

ESTUDO SOBRE OS EFEITOS DE TIORIDAZINA EM *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb03)

Ananda Braga Francisco Pinheiro Silva¹ Daniela Leite Jabes²; Luiz R. Nunes³

Estudante do Curso de Ciências Biológicas; e-mail: anaandabraga@hotmail.com¹

Professor da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: danielajabes@umc.br²

Professor da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: nunes1212@gmail.com³

Área do Conhecimento: Microbiologia

Palavras-chave: *Paracoccidioides brasiliensis*; Tioridazina; Paracoccidioidomicose;

INTRODUÇÃO

O fungo *Paracoccidioides brasiliensis* é o agente causador da paracoccidioidomicose (PCM), importante micose sistêmica da América Latina, levando a lesões principalmente no pulmão, devido a inalação de conídios fúngicos, mas também lesões secundárias na pele, mucosas oral, nasal e gastrointestinal, glândulas adrenais, linfonodos e sistema nervoso central (BRUMMER, CASTAÑEDA e RESTREPO, 1993).

Para o tratamento de pacientes acometidos com PCM são utilizadas substâncias como polienos (anfotericina B), derivados imidazólicos (itraconazol, fluconazol e cetoconazol) e as sulfonamidas (sulfametoxazol-trimetopim). O tempo de tratamento necessário é consideravelmente longo e, assim, a chance de efeitos colaterais indesejáveis é aumentada, considerando-se a toxicidade dos antifúngicos disponíveis (VISBAL et al. 2004).

Os compostos fenotiazínicos são utilizados como antipsicóticos para o tratamento de doenças como esquizofrenia e também para desequilíbrios mentais e emocionais (FRIEND E CUMMINS, 1953). No entanto, resultados obtidos em nosso laboratório mostraram que a exposição de *P. brasiliensis* (isolado 18) a concentrações crescentes de uma classe de fenotiazina, denominada tioridazina (TR) resultou em inibição progressiva do crescimento celular do fungo em cultura. Além disso, experimentos de microarray mostraram que a droga modulou mais de 1800 genes do fungo, com destaque para aqueles envolvidos com a via CWI, além de biossíntese de quitina e glucana (dados confirmados por qPCR) (RODRIGUES, 2009).

A via de sinalização CWI é ativada sempre que a célula fúngica é submetida a condições desfavoráveis que causem estresse à parede celular e possam comprometer a viabilidade do microrganismo (LEVIN, 2011). Dessa forma, o efeito inibitório exercido pela TR sobre a expressão de genes codificadores para as proteínas de parede parece ser um efeito exclusivo da droga.

No entanto, os resultados destacados foram obtidos com experimentos realizados somente com isolado 18 de *P. brasiliensis*, havendo ainda a necessidade de verificar se efeitos semelhantes podem ser verificados em outros isolados de *P. brasiliensis* – notadamente um daqueles que representam os principais grupos biogeográficos deste fungo, neste estudo o isolado 3, que pode apresentar significativa variabilidade genética em relação ao *Pb18* (TEIXEIRA et al., 2014).

OBJETIVOS

Avaliar o efeito da TR sobre leveduras de *P. brasiliensis*, isolado 3 (*Pb3*);

Verificar a CIM (Concentração Inibitória Mínima) da TR em leveduras de *P. brasiliensis*, isolado 3 (*Pb3*);

Verificar se a TR inibe a expressão de genes de CWI em leveduras de *Pb3* através de qPCR.

METODOLOGIA

Para curva de crescimento leveduras de *P. brasiliensis*, isolado 03, foram cultivadas em meio YPD líquido modificado acrescido de Tioridazina em diferentes concentrações. As culturas foram monitoradas a cada 24 horas durante 6 dias por meio de determinação da densidade óptica (D.O. 600 nm) em espectrofotômetro. Ao final do experimento, a extração de RNA foi realizada com Tryzol, o cDNA foi sintetizado e os experimentos de qPCR foram conduzidos para avaliar a variação dos níveis transcricionais de alguns genes de interesse relacionados a via CWI e biossíntese de quitina e glucana em resposta à exposição de *P. brasiliensis* a diferentes concentrações de tioridazina. A determinação da sensibilidade do isolado *Pb3* a diferentes concentrações de tioridazina foi realizada com base no descrito no documento M27-A2 (2002) - Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para Determinação da Sensibilidade de Leveduras à Terapia Antifúngica: Norma aprovada - do NCCLS. Algumas modificações foram necessárias para que o fungo *Paracoccidioides brasiliensis* crescesse em placa de microdiluição (Costar 3799 - Corning Incorporated). Nesse sentido, o meio de cultura RPMI foi acrescido com 2% de glicose, como descrito no artigo de Paula e Silva e colaboradores em 2013 (PAULA E SILVA et al., 2013).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A administração da droga Tioridazina causou diminuição no crescimento do *P. brasiliensis* – *Pb03* de maneira dose-dependente, em relação à cultura controle.

A droga na concentração de 50 µM causou inviabilidade do fungo, não mostrando crescimento aparente. Foram definidas como concentrações de trabalho 15 µM e 20 µM, onde se pode ver diminuição do crescimento do fungo, mas não a inviabilidade total das células, sendo ideal para a realização de extração de RNA e qPCR.

O teste de sensibilidade do fungo em placa de microdiluição é auxiliar no processo de verificação da ação da Tioridazina em *P. brasiliensis*, onde se pode observar que, assim como nos resultados da curva de crescimento, há diminuição do crescimento do fungo em relação à droga.

A CIM para a TR foi de 5,6 µg/mL (14 µM) para o *Pb03*. Não existem dados na literatura que estudaram a ação desta droga sobre leveduras de *Paracoccidioides*. Os resultados obtidos para determinação de Concentração Inibitória Mínima aqui apresentados para a linhagem 3 de *P. brasiliensis* foram semelhantes aos obtidos em nosso laboratório com o isolado 18. Foi obtida média entre concentrações mínimas inibitórias obtidas com o isolado 18 e o resultado foi de 0,1 µg/mL para Itraconazol e 6,25 µg/mL (15,62 µM) para Tioridazina. Os dados referentes ao itraconazol estão de acordo com a maioria dos artigos publicados com o gênero (McGINNIS 1997; HAHN E HAMDAN, 2000; PAULA E SILVA et al., 2013).

Dessa forma, uma vez verificado que a TR também é capaz de afetar o crescimento do isolado 03 de *P. brasiliensis* de uma forma semelhante ao verificado com o isolado 18, foram realizados ensaios de qPCR destinados a verificar a modulação da expressão gênica de alguns genes envolvidos com a via de quitina e glucanas assim como na via CWI de maneira a comparar os resultados com aqueles obtidos com o isolado 18.

Foi observada a sub-regulação dos genes relacionados à via de integridade da parede celular de maneira dose-dependente, ou seja, à medida que a dose de Tioridazina

aumenta, há maior sub-regulação dos genes. Os dados aqui obtidos são semelhantes aos observados com o *Pb 18* em nosso laboratório.

A via CWI é ativada sempre que o organismo está em condições desfavoráveis, reforçando a parede celular para dificultar a entrada de agentes externos que causem prejuízo. Se a Tioridazina age interferindo na via CWI e nos codificadores de proteínas componentes de parede celular, como quitina e glucanas, tal efeito pode ser o responsável pela inviabilidade dos fungos na presença da droga. Quitina e glucanas são componentes de parede e a deposição destes compostos aumenta quando o fungo é submetido a condições desfavoráveis. Assim, quando a TR inibe as vias de deposição desses componentes de parede celular, a ação de antifúngicos também pode ser mais eficiente.

Nesse sentido, novos experimentos associando antifúngicos convencionais e Tioridazina poderão ser realizados com intuito de verificar se a droga aumenta a sensibilidade de *P. brasiliensis*, Isolado 3 aos antifúngicos.

Além disso, este trabalho incentiva o estudo aprofundado para ajudar a esclarecer se a droga afeta outros processos celulares do fungo e também a possibilidade de inclusão da droga em novos tratamentos para a PCM. Estudos adicionais estão sendo conduzidos a fim de confirmar os dados aqui obtidos, como a análise da deposição de quitina por CFW.

CONCLUSÕES

Nossos dados demonstraram que a TR apresenta efeito inibitório sobre as células de *Paracoccidioides brasiliensis 3* de maneira dose dependente em experimentos de curva de crescimento. Concentrações de 25 e 50 μM foram letais para o fungo. Adicionalmente, efeito similar foi observado nos experimentos de determinação da sensibilidade do isolado *Pb3* a diferentes concentrações de tioridazina, com CIM de 5,6 $\mu\text{g/mL}$ para a TR e 0,125 $\mu\text{g/mL}$ para o itraconazol.

Experimento de análise de expressão gênica com genes relacionados à via CWI e biossíntese de quitinas e glucanas em *Pb03* evidenciaram o possível papel da TR sobre essas vias, uma vez que todos os genes estudados se mostraram sub-regulados na presença da droga, assim como já foi observado para o *Pb 18* (RODRIGUES, 2009).

Dessa forma, a verificação da deposição de quitina por CFW em *Pb3* tratado com TR foi conduzida e apresentou resultados promissores. Além disso, estudos adicionais serão conduzidos para quantificar o teor dos polissacarídeos quitina e glucana na parede de *Pb3* tratado com TR a fim de complementar os dados descritos até o momento. Assim, estudos adicionais ajudarão a esclarecer se a droga afeta outros processos celulares do fungo e também poderá, num futuro próximo, incluir a TR como um novo tratamento para a PCM.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

DE PAULA E SILVA A. C. A., OLIVEIRA H. C., SILVA J. F., et al. Microplate Alamar Blue Assay for *Paracoccidioides* Susceptibility Testing. **Journal of Clinical Microbiology**. 2013;51(4):1250-1252. doi:10.1128/JCM.02914-12.

FRIEND, D. G.; CUMMINS, J. R. A New anti-emetic drug, **J.A.M.A.**, v. 153, p. 480, 1953.

HAHN, R. C.; HAMDAN, J. S. *In vitro* susceptibilities of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast form to antifungal drugs. **Mycoses**, v. 43, n. 11-12, p. 403-407, 2000.

LEVIN, D. E. Regulation of cell wall biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*: the cell wall integrity signaling pathway. **Genetics**, v. 189, n. 4, p. 1145-1175, 2011.

MCGINNIS, M. R.; PASARELL, L.; SUTTON, D. A.; FOTHERGILL, A. W.; COOPER, C. R.; RINALDI, M. G. In vitro evaluation of voriconazole against some clinically important fungi. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 41, n. 8, p. 1832-1834, 1997

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.

OLIVEIRA, A. C. F.; OLIVEIRA, R. L. B. C. **Estudo dos efeitos de compostos fenotiazínicos no perfil transcricional e resistência múltipla a drogas em *Paracoccidioides brasiliensis***.2013. 85 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Mogi das Cruzes, Mogi das Cruzes, 2013.

RODRIGUES, A. C. F. O. Estudo dos Efeitos da Tioridazina sobre o Perfil Transcricional Transição Termofimórfica de *Paracoccidioides brasiliensis*, **Dissertação de Mestrado em Biotecnologia da Universidade de Mogi das Cruzes**, 2009.

TEIXEIRA M. M.; THEODORO R. C.; NINO-VEGA G. ; BAGAGLI E. ;FELIPE M. S. S.; *Paracoccidioides* Species Complex: Ecology, Phylogeny, Sexual Reproduction, and Virulence. **Heitman J, ed. PLoS Pathogens**.;10(10):e1004397. doi:10.1371/journal.ppat.1004397 , 2014.

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.