

# ANÁLISE DA DEPOSIÇÃO DE QUITINA POR CFW (CALCOFLUOR WHITE) EM LEVEDURAS DE *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb03 e Pb18) tratadas com tioridazina (TR)

Renata Ozelami Vilas Boas<sup>1</sup>; Luiz R. Nunes<sup>2</sup> Daniela Leite Jabes<sup>3</sup>;

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

Orientador do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade de Mogi das Cruzes; nunes1212@gmail.com<sup>2</sup>

Professora da Universidade de Mogi das Cruzes; danielajabes@umc.br<sup>3</sup>

Área do Conhecimento: Genética Molecular de Microrganismos

Palavras-chave: Paracoccidioidomicose; Quitina; Tioridazina

## INTRODUÇÃO

O fungo *Paracoccidioides brasiliensis*, é o agente causador da paracoccidioidomicose e apresenta transição morfológica de acordo com a temperatura. O tempo do tratamento para a doença é longo e está diretamente relacionado aos efeitos colaterais, especialmente no que se refere a lesões renais e hepáticas, visto alto potencial nefrotóxico e hepatotóxico destas substâncias (SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 2006). Já foram descritos isolados de *P. brasiliensis* apresentando resistência simultânea a cetoconazol e sulfametoxazol-trimetoprina (HAHN *et al.*, 2003), bem como a itraconazol (DA SILVA NETO *et al.*, 2014). Considerando todos esses fatores, a investigação da atividade antifúngica de novos compostos se torna importante, principalmente quando estes interagem com alvos diferentes daqueles utilizados pelos antifúngicos convencionais (VITALE *et al.*, 2007). A Tioridazina (TR), uma fenotiazina já usada na prática clínica para tratamento de distúrbios psiquiátricos, tem se destacado no que se referem as suas propriedades antimicrobianas (EILAM *et al.*; 1987). Estudos anteriores de nosso laboratório revelam que a TR inibiu o crescimento de leveduras de *P. brasiliensis*, isolado 18, de maneira dependente de concentração. Ensaios de microarray mostraram que a TR afetou mais de 1800 genes do microrganismo, com destaque aos genes relacionados à via CWI (principal meio de manutenção da integridade do microrganismo) e à biossíntese de quitina e glucana (sub-regulação confirmada por ensaios de qPCR) (OLIVEIRA, 2013). A quitina é um polímero essencial para a viabilidade fúngica e ausente em plantas e animais. Teoricamente, substâncias que inibam a síntese deste polímero possuem grande potencial fungicida (RUIZ-HERRERA e SAN-BLAS, 2003). O presente trabalho tem como objetivo a análise da deposição de quitina na parede celular de leveduras *P. brasiliensis*, isolados 03 e 18 tratadas com diferentes concentrações de TR, por meio de análise com CFW, um ligante de quitina.

## OBJETIVOS

O objetivo do presente trabalho foi analisar a influência da Tioridazina sobre a deposição de quitina na parede celular de leveduras de *Paracoccidioides brasiliensis*, isolados 03 e 18.

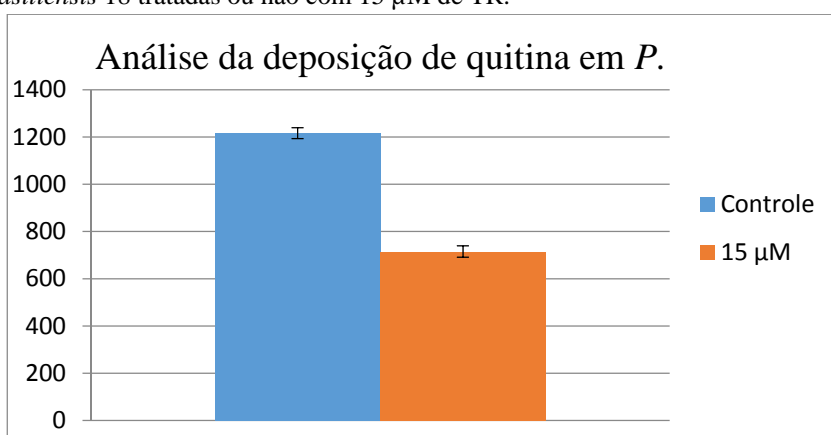
## METODOLOGIA

As leveduras de *P. brasiliensis* 03 e 18 tratadas (5, 10 e 15 µM de TR) e não tratadas foram cultivadas, todas partindo de DO<sub>600</sub>=0,2, em meio líquido YPD modificado (0,5%

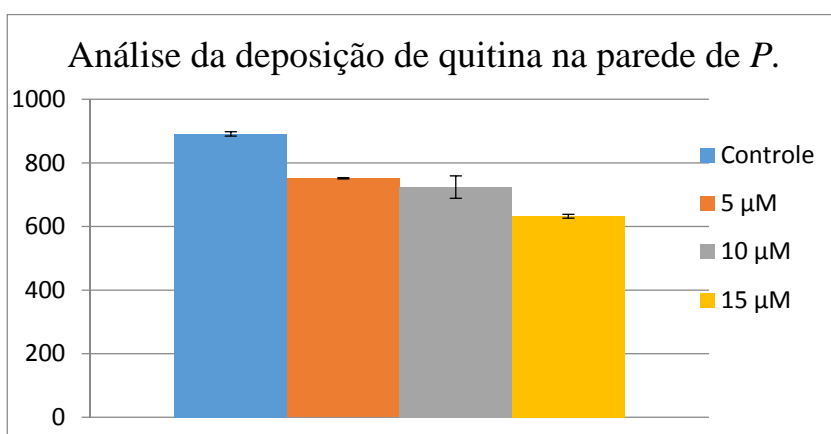
de extrato de levedura, 0,5% de peptona, 1,5% de dextrose, pH 6,3) a 37° C, agitação de 150 rpm. O crescimento foi monitorado por cinco dias, com leituras de DO<sub>600</sub> a cada 24 horas. Após cinco dias, as culturas foram coletadas por filtração a 6000 x g por dois minutos e lavadas com PBS, pH 7,4. A DO<sub>600</sub> foi ajustada para 1,0 por meio de diluições com volumes adequados de PBS. Foram aliqotados 2 mL de cada amostra e adicionados 2 µL do fluoróforo Calcofluor White (CFW 2 µg/mL). As amostras foram incubadas por cinco minutos no escuro e lidas em espectrofluorímetro Hitachi F-2500 (Tóquio, Japão) com comprimento de onda de excitação e emissão de 360/440 nm, respectivamente, fendas de emissão e excitação de 5 nm e voltagem da lâmpada de 400 V.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

**Figura 1: Efeito da TR sobre o conteúdo de quitina na parede celular de leveduras de *P. brasiliensis* 18.** Análise da fluorescência emitida por meio do CFW aderido à quitina da parede celular de leveduras de *P. brasiliensis* 18 tratadas ou não com 15 µM de TR.



**Figura 2: Efeito da TR sobre o conteúdo de quitina na parede celular de leveduras de *P. brasiliensis* 03.** Análise da fluorescência emitida por meio do CFW aderido à quitina da parede celular de leveduras de *P. brasiliensis* 03 tratadas ou não com 5 µM, 10 µM e 15 µM de TR.



Com o intuito de verificar o efeito da TR sobre a deposição de quitina na parede celular de leveduras *P. brasiliensis* 03 e 18, foram realizados experimentos com o fluoróforo CFW, que se liga à quitina. Os resultados obtidos mostraram uma redução progressiva do polímero nas células expostas a concentrações crescentes do fármaco, evidenciando o possível efeito da TR sobre a quantidade do polissacarídeo presente na parede celular

(figuras 1 e 2). Esse resultado preliminar nos leva a crer que a ação da TR sobre leveduras de Pb 03 parece ser a mesma observada em estudos anteriores para Pb18, onde a TR demonstrou capacidade de inibir a expressão de proteínas responsáveis pela ativação da via de sinalização de CWI, o principal mecanismo utilizado por células fúngicas para a manutenção da integridade e/ou fortalecimento da parede celular frente a desafios externos ou perturbações na superfície celular (LEVIN, 2005). A relação entre a ativação da via CWI em resposta ao estresse e o aumento da biossíntese e deposição de quitina na estrutura já foi observada em *Saccharomyces cerevisiae* e *Candida albicans* (MUNRO *et al.*, 2007). Sendo a via de sinalização CWI uma via imprescindível para a manutenção da integridade da parede frente a desafios externos, a escolha de um fármaco que iniba fatores responsáveis pela ativação da via CWI é um importante caminho para o tratamento da PCM.

## CONCLUSÕES

Juntamente com trabalhos realizados anteriormente, os resultados obtidos a partir da realização deste projeto confirmaram o efeito antifúngico da TR sobre leveduras de *P. brasiliensis* 03 e 18, inibindo seu crescimento *in vitro*. Sendo a parede celular a estrutura mais externa de proteção e ausente em mamíferos, utilizar fármacos que enfraqueçam essa estrutura pode ser um importante caminho de pesquisa para novos tratamentos de micoses sistêmicas. Dessa maneira, os dados aqui apresentados mostram uma possível ação da TR sobre a quitina, uma vez que a deposição de CFW, um ligante de quitina, foi diminuída ao longo do tratamento. Estudos futuros serão conduzidos a fim de quantificar o teor de quitina e glucana, importantes polissacarídeos da parede fúngica, nessas leveduras tratadas com TR. Em suma, os resultados mostram o impacto da TR sobre um processo vital para a sobrevivência das leveduras de *P. brasiliensis* 03 e 18. Embora o mecanismo pelo qual a TR exerça seu potencial antifúngico não esteja totalmente claro, os resultados mostram que a TR poderá ser utilizada como uma terapia adjuvante no tratamento de pacientes acometidos por micoses sistêmicas como a PCM.

## 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.

EILAM, Y.; POLACHEK, I.; BEN-GIGI, G.; CHERNICHOVSKY D. Activity of phenothiazines against medically important yeasts. **Antimicrob Agents Chemother.** 1987 May;31(5):834-6.

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

LEVIN, D. E. Cell wall integrity signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 69, n. 2, p. 262-291, 2005.

MUNRO, C. A.; SELVAGGINI, S.; DE BRUJIN, I.; WALKER, L.; LENARDON, M. D.; GERSSEN, B.; MILNES, S.; BROWN, A. J.; GOW, N. A. The PKC, HOG, and

Ca<sup>2+</sup> signaling pathways co-ordinately regulate chitin synthesis in *Candida albicans*. **Mol. Microbiol.**, v. 63, n. 5, p. 1399-1713, 2007.

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.

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.

RUIZ-HERRERA, J.; SAN-BLAS, G. Chitin synthesis as target for antifungal drugs. **Curr. Drug Targets Infect. Disord.**, v. 3, p. 77-91, 2003

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

VITALE, R. G.; AFELTRA, J.; MEIS, J. F. G.; VERWEIJ, P. E. Activity and post antifungal effect of chlorpromazine and trifluoperazine against *Aspergillus*, *Scedosporium* and zygomycetes, **Mycoses**, v. 50, p. 270-276, 2007.

#### **AGRADECIMENTOS**

Ao CNPq pela bolsa fornecida, à FAPESP, FAEP e à UMC pelo apoio financeiro no desenvolvimento do projeto, ao Prof<sup>o</sup>. Dr. Luiz R. Nunes e à Prof<sup>a</sup>. Dra. Daniela Leite Jabes pelo ensino e orientação e aos colegas de laboratório.