1975, embora tenha sido deixada de lado por seus demais usos. Essa pesquisa foi desenvolvida para avaliar a atividade da rapamicina no tratamento da candidíase sistêmica. A revisão foi realizada com 10 artigos da plataforma Pubmed com os termos: rapamicina para o tratamento de candidíase e rapamicina para candidíase. A atividade antifúngica da rapamicina para espécies do gênero *Candida* ocorre por diversas vias que resultam na inativação direta ou indireta de mTOR. No tratamento de candidíases, a RAPA reduz a inflamação nos rins e no baço, aumenta a proteção e reduz as chances de infecções secundárias. Quando a infecção é causada por *C. albicans*, a RAPA pode reduzir a virulência do fungo através de alterações morfológicas. Assim, a rapamicina é vista como uma droga com potencial para o tratamento da candidíase sistêmica.

**Palavras-chave:** Inibidor de mTOR; *Candida*; Infecção fúngica; Sirolimus; Candidemia.

### 1 INTRODUÇÃO

*Candida sp.* é um fungo filamentosos cujas espécies podem ter o morfotipo de leveduras unicelulares, pseudo-hifas e hifas, algumas espécies como a *C. albicans* resistentes podem variar seus morfotipos, se aderir por biofilmes e invadir células endoteliais e epiteliais, dificultando a ação do sistema imunológico e dos antifúngicos. É um fungo presente na microbiota da mucosa humana, entretanto, perturbações nessa microbiota ou enfraquecimento da imunidade do hospedeiro permite seu oportunismo (PAPPAS et al., 2018).

Os principais fatores de risco para a infecção são perfuração gastrointestinal, diabetes mellitus, aumento da idade, transplantes, diálise, antibióticos de amplo espectro, cateter venoso central, imunossupressores, cateteres, ventilação mecânica entre outros. Por isso, esses fungos têm causado surtos de infecção sendo a quarta maior responsável por infecções fúngicas nos países mais desenvolvidos. Aproximadamente 50% dos episódios de candidíase sistêmica ocorrem em unidades de terapia intensiva (UTI) e 18% das infecções em UTI são causadas por elas (PAPPAS et al., 2018).

Os principais órgãos alvo de infecção por *Candida sp.* são o rim onde os neutrófilos e a

CD169 ++ limitam o crescimento fúngico (TEO et al., 2021), o fígado que induz a resposta imune inata contra patógenos e o baço que possui genes associados à interrupção do biofilme microbiano (HEBECKER et al., 2016; MIRYALA; ANBARASU; RAMAIAH, 2022).

A demora no início do tratamento ocorre principalmente porque infecções fúngicas possuem sintomas semelhantes as infecções bacterianas, o diagnóstico diferencial é demorado, pois depende de hemo e uroculturas. Essa demora permite o agravamento das infecções e o uso prolongado de alguns medicamentos o que resultou no surgimento de cepas resistentes. Os Azóis, como o fluconazol, age na enzima do citocromo P450-lanosterol 14 $\alpha$ -desmetilase, que converte o lanosterol em ergosterol, que é o principal esteroide de membrana na maioria das espécies de fungos e é o mais utilizado no tratamento das infecções por *Candida sp.*, o que tem aumentado o surgimento de cepas resistentes (KSIEZOPOLSKA; GABALDÓN, 2018).

A rapamicina (RAPA), também chamada de sirolimus, é um macrolídeo produzido pelo metabolismo secundário da bactéria *Streptomyces hygroscopicus*. Essa droga atua pela inibição da proteína mTOR, que gera diversas aplicações, entre elas, atividade antifúngica, imunossupressora, anticancerígena e terapia antienvhecimento. A mTOR é uma proteína quinase com alta conservação entre eucariotos e pode ser dividida em dois complexos, mTORC1 e mTORC2. O complexo mTORC1 é o sensível a rapamicina, ele é formado principalmente pelas proteínas mTOR, Raptor e mLST8/GbL e controla diversos processos celulares como tradução de proteínas e autofagia (ARRIOLA APELO; LAMMING, 2016; LAMMING; SABATINI, 2010)

A atividade antibiótica e antimicótica da rapamicina começou a ser estudada em 1975, quando Vézina e colaboradores (1975) demonstrou a capacidade da RAPA em inibir o desenvolvimento de leveduras, principalmente de *Candida albicans* (VÉZINA; KUDELSKI; SEHGAL, 1975). Em *C. albicans* a via de atividade de mTOR pode ser bloqueada através da ligação da RAPA ao Rbp1 (homólogo do FKBP12 humano) ou a ligação desse complexo a mTORC1 interrompendo o ciclo celular (TONG et al., 2021).

Assim essa pesquisa foi realizada para avaliar a atividade da rapamicina no tratamento da candidíase sistêmica e incentivar o reposicionamento da RAPA como antifúngico para as crescentes infecções sistêmicas causadas por *Candida sp.*

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

Para a revisão foram considerados artigos livres da plataforma Pubmed publicados entre os anos de 1978 e 2022 com os termos: rapamicina para o tratamento de candidíase e rapamicina para candidíase. Critérios de exclusão: não avaliaram a atividade antifúngica da rapamicina ou não avaliaram a atividade para candidíase sistêmica. Do total de 20 artigos encontrados na busca, 10 foram utilizados nesta revisão.

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A ação de inibição de mTOR pela rapamicina controla a atividade dos genes GLN3 e GAT1, que possuem função sobreposta. Esses genes, principalmente GLN3, influenciam a filamentação das células, dependendo das fontes de nitrogênio disponíveis. No modelo murino de infecção por *C. albicans*, a ausência do gene GLN3 aumentou a virulência da cepa (LIAO; RAMÓN; FONZI, 2008).

Em um ensaio com monócitos treinados com  $\beta$ -glucano, a principal estrutura da parede celular de fungos do gênero *Candida*, a rapamicina mostrou capacidade *in vitro* de inibição dose-dependente do treinamento induzido por  $\beta$ -glucano e da expressão de HIF-1 $\alpha$ . A RAPA inibiu a via de sinalização I $\kappa$ B/Akt/HIF1 $\alpha$ , responsável pela ativação do alvo mamífero da rapamicina (mTOR) e consequente aumento da glicólise, que é a principal fonte de energia dos monócitos

treinados. A infecção por *Candida albicans* em camundongos tratados com metformina, que também inibe mTOR, resultou em aumento da sobrevivência (CHENG et al., 2014).

Em infecções por *C. albicans* é possível induzir a reprogramação metabólico-epigenética em monócitos e macrófagos a través da  $\beta$ -glucana, entretanto a inibição mTOR pela rapamicina pode suprimir a imunidade induzida. O gene TSC1 que induz citocinas pró-inflamatórias, polarização de macrófagos e manutenção de macrófagos teciduais forma um complexo com mTOR que controla a necroptose, morte celular regulada por RIPK3 e MLKL, de macrófagos. mTORC1 é responsável pela alta ativação de RIPK1, RIPK3 e MLKL em macrófagos deficientes em TSC1, assim a rapamicina reduz a ativação da via TSC1-mTOR (LI et al., 2021).

Entre as funções de mTORC1 em *C. albicans* está a regulação da morfogênese do fungo, que costuma se apresentar com hifa, de acordo com as condições de indução. Assim, a rapamicina bloqueia o crescimento de hifas em meios com deficiência de nutrientes e alcalinos. Entretanto, quando cultivado em meio Spider líquido com RAPA, a inibição de mTORC1 ativa os fatores de transcrição Efg1 e Bcr1 que participam da agregação celular e inibe os repressores de filamentação TUP1 e NRG1 (SHARECK; BELHUMEUR, 2011).

CaPhm7 é uma proteína da membrana plasmática dos fungos, e em espécies patogênicas do gênero *Candida* são altamente conservadas. Em *C. albicans* o alelo homozigoto de CaPhm7 é tolerante a rapamicina esse fenótipo pode ser revertido pela introdução de um alelo do gene CaPHM7. Esse gene é responsável pelo desenvolvimento das hifas e sua deleção reduz a virulência das células de *C. albicans*, além de reduzir a colônia quando tratada com RAPA (JIANG; PAN, 2018).

Chen; Lewis; Kontoyiannis (2011) avaliou drogas imunossupressoras com potencial antifúngico e ressaltou que a rapamicina e seus análogos 2 e 23 possuem atividade antifúngica dependente de FKBP12 para *C. albicans* através da inibição de mTOR, além da capacidade de bloquear a capacidade do fungo de formar filamentos pela via com o bloqueio da expressão de genes associados ao uso do nitrogênio. Um estudo *in vivo* demonstrou proteção de 50 a 90% para camundongos com candidíase tratados com rapamicina (CHEN; LEWIS; KONTOYIANNIS, 2011).

Um estudo demonstrou que camundongos com LPS (indutor da ativação de mTOR) tratados com rapamicina, apresentaram redução de células *natural killers* (NK) esplênicas produtoras de interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) e NK1.1 + células linfoides inatas (ILCs). A redução de IFN- $\gamma$  em mais de 50%, demonstrou que o mTORC1 media a produção de IFN- $\gamma$  dependente e independente de linfócitos T com propriedades de células NK (NKT). Quando avaliada no sangue e nos rins, a RAPA reduziu a produção de IFN- $\gamma$  pelas células NK apenas nos rins. Quando células NKT invariáveis (iNKT) foram ativadas por antígeno lipídico  $\alpha$ -galactosilceramida ( $\alpha$ GalCer), a RAPA reduziu em 50% a produção de IFN- $\gamma$  nas células iNKT e 66% nas células NK, NK1.1 + ILCs e células T  $\gamma\delta$ . Em camundongos *naive*, a RAPA reduziu a atividade de macrófagos Ly6c+ no baço. Entretanto, com a ativação seletiva de células NKT por  $\alpha$ GalCer, a RAPA aumentou a atividade dos macrófagos Ly6c + no baço em mais de 50%, embora não tenha alterado a atividade dos macrófagos renais. Camundongos que sofreram infecção primária por *Candida sp.*, foram tratados com RAPA e reinfectados, após um dia, mostraram melhora na função fagocitária de macrófagos Ly6c+ renais, aumentando a sobrevivência. Assim, embora seja comumente usada como imunossupressor, em relação a ativação das células iNKT, a rapamicina *in vivo* restaurou a função dos macrófagos e reduziu as chances de infecções secundárias (KIM et al., 2020).

A ligação da rapamicina com a imunofilina FKBP12 tem como alvo a calcineurina em humanos e mTOR em fungos, inibindo a síntese de proteínas e autofagia em células fúngicas. Durante o tratamento da infecção por *C. albicans*, a RAPA se liga ao FKBP12 na célula fúngica tendo como alvo do complexo a quinase mTORC1. Um estudo produziu 45.000 moléculas

análogas a rapamicina, várias mostraram menor atividade imunossupressora e maior atividade antifúngica para *C. albicans*, quatro deles (2, 18, 19 e 23) em comparação com a rapamicina. Entretanto a FKBP12 ou o gene *Rbp1* que codifica seu homólogo são necessários para atividade antifúngica da RAPA ou seus homólogos (VELLANKI; GARCIA; LEE, 2020).

Em 1978 os níveis séricos da rapamicina em camundongos foram maiores quando administrada por via subcutânea em relação a via oral. Porém a administração em cães ou camundongos, independente da via, resultou em uma rápida absorção e concentrações séricas acima dos valores da concentração inibitória mínima (MIC) e da mínima concentração fungicida (MFC) da RAPA em infecção *in vitro* por *C. albicans*. No modelo murino de infecção *in vivo*, 30 dias de tratamento por via oral de uma ou duas doses da droga resultou em sobrevida semelhante ao tratamento por anfotericina B, quando a RAPA foi administrada por via subcutânea, resultou em maior sobrevida (BAKER et al., 1978).

A suscetibilidade da *Candida glabrata* para azóis como o fluconazol é influenciada pela sinalização de mTOR e calcineurina e mediada por *CgYor1*. O cultivo de *C. glabrata* com rapamicina resultou na redução da transcrição do gene *CgYOR1* (um dos genes que codifica o transportador ABC), reduzindo a alteração da composição da membrana e a consequente difusão de fluconazol resultando na redução da suscetibilidade aos azóis. Apesar do *CgYor1* não transportar OMY, ele contribui para a resistência azólica ativando vias de sinalização de estresse como a geração de ROS, supressão de mTOR e sinalização de calcineurina, que está ligada à homeostase alterada de esfingolípídeos. Células fúngicas com deleção do gene transportador *Cg yor1 Δ* demonstraram suscetibilidade aos azóis, em condições de escassez de nitrogênio, independente do transportador *CgCdr1*. Essas células também mostraram maior suscetibilidade a mTOR e inibidores da calcineurina (KUMARI et al., 2022).

#### 4 CONCLUSÃO

A atividade antifúngica da rapamicina ocorre por diversas vias de inibição da mTOR. Sua ligação com a imunofilina FKBP12 ou um homólogo codificado pelo gene *Rbp1* tem como alvo a mTOR em fungos, inibindo a síntese de proteínas e a autofagia. Entretanto, *in vitro* a RAPA também é capaz de inibir mTOR indiretamente, através do bloqueio da via de sinalização I $\kappa$ B/Akt/HIF1 $\alpha$ , que resulta no aumento da glicólise, principal fonte de energia dos monócitos. Essa droga ainda é capaz de reduzir a ativação da via TSC1-mTOR suprimindo a imunidade induzida e a necroptose.

Infecções por *Candida sp.* tratadas por rapamicina resultaram na redução da inflação no baço causada por células NK, NK1.1 + ILCs e macrófagos Ly6c<sup>+</sup>; no rim pela redução da produção de IFN- $\gamma$  pelas células NK. Em um estudo *in vivo*, a rapamicina reduziu as chances de infecções secundárias e em outro aumentou a proteção de 50 a 90% para os camundongos tratados. O cotratamento da rapamicina com fluconazol reduziu a suscetibilidade de *Candida glabrata* aos azóis.

Em *C. albicans* a inibição de mTOR1 pela rapamicina também possui as capacidades de bloquear a expressão dos genes *GLN3* e *GAT1* associados ao uso do nitrogênio de ativar os fatores de transcrição *Efg1* e *Bcr1* que participam da agregação celular e inibem os repressores de filamentos *TUP1* e *NRG1* gerando alterações na morfologia da colônia e dificultando a formação de filamentos. Foi demonstrado que essa alteração da morfologia induzida por RAPA pode reduzir a virulência de cepas de *C. albicans*. Portanto, embora careça de estudos clínicos, a rapamicina possui alto potencial para o tratamento de candidemias.

#### REFERÊNCIAS

ARRIOLA APELO, S. I.; LAMMING, D. W. Rapamycin: An InhibiTOR of Aging Emerges

From the Soil of Easter Island. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*, v. 71, n. 7, p. 841–849, jul. 2016.

BAKER, H. et al. Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. III. In vitro and in vivo evaluation. *The Journal of Antibiotics*, v. 31, n. 6, p. 539–545, jun. 1978.

CHEN, S. C.-A.; LEWIS, R. E.; KONTOYIANNIS, D. P. Direct effects of non-antifungal agents used in cancer chemotherapy and organ transplantation on the development and virulence of *Candida* and *Aspergillus* species. *Virulence*, v. 2, n. 4, p. 280–295, 2011.

CHENG, S.-C. et al. mTOR/HIF1 $\alpha$ -mediated aerobic glycolysis as metabolic basis for trained immunity. *Science (New York, N.Y.)*, v. 345, n. 6204, p. 1250684, 26 set. 2014.

HEBECKER, B. et al. Dual-species transcriptional profiling during systemic candidiasis reveals organ-specific host-pathogen interactions. *Scientific Reports*, v. 6, p. 36055, 3 nov. 2016.

JIANG, L.; PAN, H. Functions of CaPhm7 in the regulation of ion homeostasis, drug tolerance, filamentation and virulence in *Candida albicans*. *BMC Microbiology*, v. 18, p. 49, 4 jun. 2018.

KIM, E. Y. et al. Post-sepsis immunosuppression depends on NKT cell regulation of mTOR/IFN- $\gamma$  in NK cells. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 130, n. 6, p. 3238–3252, 1 jun. 2020.

KSIEZOPOLSKA, E.; GABALDÓN, T. Evolutionary Emergence of Drug Resistance in *Candida* Opportunistic Pathogens. *Genes*, v. 9, n. 9, p. 461, 19 set. 2018.

KUMARI, S. et al. Unmasking of CgYor1-Dependent Azole Resistance Mediated by Target of Rapamycin (TOR) and Calcineurin Signaling in *Candida glabrata*. *mBio*, v. 13, n. 1, p. e03545-21, jan. 2022.

LAMMING, D. W.; SABATINI, D. M. Chapter 2 - Regulation of TOR Signaling in Mammals. Em: *The Enzymes*. *The Enzymes*. [s.l.] Academic Press, 2010. v. 27p. 21–38.

LI, T. et al. TSC1 Suppresses Macrophage Necroptosis for the Control of Infection by Fungal Pathogen *Candida albicans*. *ImmunoHorizons*, v. 5, n. 2, p. 90–101, 18 fev. 2021.

LIAO, W.-L.; RAMÓN, A. M.; FONZI, W. A. GLN3 encodes a global regulator of nitrogen metabolism and virulence of *C. albicans*. *Fungal genetics and biology : FG & B*, v. 45, n. 4, p. 514–526, abr. 2008.

MIRYALA, S. K.; ANBARASU, A.; RAMAIAH, S. Organ-specific host differential gene expression analysis in systemic candidiasis: A systems biology approach. *Microbial Pathogenesis*, v. 169, p. 105677, ago. 2022.

PAPPAS, P. G. et al. Invasive candidiasis. *Nature Reviews Disease Primers*, v. 4, n. 1, p. 1–20, 11 maio 2018.

SHARECK, J.; BELHUMEUR, P. Modulation of Morphogenesis in *Candida albicans* by

Various Small Molecules ▽ . *Eukaryotic Cell*, v. 10, n. 8, p. 1004–1012, ago. 2011.

TEO, Y. J. et al. Renal CD169<sup>++</sup> resident macrophages are crucial for protection against acute systemic candidiasis. *Life Science Alliance*, v. 4, n. 5, p. e202000890, 19 fev. 2021.

TONG, Y. et al. Hyper-Synergistic Antifungal Activity of Rapamycin and Peptide-Like Compounds against *Candida albicans* Orthogonally via Tor1 Kinase. *ACS Infectious Diseases*, v. 7, n. 10, p. 2826–2835, 8 out. 2021.

VELLANKI, S.; GARCIA, A. E.; LEE, S. C. Interactions of FK506 and Rapamycin With FK506 Binding Protein 12 in Opportunistic Human Fungal Pathogens. *Frontiers in Molecular Biosciences*, v. 7, p. 588913, 16 out. 2020.

VÉZINA, C.; KUDELSKI, A.; SEHGAL, S. N. Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle. *The Journal of Antibiotics*, v. 28, n. 10, p. 721–726, out. 1975.