

ESTUDOS DOS EFEITOS DA ASSOCIAÇÃO ENTRE COMPOSTOS FENOTIAZÍNICOS E ANTIFÚNGICOS SOBRE O CRESCIMENTO DA FORMA PATOGENICA DE *Paracoccidioides brasiliensis*

Jéssica Santiago Bispo da Silva¹; Ana Claudia de F.O. Rodrigues²; Regina Costa de Oliveira³.

Estudante do Curso de Ciências Biológicas; e-mail: Jessicabispo88@gmail.com¹

Doutoranda – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia;

Professor da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail reginaco@umc.br³

Área do Conhecimento: Genética de Microrganismos

Palavras-chave: *Paracoccidioides brasiliensis*, Fenotiazinas, Antifúngicos.

INTRODUÇÃO

Paracoccidioides brasiliensis é um fungo dimórfico que pode se apresentar sob diferentes formas, micélio ou levedura, dependendo das condições de temperatura a que o microrganismo é exposto (LACAZ, 1991). É o agente causador da micose sistêmica Paracoccidioidomicose (PCM) prevalente na América Latina onde se estima que haja pelo menos 10 milhões de pessoas infectadas, entretanto dados precisos relacionados à sua incidência e prevalência são difíceis de serem determinados já que não se trata de uma doença de notificação obrigatória (BRUMMER, CASTAÑEDA e RESTREPO, 1993; NIÑO-VEGA, 2002).

O tratamento farmacológico de pacientes acometidos de PCM é realizado com substâncias como as sulfonamidas (sulfametoxazol-trimetoprim), os derivados imidazólicos (itraconazol, cetoconazol, fluconazol) e os polienos (anfotericina B); independentemente da droga escolhida, o tempo de tratamento necessário para que critérios de cura sejam atingidos é longo, aumentando muito a chance de efeitos colaterais indesejáveis levando em conta a toxicidade inerente aos antifúngicos disponíveis (VISBAL *et al.*, 2005).

Compostos fenotiazínicos são agentes antipsicóticos historicamente utilizados para o tratamento de desequilíbrios mentais e emocionais, incluindo esquizofrenia e outras doenças psicóticas (FRIEND e CUMMINS, 1953). Além destas propriedades, diversos estudos descrevem a ação antimicrobiana destas substâncias contra uma grande variedade de microrganismos patogênicos, incluindo leveduras (AMARAL *et al.*, 2001; WANG e CASADEVALL, 1993). A capacidade das fenotiazinas de inibir o crescimento de microrganismos de importância clínica sugere que possam atuar de maneira semelhante em *Paracoccidioides brasiliensis* e aponta para o potencial destas substâncias em contribuir com a terapia farmacológica existente para o combate a PCM.

OBJETIVOS

Este projeto visa avaliar comparativamente os efeitos de compostos fenotiazínicos, de diferentes subclasses, sobre o crescimento de leveduras de *Paracoccidioides brasiliensis* em cultura, além de analisar o potencial farmacológico da associação entre fenotiazinas e antifúngicos, tradicionalmente utilizados no tratamento da PCM.

METODOLOGIA

Cultivo de *Paracoccidioides brasiliensis*:

Nestes estudos foram utilizadas culturas leveduriformes de *Paracoccidioides brasiliensis*, isolado 18, em meio líquido YPD modificado (0,5% de extrato de levedura, 0,5 de peptona e 1,5% de dextrose), mantidas a 36,5° C, sob agitação constante.

Curva de Crescimento na presença de drogas:

Culturas de *P. brasiliensis* foram submetidas ao crescimento em meio líquido, contendo tioridazina, nas concentrações de 2,5 μ M, 5 μ M, 10 μ M e 20 μ M; clorpromazina, nas concentrações de 12,5 μ M, 25 μ M e 50 μ M ou trifluoperazina, nas concentrações de 10 μ M, 50 μ M e 100 μ M. Para cada situação, foi utilizado como pré-inóculo cultura com até 4 dias de crescimento, fase exponencial de crescimento do fungo. As culturas foram monitoradas a cada 24 horas durante 6 dias por meio de determinação da densidade óptica (D.O. 600 nm) em espectrofotômetro.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O desenvolvimento celular foi afetado pela presença dos compostos fenotiazínicos: tioridazina, clorpromazina ou trifluoperazina no meio de cultura. Em todas as situações testadas, a diminuição do crescimento celular foi dependente da concentração da droga em análise (**Figuras 1, 2 e 3**).

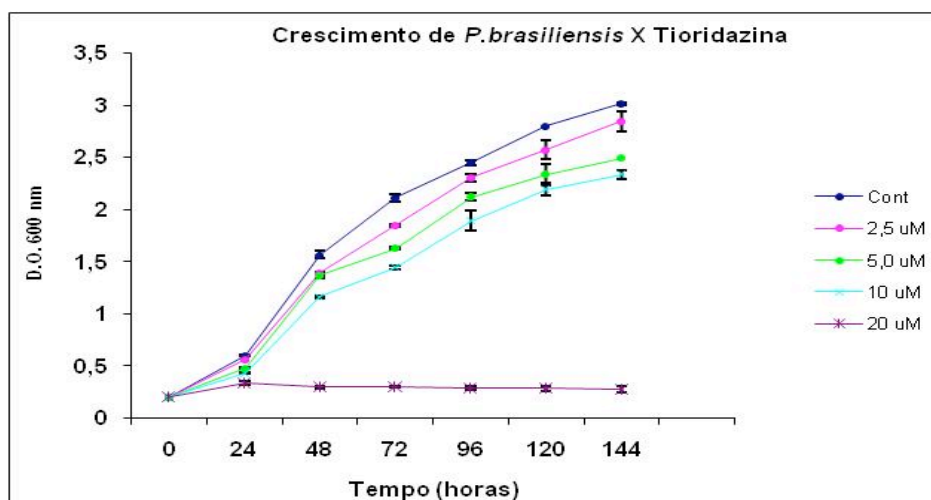


Figura 1. Curva de crescimento de *Paracoccidioides brasiliensis* em meio líquido YPD modificado na presença de Tioridazina. Culturas de *P. brasiliensis* sem adição de tioridazina foram utilizadas como controle e as outras culturas foram acrescidas de tioridazina nas concentrações finais de 2,5 μ M, 5 μ M, 10 μ M e 20 μ M. As culturas foram incubadas a 36,5 °C, sob agitação constante de 135rpm. A taxa de crescimento foi medida espectrofotometricamente em 600nm, com leituras a cada 24 horas, durante 6 dias.

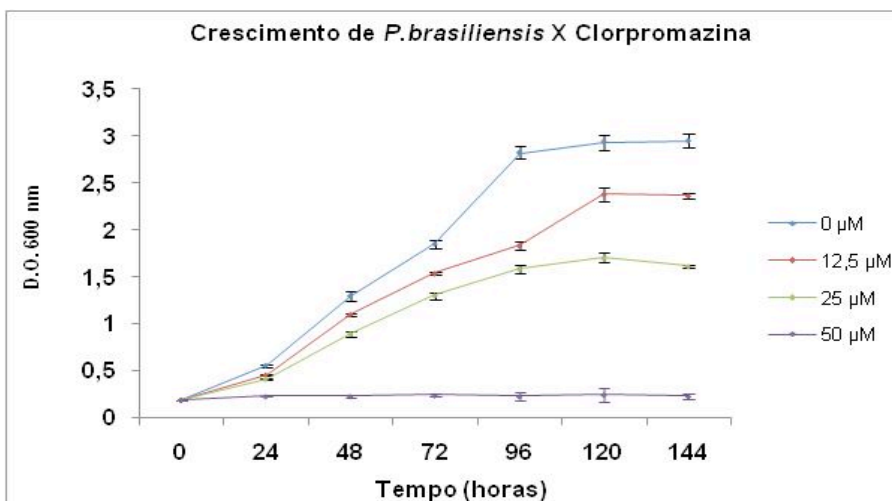


Figura 2. Curva de crescimento de *Paracoccidioides brasiliensis* em meio líquido YPD modificado na presença de Clorpromazina. Culturas de *P.brasiliensis* sem adição de clorpromazina foram utilizadas como controle e as outras culturas foram acrescidas de clorpromazina nas concentrações finais de 12,5 µM, 25 µM e 50 µM. As culturas foram incubadas a 36,5 °C, sob agitação constante de 135rpm. A taxa de crescimento foi medida espectrofotometricamente em 600nm, com leituras a cada 24 horas, durante 6 dias.

A inibição do crescimento celular das leveduras em cultura de *P.brasiliensis* resultante da exposição às fenotiazinas corrobora a propriedade antimicrobiana destas moléculas descrita em vários trabalhos, contra uma variedade de microrganismos (YING CHAN *et al.*, 2006; VAN SOOLINGEN *et al.*, 2010). O aparecimento recente na literatura de isolados de *P. brasiliensis* resistentes simultaneamente a substâncias de classes farmacológicas diferentes empregadas no combate à PCM é alarmante e justifica a busca por novas opções terapêuticas para o tratamento desta e de outras infecções fúngicas sistêmicas.

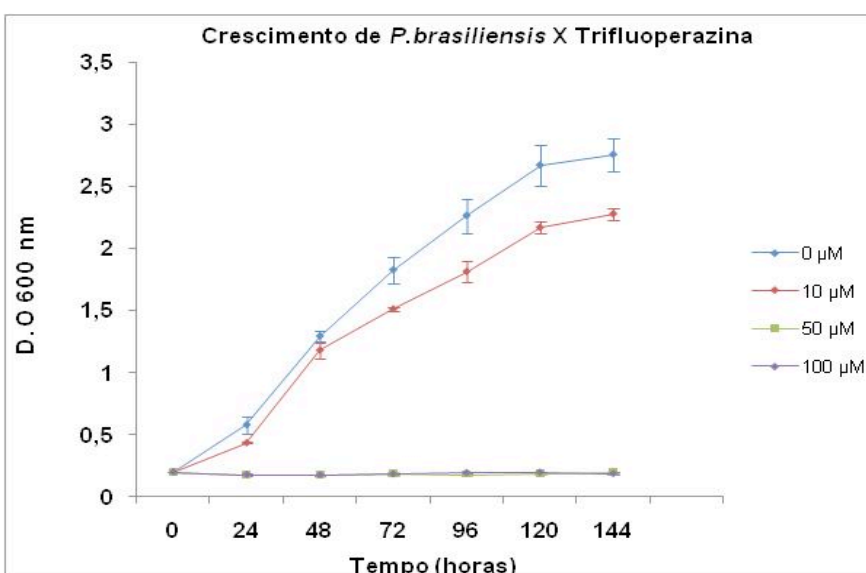


Figura 3. Curva de crescimento de *Paracoccidioides brasiliensis* em meio líquido YPD modificado na presença de Trifluoperazina. Cultura de *P.brasiliensis* sem adição de trifluoperazina foi utilizado como controle, e as outras culturas foram acrescidas de trifluoperazina nas concentrações de 10 µM, 50 µM e 100 µM. As culturas foram incubadas a 36,5°C, sob agitação de 135rpm. A taxa de crescimento foi medida espectrofotometricamente em 600nm, a cada 24 horas, durante 6 dias.

CONCLUSÕES

A exposição de *P. brasiliensis* às fenotiazinas causou diminuição do crescimento celular em cultura. O fato das fenotiazinas serem substâncias relativamente baratas, já utilizadas na clínica há muitas décadas e apresentarem ação contra microrganismos patogênicos encorajam a investigação destes compostos para o tratamento de micoses sistêmicas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMARAL, L.; KRISTIANSEN, J. E.; VIVEIROS, M.; ATOUGUIA, J. Activity of phenothiazines against antibiotic-resistant *Mycobacterium tuberculosis*: a review supporting further studies that may elucidate the potential use of thioridazine as antituberculosis therapy. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 47, p. 505-511, 2001.

BRUMMER, E.; CASTANEDA, E.; RESTREPO, A. Paracoccidioidomycosis: an update. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 6, n. 2, p. 89-117, 1993.

CHAN, Y. YING., ONG, Y. M., CHUA, L . K. Synergistic Interaction between Phenothiazines and Antimicrobial Agents against *Burkholderia pseudomallei*. **Department of Biochemistry, Yong Loo Lin School of Medicine.**, v.51, n. 2, p. 623-630, 2006.

DICK-VAN, S.; HERNANDEZ- PANDO,R. OROZCO, H.; AGUILAR, D.; MAGIS-ESCURRA, C.; AMARAL, L.; VAN. INGEN, J.; BOEREE. J. M. The Antipsychotic Thioridazine Shows Promising Therapeutic Activity in a Mouse Model of Multidrug-Resistant Tuberculosis. **J. National Mycobacteria.**, v. 5, p. 1-6, 2010.

GOW N., NIÑO-VEGA. *Paracoccidioides brasiliensis* the man-hater. **Mycologist.**; v. 16, p. 77-78, 2002.

LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C. Micologia Médica e Fungos, Morfologia e Biologia dos Fungos de Interesse Médico e Paracoccidioidomicose, *In: Micologia Médica*, 8ª ed., São Paulo: Sarvier 1991, p. 1-13, 31-57, 248-297.

VISBAL, G.; SAN-BLAS, G.; MURGICH, J.; FRANCO, H. *Paracoccidioides brasiliensis*, paracoccidioidomycosis, and antifungal antibiotics, **Curr. Drug Targets Infect. Disord.**, v. 5, n. 3, p. 211-226, 2005.

WANG, L. H.; ROTHBERG, K. G.; ANDERSON, R.G. Mis-Assembly of Clathrin Lattices on Endosomes Reveals a Regulatory Switch for Coated Pit Formation. **J. Cell Biol.** V. 123, p. 1107-1117, 1993.