

Avaliação da ação antifúngica dos compostos Plumierideo e Plumieridina em *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*

Renato Kulakowski Corá^{1,2}, Marilene Henning Vainstein²

1 Biotecnologia Molecular, UFRGS; 2 Centro de Biotecnologia, UFRGS.

INTRODUÇÃO

Cryptococcus neoformans e *Cryptococcus gattii* são leveduras patogênicas de humanos, causadoras da criptococose. A infecção ocorre pela inalação dos propágulos infecciosos destes fungos patogênicos, basidiosporos, ou leveduras dessecadas, que se instalam e se multiplicam nos pulmões, podendo posteriormente disseminar-se pelo sangue, instalando-se também no cérebro. Como consequência, a proliferação destes fungos no cérebro provoca a inflamação das meninges, causando meningite, que se não tratada, pode acarretar na morte do indivíduo infectado. A criptococose causada por *C. neoformans* tem se mostrado especialmente virulenta a imunodeficientes, e imunossuprimidos, sendo responsável por cerca de 51% dos óbitos de pacientes acometidos com AIDS. *C. gattii*, por outro lado, se mostrou ainda mais virulento, infectando também a imunocompetentes, tendo recentemente sido o causador de uma epidemia em Vancouver, Canadá. Os tratamentos atualmente disponíveis para criptococose geralmente acarretam em efeitos secundários não desejados, além de terem mostrado uma tendência a provocar o desenvolvimento de resistência por parte dos fungos. Assim, a necessidade de novos fármacos para o tratamento desta, e de outras doenças causadas por fungos tem se tornado de extrema importância. A partir do extrato de sementes de *Allamanda polyantha*, um arbusto mais conhecido como alamanda-de-cerca ou alamanda-ereta, foram identificados e isolados dois iridóides com ação antifúngica, sendo eles a Plumieridina e o Plumierideo. Ambos compostos mostraram efeito contra *C. neoformans* e *C. gattii*. A pesquisa tem como objetivo a caracterização da ação antifúngica destes dois iridóides. Foram feitos testes para avaliar a virulência desses organismos na presença dos compostos, assim como análises computacionais com objetivo de prever possíveis alvos dos compostos nestes patógenos. A partir da modelagem dos alvos, pretende-se efetuar estudos de *docking* molecular dos compostos com elas visando entender as bases moleculares desta interação.

MATERIAIS E MÉTODOS

Avaliação de tamanho de cápsula: A linhagem H99 foi pré-cultivada em YPD por 24h à 30°C. Após foi diluída em uma concentração padrão e cultivada em meio RPMI na presença ou ausência de plumieridina 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 medida célula/capsula de 100 células distintas de cada cultivo, utilizando o programa ImageJ.

Teste 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 de plumieridina e plumierideo.

Teste de crescimento a 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 de plumieridina e plumierideo. Estas placas foram incubadas a 37°C por 48 horas.

Obtenção da estrutura tridimensional: A partir das figuras da forma estrutural plana das moléculas dos compostos foi possível construir, usando o programa Avogadro, a estrutura tridimensional dos compostos estudados. A conformação dessa estrutura foi então otimizada através do pacote de programas GAMESS. (Gordon M.S *et al.* 2005)

Predição de alvos potenciais: A estrutura otimizada das moléculas do Plumierideo e da Plumieridina foram então submetidas para o PharmMapper, uma ferramenta computacional online que indica possíveis alvos para ação de fármacos. Entre os melhores resultados do PharmMapper foram selecionados proteínas presentes em fungos, e especificamente com sequência conhecida em *C. neoformans* e *gattii*, como possíveis alvos para ação dos compostos, visando propor um possível mecanismo de ação dos compostos. (Liu, X. *et al.* 2010)

RESULTADOS

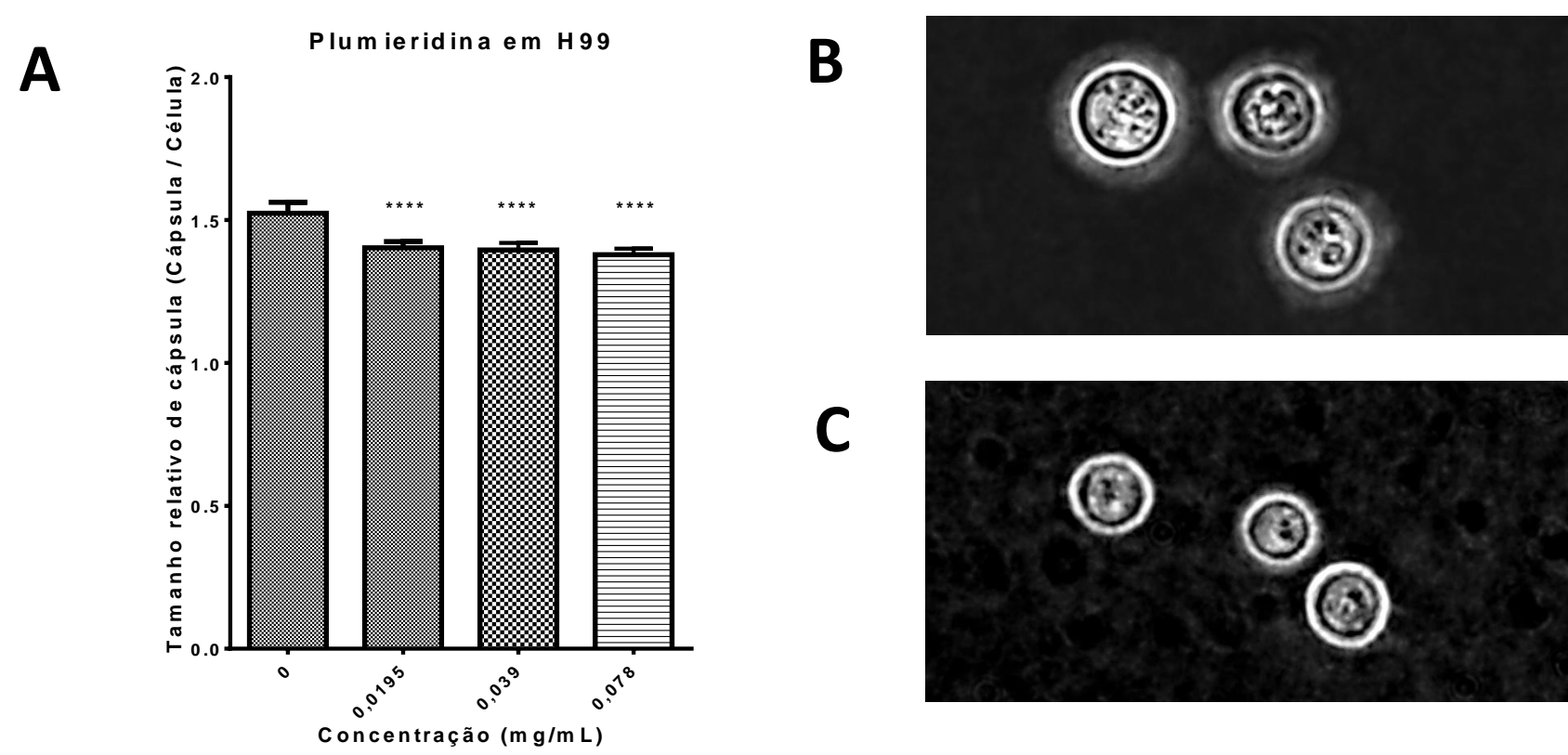


Figura 1. Indução de cápsula com CO₂ de células de *C. Neoformans* (H99) na presença de Plumieridina. (A) Gráfico comparando o tamanho relativo das cápsulas (o tamanho relativo corresponde a medida da célula dividida pela medida da célula excluindo a cápsula). (B) Imagem obtida por microscopia óptica das células de H99 na ausência de composto. (C) Células da levedura com concentração de Plumieridina correspondente ao MIC. O gráfico mostra que existe diferença significativa entre os tamanhos das cápsulas, indicando a efetividade da plumieridina.

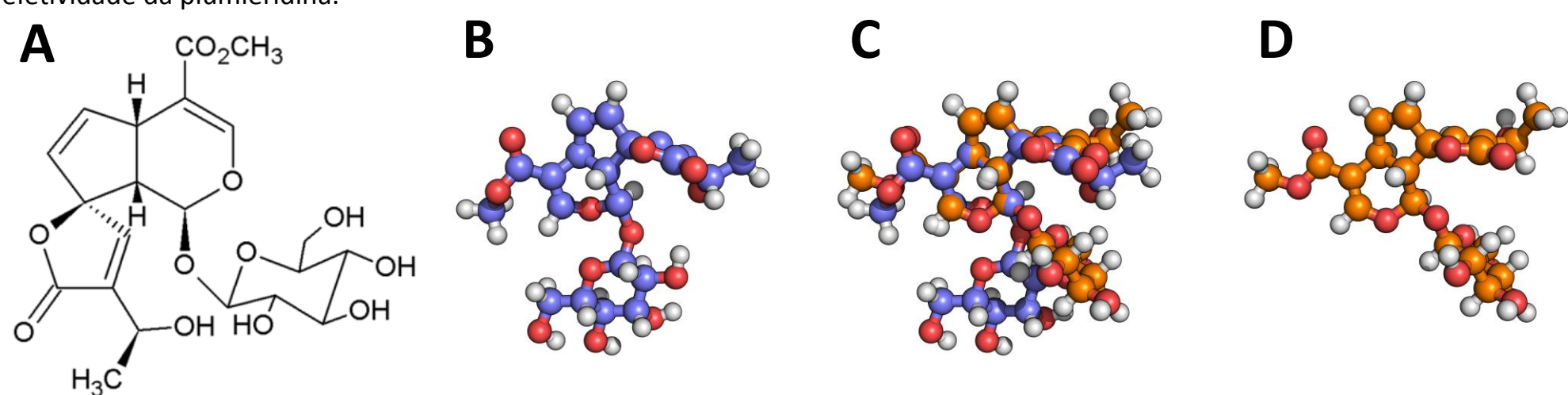


Figura 3. (A) Forma plana da Plumierideo. (B) Forma tridimensional do Plumierideo desenhada com Avogadro. (C) Sobreposição das imagens B e D, mostrando diferenças na estrutura após otimização desta. (D) Forma tridimensional do Plumierideo após ter sua estrutura otimizada com GAMESS.

Tabela 1. Possíveis alvos indicados pelo PharmMapper para ação do Plumierideo ordenados por seu z'-score, e presença deste alvos em fungos e mamíferos (onde "X" denota a presença, "-" a ausência, e "0" indica que o alvo não foi pesquisado por possuir baixo Fit Score)

N°	Target Name	N° of Feature	Fit Score	Normalized	z'-score	Mamíferos	Fungos
1	Maltose-binding periplasmic protein	8	4.669	0.5836	1,880080	X	X
2	Siroheme synthase	9	4.76	0.5289	1,422070	-	X
3	NONE	12	4.849	0.4041	1,389270	0	0
4	Heat-labile enterotoxin B chain	7	4.664	0.6663	1,263020	X	-
5	Aldose reductase	14	4.671	0.3337	1,176870	X	X
6	Probable uracil phosphoribosyltransferase	8	4.519	0.5648	1,154920	-	X
7	F17a-G fimbrial adhesin	6	4.741	0.7902	1,145080	-	-
8	Phosphoribosylglycinamide formyltransferase	7	4.486	0.6408	1,102300	X	X
9	NONE	8	4.434	0.5542	1,088600	0	0
10	2-C-methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate synthase	8	5.228	0.6535	1,008390	-	X
11	NONE	9	4.479	0.4977	0,993683	0	0
12	Gag-Pol polyprotein	10	4.557	0.4557	0,881194	X	X
13	NONE	8	4.606	0.5758	0,831672	0	0
14	NONE	8	4.339	0.5423	0,793196	0	0
15	NONE	5	4.392	0.8783	0,780194	0	0
16	Glycogen phosphorylase, muscle form	8	4.675	0.5843	0,709990	X	-
17	Glucosamine-fructose-6-phosphate aminotransferase [isomerizing]	9	4.69	0.5212	0,667055	X	X
18	Thymidylate synthase thyX	10	6.261	0.6261	0,620612	-	-
19	Beta-lactamase	9	4.559	0.5065	0,562825	X	X
20	Glutathione S-transferase A1	14	4.711	0.3365	0,561905	X	X
21	Extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-14	8	4.286	0.5357	0,558094	0	0
22	NONE	6	4.287	0.7145	0,555639	0	0
23	Cholera enterotoxin subunit B	6	4.249	0.7082	0,545029	0	0
24	Aminoglycoside 2-N-acetyltransferase	10	4.696	0.4696	0,524006	-	-
25	Fructose-1,6-bisphosphatase 1	8	4.405	0.5506	0,514626	0	0
26	tRNA	8	4.361	0.5451	0,496584	0	0
27	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase	9	4.925	0.5472	0,482836	X	X
28	Probable dipthine synthase	8	4.387	0.5484	0,475829	0	0
29	NONE	6	4.289	0.7149	0,473257	0	0
30	Thermonuclease	8	4.521	0.5651	0,463505	-	X

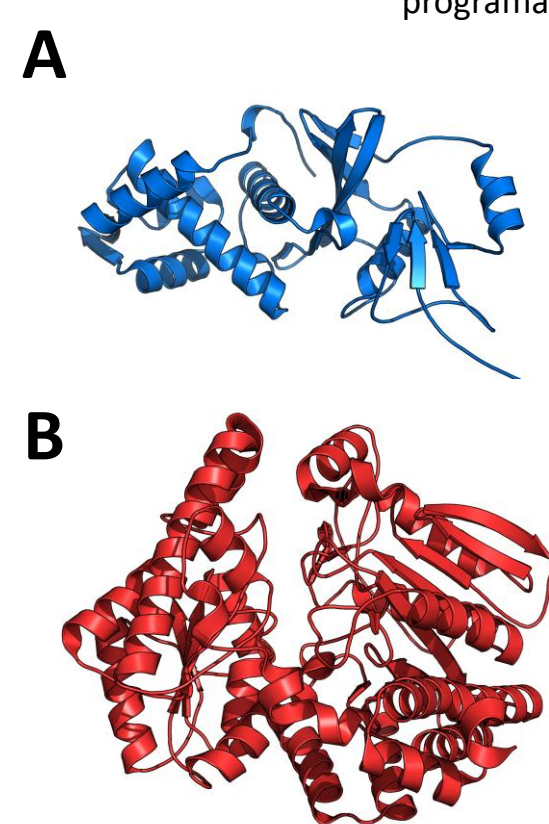


Figura 5. Potenciais alvos para a ação antifúngica da Plumieridina. (A) Histona acetiltransferase ESA1. (B) Urocanato hidratase. Ambos modelos possuem identidade com a sequência de *C. neoformans* e *C. gattii* compatível com a técnica de modelagem comparativa por homologia

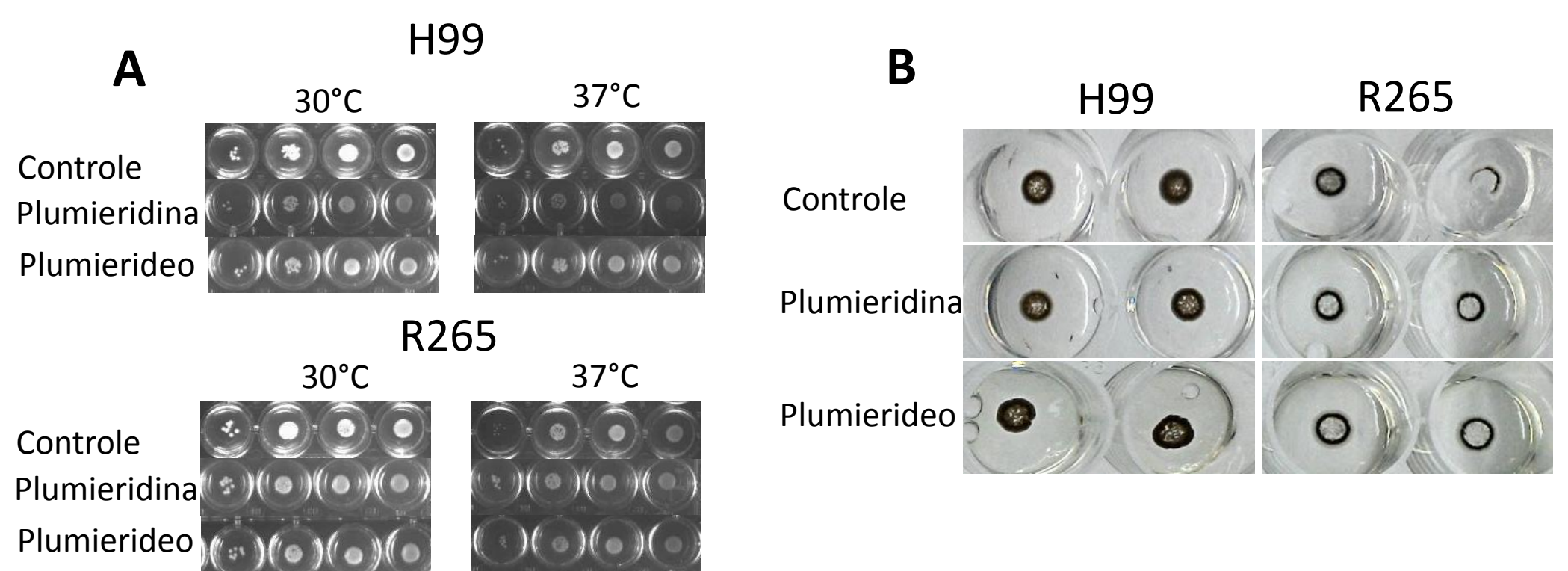


Figura 2. (A) Teste de crescimento a 37°C: Não foram encontradas variações no crescimento, indicando que os compostos não diferem quanto a sua efetividade contra *cryptococcus sp.* em temperatura ideal de crescimento ou temperatura de infecção. (B) Teste de Melanização: Não houve diferenças quanto a melanização na presença dos compostos, o que indica que a ação antifúngica dos compostos não influi na produção de melanina das leveduras.

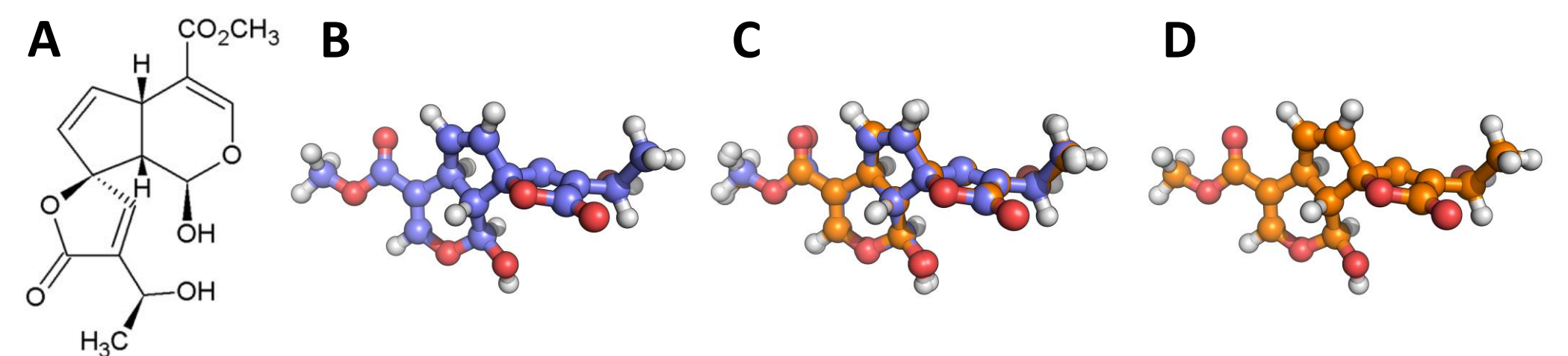


Figura 4. (A) Forma plana da Plumieridina. (B) Forma tridimensional da Plumieridina desenhada com Avogadro. (C) Sobreposição das imagens B e D, mostrando diferenças na estrutura após otimização desta. (D) Forma tridimensional da Plumieridina após ter sua estrutura otimizada com GAMESS.

Tabela 2. Possíveis alvos indicados pelo PharmMapper para ação da Plumieridina ordenados por seu z'-score, e presença deste alvos em fungos e mamíferos (onde "X" denota a presença, "-" a ausência, e "0" indica que o alvo não foi pesquisado por possuir baixo Fit Score). Os dois alvos destacados foram selecionados como alvos potenciais por possuírem alto Z'-score e fit score, conforme sugerido pelo programa

N°	Target Name	N° of Feature	Fit Score	Normalized	z'-score	Mamíferos	Fungos
1	Streptavidin	7	4.200	0.6000	3,286240	-	-
2	Streptavidin	6	4.097	0.6828	3,022540	-	-
3	Streptavidin	7	3.971	0.5673	2,342140	-	-
4	Cyclomalto-dextrin glucanotransferase	7	3.750	0.5357	1,948850	-	-
5	Streptavidin	7	3.821	0.5459	1,863130	-	-
6	NONE	8	4.873	0.6091	1,579200	0	0
7	NONE	10	3.745	0.3745	1,345610	0	0
8	Mannose/glucose-specific lectin Cramoll	5	3.606	0.7213	1,293890	0	0
9	Histone acetyltransferase ESA1	10	3.904	0.3904	1,273760	X	X
10	Guanyl-specific ribonuclease T1	7	3.671	0.5244	1,262130	-	X
11	Phenylalanine-4-hydroxylase	5	3.574	0.7147	1,259040	0	0
12	NONE	5	3.636	0.7271	1,186280	0	0
13	Maltose-binding periplasmic protein	10	4.854	0.4854	1,181980	X	X
14	Streptavidin	7	3.625	0.5178	1,124950	-	-
15	Anaerobic ribonucleoside-triphosphate reductase	6	3.665	0.6108	1,124380	X	X
16	Adenylosuccinate synthetase isozyme 1	7	3.653	0.5218	0,968255	X	-
17	Thymidylate synthase	8	3.781	0.4726	0,837650	X	X
18	NONE	7	3.407	0.5068	0,742734	0	0
19	Congerin-1	8	4.548	0.5510	0,730622	-	-
20	Orotidine 5-phosphate decarboxylase	9	3.734	0.4149	0,676681	X	X
21	2,2-dialkylglycine decarboxylase	6	3.806	0.6343	0,672025	-	X
22	Aspartate aminotransferase	9	4.364	0.4849	0,585030	X	X
23	Gag-Pol polyprotein	12	3.741	0.3118	0,584656	X	X
24	Streptavidin	6	3.510	0.5850	0,577789	-	-
25	Fucose-specific lectin	6	3.650	0.6083	0,521378	-	X
26	Urocanate hidratase	12	3.759	0.3132	0,520103	X	X
27	Streptavidin	6	3.524	0.5873	0,483433	-	-
28	Fucolectin	6	3.750	0.6249	0,454775	-	-
29	Thymidylate synthase thyX	10	4.857	0.4857	0,446112	-	-
30	1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase	9	3.568	0.3964	0,341446	0	0

PERSPECTIVAS: Executar modelagem por homologia com os potenciais alvos encontrados para Plumieridina, e em seguida, usar-los para realizar estudos de *docking* molecular com ela, que serão refinados com a técnica de dinâmica molecular. Obter potenciais alvos para a ação do Plumierideo em *Cryptococcus sp.* e realizar os mesmos processos descritos para os alvos identificados para plumieridina.