

## ANÁLISE DA AÇÃO DA TIORIDAZINA SOBRE A VIA CWI (CELL WALL INTEGRITY SIGNALING PATHWAY) NA PAREDE CELULAR DE LEVEDURAS DE *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb18)

Renata Ozelami Vilas Boas<sup>1</sup>; Daniela Leite Jabes<sup>2</sup>; Regina Costa de Oliveira<sup>3</sup>, Luiz R. Nunes<sup>4</sup>

Estudante do Curso de Ciências Biológicas; renataozelami@yahoo.com<sup>1</sup>

Orientadora do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade de Mogi das Cruzes; danielajabes@umc.br<sup>2</sup>

Orientadora do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade de Mogi das Cruzes; reginaco@umc.br<sup>3</sup>

Orientador do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade de Mogi das Cruzes; nunes1212@gmail.com<sup>4</sup>

Área do Conhecimento: Genética Molecular e de Microrganismos

Palavras-chave: *Paracoccidioides brasiliensis*; Tioridazina; CWI; parede celular

### INTRODUÇÃO

A Paracoccidioidomicose (PCM) é uma grave micose sistêmica causada por *P. brasiliensis* e *P. lutzii* e prevalente em países da América Latina. Seu tratamento farmacológico é constituído de substâncias como polienos, sulfonamidas e derivados imidazólicos. No entanto, o tempo do tratamento é longo e diretamente relacionado aos efeitos colaterais (SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 2006). O isolamento de fungos resistentes aos antifúngicos empregados usualmente tem se tornado frequente, incluindo isolados de *P. brasiliensis* (HAHN *et al.*, 2003, DA SILVA NETO *et al.*, 2014). A associação destes fatores incentiva a investigação da atividade antifúngica de outros compostos, principalmente quando estes interagem com alvos diferentes daqueles utilizados pelos antifúngicos convencionais. Resultados obtidos em nosso laboratório mostraram que a exposição de leveduras de *P. brasiliensis* (isolado 18) à tioridazina, um composto fenotiazínico, resultou em inibição progressiva do crescimento celular do fungo em cultura e afetou a expressão de mais de 1800 genes do microrganismo, avaliada por experimentos de microarranjo de DNA. A avaliação desses genes revelou que a TR inibe a modulação daqueles relacionados a uma via fundamental para a viabilidade do fungo, denominada via de Sinalização da Integridade da Parede Celular (via CWI – Cell Wall Integrity signalling pathway) (FUCHS e MYLONAKIS, 2009), impedindo a produção dos principais polissacarídeos estruturais da parede celular (quitina e glucanas). Experimentos adicionais revelaram ainda que o teor de quitina e  $\alpha$ -glucana na parede celular fúngica foi significativamente reduzido em todas as concentrações de exposição à TR, corroborando os dados obtidos a partir dos experimentos de expressão gênica (JABES *et al.*, 2016). No entanto, permanece a dúvida se a sub-regulação da via CWI é um processo observado somente na presença de TR ou somente um efeito tardio observado em células do fungo em um processo de estresse que poderia ocorrer na presença de qualquer composto. Dessa maneira, o presente estudo tem como intuito verificar se a ação da TR sobre a via CWI em leveduras de Pb18, o que incluí a biossíntese de quitina e glucanas, também é observada na presença de outros compostos. Outra questão é se a

redução nos níveis dos polissacarídeos é uma consequência dos níveis de expressão dos genes relacionados com a via CWI ou a TR tem, de forma independente, a capacidade de reduzir os seus níveis diretamente na parede celular.

## OBJETIVOS

Aprofundar a investigação dos efeitos da Tioridazina sobre leveduras de *P. brasiliensis*, isolado 18, *in vitro*, verificando se a inibição dos genes envolvidos com a via CWI está relacionada somente ao tratamento com TR. Além disso, determinar uma possível via de ação para a TR ao inibir a via CWI e verificar se a TR é capaz de agir diretamente sobre a parede celular.

## METODOLOGIA

Os fungos foram submetidos ao crescimento na presença de EGTA (25  $\mu$ M, 50  $\mu$ M e 250  $\mu$ M), de teluranas RF07, RF28 e GDS-05 (2  $\mu$ M e 5  $\mu$ M) e de TR (10  $\mu$ M), além das réplicas controle. Após 5 dias de crescimento as culturas foram tratadas com o fluoróforo CFW (2 mg/mL) seguindo o método de Rolli e colaboradores (2009). A fluorescência das amostras foi medida em espectrofluorímetro. Amostras de material da parede celular bruto seco por 48 h a 50°C (10 mg cada) foram ressuspensas em 10 ml de PBS 1X e incubadas a 36°C na ausência de TR (controle), ou na presença de 15  $\mu$ M TR durante 6 dias. Então, as amostras foram coradas com CFW e utilizadas para medir o teor de quitina. Amostras das condições supracitadas foram maceradas em nitrogênio líquido e extraídas com TRizol® (Life technologies), segundo recomendações do fabricante. O material foi quantificado em NanoDrop ND-1000 e a avaliação da integridade foi realizada por meio de eletroforese em gel de agarose desnaturante. O cDNA foi sintetizado segundo recomendação do fabricante: Superscript II RT (200 U/ $\mu$ L – 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  $\mu$ L de SYBR Green PCR Master Mix 2x® (Applied Biosystems). Alfa-tubulina 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

Em experimentos anteriores, as células de *P. brasiliensis* 18 cultivadas na presença de TR apresentaram suas taxas de crescimento significativamente afetadas, com regulação negativa de genes da via CWI. Experiências análogas foram conduzidas com as organoteluranas RF-07 e RF-28. Os resultados obtidos mostraram que ambas inibiram o crescimento das cepas em cultura, porém não foi observado diminuição da deposição de quitina na parede celular. Isso nos leva a crer que a diminuição da expressão nos genes envolvidos com a via CWI observada na presença de TR não é consequência de resposta ao estresse não específica, mas sim um efeito fármaco-relacionado. Leveduras de *P. brasiliensis* incubadas na presença de EGTA, um quelante específico de íons  $Ca^{2+}$ , sob as mesmas condições experimentais para testar TR, apresentaram inibição de crescimento de forma similar, além de diminuir a deposição de quitina na parede da célula. A partir dos dados obtidos pelos experimentos de deposição de quitina, houve a necessidade de verificar o perfil de expressão dos genes relacionados à via CWI (“WSC Domain e GEF-rho1 GDP-GTP exchange protein”) e, conseqüentemente, biossíntese de quitina (“Chitin synthase D”) e glucanas (“Glucan synthase e Cell Wall alpha 1,3

glucan synthase MOK13”) e, para isso, foram realizados ensaios de qPCR a partir das amostras de RNA oriundas do tratamento de *P. brasiliensis* com TR, teluranas e EGTA. O resultado mostra que as teluranas não são capazes de induzir a sub-regulação dos genes em questão. Em contrapartida, a TR e o EGTA induzem a sub-regulação dos genes citados. Estes resultados indicam que o efeito inibidor dos genes controladores e participantes da via CWI relacionados ao tratamento com a TR pode ser devido à sua capacidade para se ligar a calmodulina, prejudicando a sua ativação pelos íons  $\text{Ca}^{2+}$ , o que pode afetar a transcrição dos genes. A propriedade das fenotiazinas (PTZs) de atuarem como antagonistas de calmodulina é bem documentada na literatura (JASZCZYSZYN *et al.*, 2012). Essas drogas se ligam a CaM, competindo com o  $\text{Ca}^{2+}$  pelo mesmo sítio de afinidade e impedindo a ativação do complexo  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM. Esse efeito das PTZs acaba por inibir uma série de enzimas dependentes de  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM (KURSULA, 2014), afetando diversas vias bioquímicas intracelulares, como controle da expressão gênica, uma vez que  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM pode se translocar para o núcleo e interagir com diferentes fatores de transcrição (HARDINGHAM e BADING, 1998). Esses fatos sustentam a hipótese de que a TR possa atuar evitando a ativação de fatores de transcrição dependentes de  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM relacionados ao controle de genes da via CWI. É importante destacar, entretanto, que tal mecanismo poderia explicar, pelo menos em parte, os efeitos da TR (e, talvez, outras PTZs), sendo novos experimentos ainda necessários para elucidar totalmente o(s) processo(s) empregado(s) por esta droga para inibir a via CWI em *P. brasiliensis*. Para verificar se a TR é capaz de, por si só, diminuir o teor de quitina na parede celular, foi realizada a coloração de extrato celular bruto seco do fungo com CFW. A TR pareceu incapaz de diminuir os níveis de quitina na parede celular, demonstrando que o composto não exerce ação direta sobre esta estrutura. Dessa forma, a redução do polissacarídeo é consequência de alterações fisiológicas da célula. Sendo assim, a diminuição dos polissacarídeos parece ser decorrente da redução nos níveis de mRNA correspondentes à via CWI

## CONCLUSÕES

Os dados aqui descritos, em conjunto com outros experimentos desenvolvidos no laboratório, confirmam o efeito antimicrobiano da TR por uma via alternativa aos fármacos convencionais utilizados no tratamento da PCM. O tratamento de leveduras de *P. brasiliensis*, isolado 18, com organoteluranas RF-07 e RF-28 mostrou inibição do crescimento do fungo em cultura, porém o efeito de sub-regulação dos genes da via CWI não foi observado, bem como a diminuição da deposição de quitina na parede celular. Isso indica que o efeito visto anteriormente no tratamento em cultura das leveduras com TR é fármaco-relacionado, ou seja, exclusivo de compostos fenotiazínicos, e não apenas uma resposta não específica ao estresse. Os experimentos conduzidos a fim de investigar uma possível via de ação da TR utilizando o EGTA apresentaram efeito semelhante ao já visto no tratamento com TR, ou seja, inibiu o crescimento *in vitro* das células leveduriformes, bem como diminuiu a deposição de quitina sobre a estrutura, e apresentou sub-regulação dos principais genes envolvidos na via CWI, sugerindo que a droga possa atuar de maneira a evitar ativação de fatores de transcrição dependentes de  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM e relacionados a via CWI. Por fim, foi visto que a diminuição dos polissacarídeos de parede não ocorreu em extrato celular bruto submetido ao tratamento com TR, mostrando que o composto não é capaz de agir por si só na parede celular. Dessa maneira, a diminuição dos polissacarídeos parece estar diretamente relacionada com os níveis de expressão dos genes

correspondentes à via CWI. Os dados aqui apresentados nos levam a crer que TR possui potencial para atuar como composto adjuvante para o tratamento da paracoccidioidomicose e outras micoses sistêmicas. No entanto, experimentos adicionais ainda são necessários para determinar se o efeito observado *in vitro* no tratamento com TR (ou outras fenotiazinas) também é visto em experimentos *in vivo* com *P. brasiliensis* e, possivelmente, outros fungos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

DA SILVA NETO, B. R., CARVALHO, P. F., BAILÃO, A. M., MARTINS, W. S., SOARES, C. M., PEREIRA, M. Transcriptional profile of *Paracoccidioides spp.* In response to itraconazole, **BMC, Genomics** 15, 254. 2014.

FUCHS, B. B.; MYLONAKIS, E. Our paths might cross: the role of the fungal cell wall integrity pathways in stress response and cross talk with other stress response pathways. **Eukaryot. Cell**, v. 8, n. 11, p. 1616-25, 2009.

HAHN, R. C.; MORATO, C. 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**, v. 46, n. 8, p. 342-347, 2003

HARDINGHAM, G. E.; BADING, H. Nuclear calcium: a key regulator of gene expression. **Biometals**, 345-358. 1998.

JABES, D. L.; OLIVEIRA, A. C. F.; ALENCAR, V. C.; MENEGÍDIO, F. B.; RENÓ, D. L. S.; SANTOS, S. D.; BARBOSA, D. A.; VILAS BOAS, R. O.; CUNHA, R. L. O. R.; RODRIGUES, T.; COSTA DE OLIVEIRA, R.; NUNES, L. R. Thioridazine inhibits gene expression. Control of the Cell Wall Signalling Pathway (CWI) in the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **Molecular Genetics and Genomics**, 2016. No prelo.

JASZCZYSZYN, A.; GASIOROWSKI, K.; ŚWIATEK, P.; MALINKA, W.; CIESLIK-BOCZULA, K.; PETRUS, J.; CZARNIK-MATUSEWICZ, B. Chemical structure of phenotiazines and their biological activity. **Pharmacol Rep.** 64(1), 16-23. 2012.

KURSULA, P. The many structural faces of calmodulin: a multitasking molecular jackknife. **Amino Acids.** 46(10), 22950-2304, 2014.

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.

SHIKANAI-YASUDA, M. A.; QUEIROZ-TELLES, F.; MENDES, R. P.; COLOMBO, A. L.; MORETTI, M. L. Guidelines in paracoccidioidomycosis. **Revista da sociedade Brasileira Médica Tropical**, 2006 May-Jun;39(3):297-310.

## AGRADECIMENTOS

**AO CNPQ PELA BOLSA DE ESTUDO, À FAPESP PELO APOIO FINANCEIRO NO DESENVOLVIMENTO DO PROJETO, A FAEP E A UMC PELA OPORTUNIDADE DA REALIZAÇÃO DO TRABALHO E AOS**

**COMPANHEIROS DE LABORATÓRIO E PROFESSORES PELO INCENTIVO  
E APRENDIZADO.**