

ESTUDO DOS EFEITOS DA TIORIDAZINA E DE TELURANAS EM LEVEDURAS DE *Candida albicans*

David Aciole Barbosa¹; Regina Costa de Oliveira²; Luiz R. Nunes³; Daniela Leite Jabes⁴

Estudante do Curso de Biotecnologia; aciole.d@hotmail.com¹

Orientadora do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade de Mogi das Cruzes; reginaco@umc.br²

Orientador do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade de Mogi das Cruzes; nunes1212@gmail.com³

Orientadora do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade de Mogi das Cruzes; danielajabes@umc.br⁴

Área do Conhecimento: Genética Molecular de Microrganismos

Palavras-chave: *Candida albicans*; Tioridazina; Teluranas

INTRODUÇÃO

A candidíase é uma micose caracterizada por infecções superficiais ou sistêmicas, com penetração no sistema circulatório; podendo disseminar-se para os diversos órgãos do hospedeiro. É causada pelo gênero *Candida*, sendo a espécie *Candida albicans* a mais frequente. O tratamento inclui azóis, alilaminas, antimetabólitos e polienos, mas esses medicamentos causam efeitos adversos (BRUNTON *et al.*, 2012). Isolados fúngicos resistentes a fármacos são cada vez mais frequentes. (KONTOYIANNIS & LEWIS, 2002), incentivando a investigação da atividade de novos compostos. Tioridazina (TR) é um antipsicótico da classe das fenotiazinas com reconhecida atividade antimicrobiana (ORDWAY *et al.*, 2003). Teluranas são organometálicos de Telúrio com atividade antimicrobiana e baixa toxicidade (ONG *et al.*, 2014). Nosso grupo de pesquisa vem investigando a atividade antimicrobiana de TR e das Teluranas em *Paracoccidioides brasiliensis* e *P. lutzii*, evidenciando o potencial destes compostos contra estes fungos dimórficos. Nesse sentido, é interessante avaliar a ação destes novos compostos contra outro fungo dimórfico de importância médica como *C. albicans*. Assim, este projeto visa verificar a ação da TR e das teluranas RF-07 e RF-28 sobre leveduras de *C. albicans*.

OBJETIVOS

Verificar a ação da TR e das teluranas RF-07 e RF-28 sobre leveduras de *C. albicans*, além de analisar se a TR afeta a parede celular por meio do tratamento com Calcofluor White (CFW). Verificar, através de qPCR, a expressão de genes relacionados a via CWI e biossíntese de quitina e glucanas em *C. albicans* tratadas com TR.

MÉTODOS

C. albicans ATCC 90028 foi cultivada em 50 mL de YDP modificado líquido com uma alçada a partir de um cultivado em meio YPD sólido, e mantido em um agitação (120 rpm) a 36°C, durante 12 horas. Após isso, leu-se a Densidade Ótica a 600 nm (D.O₆₀₀) em espectrofotômetro (Ultrospec 2000, Pharmacia Biotec) e ajustou-se a densidade ótica, de acordo com a necessidade, para verificar durante 10 horas seu crescimento (a partir de leituras de D.O₆₀₀ a cada hora) na presença das drogas testadas. O projeto aqui apresentado é o primeiro trabalho direto de nosso grupo de pesquisa com *C. albicans*, por isso, como forma de entender o comportamento das culturas do fungo em meio líquido, foram realizados testes de crescimento

de *C. albicans* através de culturas em meio YPD modificado a 36°C e 125 rpm de agitação, de forma a se obter três culturas com densidade ótica inicial a 600 nm (D.O.i₆₀₀) de 0,4, 0,5 e 0,6, acompanhando a D.O.₆₀₀ de cada cultura a cada hora. A partir desses testes, foi selecionada uma D.O.i₆₀₀ para ser utilizada nos demais ensaios. *C. albicans* foi crescida em meio líquido contendo Tioridazina (TR) nas concentrações de 15 µM, 20 µM e 25µM ou teluranas, 10 µM, 20 µM, 50 µM e 100 µM. As drogas foram adicionadas as culturas com DO₆₀₀ = 0,4. Em seguida, a 36°C, sob agitação (120 rpm), o crescimento foi monitorado de hora em hora por determinação da DO₆₀₀ em espectrofotômetro (Ultrospec 2000, Pharmacia Biotec). Os experimentos foram realizados em duplicata. Para determinar a concentração inibitória mínima (MIC), foram seguidas as recomendações do documento M27-A2 (NCCLS, 2002). As concentrações de TR testadas foram de 120 a 0,23 µM (50 a 0,09 µg/mL) e as concentrações testadas de Teluranas foram de 120 a 0,23 µM (= 51,6 a 0,09 µg/mL de RF-07 e 43,4 a 0,08 µg/mL de RF-28). Após 48 horas de incubação a 36°C, as placas foram lidas a 530 nm de absorvância em espectrofotômetro Synergy® H1 Hybrid Multi-Mode Microplate Reader, BioTek™. Para a análise de conteúdo de quitina, leveduras de *C. neoformans* var. *grubii* H99 (D.O.₆₀₀ = 0,6) foram cultivadas sob as mesmas condições descritas acima na presença de 30 µM e 50 µM de TR. Em seguida, as células foram tratadas conforme recomendado por Rolli e colaboradores (2009), coradas com 2 µg/mL de Calcofluor White (CFW) (Sigma-Aldrich) durante 5 min, a 36 °C e a emissão de fluorescência foi então analisada em espectrofluorímetro Hitachi F-4500 (Hitachi High Technologies Co.), utilizando 360/440 nm emissão/excitação, respectivamente. Amostras foram encaminhadas para extração de RNA total, utilizando Mini Kit RNeasy da QIAGEN®. O cDNA foi sintetizado segundo recomendação do fabricante: Superscript II RT (200 U/µL – Invitrogen). O cDNA foi purificado em Microcon YM-30 (Millipore). Cada qPCR foi realizada em triplicata, sendo constituída de: 100 ng de cada cDNA, 100 nM de cada primer (Forward e Reverse) e 10 µL de SYBR Green PCR Master Mix 2x® (Applied Biosystems). O gene que codifica a actina foi utilizado como normalizador. As amplificações foram realizadas em aparelho ABI Prism® 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems®), nas condições indicadas pelo fabricante.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

TR inibiu o crescimento de *C. albicans* com 120 µM da droga. O fungo parece se recuperar dos efeitos da TR: existe inibição dose-dependente em torno de 2-6 horas, mas ao final de 10 horas, a cultura tratada se comporta como o controle. A MIC de TR foi ~120 µM (~50 µg/mL). Comparando com os dados obtidos para *P. brasiliensis*, *C. albicans* parece apresentar mais resistência a droga. Foi utilizada a Anfotericina B como controle para a técnica e, em nossos experimentos, esteve em torno de 1 µg/mL, de acordo a literatura. Telurana RF07 não inibiu o fungo nas doses testadas por curvas de crescimento. No entanto, sua MIC foi de 22,5 µM (9,75 µg/mL), sendo 2,25 vezes maior do que a MIC observada em Pb18 (JABES *et al.*, 2016). A telurana RF28 inibiu o crescimento *C. albicans* com 20, 50 e 100 µM. Em Pb18 as curvas indicam inibição 2 e 5 µM (JABES *et al.*, 2016). Porém não houve MIC de RF28 nas doses testadas (120 a 0,23 µM = 43,4 a 0,08 µg/mL) enquanto Pb18 teve MIC de 7,23 µg/mL (20 µM). Apesar da inconsistência entre as duas metodologias nos estudos em *C. albicans*, os demais trabalhos em nosso laboratório (*P. brasiliensis*, *Cryptococcus neoformans*, *P. lutzzi*) mostraram pouca variação entre experimento com curva de crescimento, ao contrário dos ensaios de MIC. Experimentos adicionais serão realizados de maneira a definir a MIC de *C. albicans* exposta a teluranas. Com relação ao conteúdo de quitina na parede celular, não foi verificada diminuição significativa ($p > 0,05$, teste T) com 10 horas de exposição a TR. Já Pb18 teve diminuição de quitina em doses crescentes da droga (JABES *et al.*, 2016). Assim como a ação da TR em Pb18, é comum a variação do conteúdo de quitina na parede de *Candida* spp. em resposta a drogas (WALKER *et al.*, 2013). Essa disparidade desperta a curiosidade, e por

isso a análise transcricional de genes relacionados à integridade de parede se faz importante. A diferença entre a expressão dos genes *cell Wall Integrity and Stress response Component 2* (WSC2), *small GTPase RHO1* (RHO1), quitina sintase 3 (Chs3) e beta-1,6-glucana sintase (KRE6) entre as culturas tratadas e as controle não foi significativa ($p > 0,05$, ANOVA-oneway), mas existe uma tendência a sub-regulação nas últimas horas de exposição à droga. Nossos dados surpreenderam, pois na literatura já são descritas modulações de genes da via CWI em *Saccharomyces cerevisiae* e *Candida* spp. em resposta a drogas, assim como a ação da TR em *P. brasiliensis* na qual todos os genes da via foram inibidos, e do teor de quitina e glucana, de maneira dose-dependente, analisado por 2 metodologias distintas (JABES *et al.*, 2016). Não houve alteração no conteúdo de quitina em culturas tratadas com TR na quantificação por CFW, mas existiu tendência a sub-regulação de Chs3 na análise de expressão gênica por qPCR. A variabilidade de respostas a condições experimentais é documentada para a virulência associada as quitina sintases de *C. albicans* (MIO *et al.*, 1996). Assim, seria interessante replicar o estudo com outros isolados de *C. albicans* para confirmar nossos dados. Como nossa análise se limitou a dois genes participantes da via CWI, a saber, WSC e Rho1, e há cerca de 20 outros genes a serem investigados e, além disso, já há descrição de diferentes isoformas para estes (DICHT *et al.*, 2016). Portanto, ampliar a análise transcricional de *C. albicans* exposta a TR para demais genes será útil para complementar nossos dados. Nossos achados somam ao conhecimento da resistência de *C. albicans* a antimicrobianos e auxilia na investigação do mecanismo de ação da TR, que apesar de não ser totalmente conhecido, acredita-se estar relacionado a fatores como, por exemplo, antagonismo a calmodulina e efluxo de drogas (AMARAL *et al.*, 2004; JABES *et al.*, 2016). Certamente, nossas aferições contribuirão no direcionamento dos estudos do mecanismo de ação da TR em fungos patogênicos. Porém, até o momento, não é possível definir de que maneira a TR afeta a viabilidade de *C. albicans in vitro*.

CONCLUSÕES

Tioridazina (TR) afeta o crescimento *in vitro* de *C. albicans* e sua MIC está em torno de 50 µg/ml (~120 µM). A droga causou uma tendência à modulação de genes da via CWI no fungo, mas os resultados não são estatisticamente significativos. Como nossos dados de expressão gênica foram inconclusivos, experimentos adicionais serão conduzidos de maneira a ampliar o número de genes estudados e relacionados a via. A Telurana RF-07 não afetou o crescimento de *C. albicans* mesmo na maior concentração testada (120 µM). No entanto, nos ensaios de MIC, o valor ficou em torno de 22,5 µM (9,75 µg/mL). RF-28 inibiu o crescimento com 20, 50 e 100 µM e não apresentou MIC nas concentrações usadas. No entanto, não foi possível encontrar valores de MIC para *C. albicans* tratadas com essa droga. Apresentamos dados inéditos sobre a ação da Tioridazina e Teluranas sobre leveduras de *Candida albicans*, um fungo de grande importância médica que colaborarão com as investigações tanto da resistência de *C. albicans* quanto do mecanismo de ação da TR.

REFERÊNCIAS

- AMARAL, L.; MOLNAR, J. Mechanisms by which thioridazine in combination with antibiotics cures extensively drug-resistant infections of pulmonary tuberculosis. *In Vivo*, v. 28, n. 2, p. 267-271, 2014.
- BRUNTON, L. L.; CHABNER, B. A.; KNOLLMANN, B. C. **As bases farmacológicas da terapêutica de Goodman & Gilman**. 12. ed. Porto Alegre: AMGH, 2012.
- DICHTL, K.; SAMANTARAY, S.; WAGENER, J. Cell wall Integrity signalling in human pathogenic fungi. *Cell Microb*, 2016.

JABES, D.; OLIVEIRA, A. C. F.; ALENCAR, V. C.; MENEGIDIO, F. B.; RENO, D. L. S.; SANTOS, D. S.; BARBOSA, D. A. VILAS BOAS, R. O.; CUNHA, R. L.O.R.; RODRIGUES, T.; COSTA DE OLIVEIRA, R. L.; NUNES, R. L. Thioridazine inhibits gene expression control of the Cell Wall Signaling Pathway (CWI) in the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **Mol Genet Genomics**, 2016.

KONTOYIANNIS, D. P.; LEWIS, R. E. Antifungal drug resistance of pathogenic fungi. **The Lancet**, v. 359, n. 9312, p. 1135-1144, 2002.

MIO, T.; YABE, T.; SUDOH, M.; SATOH, Y.; NAKAJIMA, T.; ARISAWA, M.; YAMADA-OKABE, H. Role of three chitin synthase genes in the growth of *Candida albicans*. **J. Bacteriol**, v. 178, n. 8, p. 2416-2419, 1996.

NCCLS. Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica das Leveduras; Norma Aprovada. 2 ed. Norma M27-A2 do NCCLS. **NCCLS**, v.22, n 15, Pennsylvania, Estados Unidos. 2002.

ONG, Y. C.; BLAIR, V. L.; KEDZIERSKI, L.; ANDREWS, P. C. Stability and toxicity of heteroleptic organometallic Bi (v) complexes towards *Leishmania major*. **Dalton Trans**, v. 43, n. 34, p. 12904-12916, 2014.

ORDWAY, D.; VIVEIROS, M.; LEANDRO, C.; BETTENCOURT, R.; ALMEIDA, J.; MARTINS, M.; KRISTIANSEN, J. E.; MOLNAR, J.; AMARAL, L. Clinical concentrations of thioridazine kill intracellular multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrob Agents Chemother**. v. 47, n. 3, p. 917-922, 2003.

ROLLI, E.; RAGNI, E.; CALDEROM, J.; PORELLO, S.; FASCIO, U.; POPOLO, L. Immobilization of the Glycosylphosphatidylinositol-anchored Gas1 protein into the Chitin Ring and Septum Is Required for Proper Morphogenesis in Yeast. **Mol Biol Cell**, v. 20, n. 22, p. 4856-70, 2009.

WALKER, L. A.; GOW, N. A.; MUNRO, C. A. Elevated chitin content reduces the susceptibility of *Candida* species to caspofungin. **Antimicrob Agents and Chemother**, v. 57, n. 1, p. 146-154, 2013.