

SELEÇÃO DE INIBIDORES DUPLOS CONTRA *ASPERGILLUS FUMIGATUS* COM FOCO NO DESENVOLVIMENTO DE ANTIFÚNGICOS

Rafaela Mariana Moraes de Carvalho (PIC), Rafaela Martins, Karina Mayumi Sakita, Isis Regina Grenier Capoci (Co-orientadora), Érika Seki Kioshima Cotica (Orientador), e-mail: eskcotica@uem.br

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências Biológicas e da Saúde/Maringá, PR

Ciências Biológicas III - Microbiologia - Micologia

Palavras-chave: aspergilose, antifúngico, inibidores.

Resumo:

O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antifúngica dos compostos selecionados por varredura virtual contra *A. fumigatus*, com alvos nas proteínas tioredoxina redutase e glutatona redutase, utilizando as metodologias *in vitro*, ensaio de microdiluição em caldo, e padronização de modelo *in vivo* (murino), buscando compostos com atividade satisfatória que poderão ser utilizados para tratamento de aspergilose invasiva. As principais interações moleculares entre os 3 compostos selecionados e as proteínas alvo foram as pontes de hidrogênio e ligações hidrofóbicas. Os resultados de CIM confirmaram atividade antifúngica contra *A. fumigatus* para os compostos 09 e 25 nas concentrações de <0.5 e 8 µg/mL, respectivamente. Além disso, um protocolo foi estabelecido para ensaios *in vivo* em modelo murino de aspergilose invasiva.

Introdução

A aspergilose invasiva (AI) é uma infecção fúngica causada pelo gênero *Aspergillus* spp. acometendo principalmente imunocomprometidos. O agente mais frequente dessa infecção é o *Aspergillus fumigatus* (3). As manifestações clínicas variam desde reação alérgica a infecção pulmonar invasiva. As taxas de mortalidade variam de acordo com as condições subjacentes, local de infecção e terapia antifúngica utilizada. Pacientes transplantados, com doença pulmonar obstrutiva crônica, cirrose hepática ou diabetes possuem maior taxa de mortalidade (4).

A terapêutica antifúngica ainda é limitada, com apenas três classes: azóis, poliênicos e equinocandinas, e que apresentam limitações como efeitos adversos e cepas resistentes o que leva a busca por terapias alternativa ou antifúngicos mais específicos (3).

No grupo de pesquisa responsável por este trabalho foi descrito inicialmente dez alvos potenciais de drogas presentes em oito fungos patogênicos

humanos e ausentes no ser humano. Um desses alvos é uma flavoenzima denominada tioredoxina redutase (TRR1) que é parte de um sistema complexo conhecido como tioredoxina, em que uma das principais funções é a proteção da célula do estresse oxidativo (2). Já foi descrito atividade antifúngica nessa proteína em outros gêneros fúngicos (1). No entanto, são necessários estudos para fungos filamentosos como o *Aspergillus* em relação a TRR1. A metodologia *in silico* de duplo alvo é uma alternativa que vem sendo desenvolvida para a busca de novos compostos mais específicos com atividade antifúngica. Assim, esta proposta pretende explorar novos compostos com atividade em dois alvos de *A. fumigatus*, a tioredoxina redutase e a enzima glutathione redutase, envolvidos no controle do estresse oxidativo.

Materiais e métodos

Avaliação das interações moleculares

Os compostos que apresentaram os melhores resultados nos testes de encaixe molecular *in silico*, foram adquiridos comercialmente. As interações moleculares foram analisadas pelo programa PLIP (<https://plip-tool.biotec.tu-dresden.de/plip-web/plip/index>).

Avaliação da susceptibilidade antifúngica

O método utilizado para a avaliação da susceptibilidade antifúngica foi a microdiluição em caldo, objetivando estabelecer a Concentração Inibitória Mínima (CIM), de acordo com o padronizado pelo *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2010), publicadas no documento CLSI M38-A, com modificações (5). A CIM foi determinada como a menor concentração capaz de inibir 90% do crescimento de fungos em comparação ao controle positivo.

Ensaios in vivo utilizando o modelo experimental de aspergilose

Camundongos Balb/c foram avaliados para modelo experimental de aspergilose quanto a via de infecção (intratraqueal ou endovenosa); tamanho do inóculo; via de administração do composto; e as diluições necessárias para a contagem das Unidades Formadoras de Colônia (UFC) recuperadas dos pulmões. Os ensaios foram realizados seguindo os protocolos da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UEM), aprovados no projeto número CEUA 9067030518.

Resultados e Discussão

Utilizando as proteínas alvos GR (glutathione redutase), TRO (tioredoxina redutase oxidada) e TRO (tioredoxina oxidada reduzida) e os 3 compostos obtidos comercialmente (09, 19 e 25) para testes *in vitro* e *in vivo*, o software PLIP revelou que as principais interações que os compostos fazem com as proteínas alvos são pontes de hidrogênio e ligações hidrofóbicas. Além de pontes salinas, que são uma combinação de duas interações não

covalentes, e o empilhamento, referente a um arranjo empilhado de moléculas aromáticas, devido às interações interatômicas. Capoci et al. (3) observaram em seu estudo os mesmos tipos de ligações de compostos com a tioredoxina redutase de espécies de *Candida* spp. e *Paracoccidioides* spp. indicando que são ligações relevantes para a atividade.

A atividade antifúngica determinada *in vitro* revelou que os 3 compostos exercem atividade contra *A. fumigatus*, com a CIM de <0,5 µg/mL para o composto 09, 8 µg/mL para o composto 25 e o maior valor foi de 128 µg/mL para o composto 19 (Tabela 01).

Tabela 01. Atividade antifúngica dos compostos 09, 19 e 25 contra *Aspergillus fumigatus*.

Composto	CIM (µg/mL) para <i>A. fumigatus</i>
09	<0.5
19	128
25	8

CIM: Concentração Inibitória Mínima em µg/mL capaz de inibir 90% do crescimento fúngico.

Sakita et al. (5) estudaram a atividade do Ebselen na tioredoxina redutase frente a cepa padrão e clínica de *A. fumigatus*, e os resultados obtidos da CIM foram de 4 µg/mL e para os antifúngicos convencionais de 0,25 µg/mL. Logo, os compostos 09 e 25 possuem atividade muito satisfatória contra o gênero *Aspergillus*, sendo promissores para o desenvolvimento de um inibidor duplo.

Foi necessário criar um protocolo de padronização para testes *in vivo* em modelo experimental de AI, conforme Tabela 02. Os resultados mais satisfatórios obtidos foram: via de infecção endovenosa, com inóculo fúngico variando de $1-2 \times 10^4$ conídios de *A. fumigatus*, os compostos administrados por via intraperitoneal e as diluições para a contagem de UFC quando recuperadas dos pulmões foram seriadas de 1 até 10 vezes.

Tabela 02. Condições para teste *in vivo* em modelo murino de aspergilose invasiva.

Via de infecção	Intratraqueal	Endovenosa
Tamanho do inóculo fúngico	10^7	10^4
Via de administração do composto	Intraperitoneal	Endovenosa
Diluições para contagem de UFC	Seriada 10 vezes	Seriada 5 vezes

Conclusões

Este trabalho descreveu a atividade antifúngica *in vitro* significativa de dois compostos obtidos *in silico*, que tem como duplo alvo as enzimas tioredoxina redutase e glutatona redutase. Além disso, um protocolo foi estabelecido para ensaios *in vivo* em modelo murino de aspergilose invasiva por *A. fumigatus*.

Agradecimentos

CNPq, CAPES e Fundação Araucária.

Referências

1. Capoci IRG *et al.* Two new 1, 3, 4-oxadiazoles with effective antifungal activity against *Candida albicans*. **Frontiers in Microbiology**. v. 10, p. 2130, sep, 2019.
2. Holmgren A. Antioxidant function of thioredoxin and glutaredoxin systems. **Antioxidants & Redox Signaling**. v. 2, n. 4, p. 811-820, 2000.
3. Jenks J.D.; Hoenigl M. Treatment of aspergillosis. **Journal of Fungi**, San Diego, v. 4, n. 3, p. 98, aug, 2018.
4. Kontoyiannis D.P.; Lewis R.E. Antifungal drug resistance of pathogenic fungi. **The Lancet**. London. v. 359, n. 9312, p. 1135-44, mar, 2002.
5. Sakita K.M *et al.* Efficacy of Ebselen Against Invasive Aspergillosis in a Murine Model. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**. v. 11, p. 684525, jun, 2021.