

## ESTUDO DOS EFEITOS DA CLORPROMAZINA SOBRE O PERFIL TRANSCRICIONAL DE *PARACOCIDIODES BRASILIENSIS*

Felipe de Almeida Silva<sup>1</sup>; Ana Cláudia F. de Oliveira Rodrigues<sup>2</sup>, Regina Costa de Oliveira<sup>3</sup>

Estudante do Curso de Química; e-mail: fellype@yahoo.com.br<sup>1</sup>

Estudante do Curso de Doutorado da UMC; e-mail: anaclaudiaforodrigues@yahoo.com.br<sup>2</sup>

Professora da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail reginaco@umc.br<sup>3</sup>

**Área do Conhecimento: Genética molecular e de microorganismos**

**Palavras-chave: *Paracoccidioides brasiliensis*; Clorpromazina; Expressão gênica**

### INTRODUÇÃO

*Paracoccidioides brasiliensis* (Pb) é um fungo dimórfico e termoregulado associado ao desenvolvimento de paracoccidioidomicose (PCM), uma das mais prevalentes micoses sistêmicas que afeta milhões de residentes da América Latina. A grande importância médica da PCM e o pequeno espectro de drogas disponíveis atualmente para o tratamento levam a busca por novas drogas com atividade antifúngica. Fenotiazinas são drogas antipsicóticas usadas no tratamento de esquizofrenia que foram descritas na literatura com atividade antimicrobiana contra diversos tipos de microorganismos. Um derivado fenotiazinico, clorpromazina (CPZ) mostrou-se capaz não apenas de inibir calmodulina, resultando em efeitos celulares múltiplos, e também apresentou atividade contra fungos patogênicos como *Candida albicans*, representante do gênero *Aspergillus* and *Cryptococcus neoformans*.

### OBJETIVOS

Analisar a variação da expressão gênica em *Paracoccidioides brasiliensis* quando exposto a clorpromazina, possibilitando o melhor entendimento de aspectos fisiológicos e de mecanismos de patogenicidade deste fungo, além de avaliar o potencial farmacológico dessa classe de fármacos.

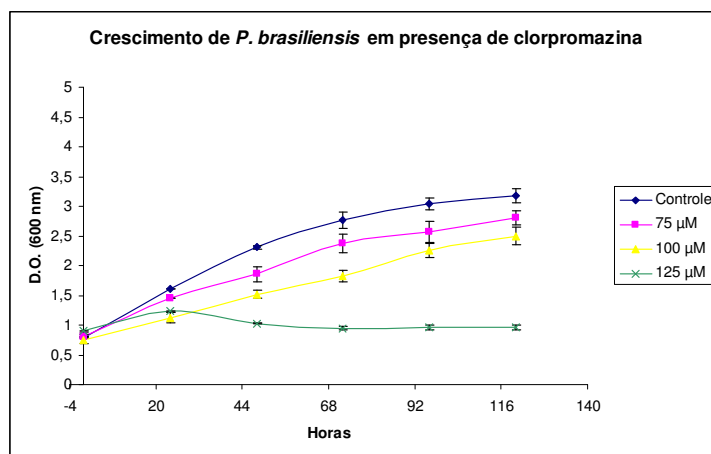
### METODOLOGIA

Em primeiro momento, verificou-se qual o efeito da exposição do fungo à droga. Para tanto, culturas de *P. brasiliensis* com 5 dias de cultivo foram inoculadas em meio de cultura YPD contendo diferentes concentrações de CPZ e cultivadas a 36,5°C sob agitação constante de 125 rpm por 7 dias. O desenvolvimento das culturas foi acompanhado através de análise de lâminas coradas com azul de tripan observadas em microscópio óptico e medidas de turbidez do meio com o auxílio de um espectrofotômetro pela absorbância a 600nm (DO<sub>600</sub>). Alíquotas de 10 mL de cada cultura foram então tratadas com CPZ por 7 dias para posterior extração de RNA. Depois de centrifugadas e descartado o sobrenadante, o sedimento celular foi triturado em almofariz de porcelana, com nitrogênio líquido. Em seguida, o material foi transferido para tubos contendo Trizol e o RNA extraído segundo especificações do fabricante (Invitrogen). O RNA extraído das culturas foi submetido a transcrição reversa e marcação do cDNA, partindo-se de 30 µg de RNA total. Para cada situação experimental testada foram realizadas duas marcações, com inversão de fluoróforos. A hibridação dos cDNAs marcados foi realizada utilizando biochips carregando

seqüências representativas de aproximadamente 4692 genes de *P. brasiliensis*, que foram construídos pelo Laboratório de Genômica Estrutural e Funcional do Núcleo Integrado de Biotecnologia (NIB) - UMC. O biochip hibridado foi submetido à detecção de fluorescência em scanner óptico GMS 418 (Affymetrix Inc., Santa Clara, CA), nos comprimentos de onda de 532 nm para o fluoróforo Cy3 e 635 nm para Cy5, gerando, para cada um deles, imagens independentes. As imagens obtidas foram posteriormente analisadas utilizando softwares específicos quanto à variação de expressão gênica com o auxílio de algoritmos de clusterização hierárquica ou pela montagem de Self Organizong Maps (SOM).

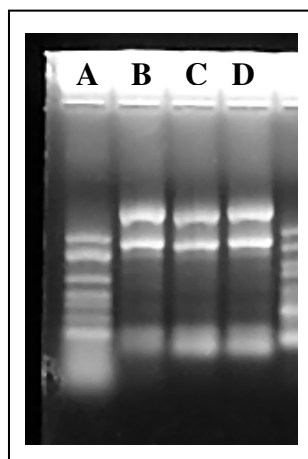
## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O tratamento de células leveduriformes de *P. brasiliensis* com CPZ resultou numa diminuição da taxa de crescimento de forma dependente da concentração. Pôde-se observar que as culturas tratadas com 75  $\mu\text{M}$  e 100  $\mu\text{M}$  de droga tiveram um crescimento inferior ao apresentado pelas culturas de controle. Quando tratadas com concentrações inferiores a 50  $\mu\text{M}$  o crescimento das culturas não foi alterado; sendo que concentrações superiores a 100  $\mu\text{M}$  mostraram-se letais às culturas, sugerindo que concentrações nesta faixa para mais sejam letais ao microrganismo (figura 1).



**Figura 1** - Curva de Crescimento de *Paracoccidioides brasiliensis* em meio YPD contendo clorpromazina. As culturas foram incubadas a 37°C, sob agitação constante de 125 rpm durante o experimento.

A partir destes dados, selecionamos os tratamentos com as concentrações de 75  $\mu\text{M}$  e 100  $\mu\text{M}$ , por 7 dias, para análise da expressão gênica. Assim, estas culturas tiveram seu RNA extraído para posterior marcação. Na figura 2 podemos visualizar a qualidade do material obtido, em eletroforese em gel de agarose desnaturante.



**Figura 2** - Gel de eletroforese (agarose 1%). Visualização da integridade das amostras de RNA obtidas a partir culturas de *P. brasiliensis* tratadas com clorpromazina. A - RNA Ladder 0,1 - 1,7 Kb; B - RNA referência (extraído de cultura não exposta à CPZ); C e D: correspondem aos RNAs de *P. brasiliensis* expostos a 75  $\mu\text{M}$  e 100  $\mu\text{M}$  de CPZ, respectivamente.

O resultado das hibridações competitivas de amostras de RNA em microarranjo revelou que uma quantidade representativa do genoma foi modulada devido à exposição da droga e estes dados estão sendo analisados e comparados com dados anteriores e da literatura.

## **CONCLUSÕES**

O tratamento de células de Pb com clorpromazina resultou numa alteração da taxa de crescimento; assim como uma variação da expressão gênica do fungo quando exposto à droga em concentrações sub-letais. A análise de genes super expressos ou sub-regulados pode ser útil para elucidar diferentes mecanismos envolvidos em processos celulares relacionados à fisiologia e patogenicidade de *Paracoccidioides brasiliensis*.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

NUNES, L.R.; COSTA DE OLIVEIRA, R.L.B.; LEITE, D.B.; DA SILVA, V.S.; MARQUES, E.R.; FERREIRA, M.E.S.; RIBEIRO, D.C.D.; BERNARDES, L.A.S.; GOLDMAN, M.H.S.; PUCCIA, R.; TRAVASSOS, L.R.; BATISTA, W.L.; NÓBREGA, M.P.; NÓBREGA, F.G.; YANG, D.; PEREIRA, C.A.B.; GOLDMAN, G.H. Transcriptome analysis of *Paracoccidioides brasiliensis* cells undergoing the Mycelium-to-Yeast transition, **Eukaryotic Cell**, v. 4, n. 12, p. 2115-2128, dezembro 2005.

VITALE, R.G.; AFELTRA, J.; MÉIS, J.F.G.M; VERWEIJ, P.E. Activity and post Antifungal effect of chlorpromazine and trifluoperazine against *Aspergillus*, *Scedosporium* and zygomycetes. **Mycoses**, n. 50, p. 270–276, 2007.

WINEK, C. L.; Wahba, W.W.; Winek Jr, C.L.; Balzer, T. W. Drug and chemical blood-level data 2001. **Forensic Science International**, v. 122, p. 107-123, 2001.

WOOD, N. C.; NUGENT K. M. Inhibitory Effects of Chlorpromazine on Candida Species. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, p. 692-694 Maio 1985.

## **AGRADECIMENTOS**

CNPq e UMC-FAEP