

Avaliação da ação antifúngica das moléculas argenilactona e tiossemicarbazida em *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*

Jéssica Scherer¹, Marilene Henning Vainstein².

¹ Biotecnologia molecular, UFRGS e ² Centro de Biotecnologia, UFRGS.

INTRODUÇÃO

Criptococose é uma doença fúngica que afeta mais de 1 milhão de pessoas por ano. Esta doença acomete principalmente o sistema nervoso central de mamíferos, sendo os agentes causadores *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*. A infecção por *C. neoformans* está associada a pacientes imunocomprometidos, enquanto *C. gattii* a indivíduos imunocompetentes. Essas espécies possuem determinantes que possibilitam seu desenvolvimento no hospedeiro, os fatores de virulência. Existem três fatores bem estabelecidos: a produção de uma cápsula polissacarídica, a produção de melanina e a habilidade de desenvolvimento a 37°C. Atualmente, os antifúngicos utilizados para o tratamento da criptococose são frequentemente associados a efeitos colaterais expressivos e ao surgimento de resistência, tornando importante a busca por novos medicamentos. Uma planta com potencial para descoberta de novos medicamentos é a *Hyptis ovalifolia*, popularmente conhecida como malva-do-cerrado, encontrada nos Estados de Goiás, Mato Grosso e Minas Gerais. Nos estudos da planta encontrou-se a molécula bioativa argenilactona que é uma forte candidata a novo antifúngico com ação comprovada em *Paracoccidioides spp.* Além de inibir o desenvolvimento de fungos, prejudica a atividade de isocitrato liase (*PbICL*) nativa e recombinante, enzima alvo para a investigação de candidatos a fármacos por não estar presente em humanos. Outro composto promissor para o desenho racional de antifúngicos é a tiossemicarbazida derivada do canfeno, que apresentou ótima atividade antifúngica contra *Trichophyton mentagrophytes*, que não apresenta alvo molecular definido. O objetivo do presente trabalho é avaliar a atividade antifúngica sobre *C. neoformans* e *C. gattii* frente as moléculas argenilactona e tiossemicarbazida, avaliando seu efeito sobre os fatores de virulência e os mecanismos moleculares estruturais da argenilactona por apresentar alvo definido.

MATERIAIS E MÉTODOS

Concentração Mínima Inibitória – MIC

Metodologia desenvolvida de acordo com protocolo padrão National Committee for Clinical Laboratory Standards.

Avaliação dos fatores de virulência

Desenvolvimento de cápsula

As linhagens H99 e R265 foram pré-cultivadas em YPD por 24h à 30°C. Após foram diluídas em uma concentração padrão e cultivadas em meio RPMI na presença ou ausência dos tratamentos por 72h à 37°C na presença de CO₂. As células foram coradas com tinta da índia para visualização em microscópio. O tamanho da cápsula foi definido pelo diâmetro da célula com cápsula dividido pelo diâmetro da célula sem cápsula, utilizando o programa ImageJ, sendo avaliadas 100 células de cada tratamento.

Capacidade de melanização

As linhagens H99 e R265 foram pré-cultivadas em YPD por 24h à 30°C e após cultivadas em meio mínimo por 24h à 30°C. Para indução de melanização as células foram incubadas em meio-mínimo sólido com L-DOPA por 72h à 37°C, na presença ou ausência dos tratamentos.

Crescimento à 37°C

As linhagens H99 e R265 foram cultivadas a 30° C em YPD por 48 horas. Após foram realizadas diluições seriadas em placas com YPD sólido na presença ou ausência dos tratamentos. Estas placas foram incubadas a 37° C por 48 horas.

Modelagem por homologia

As seqüências de aminoácidos da enzima isocitrato liase foram obtidas no site do NCBI, *C. neoformans* (AFR94564.1) e *C. gattii* (XP_003196291.1) foram modeladas utilizando o molde de *Aspergillus nidulans* (PDB:1DQU) possuindo identidade conservada em toda seqüência de 64% e 63%, respectivamente e ambos com cobertura das seqüências de 95%, programa Modeller 9v12. Visualização com o programa Pymol.

Dinâmica molecular

A minimização e dinâmica molecular foram realizadas utilizando o pacote GROMACS 4.5.7 e campo de força do software Gromos 53a6.

RESULTADOS

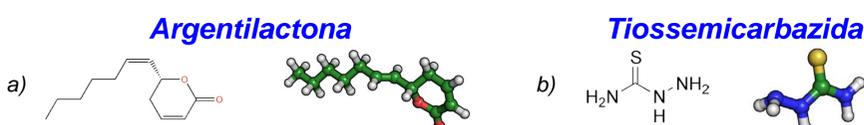


Figura 1. Representações químicas das moléculas em bidimensional (esquerda) e tridimensional (direita). a) Argenilactona. b) Tiossemicarbazida.

Concentração Mínima Inibitória – MIC

Compostos	Linhagens	MIC µg/ml	MFC µg/ml
Argenilactona	<i>C. neoformans</i> – H99	31,25	62,50
	<i>C. gattii</i> – R265	15,63	31,25
Tiossemicarbazida (alíquota antiga)	<i>C. neoformans</i> – H99	250,00	*
	<i>C. gattii</i> – R265	62,50	125,00
Tiossemicarbazida (alíquota nova)	<i>C. neoformans</i> – H99	7,80	*
	<i>C. gattii</i> – R265	3,91	*

Tabela 1. (*não definido)

Desenvolvimento de cápsula

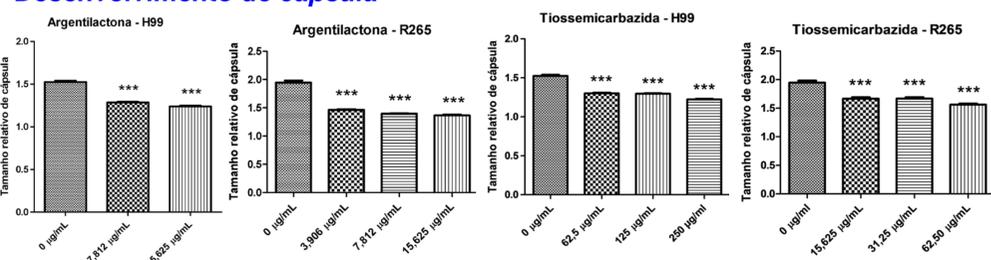


Figura 2. Efeito de Argenilactona e tiossemicarbazida no tamanho da capsula de *C. neoformans* e *C. gattii*. Teste estatístico ANOVA, p-valor <0,0001.

Capacidade de melanização

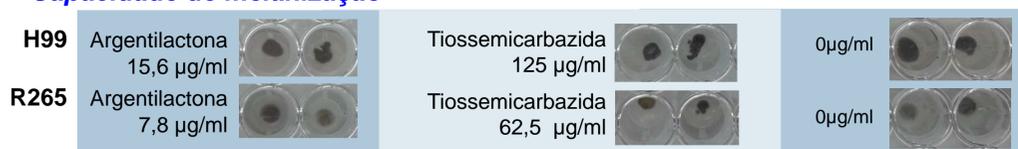


Figura 3. Argenilactona e tiossemicarbazida não alteram visualmente a produção de melanina em *C. neoformans* e *C. gattii*.

Crescimento à 37°C

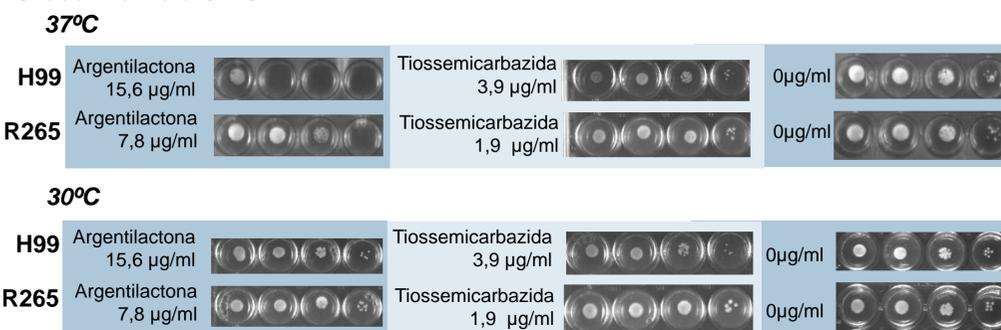


Figura 4. Argenilactona altera o desenvolvimento de *C. neoformans* a 37° C comparado com o desenvolvimento a 30° C. Tiossemicarbazida não altera o desenvolvimento de *C. neoformans* e *C. gattii* a 37° C.

Modelagem por homologia

C. neoformans:

C. gattii:

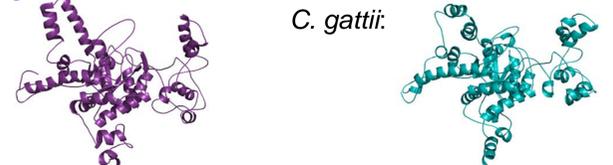


Figura 5. Estruturas 3D de isocitrato liase de *C. neoformans* e *C. gattii*. Apesar de apresentarem seqüências de aminoácidos com 99% de identidade, apresentaram algumas alterações na sua estrutura tridimensional demonstradas nas figuras acima, apresentadas na mesma orientação. Isso justifica a técnica de Dinâmica Molecular para avaliar o comportamento das estruturas no decorrer do tempo.

Dinâmica molecular

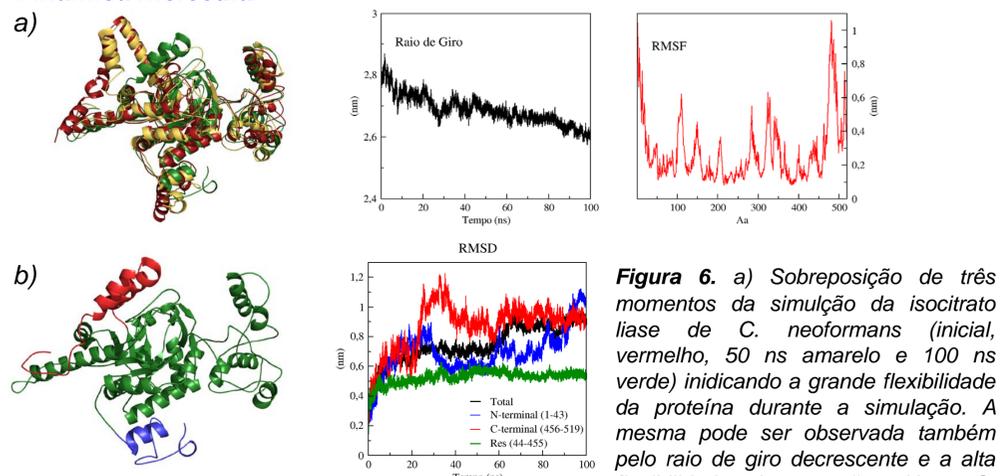


Figura 6. a) Sobreposição de três momentos da simulação da isocitrato liase de *C. neoformans* (inicial, vermelho, 50 ns amarelo e 100 ns verde) indicando a grande flexibilidade da proteína durante a simulação. A mesma pode ser observada também pelo raio de giro decrescente e a alta flexibilidade das porções N e C-terminal no RMSF (flutuação do desvio médio quadrático, por resíduo). b) Avaliação do RMSD (desvio médio quadrático) total e por regiões, demonstrando que a variação estrutural da proteína é devida principalmente as duas regiões terminais.

PERSPECTIVAS

Verificação de citotoxicidade da argenilactona e tiossemicarbazida em macrófagos;
Simulação da isocitrato liase de *C. gattii* e simulação da interação com argenilactona;
Simulação da interação entre argenilactona e a enzima isocitrato liase obtida na dinâmica;
Busca por algum possível alvo para a molécula tiossemicarbazida utilizando o programa Phammerper;
Criação de um mutante nulo para isocitrato liase de *C. gattii* para confirmar o mecanismo de ação predito da argenilactona.