

ANÁLISE DOS EFEITOS DA TIORIDAZINA SOBRE A EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS À RESISTÊNCIA MÚLTIPLA A DROGRAS EM *Paracoccidioides brasiliensis*

Kelin Chen¹, Ana Claudia de F. O. Rodrigues², Regina Costa de Oliveira³

¹ Estudante do Curso de Medicina; e-mail: kelinchen@yahoo.com.br;

² Doutoranda do Programa de Biotecnologia UMC; e-mail: anaclaudiaforodrigues@yahoo.com.br;

³ Professora da Universidade de Mogi das Cruzes; email: reginaco@umc.br

Área de conhecimento: Genética Molecular e de Microrganismos

Palavras-chave: *Paracoccidioides brasiliensis*, tioridazina, resistência múltipla a drogas

INTRODUÇÃO

O fungo termodimórfico *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb) é o agente etiológico da paracoccidioidomicose (PCM), uma micose sistêmica de alta prevalência na América Latina. A sua taxa de mortalidade (1,45/milhão de habitantes) e a severidade do quadro dos pacientes acometidos tornam-na um importante problema de saúde pública no Brasil (COUTINHO et al, 2002). Além disso, o surgimento de isolados de Pb resistentes às drogas tradicionais nas últimas décadas acrescentou mais um preocupante empecilho ao seu combate (HAHN et al, 2002). O fenômeno da resistência múltipla a drogas (MDR) é caracterizado pela falência da terapia medicamentosa no controle da infecção. Inúmeros estudos têm associado este fenótipo à superexpressão de genes codificadores de proteínas transmembranas de efluxo de drogas, que impedem o seu acúmulo no interior das células-alvo, evitando assim que se alcancem as concentrações em níveis tóxicos (WHITE et al, 1998). Existem duas principais classes de proteínas transportadoras de drogas relacionadas ao fenótipo MDR em fungos: a família ATP-Binding Cassete (ABC), que promove o efluxo mediante energia liberada pela hidrólise de ATP (energia-dependente), e a Major Facilitator Superfamily (MFS), que possui um sistema antiporte movido pela diferença de potencial elétrico gerada pela intrusão de prótons (H⁺) (LAGE, 2003). Novas drogas capazes de inibir a atividade destas proteínas de efluxo de drogas seriam potenciais alternativas no tratamento de infecções fúngicas como a PCM. Fenotiazinas como a tioridazina (TR) são drogas antipsicóticas com atividade antimicrobiana expressiva contra uma grande variedade de microrganismos de interesse médico. Estudos demonstraram que os compostos fenotiazínicos foram capazes de modular o fenótipo MDR em diferentes microrganismos e células tumorais (BISI et al, 2008).

OBJETIVOS

Este projeto visa avaliar quantitativamente os efeitos da TR sobre a expressão de genes relacionados à resistência múltipla a drogas em leveduras de Pb em cultura utilizando qPCR em tempo real.

METODOLOGIA

Neste estudo foram utilizadas células leveduriformes de Pb, isolado 18, cultivadas em meio YPD líquido modificado contendo TR em diferentes concentrações. O crescimento celular foi monitorado a cada 24 horas durante 7 dias por meio de determinação da densidade óptica em espectrofotômetro. A partir da curva de crescimento construída com os resultados obtidos, foram selecionados para o estudo

comparativo: as concentrações de 2,5, 5 e 15 μM de TR e os tempos de exposição de 48 e 144 horas. Arbitrariamente definiu-se 48 horas como fase “aguda” e 144 horas como fase “tardia” de exposição. Amostras de cada condição escolhida foram colhidas e congeladas em nitrogênio. As células leveduriformes foram rompidas por trituração em nitrogênio e imediatamente misturadas a Trizol (Invitrogen) para a extração de RNA. Para a avaliação da qualidade do RNA obtido, uma alíquota de cada amostra foi submetida à eletroforese em gel de agarose desnaturante. O critério de qualidade foi a presença das bandas 18S e 28S do RNA ribossomal íntegras. O material resultante foi purificado para a síntese de cDNA. A escolha dos genes a serem analisados foi baseada nos resultados prévios de microarranjo com *biochip* de Pb obtidos no laboratório de Genômica, na Universidade de Mogi das Cruzes (RODRIGUES, 2009). Foi selecionado o gene codificador de proteínas da família ABC: o Multidrug Resistance Protein 1 – **MAS0408**, um similar ao gene *AfuMDR1* do fungo *Aspergillus fumigatus*, relacionado à resistência ao itraconazol (TOBIN et al, 1997). Da família MFS: o Integral Membrane Transport Protein – **MAS0770**, similar ao MFS Multidrug Transporter em *Aspergillus fumigatus*, *Ajellomyces capsulatus* e *Penicillium marneffei*. A avaliação da expressão gênica foi feita por qPCR em tempo real.

RESULTADOS / DISCUSSÃO

Conforme a **figura 1**, a TR afetou de maneira dose-dependente o crescimento celular. O crescimento na concentração de 2,5 μM foi reduzido em aproximadamente 9 % em relação às amostras-controle não expostas à droga. Já nas demais concentrações testadas de 5,0 e 15 μM , a redução foi em média de 17 % e 27 %, respectivamente. A concentração de 20 μM mostrou-se letal para o fungo.

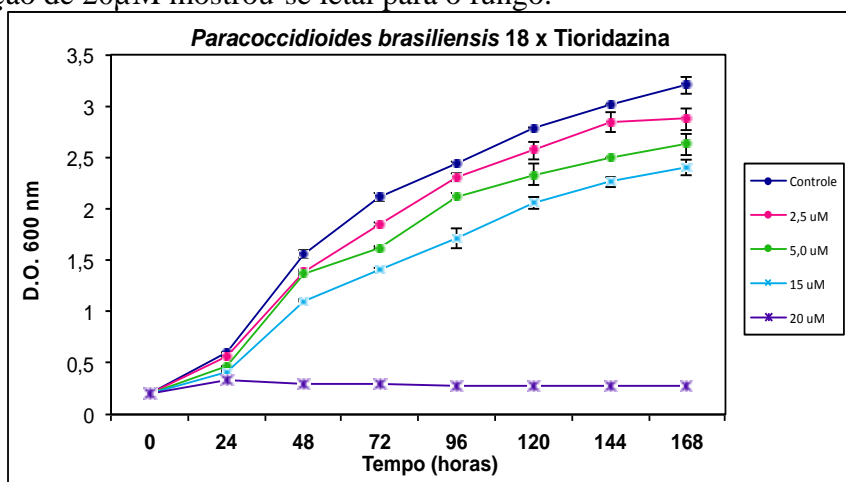


Figura 1: Curva de crescimento do *P. brasiliensis* exposto a diferentes concentrações de TR. Células leveduriformes do fungo foram submetidas a crescimento em meio YPD modificado líquido sem TR (controle) e acrescido desta, nas concentrações de 2,5, 5,0, 15 e 20 μM . A D.O._{600nm} das culturas foi determinada diariamente em espectrofotômetro Ultrospec 2000, Pharmacia Biotec.

Os resultados apresentados na **Figura 2** mostram que todas as concentrações de TR utilizadas foram capazes de inibir a expressão do gene **MAS0408**, tanto em 48 quanto 144 horas de exposição. Com 48 horas de exposição, a sub-regulação não foi dependente da concentração utilizada da substância, uma vez que a inibição permaneceu relativamente constante, em torno dos 50 %, em relação ao nível de expressão do gene em células de culturas-controle. Com 144 horas de exposição à TR, a inibição da expressão ainda foi observada, porém em níveis mais discretos. As células expostas às concentrações de 2,5 e 5 μM apresentaram redução de aproximadamente 10% nos níveis transcricionais, enquanto que em 15 μM , aproximadamente 40%.

Quando cada concentração de TR é comparada em função dos diferentes períodos de exposição à droga, observa-se a diminuição dos níveis de sub-regulação ao longo do tempo, sugerindo que o impacto da TR sobre a expressão deste gene seja mais contundente na fase “aguda” de exposição. Entretanto, na cultura exposta a 15 μM de TR, os níveis de sub-regulação tiveram pouca alteração, passando de 50% (48 horas) para 40% (144 horas), sugerindo que nesta concentração de exposição, a influência de TR sobre os níveis transcricionais permanece importante e praticamente inalterada ao longo do tempo.

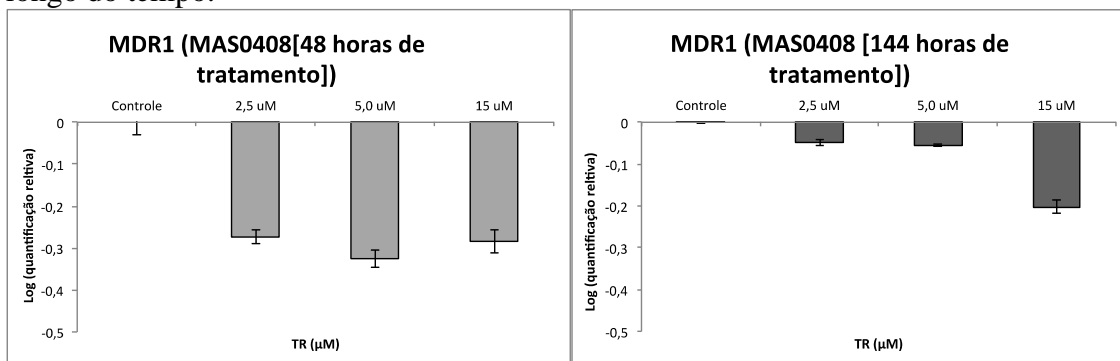


Figura 2: Variação dos níveis transcricionais do gene MAS0408 em células de *P. brasiliensis* expostas à TR por 48 e 144 horas. Os experimentos de qPCR em tempo real foram realizados com amostras cDNA produzidas a partir de RNA total extraído de culturas submetidas a 2,5; 5 e 15 μM de TR. **MAC1196**, foi utilizado como controle endógeno para a normalização experimental por não apresentar modulação de expressão nas condições experimentais avaliadas neste estudo. Em cada caso, as variações transcricionais foram calculadas tomando-se como referência os níveis de expressão em amostra não exposta à TR (controle) e são representadas no gráfico pelo log (base 10) das quantificações relativas (*eixo y*) em função das concentrações de TR (*eixo x*). Todas as condições experimentais foram avaliadas em triplicata e são representadas pelas médias e respectivos desvios-padrão.

A **figura 3** mostra os níveis transcricionais do gene **MAS0770**, que foram inibidos de maneira dependente da concentração em ambos os períodos de exposição. Com 48 horas, a concentração de 2,5 μM acarretou a inibição de 44 % em relação ao nível de expressão gênica em células não expostas à droga, enquanto que as de 5 e 15 μM , 60 % e 62% , respectivamente. Na exposição de 144 horas à TR, a sub-regulação foi mantida, todavia nas concentrações de 2,5 e 5 μM , os níveis de inibição não se mantiveram elevados, decrescendo para 6 % e 33%, respectivamente. Na concentração de 15 μM , a inibição praticamente ficou inalterada.

Na comparação entre os distintos períodos de exposição à TR, os resultados do gene **MAS0770** são semelhantes ao de **MAS0408**: a droga possui um impacto mais proeminente na fase “aguda” que na “tardia”, e que a concentração de 15 μM assegura uma maior sustentação da inibição dos níveis transcricionais ao longo do tempo.

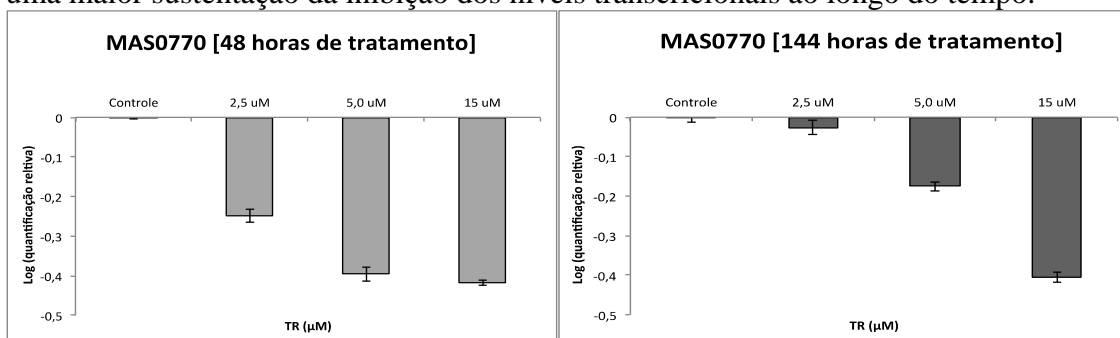


Figura 3: Variação dos níveis transcricionais do gene MAS0770 em células de *P. brasiliensis* expostas à TR por 48 e 144 horas. Os experimentos de qPCR em tempo real foram realizados com amostras cDNA produzidas a partir de RNA total extraído de culturas submetidas a 2,5; 5 e 15 μM de TR. **MAC1196**, foi utilizado como controle endógeno para a normalização experimental por não apresentar modulação de expressão nas condições experimentais avaliadas neste estudo. Em cada caso, as variações transcricionais foram calculadas tomando-se como referência os níveis de expressão em amostra não exposta à TR (controle) e são representadas no gráfico pelo log (base 10) das quantificações relativas (*eixo y*) em função das concentrações de TR (*eixo x*). Todas as condições experimentais foram avaliadas em triplicata e são representadas pelas médias e respectivos desvios-padrão.

Neste trabalho, a exposição das células de Pb à TR produziu resultados que corroboram os estudos mencionados anteriormente. A droga foi capaz de inibir a expressão dos genes associados ao MDR, o que certamente contribuiu para redução do crescimento celular, observada em todas as condições de exposição avaliadas. Os resultados também ressaltam o impacto da TR na fase “aguda” de exposição, na qual a inibição da expressão dos genes foi mais significativa. O contato inicial de 48 horas das células com a droga provocou uma redução mais incisiva na expressão gênica em todas as concentrações testadas. Neste tempo de exposição, o efeito da substância sobre a expressão gênica parece ser independente da concentração. Na fase “tardia” de exposição, a inibição da expressão foi mais discreta em todas as concentrações, principalmente nas menores concentrações testadas, ou seja, 2,5 e 5 μM . Diferentemente destas, as culturas expostas a 15 μM de TR apresentaram uma variação menor na sub-regulação dos níveis transcricionais quando comparadas às mesmas da fase “aguda”, indicando uma tendência à sustentação da sub-regulação da expressão gênica. Diferentes hipóteses poderiam explicar a diminuição nos níveis de sub-regulação dos genes estudados, observada para todas as concentrações de TR em 144 horas de tratamento. Uma possibilidade estaria relacionada ao aumento do número de células expostas a cada concentração da droga ao longo do tempo. Em todas as condições experimentais, o número de células com 48 horas de experimento é menor do que este número após 144 horas, já que as células continuaram o processo de replicação celular. Assim, o estímulo tóxico exercido pela TR sobre cada célula ao final do experimento é evidentemente menor do que no início, pois a quantidade de células presente é muito maior. Outra possibilidade estaria relacionada à fotossensibilidade característica da TR. Embora o experimento em si, bem como todas as manipulações necessárias das culturas ao longo do ensaio, tenha sido realizado no escuro ou com a menor quantidade possível de luz, não é possível afirmar que a integridade total da substância foi mantida durante todo o experimento, o que também poderia contribuir para a inibição do efeito no período de 144 horas de exposição. Além destes fatores, vários mecanismos celulares de adaptação a condições adversas poderiam atuar em conjunto para diminuir a influência da TR sobre a expressão deste e de outros genes relacionados à resistência à drogas em Pb.

CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo mostram que a TR causou a sub-regulação de genes que estão diretamente relacionados ao fenótipo de resistência múltipla a drogas em microorganismos patogênicos como o Pb, o que reforça o potencial desta fenotiazina de contribuir com a terapia farmacológica existente para o combate a PCM.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BISI, A.; MELI, M.; GOBBI, S.; RAMPA, A.; TOLOMEO, M.; DUSONCHET, L. *Multidrug resistance reverting activity and antitumor profile of new phenothiazine derivatives*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry** 16, p. 6474-6482, 2008).

COUTINHO, Z. F.; SILVA, D.; LAZÉRA, M.; PETRI, PETRI, V.; OLIVEIRA, R. M.; SABROZA, P. C.; WANKE, B. *Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980-1995)*, **Caderno de Saúde Pública**, v. 18, N° 5, p. 1441-1454, 2002.

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.

LAGE, H. *ABC-transporters: implications on drug resistance from microorganism to human cancers. International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 22, p. 188-199, 2003.

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.

TOBIN, M.B.; PEERY, R.B.; SKATRUD, P. L. *Genes encoding multiple drug resistance – like proteins in Aspergillus fumigatus and Aspergillus flavus. Gene*, v. 200, p. 11-23, 1997.

WHITE, T. C.; MARR, T. A.; BOWDEN, R.A. *Clinical, Cellular, and Molecular Factors That Contribute to Antifungal Drug Resistance. Clinical Microbiology Reviews*, v.11, N° 2, p.382-402, 1998.