

Análise do mecanismo de ação da molécula argentilactona 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 sistêmica que afeta mais de 1 milhão pessoas por ano, os principais agentes causadores são *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*. A infecção por *C. neoformans* está associada a pacientes imunocomprometidos, enquanto *C. gattii* pode acometer indivíduos imunocompetentes. Essas espécies possuem a capacidade de escape do sistema imunológico do hospedeiro, garantindo a sua sobrevivência e proliferação, esses mecanismos são conhecidos como fatores de virulência entre eles estão à produção de cápsula, capacidade de melanizar e o crescimento a 37° C. O tratamento para a doença se dá através de antifúngicos, porém eles são limitados comparados com o número de antibióticos existentes, devido a conservação da estrutura celular entre fungos e humanos, e o número de drogas anticriptococcal é ainda mais limitado, mesmo com a importância clínica da doença, associado com a alta toxicidade dos remédios já existentes e a resistência adquirida torna fundamental a busca por novos fármacos mais eficientes. 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 argentilactona 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. A enzima ICL está presente no ciclo do glioxilato, que é uma alternativa do ciclo de Krebs para moléculas com dois carbonos, como acetato. A ausência da enzima ICL em *C. neoformans* não afetou a virulência, porém, não havia estudos em *C. gattii*. O objetivo do presente trabalho é avaliar comparativamente a atividade antifúngica sobre *C. neoformans* e *C. gattii* frente a molécula argentilactona analisando o efeito sobre os fatores de virulência e mecanismo molecular comparado ao inibidor de ICL 3-nitropropionato.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

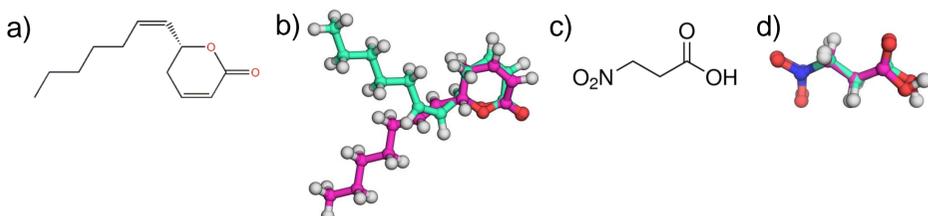


Figura 1. Moléculas argentilactona e 3-NPA. a) Estrutura secundária da molécula argentilactona. b) Estrutura tridimensional de argentilactona obtida através do programa Avogadro (carbonos em ciano) e otimizada pelo programa GAMESS (carbonos em rosa). c) Estrutura secundária da molécula 3-NPA. d) Estrutura tridimensional de 3-NPA obtida através do programa Avogadro (carbonos em ciano) e otimizada pelo programa GAMESS (carbonos em rosa).

Tabela 1. Valores de CIM de argentilactona.

Espécies	Linagem	CIM µg/ml	CFM µg/ml
<i>C. gattii</i>	R265	15,62	31,25
<i>C. neoformans</i>	H99	31,25	62,50

Obtido através do método de microdiluição de caldo, de acordo com protocolo do *Clinical and Laboratory Standards Institute* M27-A2.

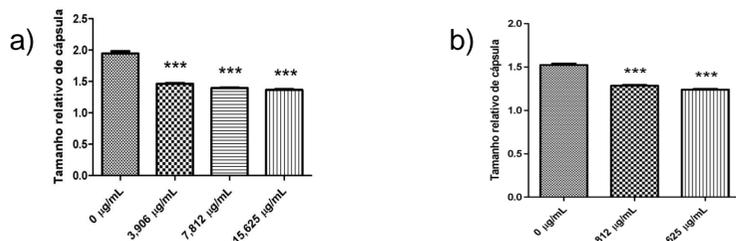


Figura 2. Teste de produção de cápsula na presença de argentilactona com nanquim. a) Gráfico de tamanho de cápsula de *C. gattii* em diferentes concentrações de argentilactona. b) Gráfico de tamanho de cápsula de *C. neoformans* em diferentes concentrações de argentilactona. Foram medidas 100 células em cada condição. Teste estatístico ANOVA, p-valor < 0,0001. Demonstrando uma diminuição significativa no tamanho de cápsula em ambas as espécies na presença do composto. A melanização não demonstrou diferença na presença de argentilactona. O desenvolvimento em 37° C foi afetado apenas em *C. neoformans*, o que indica um mecanismo de ação não diretamente relacionado com ICL (dados não mostrados).

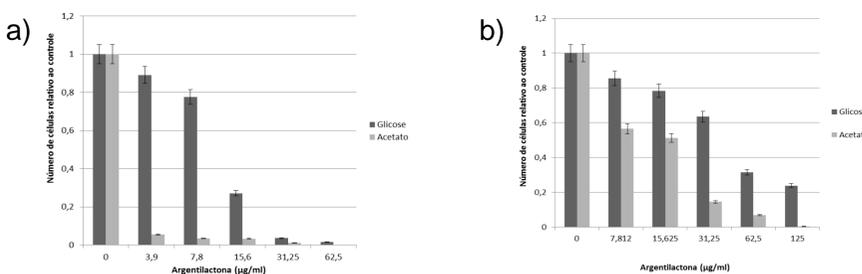


Figura 3. Desenvolvimento em meio com glicose ou acetato na presença de diferentes concentrações de argentilactona. a) *C. gattii* b) *C. neoformans*. Observou-se uma diminuição mais brusca no desenvolvimento de *C. gattii*, comparado ao *C. neoformans*.

Este dado sugere uma possível ação inibitória de argentilactona na enzima ICL, estando de acordo com o valor obtido no CIM, no qual demonstrou que *C. gattii* é mais sensível.

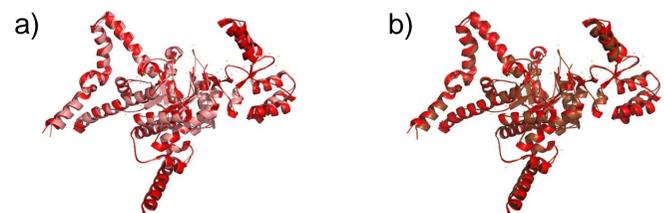


Figura 4. Modelagem por homologia. Molde de *Aspergillus nidulans* (vermelho) (PDB:1DQU). Alinhamento pelo Clustal W2 identidade a) 59,86% para *C. gattii gattii* (XP_003196291.1) (rosa) e b) 60,04% para *C. neoformans* (AFR94564.1) (marrom). Programa Modeller 9V12.

Com essas estruturas seguimos para o *docking* molecular no programa online PatchDock da argentilactona e 3-NPA, selecionando a região de ligação descrita pela literatura.

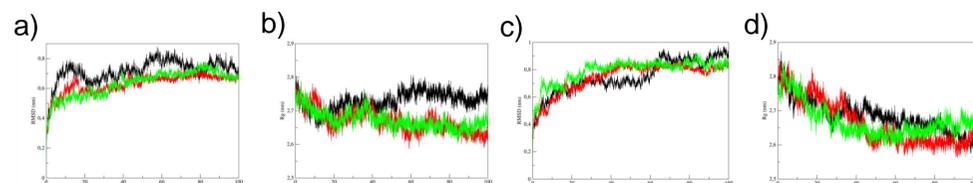


Figura 5. Análise comparativa dos gráficos de RMSD e raio de giro. Representado em preto a simulação da apoenzima, em vermelho a simulação da enzima com argentilactona e em verde a simulação da enzima com 3-NPA. a) Avaliação do RMSD – desvio médio quadrático de ICL de *C. gattii*. b) Avaliação do raio de giro de ICL de *C. gattii*. c) Avaliação do RMSD – desvio médio quadrático de ICL de *C. neoformans*. d) Avaliação do raio de giro de ICL de *C. neoformans* pelo raio de giro. No RMSD podemos verificar uma maior oscilação da ICL sem ligante em *C. gattii*. Os cálculos foram realizados pelo pacote GROMACS 4.5.7, com campo de força GROMOS 53a6 por 100 ns.

Tabela 2. Tabela de energia de ligação entre a enzima e os ligantes.

	<i>C. gatti</i>		<i>C. neoformans</i>	
	Energia (J)	Desvio-padrão	Energia (J)	Desvio-padrão
Argentilactona	-145,7	31,7	-90,7	22,2
3-NPA	-169,1	36,5	-201,2	58,3

A energia de ligação demonstrou uma ligação mais favorável de argentilactona com ICL de *C. gattii* do que *C. neoformans*, corroborando com o resultado obtido in vitro. A ligação com 3-NPA apesar de ser em média menor, é muito variável o que se justifica pelo tamanho reduzido do ligante.

CONCLUSÃO E PERSPECTIVA

A priori ICL de *C. gattii* possui várias diferenças estruturais comparado a *C. neoformans*, e sua aplicabilidade como potencial proteína-alvo para novos fármacos pode ser estudado na presença de argentilactona. Um teste preliminar que poderia contribuir com esta análise, a avaliação da fagocitose de macrófagos em *C. gattii* na presença da molécula.