

Análise proteômica do fungo *Paracoccidioides brasiliensis* na presença do candidato a antifúngico Argentilactona

Joyce Villa Verde Bastos, Maristela Pereira
Universidade Federal de Goiás, 74690-903, Brasil
joyce_jvzb@hotmail.com, mani@icb.ufg.br

PALAVRAS CHAVE : *P. brasiliensis*, Argentilactona, Proteômica, Toxicidade

1. INTRODUÇÃO

O fungo *Paracoccidioides brasiliensis* é o agente etiológico da Paracoccidioidomicose (PCM), uma micose humana sistêmica granulomatosa, inicialmente denominada hifoblastomicose pseudococidióica (LUTZ, 1908). Embora não seja uma moléstia de notificação compulsória, no Brasil é a nona causa de mortalidade entre as doenças infecciosas parasitárias constituindo-se um problema de saúde pública (PRADO *et al.*, 2009). Um grande número de trabalhadores rurais foi observado entre os acometidos pela PCM; a maioria residente em áreas endêmicas, do sexo masculino, entre 30 a 60 anos de idade. (SVIDZINSKI *et al.*, 1999; VILLAR *et al.*, 2000).

Devido à toxicidade dos antifúngicos existentes para o tratamento de micoses e ao isolamento de linhagens resistentes, tornam-se cada vez mais necessários estudos em busca de novas terapias (HAHN *et al.*, 2003). Plantas com propriedades antimicrobianas representam uma fonte em potencial para a obtenção de compostos antifúngicos (KUHNT *et al.*, 1995). No entanto, devido à imensa quantidade de espécies a serem exploradas, selecionar espécies vegetais e investigar o seu potencial farmacológico torna-se difícil. Os riscos associados ao uso dessas plantas, como por exemplo, a toxicidade, também deve ser avaliada (AURICCHIO & BACCHI, 2003). Em adição, moléculas-alvo presentes em fungos e ausentes em humanos têm se tornado prioritário para o desenvolvimento de antifúngicos. Estudos que de perfis proteômicos fornecem a oportunidade para compreensão da interação patógeno - hospedeiro e tem trazido importantes contribuições aos mecanismos de patogênese em vários sistemas biológicos. O estudo da interação patógeno - hospedeiro revela fatores de virulência que podem vir a ser alvos específicos para o desenvolvimento de fármacos visando o tratamento de doenças.

O gênero *Hyptis* apresenta cerca de 400 espécies, representando uma importante fonte de constituintes bioativos com importantes propriedades, tais como atividades antimicrobianas, citotóxicas e inseticidas (OLIVEIRA *et al.*, 2004). Uma grande diversidade morfológica de plantas desse gênero é encontrada no Cerrado, sendo que suas espécies são ricas em óleos essenciais e utilizadas popularmente no tratamento de infecções (FÁTIMA *et al.*, 2004).

Ensaio bio-guiados em patógenos humanos como *Trypanosoma cruzi*, *Plasmodium falciparum*, *Leishmania amazonensis* e *Leishmania panamensis*, levaram à identificação do composto argetilactona, isolado a partir do óleo essencial de *H. ovalifolia* (OLIVEIRA *et al.*, 2004). Diante de tais evidências esta molécula, análoga estrutural da incrustoparina, e encontrada em grande quantidade na espécie *H. ovalifolia*, é um modelo apropriado para gerar futuros derivados candidatos a antifúngicos.

Outro composto promissor para o desenho racional de antifúngicos é a tiossemicarbazida derivada do canfeno. Estudos demonstram que a esse composto apresentou ótima atividade antifúngica em *Trichophyton mentagrophytes*, com valores de MIC = 55 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e MFC = 110 $\mu\text{mol L}^{-1}$. (YAMAGUCHI *et al.*, 2009).

Este trabalho fornece informações de como *P. brasiliensis* responde à argetilactona, propiciando uma idéia da ação desta substância sobre as proteínas do fungo estudado, além de resultados preliminares do estudo de toxicidade deste composto e da tiossemicarbazida derivada do canfeno sobre células humanas normais.

2. OBJETIVOS

- Investigar o mecanismo de ação do produto natural argetilactona sobre o fungo patogênico humano *P. brasiliensis* por análise proteômica.
- Avaliar o efeito inibidor da proliferação celular dos produtos naturais argetilactona e tiossemicarbazida derivada do canfeno.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Análise Proteômica de *P. brasiliensis* na presença de Argetilactona

3.1.1 Extração de proteínas de *P. brasiliensis*

Células leveduriformes de *P. brasiliensis* crescidas por 24 h em meio MMcM na presença de glicose foram centrifugadas por 5 min a 3500 g. Proteínas foram extraídas de acordo com (EBEL *et al.*, 2006) com modificações. As células foram lavadas e maceradas em nitrogênio líquido. O pó foi coletado e agitado com pérolas de vidro por 30 min a 4°C, na presença de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7.0 suplementado com 1 mM ditioneitol (DTT). O material foi centrifugado por 15 min a 4°C, 3500 g; o sobrenadante foi coletado e centrifugado por 15 min a 4°C, 14000 g. O extrato obtido foi estocado a -20°C para análises posteriores.

3.1.2 Focalização isoeétrica e análise protéica por eletroforese bidimensional

Os géis de análise bidimensionais (2D) foram realizados de acordo com o método de Rabilloud (1998) com pequenas modificações. Amostras contendo as diferentes frações protéicas foram solubilizadas em tampão de lise contendo uréia 7 M, tiouréia 2M, CHAPS 2% p/v, 65 mM DTT, anfólitos pH 3-11 e azul de bromofenol. As amostras foram aplicadas em fitas immobiline (13 cm de comprimento, *GE Healthcare Biosciences*) pH 3-11. A focalização isoeétrica foi realizada em sistema IPGphor onde as fitas foram reduzidas com 1% de DTT p/v e alquiladas em 2,5 % de iodoacetamina p/v em tampão de equilíbrio (uréia 6 M, pH 6.8; 30 % de glicerol v/v e 2 % de SDS p/v) (BJELQVIST *et al.*, 1993). A segunda dimensão foi realizada em gel de poliacrilamida segundo Laemmli (1970). Os géis de poliacrilamida foram corados por azul de *Coomassie*.

3.2 Ensaios de Toxicidade dos produtos naturais argenilactona e tiossemicarbazida.

3.2.1 Linhagens celulares

Foi utilizada a linhagem humana MRC5 (fibroblasto de pulmão humano) proveniente do *American Type Culture Collection* ATCC, Rockville, Maryland, USA. Tais células foram mantidas em cultura em meio RPMI1640 (Sigma, St. Louis, MO) suplementado com 10% de soro bovino fetal (Gibco) e 1% de glutamina, eritromicina e estreptomicina (Sigma) em estufa com 5% de CO₂ a uma temperatura constante de 37°C.

3.2.2 Método de Redução do Tetrazólio

Para o estudo do método de redução do tetrazólio (MTT), as células foram incubadas com as diferentes concentrações de argenilactona e tiossemicarbazida. A seguir, as mesmas foram incubadas em estufa úmida com 5% de CO₂ por 48 h. Após o período de incubação das

células com argenticlactona, a solução de MTT (Kit – Boehringer Mannheim) foi adicionada e a placa de cultura foi incubada por mais 4 horas. Logo após, adicionou-se a solução solubilizante do MTT e incubou-se por 24 horas em estufa úmida com 5% de CO₂. No dia seguinte, foi efetuada a leitura em ELISA utilizando filtro de 570 nm, segundo MOSMAN (1983).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As análises da avaliação do perfil protéico de *P. brasiliensis* frente à argenticlactona são compostas por várias etapas, entre elas a focalização isoeétrica, que separa as proteínas do fungo de acordo com seu *pI* (ponto isoeétrico) e a separação das mesmas com base em seu peso molecular através da eletroforese em gel de poliacrilamida. Trata-se de uma análise bidimensional uma vez que as amostras correm ao longo da malha do gel verticalmente após terem sido previamente separadas horizontalmente. Neste trabalho se encontram resultados relativos a essas duas etapas.

A focalização isoeétrica de proteínas extraídas de *P. brasiliensis* cultivado na presença e na ausência de argenticlactona passou pela etapa de hidratação atingindo o pico esperado de focalização (Figura 1). Esse fato demonstra que as proteínas foram focalizadas de maneira satisfatória entre os *pI* pré-determinados.

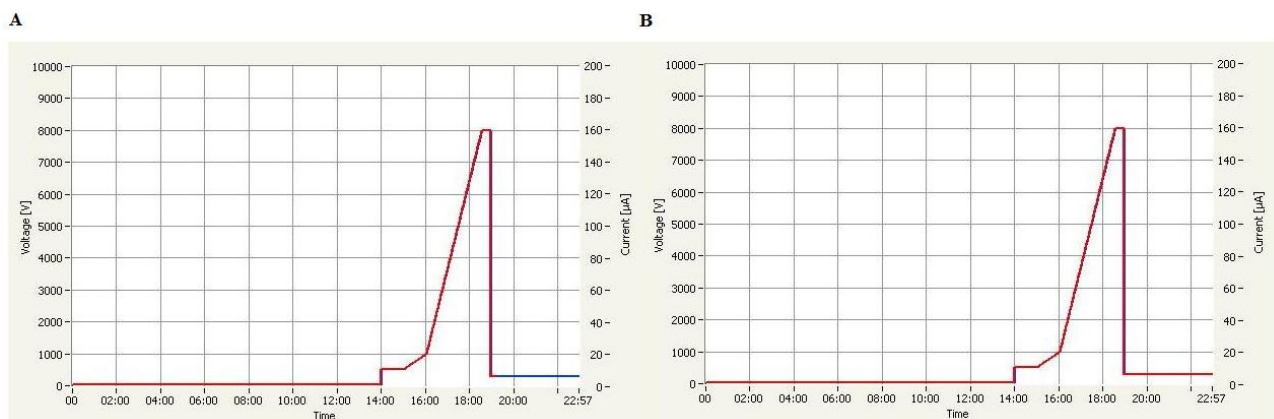


Figura 1: Focalização isoeétrica de extratos protéicos de *P. brasiliensis* cultivado na ausência (A) e na presença (B) de argenticlactona.

Após a focalização isoeétrica seguiu-se com as análises em gel bidimensional (2D). Pôde-se perceber pequena alteração no perfil de corrida das proteínas entre as amostras controle e tratada, o que sugere maior especificidade na atuação do composto testado.

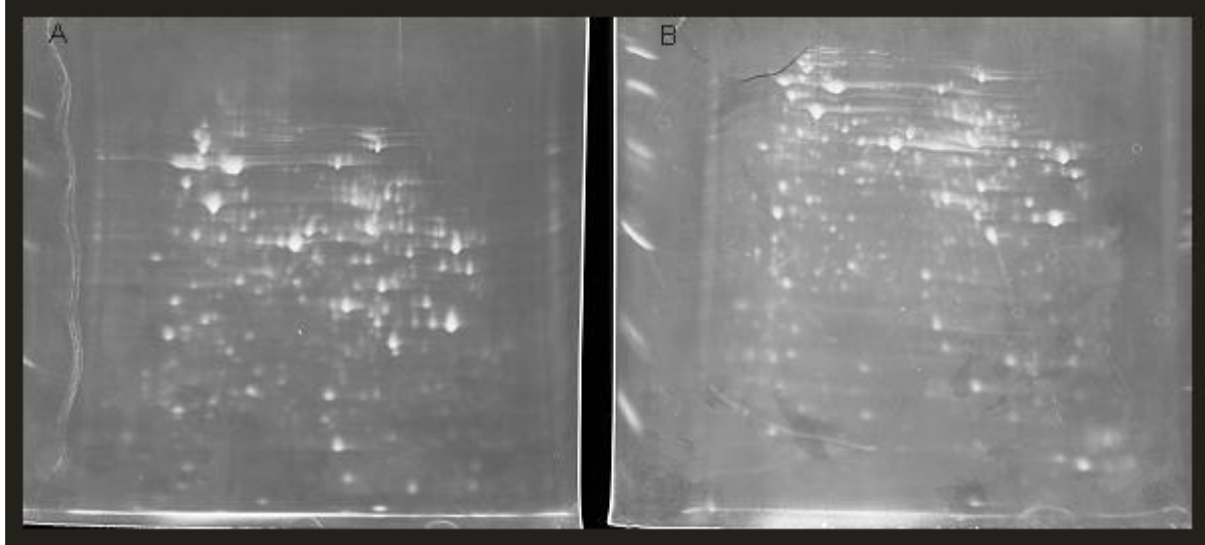


Figura 2: Géis 2D de extratos protéicos de *P. brasiliensis* cultivado na ausência (A) e na presença (B) de argentinolactona.

O Método de redução do tetrazólio (MTT) foi utilizado para avaliar a atividade mitocondrial em linhagens celulares de fibroblastos de pulmão humano (MRC-5), frente a diferentes concentrações dos compostos argentinolactona e tiossemicarbazida. Quanto menor a atividade mitocondrial, menor a viabilidade celular, indicando maior toxicidade do composto.

Os resultados dos ensaios de MTT para argentinolactona mostraram que houve diferença significativa na viabilidade celular entre testes com concentrações de 0,036 mg/ml e 0,072 mg/ml e o controle negativo (figura 3). Isso indica que o composto é tóxico para fibroblastos de pulmão humano nessas duas concentrações.

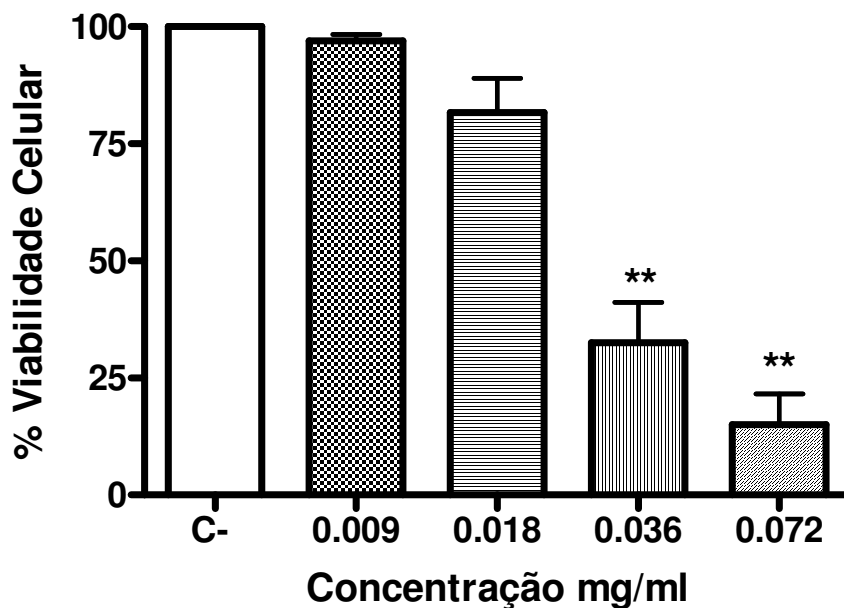


Figura 3: Viabilidade celular de fibroblastos de pulmão humano frente a diferentes concentrações de argentilactona.

O valor de IC50 encontrado para argentilactona foi $101 \mu\text{mol L}^{-1}$. Conforme estudos anteriores, o IC50 para células leveduriformes de *P. brasiliensis* foi $50 \mu\text{mol L}^{-1}$. Dessa forma, o composto argentilactona é duas vezes mais tóxico para as células do fungo que para células do hospedeiro.

Também foi observado que a viabilidade das células de fibroblasto de pulmão humano diminuiu com o aumento da concentração do composto, conforme o gráfico na escala logarítmica (Figura 4).

Vale ressaltar que a estrutura pequena e lipofílica da argentilactona permite a obtenção de derivados na busca por um composto mais efetivo e menos tóxico para o tratamento de micoses sistêmicas, o que torna a argentilactona um composto promissor como protótipo de antifúngico.

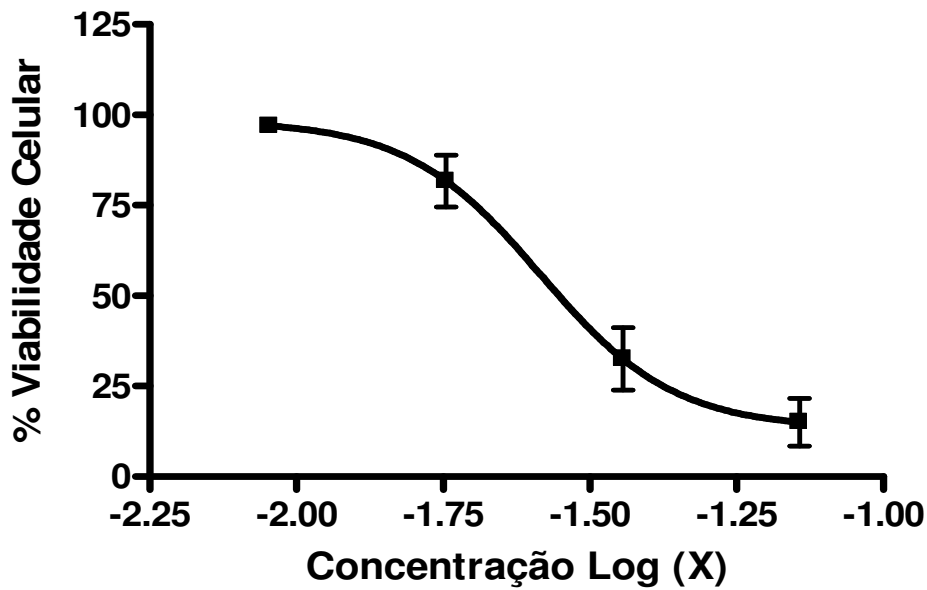


Figura 4: Viabilidade de células de fibroblasto de pulmão humano em função do logaritmo das concentrações de arginilactona.

Os resultados do teste do MTT para a tiossemicarbazida derivada do canfeno demonstraram que não houve diferença significativa na viabilidade celular nas concentrações testadas em relação ao controle negativo. Esse fato indica que o composto é pouco tóxico para as células testadas. O IC50 não pôde ser calculado, pois na maior concentração testada (72 mg/mL), a inibição foi muito pequena, sendo necessário que se faça testes em concentrações superiores.

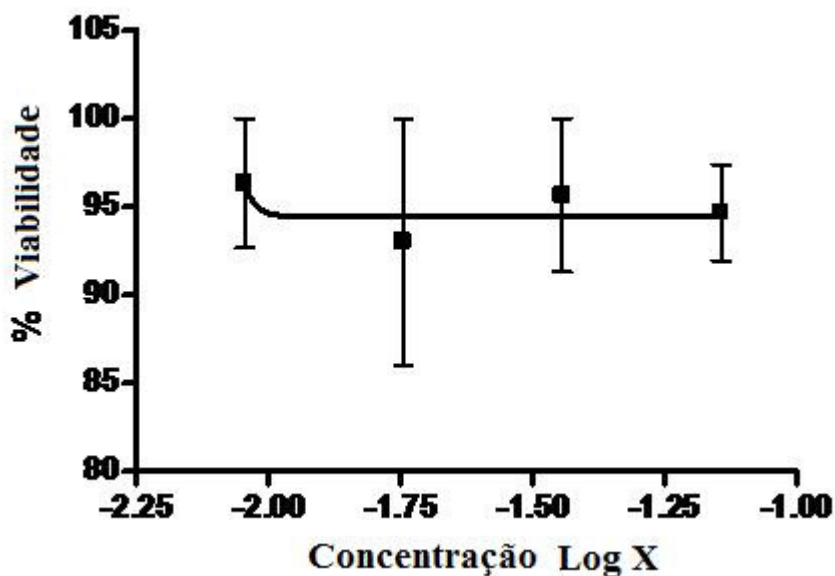


Figura 5: Viabilidade de células de fibroblasto de pulmão humano em função do logaritmo das concentrações de tiossemicarbazida derivada do canfeno.

5. CONCLUSÃO

De posse dos dados obtidos pode-se concluir que argentilactona exerce influência significativa sobre *P. brasiliensis*, uma vez que leva a uma resposta diferencial a nível protéico. Serão realizadas análises para a identificação das proteínas diferencialmente expressas.

Ficou demonstrado, também, que argentilactona apresentou toxicidade frente a células humanas normais em concentrações elevadas, no entanto, devido à estrutura pequena e lipofílica do composto fica aberta a possibilidade de ensaios com modificações estruturais em busca de um composto menos tóxico.

Em adição, a tiossemicarbazida derivada do canfeno não apresentou toxicidade significativa a células humanas normais nas concentrações testadas, o que somada à sua capacidade inibitória já descrita do crescimento de fungos, faz da mesma um excelente candidato a protótipo de antifúngico.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AURICCHIO, M. T.; BACCHI, E. M.; *Eugenia uniflora* L. “brazilian cherry” leaves: pharmabotanical, chemical and pharmacological proprieties. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, n.62, p.5561, 2003.

EBEL, F.; SCHWIENBACHER, M.; BEYER, J.; HEESEMANN, J.; BRAKHAGE, A. A.; BROCK, M.; Analysis of the regulation, expression, and localization of the isocitrate lyase from *Aspergillus fumigatus*, a potential target for antifungal drug development. **Fungal Genetics and biology**, n.43, p.476-489, 2006.

FÁTIMA, A.; KOHN L. K.; ANTONIO, M. A.; CARVALHO, J. E.; PILLI, R. A.; Enantioselective syntheses of (R)and (S)argentilactone and their cytotoxic activities against cancer cell lines. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, n.12, p.5437–5442.

HAHN R.C, MORATO CONCEIÇÃO Y. T., SANTOS N.L., FERREIRA J.F., HAMDAN J. S.; Disseminated paracoccidioidomycosis: correlation between clinical and in vitro resistance to ketoconazole and trimethoprim sulphamethoxazole. **Mycoses**, n.46, p.342-347, 2003.

KUHNT, M.; PROBSTLE, A.; RIMPLER, H.; BAUER, R.; HEINRICH, M.; Biological and harmacological activities and further constituents of Hyptis verticillata. **Planta Medica**, n.6, p.227, 1995.

LAEMMLI, U. K.; Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. **Nature**, n.227, p.680-685, 1970.

LUTZ, A.; Uma micose pseudococcídica localizada na boca e observada no Brasil: contribuição ao conhecimento das hiphoblastomicoses americanas. **Brasil Med.**, n.22, p.121-124, 1908.

OLIVEIRA, C. M. A.; SILVA, M. R. R.; KATO, L.; SILVA, C. C.; FERREIRA, H. D.; SOUZA, L. K. H.; Chemical Composition and Antifungal Activity of the Essential Oil of *Hyptis ovalifolia* Benth. (Lamiaceae). **Jornal of the Brazilian Chemical Society**, n.5, p.756-759, 2004.

PRADO, M.; SILVA, M. B.; LAURENTI, R.; TRAVASSOS, L. R.; TABORDA, C. P.; Mortality due to systemic mycoses as a primary cause of death or in association with AIDS in Brazil: a review from 1996 to 2006. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.104, n.3, p.513-521, 2009.

RABILLOUD, T. Use of thiourea to increase the solubility of membrane proteins in two-dimensional electrophoresis. **Electrophoresis**, v.19, n.3, p.758-760, 1998.

SVIDZINSKI, T. I., MIRANDA NETO, M. H., SANTANA, R. G., FISCHMAN, O., COLOMBO, A. L.; Paracoccidioides brasiliensis isolates obtained from patients with acute and chronic disease exhibit morphological differences after animal passage. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, n.41, p.279-283, 1999.

VILLA, L. A., TOBÓN, A., CALLE, D., ROSERO, D. S., GÓMEZ, B. L., RESTREPO, A.; Central nervous system paracoccidioidomycosis. Report of a case successfully treated with itraconazol. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, n.42, p.231-234, 2000.

YAMAGUCHI, M. U.; SILVA, A. P. B.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS, B. P.; SILVA, C. C.; NAKAMURA, C. V.; Effects of a Thiosemicarbazide Camphene Derivative on *Trichophyton mentagrophytes*. **Molecules**, n.14, p.1796-1807, 2009.