

# ESTUDO DOS EFEITOS DA TIORIDAZINA EM *Paracoccidioides lutzii* (*P. lutzii*)

Yan Teixeira de Oliveira<sup>1</sup>; Ana Claudia de Freitas Oliveira<sup>2</sup>; Luiz Roberto Nunes<sup>3</sup>

Estudante do Curso de Ciências Biológicas; yaanoliveira16@gmail.com<sup>1</sup>

Professora da Universidade de Mogi das Cruzes; ana.oliveira@umc.br<sup>2</sup>

Orientador do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade de Mogi das Cruzes; nunes1212@gmail.com<sup>3</sup>

Área do Conhecimento: Genética Molecular de Microrganismos

Palavras-chave: *Paracoccidioides lutzii*; Tioridazina; CFW; MIC.

## INTRODUÇÃO

Ao longo da última década, as infecções fúngicas sistêmicas, grande parte causada pelos fungos dimórficos, emergiram como um problema importante de saúde pública, (MARESCA & KOBAYASHI, 1989) A Paracoccidioidomicose (PCM) é uma grave micose sistêmica, que pode ser causada independentemente por duas espécies do gênero *Paracoccidioides*, o *Paracoccidioides brasiliensis* e *Paracoccidioides lutzii* (TEIXEIRA, *et al.*, 2014). Ao longo dos últimos anos, fenotiazinas em geral - especialmente a Tioridazina (TR) vem se destacando como um grupo de drogas extremamente versátil, no que se refere às suas atividades antimicrobianas (EILAM, *et al.*, 1987). 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 microarranjos de DNA mostraram que a droga modulou mais de 1800 genes do fungo, com destaque para a sub-regulação daqueles 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). O comprometimento desta via se mostra importante como novo alvo quimioterápico para o tratamento da PCM. Todos os resultados destacados foram obtidos com experimentos realizados somente com isolado 18 de *P. brasiliensis*, portanto há ainda a necessidade de verificar se efeitos assemelhados podem ser verificados em outros isolados como o *Paracoccidioides lutzii*, foco deste trabalho.

## OBJETIVOS

Avaliar os efeitos da Tioridazina sobre leveduras de *Paracoccidioides lutzii*, observar a deposição de quitina na parede celular de *P.lutzii* por meio do reagente de Calcoflúor White e em seguida, verificar a concentração inibitória mínima para a TR frente *P.lutzii*.

## METODOLOGIA

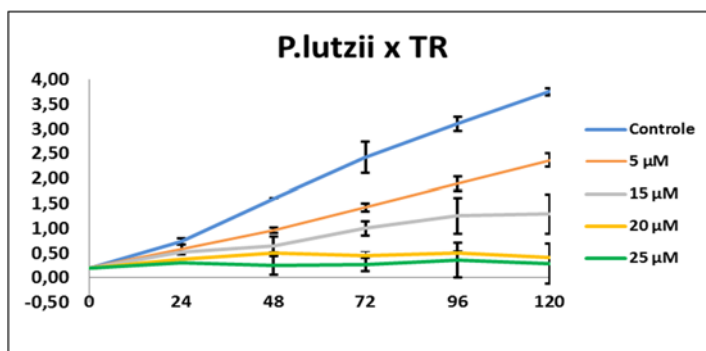
Foi cultivado o isolado Pb18 de *Paracoccidioides lutzii*, na fase leveduriforme, em meio de cultura sólido YPD modificado (0,5% de extrato de levedura, 0,5% de peptona, 1,5% de dextrose e 1,5% de ágar, pH 6,3) a 36° C, com repiques semanais. Foram realizadas curvas de crescimento baseadas na densidade óptica a 600 nm das culturas leveduriformes de *P.lutzii* em meio YPD modificado com adição de Tioridazina nas

concentrações de 5, 15, 20 e 25  $\mu\text{M}$ . Após cada leitura de densidades óptica diária, foi calculado o IC50, ou seja, a concentração necessária para a inibição de 50% das células fúngicas. Em seguida, realizamos o protocolo espectofotometria de fluorescência para análise da deposição de quitina, foram coletadas culturas sob a exposição por um período de cinco. Estas culturas foram coletadas 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 PBS. 2 mL de cada amostra foram alíquotadas em tubos de ensaio e adicionado 2  $\mu\text{L}$  do reagente CFW. As amostras foram incubadas por três minutos no escuro à temperatura ambiente. A leitura foi feita em espectrofluorímetro, 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. A determinação de sensibilidade de *P.lutzii*, foi realizada com algumas modificações foram necessárias para o crescimento de *P.lutzii*, com isso, o meio RPMI, com isso acrescido com 2% glicose. Os testes de determinação de sensibilidade foram realizados em placas de microdiluição com o Itraconazol como controle do experimento e à droga Tioridazina. Foram produzidas soluções padrão de Tioridazina em uma série de 10 diluições, essas soluções foram diluídas 10X em meio RPMI, e novamente diluídas 1:5 em RPMI para se conseguir a concentração 2X, necessária para o experimento. Foram produzidas placas de colônias isoladas em meio YPD modificado-Ágar 1,5%, colônias de aproximadamente 1 mm de diâmetro e suspensas em solução salina estéril, as suspensões foram diluídas para 1:50 e depois 1:20 em meio RPMI 2% glicose. Em seguida, foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  de soluções de Tioridazina diluídas nos poços de 1 a 10 e os poços 11 e 12, como controle de crescimento do organismo e como controle de esterilidade do meio, respectivamente. Após isso foi adicionado nos poços de 1 a 11 soluções diluídas do inóculo 1:20; Depois de 48 horas foi adicionado o corante de viabilidade celular Alamar Blue™.

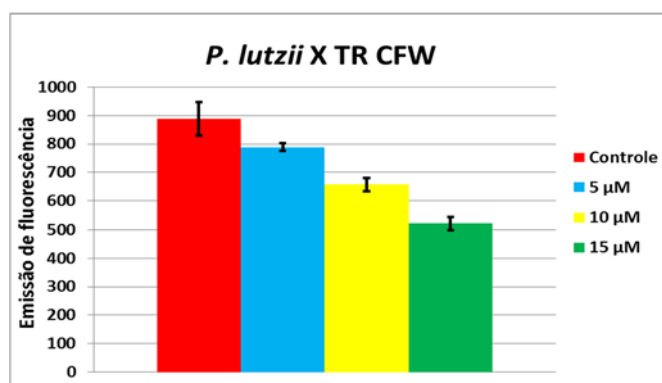
## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Células de *P.lutzii* foram submetidas ao crescimento em meio YPD líquido modificado acrescido de Tioridazina em quatro concentrações (5, 15, 20, 25  $\mu\text{M}$ ), a TR afetou de maneira dependente da concentração (Figura 1) o crescimento celular de *P. lutzii*, ou seja, quanto maior a concentração da droga testada, menor o crescimento do fungo, Além disso, calculamos o IC50 para a droga, que ficou em 13,79  $\mu\text{M}$  (5,52  $\mu\text{g/mL}$ ). Com base nestes resultados, concentrações de 5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  e 15  $\mu\text{M}$  de culturas tratadas com tioridazina foram definidas para estudo em deposição de quitina. Os experimentos foram realizados com *P. lutzii* tratado com TR através de ensaio com reagente de fluorescência (CFW) e os resultados obtidos demonstram uma redução progressiva do polímero nas células expostas a concentrações crescentes do fármaco (Figura 2). Dessa forma, a TR parece apresentar o mesmo padrão antes verificado para *Pb18*: 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, 2011), uma vez que a quitina é o principal polissacarídeo presente na parede celular fúngica. Experimentos adicionais foram realizados a fim de determinar a sensibilidade do fungo *P.lutzii* frente à Tioridazina (TR), usando como controle o antifúngico Itraconazol. Para o Itraconazol, a MIC observada foi de 0,229  $\mu\text{g/mL}$ , valor condizente com o observado na literatura para o gênero *Paracoccidioides* que variam entre 0,025 até 4,0  $\mu\text{g/mL}$  (MCGINNIS, 1997). 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 (FUCHS e MYLONAKIS, 2009).



**Figura 1 – Curva de crescimento de *P. lutzii* em meio YPD Modificado na presença de Tioridazina.** Células do fungo foram submetidas a crescimento em meio de cultura acrescido de tioridazina nas concentrações de 5 µM, 15 µM, 20 µM e 25 µM. No controle, a droga não foi adicionada. O crescimento celular foi avaliado pela medição diária da densidade óptica a 600 nm (D.O.<sub>600</sub>).



**Figura 2 – Gráfico de emissão de fluorescência (emitida conforme o reagente de CFW adere a quitina depositada na parede) em comparação entre culturas de *P. lutzii*, controle sem exposição a TR e concentrações crescentes de Tioridazina (5, 10 e 15 µM).**

## CONCLUSÕES

Com os resultados do presente trabalho foi possível verificar que a TR também possui atividade antifúngica quando ministrada *in vitro* em leveduras de *Paracoccidioides lutzii* (5,51 µg/mL), da mesma forma em que observamos em *P. brasiliensis* isolado 18 7,52 µg/mL (18,65 µM). A determinação da sensibilidade de *P. lutzii* a diferentes concentrações de Tioridazina foi realizada com base no descrito documento 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. A MIC para a TR foi de 4,167 µg/mL (10,41 µM) e para o Itraconazol a MIC observada foi de 0,229 µg/mL. Os experimentos de análise de deposição de quitina mostraram uma redução progressiva do polímero nas células expostas a concentrações crescentes do fármaco, evidenciando o possível efeito da TR sobre a parede celular do fungo. Dessa maneira, os dados aqui apresentados mostram uma aparente ação da TR sobre a quitina, possivelmente relacionado à via CWI (dados já observados em *Pb18*). Dessa forma, estudos futuros serão conduzidos a fim de quantificar o teor de quitina (e adicionalmente glucanas) nessas leveduras de *P. lutzii* tratadas com TR.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

EILAM, Y.; POLACHEK, I.; BEN-GIGI, G.; CHERNICHOVSKY D. Activity of phenothiazines against medically important yeasts. **Antimicrob Agents Chemother.** v. 31, n. 5, p. 834-836, 1987.

FUCHS, B. B.; MYLONAKIS, E. Our paths might cross: the role of the fungal cell wall integrity pathway in stress response and cross talk with other stress response pathways. **Eukaryot Cell.** v. 8, n. 11, p. 1616-1625, 2009

KLIS, F. M.; BOORSMA, A.; DE GROOT, P. W. Cell Wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast.** v. 23, n. 3, p. 185-202, 2006.

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.

MARESCA, B.; KOBAYASHI, G. Dimorphism in *Histoplasma capsulatum*: a Model for The Study of Cell Diferenciation in Pathogenic Fungi. **American Society for Microbiology.** v. 53, n. 2, p. 186-209, 1989.

MARTINS, M.; BLEISS, W.; MARKO, A.; ORDWAY, D.; VIVEIROS, M.; LEANDRO, C.; PACHECO, T.; MOLNAR, J.; KRISTIENSEN, J. E.; AMARAL, L. Clinical concentrations of thioridazine enhance the killing of intracellular methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an in vivo, ex vivo and electron microscopy study. **In Vivo.** v. 18, n. 6, p. 787-794, 2004.

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. **Antimicrobial agents and chemotherapy,** v. 41, n. 8, p. 1832-1834, 1997.

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

SÁ, N. P.; CISALPINO, P. S.; TAVARES, L. C.; ESPÍNDOLA, L.; PIZZOLATTI, M. G.; SANTOS, P. C.; PAULA, T. P.; ROSA, C. A.; SOUZA, D. G.; SANTOS, D. A.; JOHANN, S. Antifungal activity of 6-quinolinyln N-oxide chalcones against *Paracoccidioides*. **J. Antimicrob. Chemother.** v. 70, n. 3, p. 841-845, 2015.

TEIXEIRA M. M., THEODORO R. C., OLIVEIRA F. F.; MACHADO, G. C.; HANH, R. C.; BAGAGLI, E.; SAN-BLAS, G.; FELIPE, M. S. *Paracoccidioides lutzii* sp. biological and clinical implications. **Med. Mycol.** v. 52, n. 1, p. 19-28, 2014.

## AGRADECIMENTOS

Ao CNPq pelas bolsas de estudo, à FAPESP pelo apoio financeiro no desenvolvimento do projeto, a UMC pela oportunidade de aprendizado, aos companheiros de iniciação científica pelo companheirismo e aos professores/orientadores pelo apoio e ensinamentos.