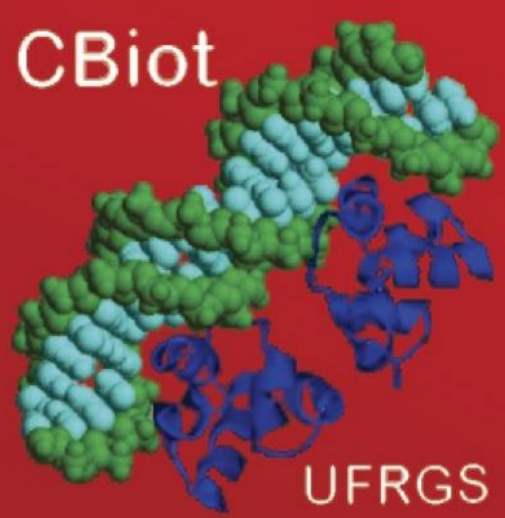


# Ação antifúngica dos compostos Plumerídeo e Plumieridina sobre mutantes de *Cryptococcus gattii*



Betina Iser<sup>1</sup> e Marilene Henning Vainstein<sup>1</sup>.

1 - Centro de Biotecnologia, UFRGS.

betina\_22@hotmail.com

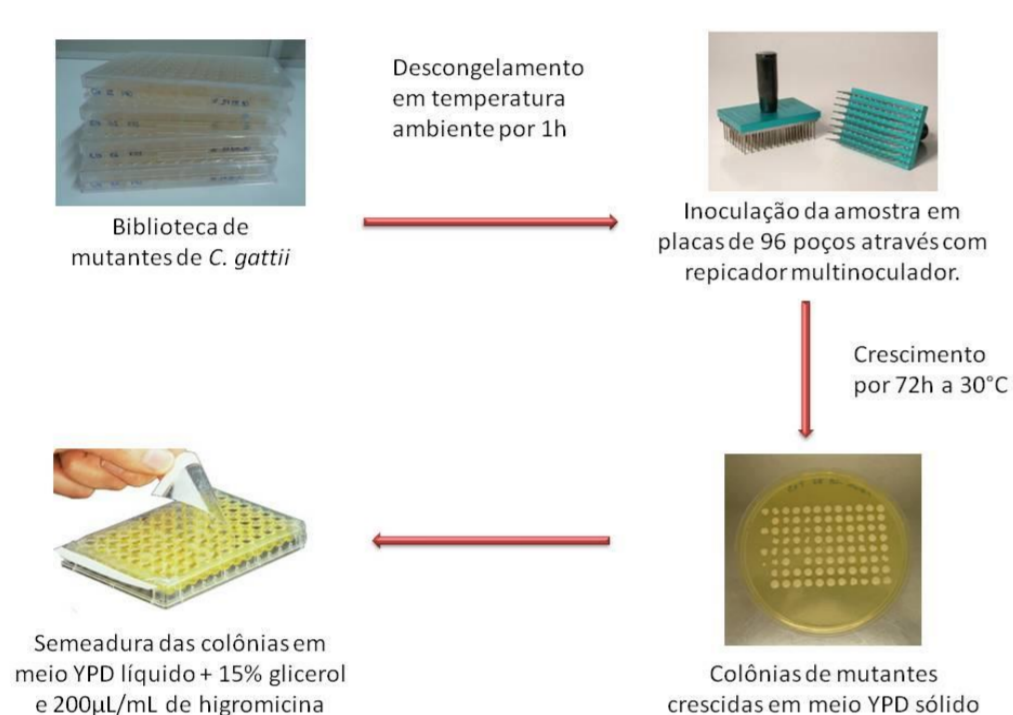


## INTRODUÇÃO

A criptococose é uma doença fúngica invasiva causada por fungos basidiomicéticos do gênero *Cryptococcus sp*, que possuem três principais fatores de virulência: produção de cápsula polissacarídica, produção de melanina e crescimento a 37° C. A transmissão ocorre por inalação de esporos ou leveduras dissecadas encontrados no ambiente, e conseqüentemente, a doença atinge primeiramente o pulmão. Além disso, o patógeno apresenta tropismo pelo sistema nervoso central, causando meningoencefalite. *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* são os principais agentes etiológicos da criptococose. *C. neoformans* acomete majoritariamente pacientes imunocomprometidos, enquanto *C. gattii* indivíduos imunocompetentes. Atualmente os fármacos usados no tratamento da doença, como anfotericina B e fluconazol, têm elevado grau de citotoxicidade, causando prejuízos aos tecidos renais e hepáticos. Como alternativa, um trabalho prévio do grupo mostrou atividade antifúngica de dois compostos iridóides extraídos das sementes de *Allamanda polyantha*: plumerídeo e plumieridina. Com a utilização destes será realizado *screening* utilizando uma biblioteca de mutantes de *C. gattii*, com o objetivo de elucidar o mecanismo de ação destes compostos.

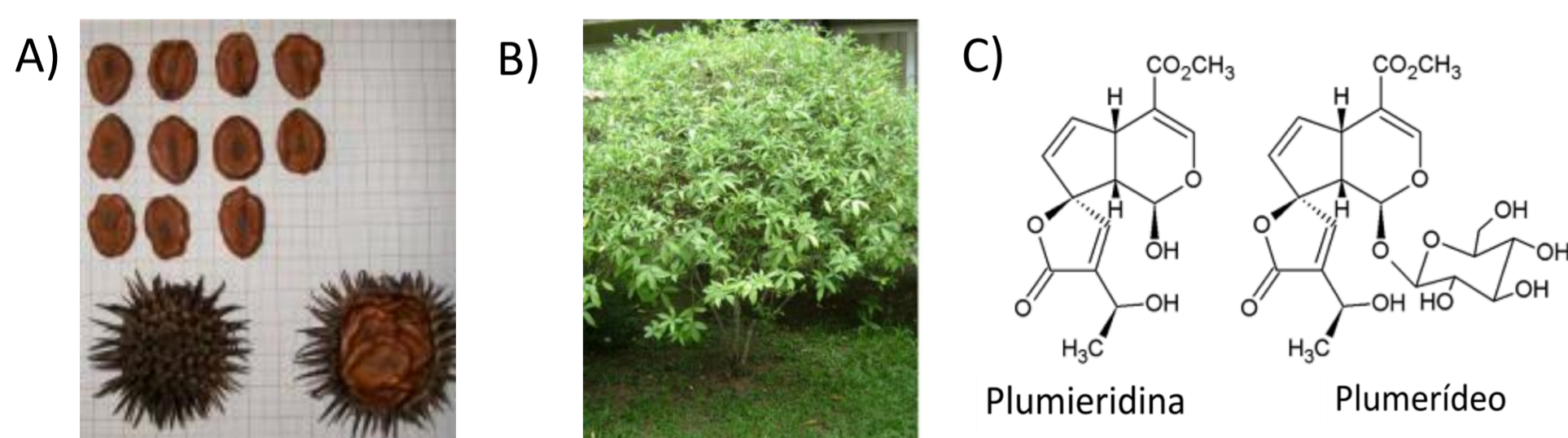
## MATERIAIS E MÉTODOS

### Recuperação da biblioteca de mutantes *C. gattii*



**Figura 1:** Figura esquemática do método de repique e manutenção da biblioteca de mutantes de *C. gattii* construída por transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. Utilizou-se a linhagem R265 de *C. gattii* para construção de aproximadamente 8.000 mutantes com inserção aleatória de T-DNA.

### Obtenção dos compostos plumerídeo e plumieridina



**Figura 2:** As sementes da planta *Allamanda polyantha* foram coletadas no Campus do Vale UFRGS (Figura A e B), das quais foram extraídos os compostos plumerídeo e plumieridina. O extrato aquoso é filtrado e liofilizado. Após, é estocado a - 20°C. Os compostos são purificados por cromatografia em coluna. A figura C representa as estruturas químicas dos compostos iridóides extraídos e dissolvidos em 10% DMSO.

### Determinação da concentração inibitória mínima (MIC)

Seguindo o protocolo do método de referência internacional para teste de susceptibilidade antifúngica de leveduras em diluição em caldo (NCCLS: M27-A2), foram testados os compostos plumerídeo e plumieridina em diluição seriada em meio RPMI tamponado com MOPS, e leitura do ensaio após 72h à 37°C.

### Screening da biblioteca de mutantes de *C. gattii*

Considerando-se o valor de da Concentração Mínima Inibitória (MIC) determinado para a linhagem selvagem R265 de *C. gattii*, os mutantes da biblioteca serão testados nas concentrações de ¼ MIC, MIC e 4x MIC para avaliar quais mutantes são sensíveis e resistentes aos compostos plumerídeo e plumieridina.

## RESULTADOS

### Quantidade de mutantes recuperados

Dos 8.000 mutantes gerados foi possível recuperar até o momento 4.815 linhagens transformadas. Estas linhagens serão utilizadas no *screening* com os compostos plumerídeo e plumieridina.

### Concentração mínima inibitória dos compostos plumerídeo e plumieridina para *C. neoformans* e *C. gattii*

**Tabela 1:** Concentração inibitória mínima (MIC) e concentração fungicida mínima (MFC) determinadas para os compostos plumerídeo e plumieridina para as linhagens *C. gattii* (R265) e *C. neoformans* (H99).

espécie	linhagem	plumerídeo (mg/ml)		plumieridina (mg/ml)	
		MIC	MFC	MIC	MFC
<i>C. gattii</i>	R265	0,312	0,625	0,625	1,25
<i>C. neoformans</i>	H99	0,625	1,25	0,625	1,25

### Concentração inibitória mínima dos compostos linhagens *Candida sp.* para comparação com *Cryptococcus sp.*

**Tabela 2:** Concentrações de MIC e MFC determinadas para espécies de *Candida sp.* utilizando os compostos plumerídeo e plumieridina.

espécie	linhagem	plumerídeo (mg/ml)		plumieridina (mg/ml)	
		MIC	MFC	MIC	MFC
<i>C. albicans</i>	ATCC 18804	2,5	2,5	1,25	2,5
<i>C. krusei</i>	ATCC 34135	0,3125	0,3125	0,156	0,156
<i>C. glabrata</i>	ATCC 40136	2,5	2,5	1,25	>2,5
<i>C. parapsilosis</i>	ATCC 22019	2,5	>2,5	1,25	2,5
<i>C. tropicalis</i>	ATCC 750	0,625	1,25	0,3125	>0,625

## PERSPECTIVAS

- Concluir o teste de *screening* utilizando a biblioteca de mutantes de *C. gattii* para selecionar mutantes sensíveis ou resistentes aos compostos plumerídeo e plumieridina.
- Utilizar métodos como PCR inverso e sequenciamento para determinar o *locus* inativado nos mutantes selecionados.
- Determinar os mecanismos de morte celular causada pela ação dos compostos plumerídeo e plumieridina em *C. neoformans* e *C. gattii*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- IDNURM, A. *et al.* Deciphering the model pathogenic fungus *cryptococcus neoformans*. Nature Reviews Microbiology. 2005.
- MICHELSE, C. B. *et al.* *Agrobacterium*-mediated transformation as a tool for functional genomics in fungi. Current Genetics. 2005.
- ZHOU, X. *et al.* A Genome-Wide Screening of Potential Target Genes to Enhance the Antifungal Activity of Micafungin in *Schizosaccharomyces pombe*. PLoS ONE. 2013.