

UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES

Ana Claudia de Freitas Oliveira Rodrigues

Estudo dos Efeitos da Tioridazina sobre o Perfil Transcricional

Transição Termodimórfica de *Paracoccidioides brasiliensis*

Mogi das Cruzes, SP  
2009

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES

Ana Claudia de Freitas Oliveira Rodrigues

Estudo dos Efeitos da Tioridazina sobre o Perfil Transcricional e  
Transição Termodimórfica de *Paracoccidioides brasiliensis*

Dissertação apresentada ao mestrado em  
Biotecnologia da Universidade de Mogi  
das Cruzes como parte dos requisitos para  
obtenção do título de Mestre em  
Biotecnologia

Área de Concentração: Ciências Biológicas

Orientador: Profa. Dra. Regina Lucia Batista Costa de Oliveira

Mogi das Cruzes, SP  
2009

FINANCIAMENTO: FAPESP e FAEP/UMC

**FICHA CATALOGRÁFICA**

Universidade de Mogi das Cruzes - Biblioteca Central

Rodrigues, Ana Claudia de Freitas Oliveira

Estudo dos efeitos da tioridazina sobre o perfil transcricional e transição termodimórfica de *Paracoccidioides brasiliensis* / Ana Claudia de Freitas Oliveira Rodrigues. – 2009.

75 f.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) -  
Universidade de Mogi das Cruzes, 2009

Área de concentração: Ciências Biológicas

Orientador: Prof<sup>ª</sup>. Dr.<sup>ª</sup> Regina Lucia Batista Costa de Oliveira

1. Paracoccidioidomicose 2. Paracoccidioides  
brasiliensis 3. Microarranjos 4. Tioridazina I. Oliveira,  
Regina Lucia Batista Costa de

CDD 579.5

**ATAS**

**ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE APRESENTAÇÃO DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA DA UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES**

Às catorze horas e trinta minutos do dia cinco de março de dois mil e nove, na Universidade de Mogi das Cruzes, realizou-se a defesa de dissertação "Estudos dos efeitos da tioridazina sobre o perfil transcricional e transição termodimórfica de *Paracoccidioides brasiliensis*" para obtenção do grau de Mestre pelo(a) candidato(a) **Ana Cláudia de Freitas Oliveira Rodrigues**. Tendo sido o número de créditos alcançados pelo(a) mesmo(a) no total de 50 (cinquenta), a saber: 26 unidades de crédito em disciplinas de pós-graduação e 24 unidades de crédito no preparo da dissertação, o(a) aluno(a) perfaz assim os requisitos para obtenção do grau de Mestre. A Comissão Examinadora estava constituída dos Senhores Professores Doutores Regina Lúcia Batista da Costa Oliveira e Iseli Lourenço Nantes da Universidade de Mogi das Cruzes e João Lúcio de Azevedo da Universidade de São Paulo, sob a presidência do(a) primeiro(a), como orientador(a) da dissertação. A Sessão Pública da defesa de dissertação foi aberta pelo Senhor Presidente da Comissão que apresentou o(a) candidato(a). Em seguida o(a) candidato(a) realizou uma apresentação oral da dissertação. Ao final da apresentação da dissertação, seguiram-se as arguições pelos Membros da Comissão Examinadora. A seguir a Comissão, em Sessão Secreta, conforme julgamento discriminado por cada membro, considerou o(a) candidato(a)

Aprovada por unanimidade  
(aprovado(a)/reprovado(a)) (unanimidade/maioria)

Mogi das Cruzes, 05 de março de 2009.

Comissão Examinadora

Julgamento

Regina Lúcia Batista da Costa Oliveira  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Regina Lúcia B C Oliveira

aprovada  
(aprovado(a)/reprovado(a))

Iseli Lourenço Nantes  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Iseli Lourenço Nantes

aprovada  
(aprovado(a)/reprovado(a))

João Lúcio de Azevedo  
Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo

APROVADA  
(aprovado(a)/reprovado(a))

*ESTE TRABALHO É DEDICADO*

*A DEUS*

*Que me concedeu a dádiva da vida e a cada  
dia coloca em meu caminho experiências  
que me levam um passo além.*

*AOS MEUS PAIS*

*Que tantas vezes renunciaram aos próprios  
sonhos para me proporcionar a  
oportunidade de buscar meus objetivos.*

*AO MEU MARIDO TIAGO*

*Pelo incentivo, carinho, companhia e,  
sobretudo, paciência constantes.*



## AGRADECIMENTOS

À Professora Doutora Regina Costa de Oliveira agradeço os ensinamentos que extrapolaram muito os limites deste trabalho e a orientação segura e paciente, reflexo de sua extraordinária competência. Seu amor pela Ciência é alvo de meu profundo respeito e admiração.

Ao Professor Doutor Luiz R. Nunes, exemplo de dedicação incansável ao ensino e à pesquisa, sempre disposto compartilhar seu imenso conhecimento, sanar qualquer dúvida e a auxiliar na busca por respostas científicas.

Aos amigos Marcus Vinícius de Oliveira e Vivian Schmidt da Silva, sempre presentes e dispostos a ajudar desde os meus primeiros tempos no laboratório, sou grata pela colaboração durante os experimentos e participação nos momentos de descontração.

Aos alunos do Laboratório de Genômica Estrutural e Funcional Daiene Souza Santos, Deibs Barbosa, com os quais construí laços de amizade e aprendi o significado e a importância do trabalho em equipe e aos alunos de iniciação científica Marina Ribeiro da Silva e Felipe de Almeida Silva pelo auxílio técnico, apoio e agradável convivência.

Aos funcionários desta Universidade Neilce Ribeiro Prado e Renata Martins, pela atenção e assistência a mim dispensadas durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos docentes do Curso de Mestrado em Biotecnologia da Universidade de Mogi das Cruzes, por contribuírem com a minha formação.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) por financiar os equipamentos, reagentes e insumos utilizados e à Fundação de Amparo ao Ensino e Pesquisa da Universidade de Mogi das Cruzes (FAEP-UMC).

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho. Muito obrigada.

*"Se pude ver mais longe que os outros,  
foi por estar apoiado sobre os ombros  
de gigantes".*

## RESUMO

O fungo termodimórfico *Paracoccidioides brasiliensis* é o agente etiológico da paracoccidioidomicose (PCM), micose sistêmica endêmica em países da América Latina e no Brasil, que responde por cerca de 80 % do total mundial de casos da doença, número que define a PCM como um importante problema de saúde pública no país. Recentemente, detectou-se o surgimento de isolados de *P. brasiliensis* com fenótipo de resistência a drogas em pacientes acometidos por PCM no Brasil. O fenômeno de resistência em fungos compromete os resultados obtidos com terapia medicamentosa e, normalmente, envolve a extrusão de toxinas do ambiente intracelular por diferentes classes de transportadores transmembrana. Fenotiazinas são agentes antipsicóticos, clinicamente úteis também por suas propriedades antieméticas e anti-histamínicas. A atividade antimicrobiana destes compostos foi descrita contra bactérias, leveduras patogênicas e alguns protozoários, tanto *in vitro* como *in vivo*. Além disso, possuem capacidade de diminuir ou reverter a resistência múltipla a drogas (MDR) em bactérias, fungos filamentosos, leveduras e células tumorais. A exposição de células leveduriformes de *P. brasiliensis* em cultura à tioridazina (TR), composto fenotiazínico utilizado neste trabalho, provocou a inibição do crescimento celular e variação de expressão de mais de 1800 genes de *P. brasiliensis*, quando analisados por hibridação competitiva em microarranjos de DNA. A sub-regulação do grupo de genes codificadores para enzimas integrantes da rota sintética de quitina pela exposição à droga foi especialmente significativa, pois mostrou a ação da TR sobre um alvo farmacológico diferente daqueles visados pelos antifúngicos convencionais, uma vez que afetou um componente estrutural indispensável à viabilidade celular fúngica, ausente em células de mamíferos. A exposição à TR promoveu também a modulação de genes codificadores para proteínas transportadoras transmembrana, envolvidas com a extrusão de drogas do interior celular, intimamente relacionadas ao fenótipo MDR. Estes resultados tomados em conjunto trazem expectativas positivas quanto à possibilidade de desenvolvimento de estratégias para a associação de antifúngicos clássicos e TR em esquemas de tratamento de infecções fúngicas, especialmente da PCM.

Palavras-chave: Paracoccidioidomicose, *Paracoccidioides brasiliensis*, microarranjos, tioridazina.

## ABSTRACT

*Paracoccidioides brasiliensis* is a thermomorphous fungus associated with paracoccidioidomycosis (PCM), a systemic mycosis considered endemic in Latin America. Approximately 80 % of the PCM cases registered worldwide have occurred in Brazil, which makes this disease an important health problem in this country. Recently, multidrug resistance phenotypes have been observed in *P. brasiliensis* isolates obtained from PCM patients in Brazil. Drug resistance in fungi is one of the main reasons for failure of chemotherapeutic approaches to control infection and the drug extrusion by different transmembrane transporters is considered the most frequent cause for such resistance. Phenothiazines are antipsychotic drugs, which have also been used as antiemetic and antihistaminic. This class of drugs also present antimicrobial activity *in vitro* and *in vivo* against bacteria, pathogenic yeasts and some protozoa. Moreover, they possess the ability to decrease, or even to revert, the multidrug resistance (MDR) in bacteria, filamentous fungi, yeasts and tumor cells. The exposure of cultured *P. brasiliensis* yeast cells to thioridazine (TR) resulted in the inhibition of cell growth and promoted changes in the expression of more than 1800 genes from this fungus, as assessed by competitive hybridizations with DNA microarrays. The TR-mediated down-regulation of genes that encode enzymes from the chitin synthetic pathway was particularly relevant, since such pathway is involved with the biosynthesis of an essential structural component of fungal cell wall, which is absent in mammalian cells. In this sense, TR may be able to inhibit fungal growth by acting on pharmacological targets that differ from those targeted by conventional antifungal agents. TR also modulated genes that encode MDR-related transmembrane transporter proteins, involved in drug extrusion. In conclusion, the results shown in this work point to the possible development of strategies for the combined use of classic antifungal agents and TR for the treatment of fungal infections, particularly in the case of PCM.

Keywords: Paracoccidioidomycosis, *Paracoccidioides brasiliensis*, microarray, thioridazine.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b>	Morfologia macro e microscópica de culturas de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	13
<b>Figura 2</b>	Paracoccidioidomicose	15
<b>Figura 3</b>	Distribuição geográfica da paracoccidioidomicose na América Latina	16
<b>Figura 4</b>	Estrutura química de compostos fenotiazínicos	23
<b>Figura 5</b>	Esquema representativo do procedimento de hibridação competitiva em microarranjos de DNA	27
<b>Figura 6</b>	Arquitetura do chip de <i>P. brasiliensis</i> utilizado na hibridação competitiva em microarranjos de DNA	28
<b>Figura 7</b>	Experimento representativo do crescimento percentual de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> exposto a diferentes concentrações de TR	37
<b>Figura 8</b>	Efeito de TR sobre a transição termodimórfica de <i>P. brasiliensis</i> de micélio para levedura	38
<b>Figura 9</b>	Padrão de migração de RNA total de <i>P. brasiliensis</i> em eletroforese em gel de agarose desnaturante	39
<b>Figura 10</b>	Representação dos 1809 genes com variação na expressão estatisticamente significativa após a exposição a diferentes concentrações de droga	41
<b>Figura 11</b>	Gráfico gerado pelo algoritmo FOM para os genes significativamente modulados pela exposição à TR	42
<b>Figura 12</b>	Agrupamento dos 1809 genes com variação de expressão estatisticamente significativa	43
<b>Figura 13</b>	Cluster 7	44
<b>Figura 14</b>	Cluster 6	45
<b>Figura 15</b>	Cluster 18	46
<b>Figura 16</b>	Cluster 44	46
<b>Figura 17</b>	Cluster 45	47
<b>Figura 18</b>	Cluster 3	48
<b>Figura 19</b>	Cluster 40	49
<b>Figura 20</b>	Agrupamento manual dos genes representativos da rota de síntese de quitina	50
<b>Figura 21</b>	Via bioquímica de síntese de quitina	50

<b>Figura 22</b>	Agrupamento manual de genes envolvidos com o efluxo de drogas modulados em resposta à exposição à TR	56
<b>Figura 23</b>	Ciclo de ativação e inativação de Rho GTPase	58

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

cDNA	DNA Complementar
Cy3-dCTP	2'-desoxicitidina 5'trifosfato acoplado ao fluoróforo Cianina 3
Cy5-dCTP	2'-desoxicitidina 5'trifosfato acoplado ao fluoróforo Cianina 5
D.O.	Densidade Óptica
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos
EST	Fragmento de seqüência expressa
FOM	Figura de Mérito
Kb	Quilopares de bases
MDR	Resistência Múltipla a Drogas
mRNA	RNA ribossomal
PCM	Paracoccidiodomicose
RNA	Ácido Ribonucléico
rpm	rotações por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SSC	Solução de citrato de sódio e cloreto de sódio
TR	Tioridazina
YPD	meio de cultura composto por extrato de levedura, peptona e dextrose

# SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
1.1 Considerações Gerais	11
1.2 <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	12
1.3 Paracoccidioidomicose	14
1.4 Tratamento Farmacológico do Paciente Acometido por PCM	19
1.5 Resistência Múltipla a Drogas em Fungos	21
1.6 Fenotiazinas	23
1.7 Hibridação em Microarranjos de DNA	25
2. OBJETIVOS	29
3. MÉTODO	30
3.1 Cultivo de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	30
3.2 Exposição de <i>P. brasiliensis</i> à tioridazina	30
3.3 Extração de RNA	31
3.4 Avaliação da qualidade do RNA obtido	32
3.5 Purificação do RNA	32
3.6 Amplificação do mRNA	33
3.7 Síntese de cDNA marcado com Cy3-dCTP ou Cy5-dCTP	34
3.8 Hibridação de microarranjos de DNA em câmara úmida	35
3.9 Aquisição e análise de imagens	35
4. RESULTADOS	37
4.1 Crescimento de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> na presença de tioridazina	37
4.2 Identificação de genes diferencialmente expressos	39
5. DISCUSSÃO	51
6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	62
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64



# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS

A incidência de infecções fúngicas sistêmicas em pacientes saudáveis e imunocomprometidos têm crescido mundialmente nos últimos anos, tornando os fungos patogênicos um importante campo para a pesquisa médica (TAVARES *et al.*, 2005). A maior parte destas infecções sistêmicas é causada por fungos dimórficos, dentre eles *Blastomyces dermatitidis*, *Histoplasma capsulatum*, *Paracoccidioides brasiliensis* e *Coccidioides* spp. (MARESCA e KOBAYASHI, 1989; ROONEY e KLEIN, 2002). Estima-se que estes fungos permaneçam latentes em dezenas de milhões de pessoas em todo o mundo, podendo tornar-se reativos em situações de imunodeficiência do hospedeiro (KLEIN e TEBBETS, 2007).

Fungos dimórficos são aqueles que podem se apresentar sob duas diferentes formas, micélio ou levedura, dependendo das condições a que são submetidos. Dentre os fatores ambientais associados à interconversão da morfologia fúngica têm-se: temperatura, pH, níveis de glicose, fonte de nitrogênio, presença de metais de transição e agentes quelantes (HORNBY *et al.*, 2004). Em *Paracoccidioides brasiliensis*, a transição morfológica é desencadeada por mudanças na temperatura a que o microrganismo é exposto. No ambiente, sob temperaturas de 23°C a 28°C, a forma representativa é o micélio filamentosos; após a infecção de mamíferos hospedeiros, o fungo é submetido à temperatura de 37°C e adquire a forma de levedura (LACAZ, 1991).

A mudança fenotípica de micélio para levedura patogênica resulta em alterações não somente na forma da célula, mas também na composição da parede celular, presença de moléculas antigênicas e expressão de traços de virulência. Para diversos fungos dimórficos, incluindo *B. dermatitidis*, *H. capsulatum* e *P. brasiliensis*, o nível de  $\alpha$ -1,3-glucana na parede celular das leveduras patogênicas está relacionado ao grau de virulência apresentado pelo microrganismo (KLEIN e TEBBETS, 2007).

Tanto a tolerância térmica quanto o dimorfismo têm sido considerados importantes fatores de virulência, uma vez que a temperatura corporal de mamíferos hospedeiros é consideravelmente alta (KUROKAWA, SUGIZAKI e PERAÇOLI, 1998). Neste sentido, a endotermia em animais é considerada um fator de proteção contra doenças infecciosas, em

particular doenças fúngicas, já que a maioria das espécies de fungos se desenvolve melhor na temperatura ambiente. Poucas espécies de fungos podem sobreviver a altas temperaturas, mas esta tolerância é comum entre fungos dimórficos patogênicos (BAGAGLI *et al.*, 2008).

O fenômeno da transição termodimórfica tem se mostrado intimamente relacionado com a patogenicidade destes organismos, uma vez que linhagens de *P. brasiliensis*, *B. dermatitidis* e *H. capsulatum* incapazes de se converterem em leveduras não apresentam virulência (MEDOFF *et al.*, 1986; SAN-BLAS e NIÑO-VEGA, 2001).

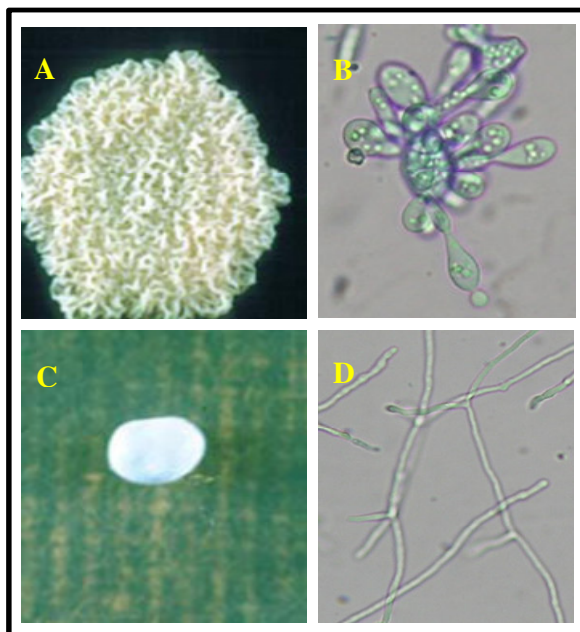
## **1.2. *Paracoccidioides brasiliensis***

*Paracoccidioides brasiliensis* é um fungo dimórfico que depende da temperatura a que é exposto como único requerimento para expressão de suas alterações morfológicas e patogenicidade. O micélio, forma infectante do fungo, cresce vagarosamente na natureza à temperatura de 23°C a 28°C. Macroscopicamente, as culturas apresentam-se como colônias brancas e aderentes ao meio de cultura e quando analisadas em microscópio óptico, as células fúngicas apresentam-se como hifas septadas finas, com clamidiosporos. Seu pequeno tamanho, de 3,5 a 5 µm, é compatível com a deposição alveolar (**Figura 1**) (BRUMMER, CASTAÑEDA e RESTREPO, 1993).

Em tecidos infectados de hospedeiros ou em culturas *in vitro* mantidas a 37°C, o fungo sofre sua transição dimórfica e assume a forma parasitária de levedura, que mostra macroscopicamente aspecto de colônia “cerebriforme”. Microscopicamente, é descrito como estrutura ovóide e com múltiplos brotamentos, parede celular fina, dividida em duas subcamadas; o citoplasma é rico em mitocôndrias e vacúolos, possui escassos retículos endoplasmáticos e múltiplos núcleos. Este morfotipo se reproduz por gemulação, **Figura 1** (BRUMMER, CASTAÑEDA e RESTREPO, 1993; CANO *et al.*, 1998; SAN-BLAS e SAN-BLAS, 1984).

Com a mudança de micélio para levedura diversas alterações ocorrem na parede celular do fungo, há aumento do conteúdo de quitina e modificação na estrutura das glucanas, que passam a ter monômeros unidos por ligações  $\alpha$ -1,3 em detrimento das ligações  $\beta$ -1,3 características do micélio. A alteração das ligações para  $\alpha$ -1,3-glucana pode ser considerada um fator favorável à adaptação do patógeno aos tecidos do hospedeiro, uma vez que células

fagocitárias são incapazes de clivá-las (BRUMMER, CASTAÑEDA e RESTREPO, 1993; SAN-BLAS, 1982).



**Figura 1: Morfologia macro e microscópica de culturas de *Paracoccidioides brasiliensis*.** A e C: culturas de levedura e micélio, respectivamente. B e D: Aspecto microscópico de levedura e micélio cultivados em meio YPD líquido (1% de extrato de levedura, 2% de peptona, 2% de dextrose, pH 6,3), em 36,5 e 26°C, respectivamente. B e D: aumento de 400x. Fontes: A e C - Adaptado de Shikanai-Yasuda *et al.*, (2006).

O principal componente antigênico de *P. brasiliensis* reconhecido no soro de pacientes infectados é uma glicoproteína de peso molecular de 43 kDa, a gp43. Esta glicoproteína é secretada para o exterior da célula e virtualmente 100% dos pacientes acometidos apresentam anticorpos reativos à gp43. Os títulos de anticorpos apresentados estão diretamente relacionados à severidade da doença, de maneira que títulos mais elevados indicam piores prognósticos (GIANNINI *et al.*, 1990; TRAVASSOS *et al.*, 2008).

Durante muito tempo *P. brasiliensis* foi considerado um fungo imperfeito devido à ausência de relatos sobre sua fase sexual ou teleomórfica. Com o avanço das técnicas de biologia molecular, *P. brasiliensis* foi classificado no Filo Ascomycota, Ordem Onygenales, Classe Plectomycetes, Família Onygenaceae *sensu lato*, no mesmo grupo com *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum* e *Lacazia loboi* (BAGAGLI *et al.*, 2008).

Estudos recentes em filogenia molecular e filogeografia indicam que vários gêneros membros de Onygenaceae *sensu lato* podem ter tido sua origem nas Américas, há cerca de 3-

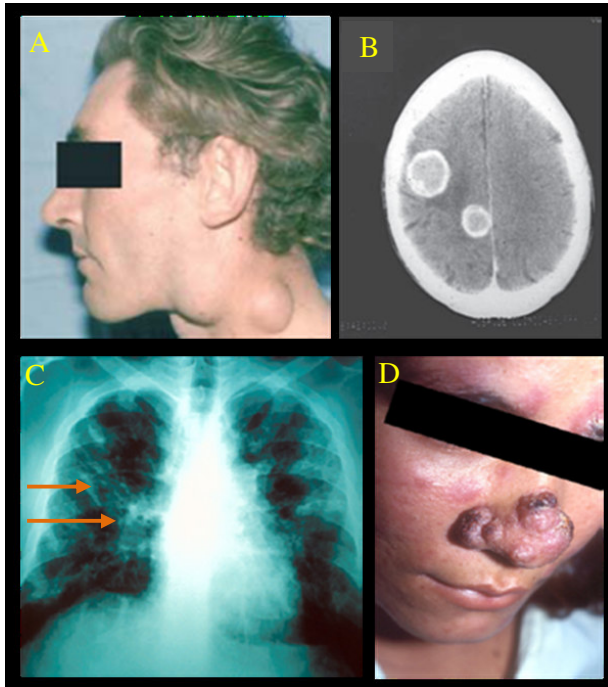
20 milhões de anos e que alguns dos mais importantes como *Histoplasma* e *Paracoccidioides*, quase certamente evoluíram na América do Sul (BAGAGLI *et al.*, 2006).

Embora *P. Brasiliensis* já tenha sido isolado de amostras de solo, fezes de pinguins *Pygoscelis adeliae* e de morcegos *Artibeus lituratus* e até de rações de cachorros, a falta de reprodutibilidade destes achados associada ao longo período de latência da infecção (nem sempre diagnosticada no local de contaminação) dificultam a determinação do preciso nicho ecológico deste fungo, embora dados epidemiológicos indiquem claramente que o patógeno ocorre em áreas geográficas circunscritas da América do Sul (FRANCO *et al.*, 2000).

A demonstração da alta incidência de infecção de tatus das espécies *Dasyopus novemcinctus* e *Cabassous centralis*, dos quais *P. brasiliensis* pode ser isolado com regularidade abriram novas perspectivas com relação à compreensão de aspectos ecológicos deste fungo. Estudos recentes demonstraram que isolados de *P. brasiliensis* oriundos de tatus *Dasyopus novemcinctus* foram indistinguíveis de isolados clínicos, indicando que o mesmo genótipo é capaz de infectar tatus e seres humanos. Tatus infectados têm sido encontrados com frequência nas proximidades da cidade de Botucatu, SP, área endêmica para PCM no Brasil (BAGAGLI *et al.*, 2006).

### 1.3. PARACOCCIDIOIDOMICOSE

A paracoccidioidomicose (PCM), também chamada de doença de Lutz-Splendore-Almeida ou blastomicose sul-americana, é uma micose sistêmica, granulomatosa, crônica que tem início quando propágulos fúngicos são inalados e atingem porções distais dos pulmões, onde sofrem transição para a forma de levedura e se multiplicam. Do trato respiratório, células fúngicas podem se disseminar por meio de vasos linfáticos ou da circulação sanguínea para outros órgãos e sistemas: pele, linfonodos, mucosas oral, nasal e gastrointestinal, glândulas adrenais e sistema nervoso central estão entre as principais regiões acometidas por lesões secundárias, **Figura 2** (BRUMMER, CASTAÑEDA e RESTREPO, 1993; RAMOS-E-SILVA e SARAIVA, 2008).

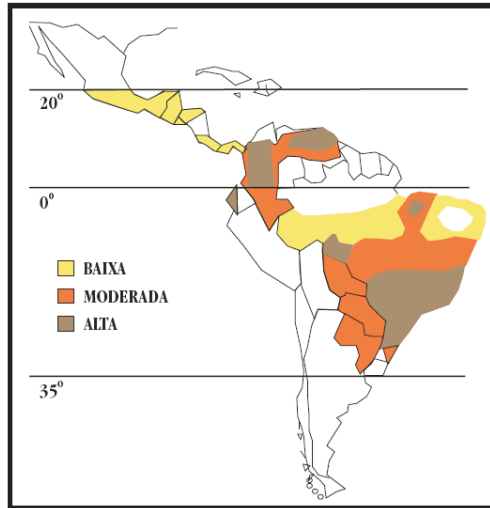


**Figura 2: Paracoccidioidomicose.** A e D: acometimento de linfonodos e pele, decorrentes da PCM. B e C: radiografias mostrando o envolvimento do sistema nervoso central e lesões pulmonares (setas) associadas à PCM. Fontes: A, B e C - Adaptado de: Shikanai-Yasuda *et al.*, (2006) e D - Ramos-e-Silva e Saraiva, (2008).

A infecção ocorre principalmente nas duas primeiras décadas da vida dos acometidos, entretanto devido ao longo período de latência característico da PCM, as manifestações clínicas são mais comuns em adultos com idade entre 30 e 50 anos, levando potencialmente a seqüelas incapacitantes ou até à morte prematura indivíduos na fase da vida de maior produtividade econômica (SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 2006; BRUMMER, CASTAÑEDA e RESTREPO, 1993).

Em virtude de o trato respiratório ser a principal via de contaminação do hospedeiro, profissionais com atividades relacionadas ao manejo do solo constituem ao mesmo tempo o principal grupo de risco para a aquisição do parasita e o maior grupo acometido pela doença, já que 70 % dos casos informados na América Latina é composto por trabalhadores rurais (SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 2006; BRUMMER, CASTAÑEDA e RESTREPO, 1993).

A PCM é prevalente na América Latina, contudo apresenta distribuição geográfica heterogênea com áreas endêmicas principalmente localizadas na Argentina, Brasil, Colômbia, Equador e Venezuela, casos raros têm sido reportados na América Central e no México, **Figura 3** (SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 2006).



**Figura 3: Distribuição geográfica da paracoccidioidomicose na América Latina.** Fonte: Shikanai-Yasuda *et al.*, (2006).

Mesmo em países que concentram grande número de zonas endêmicas, situação do Brasil, a distribuição de casos é heterogênea e está diretamente relacionada ao clima regional. A maioria dos casos ocorre em áreas tropicais ou subtropicais, com temperaturas médias entre 17° e 24°C, em altitudes de até 1500 m e com índice pluviométrico de 500 a 2500 mm/ano (RAMOS-E-SILVA e SARAIVA, 2008).

A PCM não é uma doença de notificação compulsória, o que dificulta a obtenção de dados precisos sobre sua incidência, estima-se que cerca de 10 milhões de pessoas estejam infectadas na América Latina e que 2 % delas irão desenvolver a doença em algum momento da vida (COUTINHO *et al* 2002; BRUMMER, CASTAÑEDA e RESTREPO, 1993).

O Brasil soma 80 % do total de casos informados no mundo. No país, a doença ocupa o primeiro lugar em mortes causadas por micoses sistêmicas e a oitava posição entre as doenças predominantemente crônicas, considerando males infecciosos e parasitários. A mortalidade por PCM varia de 2 % a 23 % em regiões endêmicas, entretanto, quando associada à AIDS, o índice de mortes pode chegar a 30 % (LACAZ, 1991; COUTINHO *et al.*, 2002).

### **1.3.1. Manifestações Clínicas**

O desenvolvimento de sintomas e a evolução da PCM propriamente dita dependem de fatores relacionados à situação do hospedeiro no que se refere a idade, uso de drogas imunossupressoras, ocorrência de doenças concomitantes, entre outros; entretanto em todos os casos há depressão da resposta imune celular, principalmente do padrão 1 de resposta imunológica (caracterizado pela síntese de citocinas, ativação de macrófagos e linfócitos T CD4+ e CD8+ e formação de granuloma) e o grau de depressão desta está diretamente correlacionado à severidade da doença. Devido ao estreito envolvimento do trato respiratório no processo de infecção, o desenvolvimento de PCM pulmonar ocorre em 80 a 90% dos casos (SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 2006; LACAZ *et al.*, 2002).

De acordo com o consenso em paracoccidioidomicose de 2006, as formas clínicas de PCM, definidas relacionando dados clínicos à história natural da doença, são:

#### *1.3.1.1- Infecção:*

Caracteriza-se pela infecção sem evolução para um quadro de doença. É a forma que afeta indivíduos aparentemente sadios de ambos os sexos, que residem ou residiram em zonas endêmicas e apresentam reação intradérmica positiva para paracoccidioidina. Nestes indivíduos não há depressão da resposta imunológica celular (LACAZ *et al.*, 2002; BRUMMER, CASTAÑEDA e RESTREPO, 1993).

#### *1.3.1.2- Doença:*

##### *1.3.1.2.1- Forma Juvenil, Aguda ou Subaguda:*

Esta forma de manifestação representa de 3 a 5 % dos casos e afeta principalmente indivíduos jovens (crianças e adolescentes). Caracteriza-se por evolução rápida, com

linfadenomegalia, hepatoesplenomegalia, envolvimento ósteo-articular e lesões cutâneas. É a forma mais severa da doença, com o pior prognóstico, na qual a resposta imune celular está severamente deprimida e a taxa de letalidade chega a 11 % do total de acometidos (RAMOS-E-SILVA e SARAIVA, 2008; SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 2006; BRUMMER, CASTAÑEDA e RESTREPO, 1993).

#### *1.3.1.2.2- Forma Crônica ou do tipo adulto:*

A PCM em sua forma crônica representa mais de 90 % dos casos da doença e afeta principalmente adultos do sexo masculino, geralmente com mais de 20 anos. Caracteriza-se pelo comprometimento do estado geral do paciente, evolução lenta e silenciosa com manifestações pulmonares em mais de 90 % dos casos. É chamada de **unifocal** quando a micose está restrita a um único órgão ou sistema, há pequeno comprometimento da imunidade celular. O comprometimento unicamente pulmonar representa 25 % dos casos. Quando envolve vários órgãos ou sistemas a doença é chamada de **multifocal**. A depressão da imunidade celular é variável (RAMOS-E-SILVA e SARAIVA, 2008; SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 2006; BRUMMER, CASTAÑEDA e RESTREPO, 1993).

#### *1.3.1.3- Forma Residual ou Sequelar:*

Esta forma é determinada pelo processo inflamatório crônico que culmina num acúmulo de colágeno, formação de fibrose e alterações anatômicas e funcionais nos órgãos afetados. A fibrose pulmonar aparece como a principal seqüela, reportada em 50 % dos casos (RAMOS-E-SILVA e SARAIVA, 2008; SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 2006; BRUMMER, CASTAÑEDA e RESTREPO, 1993).



## 1.4. TRATAMENTO FARMACOLÓGICO DO PACIENTE ACOMETIDO POR PCM

A assistência dispensada ao paciente acometido por PCM deve necessariamente incluir medidas de suporte às complicações secundárias associadas aos órgãos acometidos pelo fungo, além da terapia antifúngica propriamente dita, para que a recuperação do estado geral do paciente aconteça da forma mais rápida e completa possível (SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 2006).

O tratamento farmacológico da PCM é longo e basicamente pode ser dividido em duas fases: a fase inicial de ataque, em que ocorre administração de doses elevadas dos medicamentos aos pacientes por um período relativamente curto, e a fase de manutenção, em que as doses dos medicamentos são menores, porém administradas por um longo período. A fase inicial, que dura em média 3 meses, tem como objetivo controlar rapidamente os sinais e sintomas da doença e reduzir o nível de parasitas para que haja recuperação do sistema imunológico do hospedeiro, ponto fundamental ao sucesso do tratamento. Já a prolongada etapa de manutenção, mantida até que critérios de cura sejam atingidos, é necessária para reduzir o risco de recidivas (SAN BLAS e SAN BLAS, 1994).

Entre as principais drogas de escolha para o tratamento da PCM em humanos estão as sulfonamidas (sulfametoxazol-trimetoprim), os derivados imidazólicos (itraconazol, cetoconazol, fluconazol) e os polienos (anfotericina B). Estas substâncias podem ser usadas isoladamente ou em associações, dependendo da necessidade e evolução clínica de cada paciente (VISBAL *et al.*, 2005).

Dentre as classes disponíveis, as sulfonamidas são definidas como drogas de primeira escolha em grande parte dos casos em razão do seu baixo custo e do pequeno poder econômico dos acometidos, e o tratamento deve ser seguido por 2 anos, já que tempos menores estão associados a altas taxas de recidivas (HAHN *et al.*, 2003).

No grupo dos derivados imidazólicos, o itraconazol é definido como droga de escolha para o tratamento da PCM, pois apresenta menor hepatotoxicidade do que o cetoconazol e é mais efetivo contra *P. brasiliensis* do que o fluconazol. Não há consenso quanto ao tempo adequado para tratamento com derivados imidazólicos, entretanto sob nenhuma hipótese o período de terapia pode ser inferior a 3 meses (BETHLEM *et al.*, 1999).

O uso da anfotericina B é reservado aos casos severos de PCM ou quando há resistência a sulfonamidas e/ou derivados imidazólicos. O tratamento é endovenoso e prolonga-se até que haja melhora clínica compatível com a terapia administrada por via oral (HAHN et al., 2003).

Independentemente do medicamento empregado no tratamento, o longo período de terapia necessário para que critérios de cura sejam atingidos está diretamente relacionado à severidade dos efeitos colaterais observados. Atenção especial deve ser dada aos pacientes acometidos pela PCM quando estes são portadores de insuficiência renal ou hepática, visto o elevado potencial nefrotóxico e hepatotóxico associado aos medicamentos antifúngicos disponíveis atualmente (SHIKANAI-YASUDA et al., 2006).

Embora ainda incomum para *P. brasiliensis*, o isolamento de fungos resistentes aos antifúngicos usualmente empregados na clínica tem se tornado freqüente. Já há descrição na literatura de isolados resistentes de diferentes fungos patogênicos, incluindo *Candida* spp, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus* spp e *Histoplasma capsulatum* o que contribui para o aumento do número de mortes associadas estas micoses (ALEXANDER e PERFECT, 1997; KONTOYIANNIS e LEWIS, 2002).

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 (VITALE et al., 2007).

## **1.5. RESISTÊNCIA MÚLTIPLA A DROGAS EM FUNGOS**

Ao longo da última década, as infecções fúngicas sistêmicas emergiram como um importante problema de saúde pública em decorrência do crescente número de afetados e da severidade do quadro apresentado pelos pacientes. Esta situação é consequência do progressivo acometimento de imunocomprometidos por infecções fúngicas oportunistas e do desenvolvimento de resistência microbiana aos agentes antifúngicos empregados (LUPETTI et al., 2002). O fenômeno de resistência em fungos é caracterizado pela falência da terapia medicamentosa em controlar a infecção, o que é mensurado pelo do aumento da concentração inibitória mínima, quando comparado a valores obtidos para organismos susceptíveis, tomados como referência. O aumento do número de casos de infecções fúngicas hospitalares,

bem como o uso indiscriminado de antifúngicos nos últimos anos, são dois fatores que contribuem para esta situação (ALEXANDER e PERFECT, 1997; SANGLARD e ODDS, 2002; SANGLARD, 2002).

A resistência pode ser classificada como primária ou intrínseca, quando está presente antes da exposição a agentes antifúngicos, ou como secundária ou selecionada, quando se desenvolve após a exposição aos medicamentos. Ela varia conforme o patógeno causador da infecção e tipo de antifúngico empregado no tratamento (KONTOYIANNIS e LEWIS, 2002).

Vários mecanismos moleculares podem contribuir para o fenótipo de resistência a drogas, contudo os mecanismos mais frequentemente envolvidos são: diminuição da afinidade dos alvos celulares pelas drogas, degradação ou inativação enzimática das substâncias e a super expressão de genes codificam proteínas que controlam o efluxo de drogas. Estes mecanismos podem ser acionados simultaneamente, causando diversas alterações nas células, visando sua sobrevivência (WHITE, MARR e BOWDEN, 1998).

O mecanismo que envolve a extrusão de toxinas do ambiente intracelular para o exterior abrange diferentes classes de proteínas transportadoras transmembrana, sendo que a super expressão desses transportadores é a causa mais freqüente de resistência a agentes tóxicos. Estas proteínas podem funcionar como bombas de efluxo, evitando a concentração de drogas no interior celular, o que confere ao microrganismo a capacidade de resistir simultaneamente a um grande número de compostos (LAGE, 2003).

A primeira bomba de efluxo de múltiplas drogas descrita foi a glicoproteína-P de mamíferos, uma bomba movida por hidrólise de ATP que provê resistência a um amplo espectro de compostos, incluindo agentes utilizados na quimioterapia contra o câncer. Em muitos casos de câncer, a glicoproteína-P é super expressa, contribuindo para a resistência a quimioterápicos importantes que são reconhecidos por este tipo de transportador (LING, 1997; LAGE, 2003).

Em microrganismos patogênicos estas proteínas têm sido apontadas como responsáveis por um importante fenótipo, caracterizado pela resistência cruzada contra várias drogas que diferem grandemente tanto na estrutura molecular quanto na especificidade de alvos, chamado de fenótipo de resistência múltipla a drogas (MDR, da sigla em inglês *multidrug resistance*). Duas classes principais de transportadores de agentes tóxicos estão envolvidas na resistência a drogas em fungos: transportadores do tipo ABC e do tipo MFS (COSTA *et al.*, 2005).

Transportadores ABC (*ATP Binding Cassete*) formam uma das maiores superfamílias de proteínas transportadoras, com mais de 3000 membros, diferentes papéis fisiológicos e

grande diversidade de substratos. Estão presentes em todos os táxons e possuem sistemas de transporte relacionados à captação e ao efluxo de substâncias. Os transportadores pertencentes a esta superfamília utilizam a energia derivada da hidrólise de ATP para transportar substâncias através da membrana contra um gradiente de concentração. Alguns deles reconhecem e removem inúmeros xenobióticos não relacionados estrutural ou funcionalmente, mediando a detoxificação celular e conferindo assim a resistência múltipla a drogas (COSTA *et al.*, 2005; JUNGWIRTH e KUCHLER, 2006).

Transportadores MFS (*Major Facilitator Superfamily*) correspondem a mais de mil proteínas relacionadas que transportam grande variedade de solutos e metabólitos através da membrana de organismos tão diversos quanto bactérias e seres humanos. O transporte de substâncias através da membrana por este tipo de transportador é guiado pelo gradiente eletroquímico de prótons (PAULSEN, BROWN e SKURRAY, 1996).

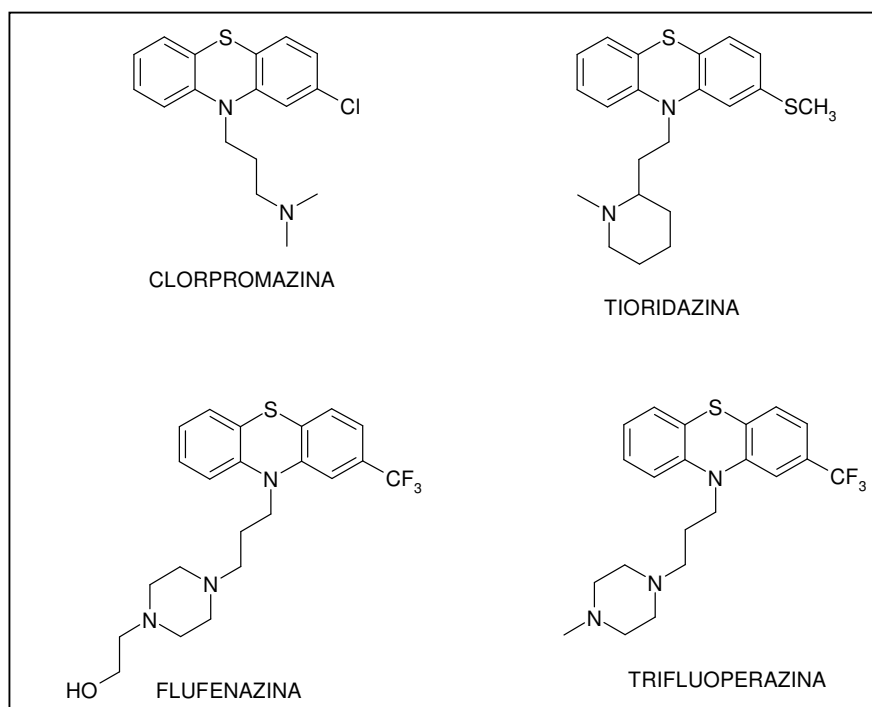
Embora incomuns, já existe na literatura descrição de isolados de *P. brasiliensis* resistentes a drogas (cetoconazol e associação sulfametoxazol-trimetoprim) classicamente utilizadas no tratamento medicamentoso da PCM (HAHN *et al.*, 2003). Neste sentido, o estudo de drogas capazes de promover a modulação da expressão de genes relacionados ao fenótipo MDR é de extrema importância tanto para o entendimento dos mecanismos moleculares responsáveis pelo desenvolvimento de resistência quanto para a avaliação do potencial farmacológico dessas substâncias.

## **1.6. FENOTIAZINAS**

Compostos fenotiazínicos são agentes antipsicóticos historicamente utilizadas para o tratamento de desequilíbrios mentais e emocionais, incluindo esquizofrenia e outras doenças psicóticas. São usados clinicamente também por suas reconhecidas propriedades antieméticas e anti-histamínicas (FRIEND e CUMMINS, 1953).

Além de suas propriedades farmacológicas como substâncias antipsicóticas, compostos fenotiazínicos apresentam outros efeitos, derivados de sua estrutura anfifílica, na qual o núcleo fenotiazínico é relativamente hidrofóbico, enquanto as cadeias laterais são hidrofílicas e podem estar até positivamente carregadas dependendo do pH do meio que as envolve (RODRIGUES, 2007). Quimicamente, fenotiazinas são compostas por uma estrutura de três anéis, o núcleo fenotiazínico, onde dois anéis benzênicos estão ligados por um átomo

de enxofre e um de nitrogênio. As substituições no núcleo fenotiazínico estão no carbono 2 e no nitrogênio 10. Em função do grupo lateral substituinte na posição 10, esses fármacos podem ser subdivididos em três subclasses: os alifáticos, cujo principal representante é a clorpromazina, os piperazínicos, os quais incluem a trifluoperazina e a flufenazina e os piperidínicos, do qual a tioridazina é o principal representante, **Figura 4** (BALDESSARINI e TARAZI,1989).



**Figura 4:** Estrutura química de compostos fenotiazínicos.

Dentre suas propriedades, destaca-se a capacidade de interação com fosfolípidos de membrana (CAETANO e TABAK, 2000), o que provoca deformações nesta estrutura. Suas funções podem ser afetadas por mudar a estrutura e/ou atividade de proteínas a ela associadas (RODRIGUES, 2007), podendo culminar com a lise da membrana, efeito já descrito na literatura para eritrócitos (MALHEIROS, DE PAULA e MEIRELLES, 1998). São igualmente capazes de alterar o funcionamento de organelas intracelulares envolvidas por membrana, como por exemplo, mitocôndrias isoladas (RODRIGUES *et al.*, 2002). Estes compostos também são capazes de inibir calmodulina, uma proteína ligante de cálcio, envolvida numa série de processos de sinalização celular, causando efeitos celulares

múltiplos, incluindo alterações no metabolismo de nucleotídeos e intercalação no DNA (De FILIPPI *et al.*, 2007 ; VITALE *et al.*, 2007).

Estudos têm demonstrado que a tioridazina (TR) inibe a proliferação de células em cultura, devido à diminuição do suprimento de ATP, por inibir a via glicolítica e a F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP sintase (GLASS-MARMOR, MORGENSTERN e BEITNER, 1996), além de induzir apoptose em células tumorais (ZHELEV *et al.*, 2004) e diminuir a resistência de células tumorais à quimioterapia convencional (SOUZA *et al.*, 2003).

Uma característica interessante destas substâncias está relacionada à sua atividade antimicrobiana contra bactérias, alguns protozoários e leveduras de interesse médico tanto *in vitro* quanto *in vivo* (AMARAL *et al.*, 2001; WANG e CASADEVALL, 1996; EILAM *et al.*, 1987). Outro aspecto de grande importância, mais recentemente explorado e já bastante fundamentado na literatura, é a capacidade destas moléculas de modulação do fenótipo de resistência múltipla a drogas (MDR), já descrito em bactérias, fungos filamentosos, leveduras e células tumorais. O fenótipo MDR é atualmente apontado como o maior obstáculo ao sucesso do tratamento medicamentoso de doenças infecciosas e tumores (KOLACZKOWSKI, MICHALAK e MOTOHASHI, 2003; MICHALAK, 2006).

A atividade de fenotiazinas contra microrganismos de importância clínica, incluindo leveduras, sugere que possam atuar de maneira semelhante em *Paracoccidioides brasiliensis* e acena para o potencial destas substâncias de contribuir com a terapia farmacológica existente de combate a PCM. O interesse na avaliação destas hipóteses estimulou o desenvolvimento deste trabalho.

## **1.7. HIBRIDAÇÃO EM MICROARRANJOS DE DNA**

Uma contribuição importante dos estudos de seqüenciamento dos genomas foi a de que é a expressão molecular da mensagem codificada, e não tanto o número de genes, a responsável pela variabilidade entre organismos. A compreensão das bases moleculares que diferenciam células normais das doentes, linhagens com variados graus de virulência de um mesmo microrganismo e os mecanismos relacionados a essas circunstâncias biológicas de um ponto de vista genômico são questões desafiadoras para a ciência há anos. Análises por meio de hibridações competitivas e, mais recentemente, utilizando microarranjos de DNA tem sido o método de escolha para estudos de expressão gênica, pois permitem a obtenção de

resultados com elevada eficiência, possibilitando o entendimento da resposta a um estímulo de uma forma integrada e global. (LARKIN, 2005; GARAIZAR *et al.*, 2006).

O uso de moléculas de ácido nucléico marcadas para investigar, por hibridação, moléculas de DNA aderidas a um suporte sólido, foi descrito primeiramente na década de 1970, entretanto, com uma abordagem restrita gene a gene, o que limitava o uso da técnica ao estudo de funções biológicas individuais relacionadas a poucos genes, ou na melhor das hipóteses, vias metabólicas para investigações mais globais da atividade celular (D'AMBROSIO, GATTA e BONINI, 2005; HOHEISEL, 2006). Os microarranjos exploram o princípio de complementaridade de bases dos ácidos nucléicos, ou seja, a capacidade de um DNA/RNA se hibridar especificamente a uma fita de DNA segundo sua seqüência de nucleotídeos. O desenvolvimento desta tecnologia representou um novo e poderoso conjunto de ferramentas que possibilitou o entendimento de sistemas biológicos e organismos de maneira ampla, uma vez que permitiu a medida do nível de expressão de milhares de genes simultaneamente, de uma maneira compreensível e sistemática, vinculando o teste de hipóteses a resultados observados (HELD, GRINSTEIN e TU, 2006; SCHENA *et al.*, 1998).

Os primeiros arranjos genômicos foram realizados em suportes porosos, como membranas de nylon, que, embora permitissem análise de centenas de genes num único experimento, ainda apresentavam desvantagens como a dificuldade de manipulação inerente ao material componente deste tipo de suporte e a necessidade de uso de marcadores radioativos (D'AMBROSIO, GATTA e BONINI, 2005).

Os microarranjos são geralmente produzidos sobre uma lâmina de vidro, um suporte inerte que, entre outras vantagens, permite efetiva imobilização de sondas em sua superfície, e uma hibridação robusta destas com amostras alvo (CHEUNG *et al.*, 1999). As técnicas de produção de microarranjos seguem duas categorias principais: síntese e fixação. Na abordagem de síntese, os microarranjos são preparados pela síntese *in situ* de “blocos” de ácidos nucléicos. Em cada etapa de síntese, os nucleotídeos são adicionados em seqüência às cadeias crescentes até que o comprimento desejado seja conseguido. A tecnologia de fixação, por outro lado, usa a adesão de moléculas de ácidos nucléicos previamente sintetizadas para a fabricação do chip. Moléculas como DNA ou DNA complementar (cDNA) são amplificadas por PCR, purificadas e quantidades pequenas são depositadas em posições conhecidas com o auxílio de robôs de alta precisão, os *arrayers* (SCHENA *et al.*, 1998; HELLER, 2002).

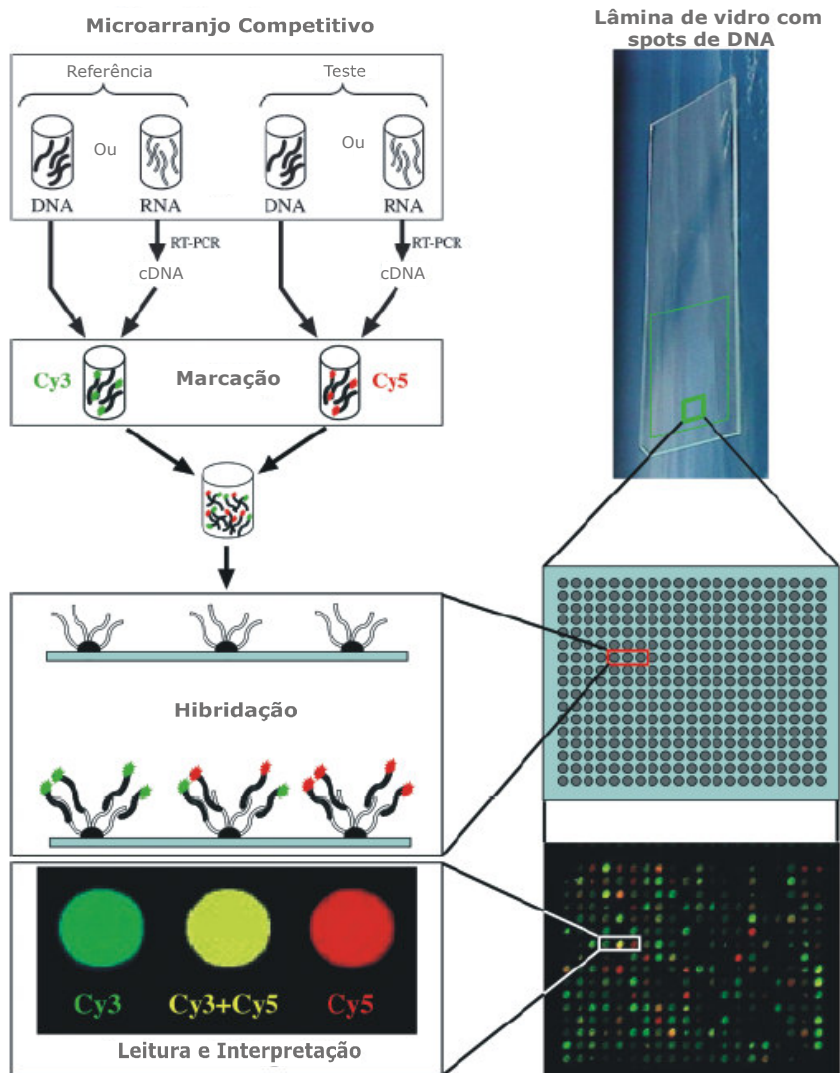
Para a análise comparativa da expressão gênica em uma situação biológica de interesse, é feita a extração de conjuntos de RNA representativos das populações teste e referência, estas amostras são então convertidas em cDNA e marcadas com fluoróforos

diferentes. Em seguida, as amostras são misturadas e submetidas à hibridação competitiva com as seqüências fixadas no chip. Após o período de hibridação, uma lavagem é realizada para que o excedente de material seja retirado. A fluorescência de cada ponto ou *spot* é avaliada separadamente nos comprimentos de onda referentes a cada um dos fluorófos com auxílio de varredura em scanner conectado a um computador que avalia e quantifica o sinal emitido. Uma vez que a hibridação é competitiva, quanto maior a intensidade de sinal captada no *spot*, maior é a modulação da expressão do gene na condição testada. A marcação com fluoróforos diferentes permite uma comparação do nível de expressão de cada gene nas circunstâncias biológicas avaliadas, **Figura 5**.

Os estudos de expressão gênica geram um montante enorme de dados, os quais devem ser integrados e avaliados de forma organizada e global, e para isso são utilizados pacotes de programas computacionais especializados, adaptados ao tratamento de quantidades maciças de dados, desenvolvidas por bioinformatas e bioestatísticos.

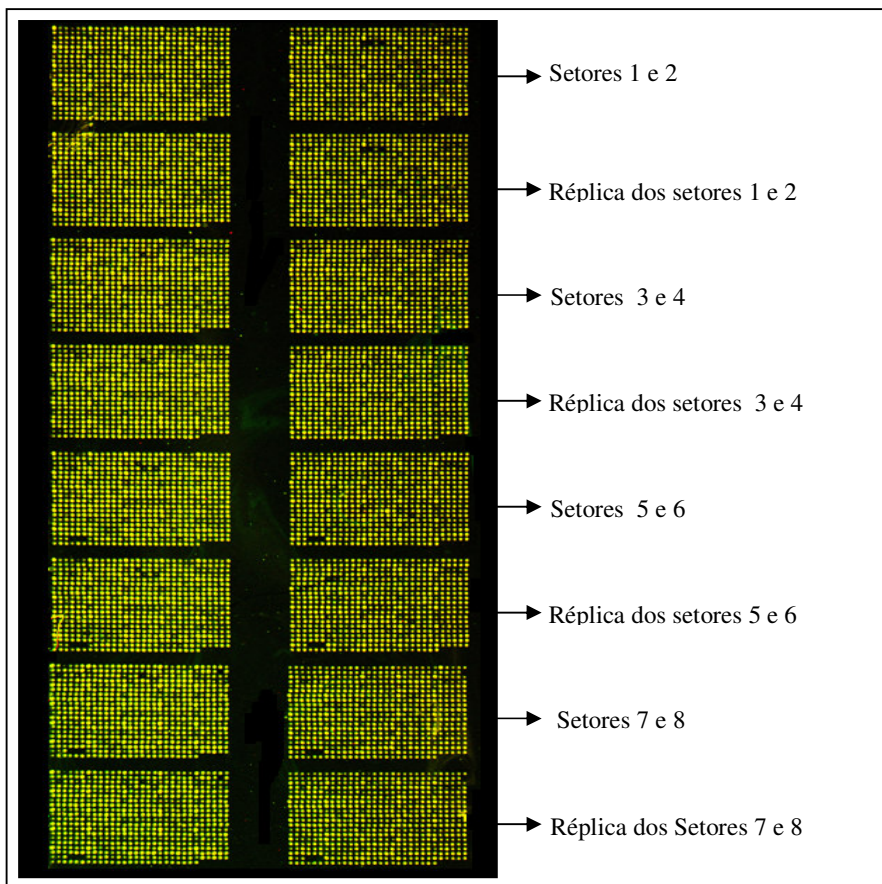
Os resultados gerados pelos programas de análise podem necessitar de análises estatísticas adicionais para serem adequadamente interpretados e, quando um grupo de genes com variação estatisticamente significativa na expressão é identificado, experimentos validatórios são necessários para confirmar as alterações observadas no perfil de expressão. A validação deve ser realizada preferencialmente por métodos como RT-PCR, PCR quantitativa, Northern e Western *blotting*, citometria de fluxo, todos adequados à confirmação de resultados prévios observados no perfil de expressão (D'AMBROSIO, GATTA e BONINI, 2005).





**Figura 5: Esquema do procedimento de hibridação competitiva em microarranjos de DNA.** Amostras de RNA ou DNA extraídas das populações referência e teste são marcadas com diferentes fluoróforos e misturadas para hibridação em microarranjo. A imagem formada após varredura em “scanner” óptico contém pontos verdes, vermelhos ou amarelos, correspondendo à hibridação com sondas marcadas com Cy3, Cy5 ou com ambos na mesma proporção. Fonte: Modificado de Garaizar *et al.*, (2006).

Para a análise de variações no perfil de expressão gênica de *P. brasiliensis* na presença do tioridazina foi utilizado um microarranjo (também denominado *chip* ou *biochip*) construído no Laboratório de Genômica Estrutural e Funcional, do Núcleo Integrado de Biotecnologia (NIB) da Universidade de Mogi das Cruzes, contendo elementos de 4692 fragmentos de seqüências expressas (EST) representativos do organismo, que foram funcionalmente classificados por similaridade a genes conhecidos, **Figura 6** (NUNES *et al.*, 2005).



**Figura 6: Arquitetura do chip de *P. brasiliensis* utilizado na hibridação competitiva em microarranjos de DNA.** As 4692 sequências representativas do genoma estão divididas em oito setores e aplicados em duplicata no “chip”. As réplicas estão situadas imediatamente abaixo dos setores correspondentes. Fonte: Leite, (2005).

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. GERAL**

Este trabalho tem como objetivo analisar a variação da expressão gênica em células de leveduras de *Paracoccidioides brasiliensis* expostos à tioridazina, possibilitando o melhor entendimento de aspectos fisiológicos e de mecanismos de patogenicidade deste fungo, além de avaliar o potencial farmacológico desta classe de fármacos no tratamento da paracoccidioidomicose.

### **2.2. ESPECÍFICOS**

- ▶ Avaliar morfológicamente os efeitos da tioridazina sobre a transição de *P. brasiliensis* da forma micelial para leveduriforme;
  
- ▶ Avaliar os efeitos da tioridazina sobre a viabilidade de *P. brasiliensis*;
  
- ▶ Investigar, por meio da técnica de hibridação em microarranjos de DNA, a modulação da expressão gênica de *P. brasiliensis* induzida por diferentes concentrações de tioridazina e como estas alterações do perfil transcricional estão envolvidas em processos fisiológicos e/ou ligadas à patogenicidade do *P. brasiliensis*.

### **3. MÉTODO**

#### **3.1. CULTIVO DE *Paracoccidioides brasiliensis***

Nestes estudos foram utilizadas amostras de *P. brasiliensis* cedidas pela Dra. Rosana Puccia, do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) e pelo Dr. Francisco Nóbrega, do Instituto de Pesquisa e desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP). Este isolado apresenta elevado grau de virulência e foi identificado como *P. brasiliensis* 18 (pode ser descrito em alguns trabalhos como *P. brasiliensis* 07 – MORAIS *et al.*, 2000) e inicialmente obtido de paciente que manifestava a forma crônica da PCM no estado de São Paulo – Brasil.

As culturas foram mantidas em meio YPD líquido (1% de extrato de levedura, 2% de peptona, 2% de dextrose, pH 6,3) em frascos de 100 ml, contendo 27 ml de meio, aos quais são adicionados inóculos de 3 ml de culturas de *P. brasiliensis*. A temperatura de incubação é de 26°C e 36,5°C, respectivamente, para micélio e levedura e as culturas foram submetidas à agitação constante em agitador orbital. Os repiques foram realizados semanalmente.

#### **3.2. EXPOSIÇÃO DE *P. brasiliensis* À TIORIDAZINA**

Com o objetivo de detectar possíveis alterações morfológicas, culturas de *P. brasiliensis* nas circunstâncias biológicas de micélio, transição micélio-levedura e levedura, foram submetidas ao crescimento em meio líquido contendo tioridazina nas concentrações de 5 µM, 15 µM, 20 µM, 25 µM, 30 µM e 50 µM. O experimento foi realizado em duplicata e as culturas mantidas à temperatura de 26°C, para o micélio, e 36,5°C, para transição e levedura, em agitador orbital sob agitação constante de 125 rpm. Para as situações testadas, foram utilizadas como pré-inóculos culturas com 5 dias, quando se atinge a fase exponencial de crescimento do fungo. O desenvolvimento das culturas foi acompanhado diariamente, pelo período de 7 dias, com análise de lâminas coradas com azul de tripan observadas em microscópio óptico (Nikon Eclipse E400, NIKON CORP), o registro das imagens foi feito

por captura fotográfica em câmera (Nikon coolpix 5400, NIKON CORP) acoplada ao equipamento de microscopia.

Posteriormente foi realizada uma curva de crescimento com células de levedura de *P. brasiliensis* em meio YPD em presença de tioridazina nas concentrações de 5  $\mu$ M, 15  $\mu$ M, 20  $\mu$ M, 25  $\mu$ M e 50  $\mu$ M, com a finalidade de determinar as concentrações de droga adequadas para o estudo. A partir de uma cultura-mãe com 5 dias de crescimento foram feitas sete novas culturas, seis expostas a diferentes concentrações de droga e uma não exposta, tomada como referência. Para todas as amostras, o volume de trabalho adotado foi de 30 mL, sendo 3 mL provenientes da cultura-mãe e 27 mL de meio YPD. Nas amostras expostas à TR, a droga foi adicionada ao meio de cultura imediatamente antes da adição do microrganismo. As culturas foram mantidas à temperatura de 36,5°C sob agitação constante de 125 rpm em agitador orbital. O crescimento celular foi monitorado a cada 24 horas durante 7 dias por meio de determinação da densidade óptica (D.O.) das culturas em 600 nm em espectrofotômetro (Ultrospec 2000, Pharmacia Biotec).

O experimento definido para extração de RNA e posterior hibridação em microarranjos de DNA foi constituído de oito culturas: uma duplicata de cada concentração escolhida de tioridazina e uma duplicata do controle não exposto. As culturas foram mantidas à temperatura de 36,5°C, sob agitação constante durante 7 dias conforme descrito acima e ao fim deste período o RNA total de cada condição testada foi extraído.

### **3.3. EXTRAÇÃO DE RNA**

Para extração de RNA total, alíquotas de 10 mL de cada cultura foram centrifugadas a 10.600 g (em centrífuga himac CR 21F, HITACHI) durante 20 minutos para separação das células do meio de cultura e, após o descarte do sobrenadante, o sedimento celular foi triturado em almofariz de porcelana, com nitrogênio líquido. Em seguida, o material foi transferido para tubo Falcon contendo 1 mL de Trizol<sup>®</sup> (Invitrogen) e o mesmo volume de pérolas de vidro com 2 mm de diâmetro. Os tubos foram mantidos sob agitação constante e intensa em agitador do tipo vortex por 10 minutos. Após a decantação das pérolas de vidro, o sobrenadante foi transferido para tubos de Eppendorf de 1,5 mL; houve adição de 200  $\mu$ L de clorofórmio, o material foi novamente agitado em vortex durante 15 segundos e centrifugado a 15.600 g por 15 minutos. A fase aquosa foi, então, transferida para novo tubo plástico de 1,5

mL e a ele foi adicionado o mesmo volume de isopropanol absoluto gelado. Este material foi mantido em  $-20^{\circ}\text{C}$  por 12 horas para precipitação. Após este período, a amostra foi centrifugada a 15.600 g por 40 minutos em centrífuga refrigerada a  $4^{\circ}\text{C}$  e o *pellet* formado foi lavado com etanol 70% (v/v) e seco em concentrador a vácuo (speed-vac) por 10 minutos. A amostra foi ressuspensa com 200  $\mu\text{L}$  de água e quantificada por D.O.<sub>260</sub>, medida em espectrofotômetro NanoDrop® ND-1000.

Todo o material utilizado para obtenção e tratamento de RNA foi esterilizado e/ou tratado com DEPC para eliminação de RNase (*RNase free*).

### **3.4. AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DO RNA OBTIDO**

A qualidade das amostras obtidas foi avaliada por eletroforese em gel de agarose desnaturante 1% [agarose 1% (p/v), tampão MOPS 10x 10% (v/v) e formaldeído 5% (v/v)]. Para a corrida, foram utilizados 2  $\mu\text{g}$  do RNA e o volume completado para 10  $\mu\text{L}$  com tampão de amostra contendo brometo de etídio. As amostras foram desnaturadas em termociclador mantido a  $65^{\circ}\text{C}$  por 10 minutos e a eletroforese foi desenvolvida com 60 V durante 60 minutos (modificado de MONTE e SOMERVILLE, 2002).

O critério utilizado para avaliar a qualidade do RNA total obtido pela extração foi a presença das bandas 18S e 28S do RNA ribossomal íntegras.

### **3.5. PURIFICAÇÃO DO RNA**

As amostras de RNA sem degradação aparente no gel foram consideradas adequadas para o trabalho e purificadas utilizando-se RNeasy Mini Kit (50) (Qiagen, Valencia, CA), de acordo com o protocolo do fabricante. A purificação do material é necessária, pois garante a eliminação de resquícios de DNA ou proteína que possam eventualmente permanecer na amostra. Esta etapa permite a obtenção de amostras com o grau de pureza necessário para as marcações.

### 3.6. AMPLIFICAÇÃO DO mRNA

A amplificação de mRNA é uma etapa fundamental para a obtenção de amostras de ácido nucléico com qualidade e em quantidade adequada para o ensaio em microarranjos de DNA.

O primeiro passo do processo de obtenção de mRNA amplificado foi a síntese da primeira fita de cDNA, para isso foram utilizados de 3-5 µg de RNA total (concentrado em 6 µL) ao qual foi adicionado 1 µL de *primer* oligo-dT (15)-T7 (5'-AAA CGA CGG CCA GTG AAT TGT AAT ACG ACT CAC TAT AGG CGC-3') (0,5µg/ µL). O RNA total foi então submetido à desnaturação por 10 minutos a 70°C, seguido de resfriamento em gelo. A este conjunto, mantido no gelo, foram acrescentados os reagentes necessários à reação de transcrição reversa: 4 µL de 5x first strand buffer, 2 µL de DTT (0,1M), 2 µL de dNTP (10mM), 1 µL de RNasin<sup>®</sup> (Promega, Madison, WI), 3 µL de primer template switch T5 (5'-AAG CAG TGG TAT CAA CGC AGA GTA CGC GGG-3') (Clontech, Palo Alto, CA) e 2 µL Superscript<sup>™</sup> II RT (200 U/µL – Invitrogen). A síntese do cDNA foi concluída com incubação de 2 horas a 42°C.

Prontamente foi iniciada a síntese da segunda fita de cDNA, com a adição no tubo de reação de: 64,3 µL de água livre de DNase, 10 µL de Advantage PCR buffer (Clontech), 2 µL de mix de dNTPs (10mM), 0,7 µL de RNase-H (Invitrogen) e 2 µL de Advantage cDNA polymerase (Clontech). O seguinte ciclo de temperatura foi utilizado: 37 °C – 10 minutos para digestão do RNA; 94°C – 3 minutos para desnaturação; 65°C – 5 minutos para anelamento do *primer* à fita molde e 75°C – 30 minutos para extensão. Ao final do ciclo, a reação foi bloqueada por inativação enzimática realizada por incubação a 65°C por 10 minutos com 5 µL de solução de NaOH (1M) e EDTA (2mM).

O ds-cDNA produzido foi purificado com uma mistura de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1/ v:v), precipitado com etanol na presença de 1 µL de acrilamida linear (5 mg/mL) e ressuspenso em 10 µL de água tratada com DEPC.

Para a transcrição *in vitro*, 10 µL de ds-cDNA foram incubados com 7,5 µL de rNTPs (25mM), 5 µL de 5x reaction buffer e 2,5 µL de enzyme mix (RNase inhibitor e T7 phage polymerase) (Ribomax<sup>™</sup> Large Scale RNA Production System T-7, Promega) a 37°C por 6 horas. O aRNA sintetizado foi extraído da reação por purificação com Trizol-clorofórmio e ressuspenso em 6 µL de água livre de RNase.

No segundo ciclo de amplificação, o aRNA sintetizado foi convertido em cDNA usando 3 µL de *random hexamer* Pd(N)6 (3 µg/µL), 1 µL de *primer* oligo-dT (15)-T7 (0,5µg/µL), 4 µL de 5x first strand buffer, 2 µL de DTT (0,1M), 2 µL de dNTP (10mM), 1 µL de RNAsin® e 2 µL Superscript™ II RT. A reação foi incubada à 42°C durante 2 horas.

Em seguida, a síntese da segunda fita de cDNA teve início nas mesmas condições usadas no primeiro ciclo.

As demais etapas do protocolo do segundo ciclo de amplificação compostas por purificação e precipitação do cDNA, transcrição e purificação do RNA, ocorreram nas mesmas condições utilizadas no primeiro ciclo (modificado de WANG *et al.*, 2000).

### **3.7. SÍNTESE DE cDNA MARCADO COM Cy3-dCTP ou Cy5-dCTP**

A síntese do cDNA foi realizada partindo-se de 10 µg de RNA amplificado (concentrado em 8,4 µL) ao qual foram adicionados 3 µL de *primer* oligo-dT (15)-T7 (0,5µg/µL), 3 µL *random hexamer* Pd(N)6 (3 µg/µL), 0,5 µL de “primer” λQ plus (10µM) e 1 µL de RNA λQ como controle positivo da marcação, perfazendo um volume total de 15,9 µL de reação.

A amostra foi submetida à desnaturação a 70°C por 10 minutos, seguida de anelamento em temperatura ambiente por 5 minutos, foram então adicionados 6 µL de 5x first strand buffer (Invitrogen), 3 µL de DTT (0,1M), 0,6 µL de mix dNTPs (25mM de dTTP, dGTP, dATP e 10mM de dCTP), 3 µL de Fluorolink® Cy3-dCTP ou Cy5 dCTP (25nM) (Amersham, Piscataway, NJ), 0,5 µL de RNAsin®, 2,5 uL de Superscript™ II RT (200 U/µL – Invitrogen). A reação foi incubada a 42°C por 2 horas.

Para degradar o RNA e a enzima remanescentes na reação houve: adição de 1,5 µL de EDTA (0,5 M) e 1,5 µL de NaOH (1M), incubação a 70°C por 20 minutos e adição 1,5µL de HCl (1 M). A purificação do cDNA já marcado com os fluoróforos Cy3-dCTP ou Cy5-dCTP foi realizada com Cyscribe™ GFX™ Purification Kit (Amersham), segundo as orientações do fabricante.

Para cada situação experimental testada, foram realizadas duas marcações com inversão de fluoróforos. Na primeira marcação utilizou-se Cy3-dCTP para a construção de cDNA a partir de mRNA proveniente da amostra referência e Cy5-dCTP para mRNA oriundo da



amostra teste. Na segunda marcação usou-se Cy5-dCTP para amostra não tratada e Cy3-dCTP para a amostra teste.

### **3.8. HIBRIDAÇÃO DE MICROARRANJOS DE DNA EM CÂMARA ÚMIDA**

A hibridação foi realizada utilizando biochips carregando seqüências representativas de aproximadamente 4692 genes de *P. brasiliensis*, construídos pelo Laboratório de Genômica Estrutural e Funcional do Núcleo Integrado de Biotecnologia (NIB) da Universidade de Mogi das Cruzes. Os cDNAs marcados foram ressuspensos, aos pares, em 40 µL de tampão de hibridação contendo 6x SSC (1x SSC contém 0.15 M NaCl e 0.015 M citrato de sódio), 5x solução de Denhardt, 0.25 mg/ml de DNA de esperma de salmão, 0,01% de dodecil sulfato de sódio (SDS), formamida 50% (v/v) e poli (dT) 92,5 ng/µL (25 U - Amersham). A solução contendo os cDNAs foi desnaturada a 95°C por 5 minutos, o material foi em seguida aplicado em uma lâmina de biochip e submetido a hibridação competitiva em câmara úmida, por 16-24 horas a 42°C.

Após o período de hibridação, a lâmina sofreu o procedimento de lavagem, no qual cada etapa é repetida duas vezes; a primeira etapa é realizada a 42°C, com solução de média estringência composta por 0,5x SSC e SDS 0,01% (p/v), a etapa seguinte é realizada com solução de alta estringência contendo 0,06x SSC e SDS 0,01% (p/v), a etapa final é feita com solução 0,06x SSC. Cada lavagem consistiu em 2 minutos e 30 segundos de incubação, de maneira que a lâmina permaneceu em contato com cada solução de lavagem durante cinco minutos. Ao fim da lavagem, a lâmina foi seca por centrifugação a 106 g durante 2 minutos.

### **3.9. AQUISIÇÃO E ANÁLISE DE IMAGENS**

O biochip hibridado foi submetido à detecção de fluorescência em *scanner* óptico GMS 418 (Affymetrix Inc., Santa Clara, CA), nos comprimentos de onda de 532 nm para o fluoróforo Cy3 e 635 nm para Cy5, gerando, para cada um deles, imagens independentes.

Os genes de *P. brasiliensis* estão fixados em duplicata no biochip e para cada uma das condições testadas, foram realizadas duas marcações independentes com inversão dos

fluoróforos (*Dye Swap*), totalizando oito leituras para cada *spot* no microarranjo. As imagens geradas foram analisadas pelo programa TIGR Spotfinder (v.3.1.1), que delimita a área de cada spot a partir da imagem bruta pela criação de um grid (SAEED *et al.*, 2003). Os valores de intensidade dos *spots* e do background local são quantificados, de maneira que a intensidade de sinal medida despreze o background. *Spots* que não possuíam intensidade equivalente ao background local mais dois desvios-padrão foram excluídos das análises. Os dados foram, então, salvos em uma planilha com a extensão .mev, na qual foram compiladas todas as informações sobre as intensidades das leituras, background local e sobre a identificação de cada elemento presente no microarranjo. Os resultados de cada hibridação foram submetidos a uma série de transformações matemáticas no programa TIGR Midas v.2.19 e os dados foram filtrados de maneira a excluir *spots* que possuísem valores integrados inferiores a 10.000 unidades análogo-digitais. As intensidades obtidas para os dois canais foram normalizadas pelo algoritmo Lowess de regressão não linear, que utiliza fatores de normalização dependentes de intensidade para diferentes *spots*. As variações nos valores de expressão em cada setor do biochip foram equalizadas utilizando-se a opção de regularização de desvio-padrão.

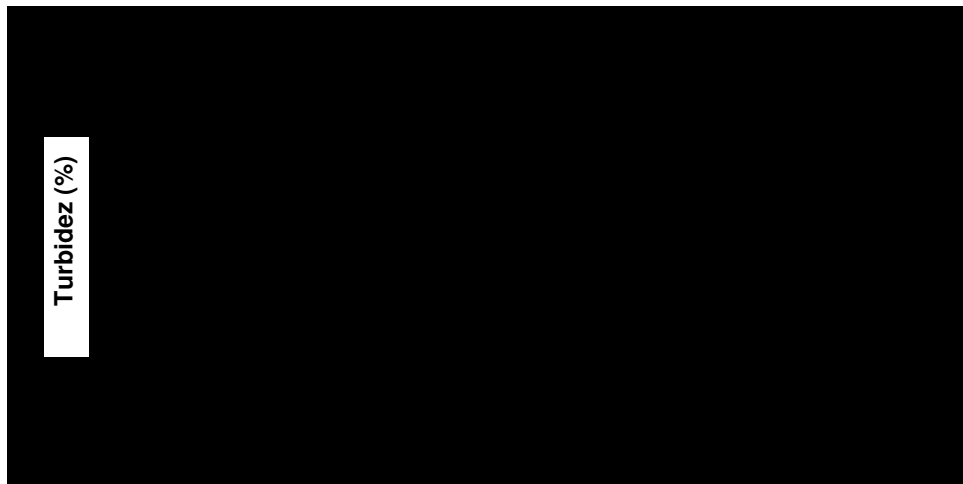
As planilhas contendo os dados finais das análises foram carregadas em outro programa do pacote TIGR denominado *Multi Experiment Viewer* (MEV) v. 3.1.1 onde foi feita a normalização entre os experimentos e a análise de variância (ANOVA) entre os grupos, utilizando-se o valor de  $P = 0,01$  como limite de confiabilidade para identificar os genes com variação de expressão estatisticamente significativa. Em seguida, os genes foram agrupados com auxílio dos algoritmos de clusterização hierárquica, *K-means*, a fim de permitir a visualização daqueles genes super expressos e sub-regulados em resposta à exposição à tioridazina. A variação da expressão gênica em relação às diferentes concentrações de droga é dada em função do logaritmo na base 2 da razão média das intensidades de fluorescência entre Cy5 e Cy3. As réplicas dos experimentos foram normalizadas de modo que a intensidade de fluorescência em Cy3 correspondesse às amostras não expostas e a intensidade em Cy5 correspondesse às amostras expostas à tioridazina.

Todos os softwares empregados nestes estudos, bem como detalhes referentes à sua utilização podem ser obtidos em <http://www.tigr.org/software>.

## 4 - RESULTADOS

### 4.1- CRESCIMENTO DE *Paracoccidioides brasiliensis* NA PRESENÇA DE TIORIDAZINA

A viabilidade das células de *P. brasiliensis* submetidas ao crescimento em meio YPD líquido acrescido de TR em diversas concentrações foi avaliada indiretamente pela medida diária da densidade óptica (D.O.<sub>600</sub>) das culturas. Este experimento permitiu o estabelecimento das concentrações sub letais adequadas de exposição à TR.

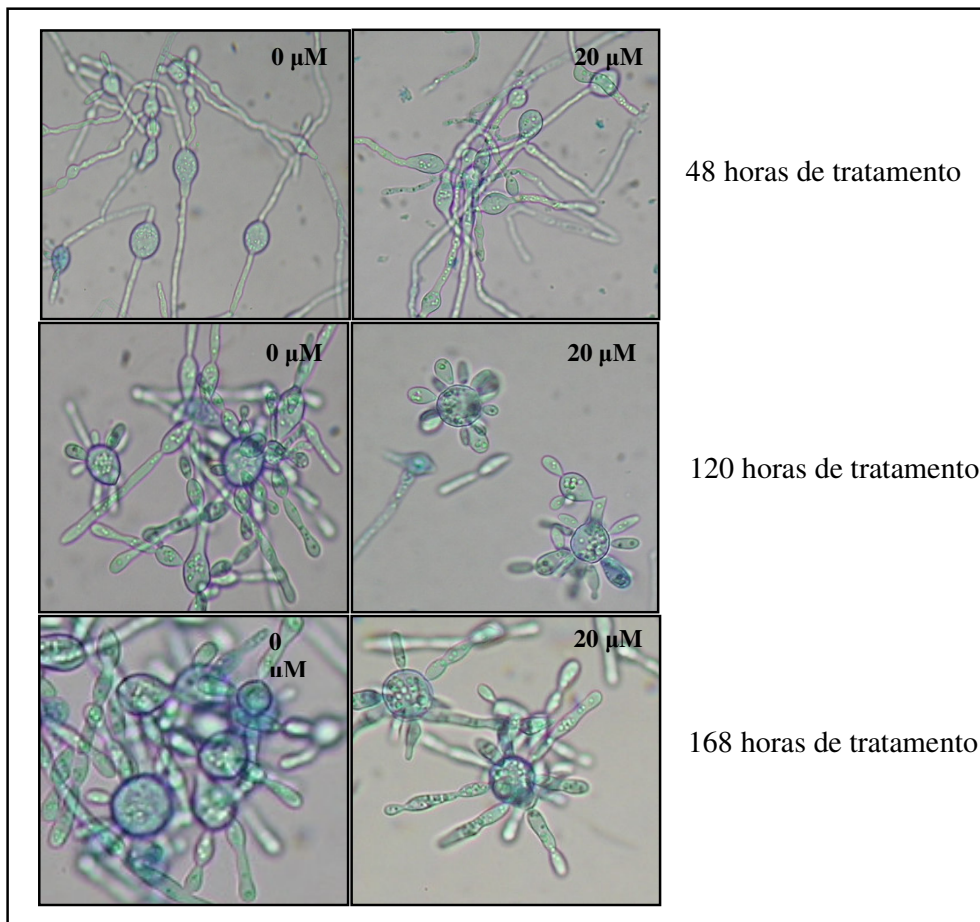


**Figura 7:** Experimento representativo do crescimento percentual de *Paracoccidioides brasiliensis* exposto a diferentes concentrações de TR. Células leveduriformes do fungo foram submetidas a crescimento em meio YPD líquido acrescido de tioridazina nas concentrações de 5, 15, 20, 25 e 50 µM. A D.O.<sub>600 nm</sub> das culturas foi determinada diariamente em espectrofotômetro Ultrospec 2000, Pharmacia Biotec. Os percentuais de crescimento foram calculados tomando como referência uma cultura não exposta à droga.

Como pode ser observado na **Figura 7**, a TR afetou de maneira dependente da concentração o crescimento celular, sendo que para a concentração de 50 µM em 48 horas de tratamento, o crescimento já correspondia a cerca de 30 % da D.O.<sub>600 nm</sub> observada para o controle não exposto à droga e após 7 dias já era menor que 10 % o que impossibilitou o uso desta concentração no estudo. Para a concentração de 5 µM de TR o crescimento celular

manteve-se em torno de 75 % e este efeito foi considerado pequeno frente ao resultado obtido para as demais concentrações testadas no experimento, sendo também excluída do estudo.

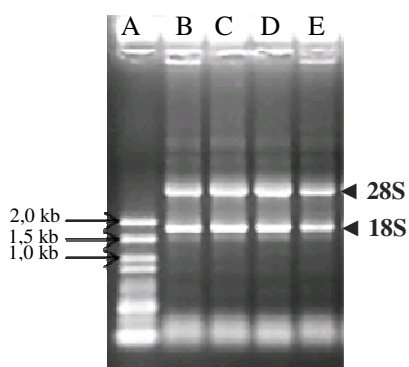
Após a conclusão da curva de crescimento, foi realizado um experimento visando avaliar morfológicamente a influência da tioridazina sobre culturas de *P. brasiliensis* submetidas à transição termodimórfica de micélio para levedura. Alíquotas do material em tratamento foram coradas com azul de tripan e analisadas diariamente em microscópio óptico. Nenhum efeito sobre a morfologia das culturas tratadas foi observado quando comparadas ao controle, assim como não houve bloqueio ou retardo no processo de transição nas condições experimentais empregadas, **Figura 8**.



**Figura 8: Efeito de TR sobre a transição termodimórfica de *P. brasiliensis* de micélio para levedura.** Células miceliais do fungo foram submetidas a crescimento a 36,5°C em meio YPD líquido acrescido de TR na concentração de 20 μM. As culturas foram avaliadas após 48, 120 e 168 horas de tratamento por análise de lâminas coradas com azul de tripan em microscópio óptico. O registro das imagens foi feito por fotografia em câmera acoplada ao equipamento de microscopia. 400x.

Com base nestes resultados, as concentrações de 15  $\mu\text{M}$ , 20 $\mu\text{M}$  e 25  $\mu\text{M}$  de tioridazina, aquelas que mostraram influência mais pronunciada sobre o crescimento celular, foram definidas como as concentrações de trabalho e sua influência sobre o perfil transcricional de leveduras de *P. brasiliensis* como o alvo do estudo.

O experimento que possibilitou a obtenção de RNA oriundo de células expostas às diferentes concentrações de TR foi realizado conforme descrito no item 3.3 do Método. A qualidade do material foi avaliada por eletroforese em gel de agarose desnaturante 1 %, e o critério para avaliação de integridade foi a presença das bandas 18S e 28S de RNA ribossomal preservadas, **Figura 9**.



**Figura 9: Padrão de migração de RNA total de *P. brasiliensis* em eletroforese em gel de agarose desnaturante.** No gel [agarose 1% (p/v), tampão MOPS 10x 10% (v/v) e formaldeído 5% (v/v)], 2 $\mu\text{g}$  de RNA misturado a tampão de amostra contendo brometo de etídio foram colocados em cada canaleta. A: RNA Ladder 0,1-2,0 Kb – Invitrogen; B: RNA referência (extraído de cultura não exposta à TR); C, D e E: correspondem aos RNAs de *P. brasiliensis* expostos a 15 $\mu\text{M}$ , 20 $\mu\text{M}$  e 25  $\mu\text{M}$  de TR, respectivamente. As setas à direita indicam as bandas 28S e 18S de RNA ribossomal intactas em B, C, D e E. As setas à esquerda indicam bandas de 2,0 kb, 1,5kb e 1,0 kb de tamanho.

Como pode ser observado na **Figura 9**, o RNA referente a todas as condições de exposição à droga, bem como do controle, apresentaram qualidade adequada e foram submetidos aos procedimentos de purificação e amplificação de RNA mensageiro (mRNA) descritos, respectivamente, nos itens 3.5 e 3.6 do Método.

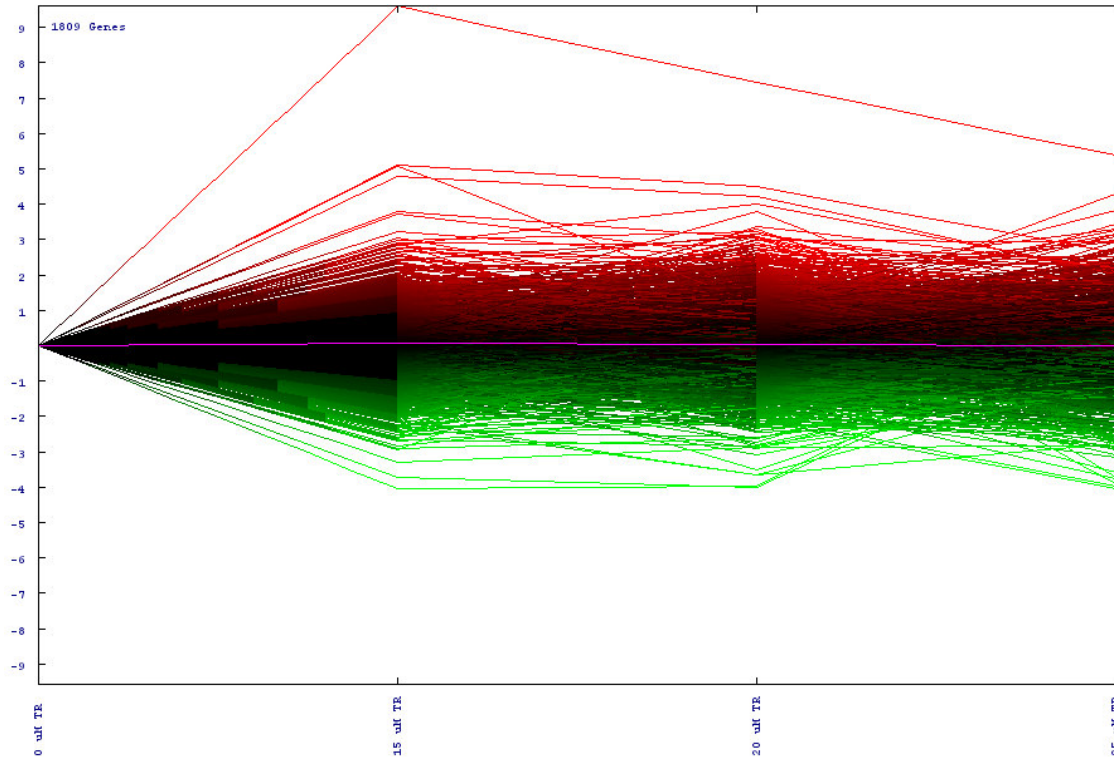
## 4.2- IDENTIFICAÇÃO DE GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS

Para cada uma das condições de exposição à tioridazina, o RNA extraído de células leveduriformes de *P. brasiliensis* foi utilizado como material de partida para duas marcações independentes com inversão de fluoróforos Cy3 e Cy5, nas quais o cDNA construído a partir do mRNA derivado de células não expostas à droga foi utilizado como referência em

hibridações competitivas contra o cDNA produzido a partir do mRNA derivado de células expostas à tioridazina. A descrição dos procedimentos de construção de cDNA marcado com fluorescência e hibridação dos microarranjos encontram-se nos itens 3.7 e 3.8 do Método, respectivamente.

Os resultados obtidos, após a hibridação competitiva e varredura do biochip em *scanner* óptico, foram submetidos à análise estatística para separação dos genes com modulação estatisticamente significativa daqueles com variação não estatisticamente significativa.

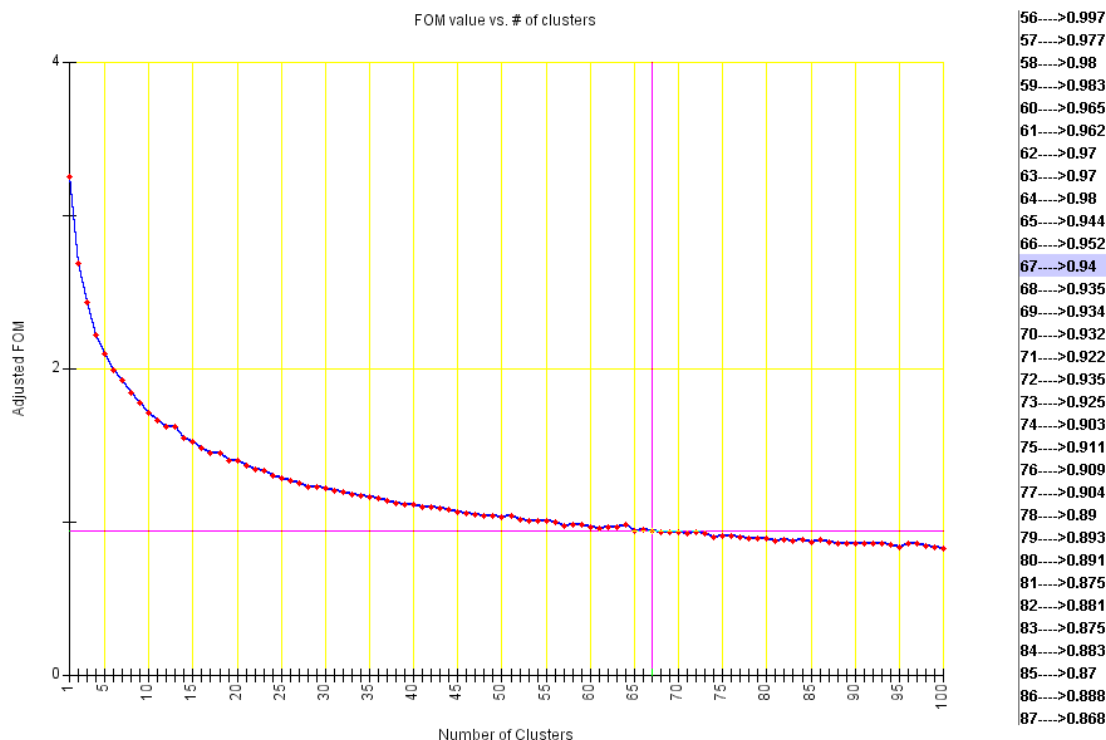
A variação da expressão gênica é dada como função logarítmica da razão média das intensidades de fluorescência entre Cy5 e Cy3 e as réplicas dos experimentos foram normalizadas para que a fluorescência em Cy3 correspondesse à amostra não exposta e a fluorescência em Cy5 correspondesse às amostras expostas à tioridazina, conforme descrito no item 3.9 do Método. Quando o resultado do logaritmo da razão é menor que zero ( $Cy3 > Cy5$ ), o gene tem sua expressão diminuída pela exposição à droga e a representação no gráfico é na cor verde, sendo que quanto maior for a distância a relação à linha média (nível constitutivo de expressão gênica), maior é o nível de sub-regulação do gene. Quando o resultado do logaritmo da razão é maior que zero ( $Cy3 < Cy5$ ), o gene tem sua expressão aumentada pela exposição à droga, é representado no gráfico na cor vermelha e, quanto maior for a distância em relação à linha média, maior é o nível de super expressão do gene.



**Figura 10:** Representação dos 1809 genes com variação na expressão estatisticamente significativa, após a exposição a diferentes concentrações de droga. No eixo Y, a escala mostra o logaritmo na base 2 da razão das intensidades de Cy5/Cy3 em função das concentrações 15  $\mu\text{M}$ , 20  $\mu\text{M}$  e 25  $\mu\text{M}$  de tioridazina.

Dessa forma, a análise resultou na reunião de 1809 genes de *P. brasiliensis* com variação de expressão estatisticamente significativa sob o estímulo de tioridazina, **Figura 10**, sendo que cada linha representa a variação média na expressão de um gene.

Para tornar possível a análise dos genes com modulação estatisticamente significativa, é necessária uma separação dos mesmos em grupos denominados *clusters*, de acordo com o padrão de expressão apresentado. A seguir, para definir o número adequado de *clusters* que devem ser formados, utiliza-se o algoritmo figura de mérito, do inglês *Figure Of Merit* (FOM). Neste algoritmo, o usuário define o número máximo de agrupamentos a serem formados e o algoritmo faz a divisão dos genes em um número crescente de *clusters*, de um até o limite previamente determinado. Com o aumento do número de *clusters*, a variação média do padrão de expressão dos genes de um mesmo agrupamento diminui progressivamente até atingir uma região de estabilidade. Estes dados são representados em um gráfico em que a variabilidade média entre o padrão de expressão dos genes é dada em função do número de *clusters*, sendo que nesta região é definido o número ideal de grupos para análise.

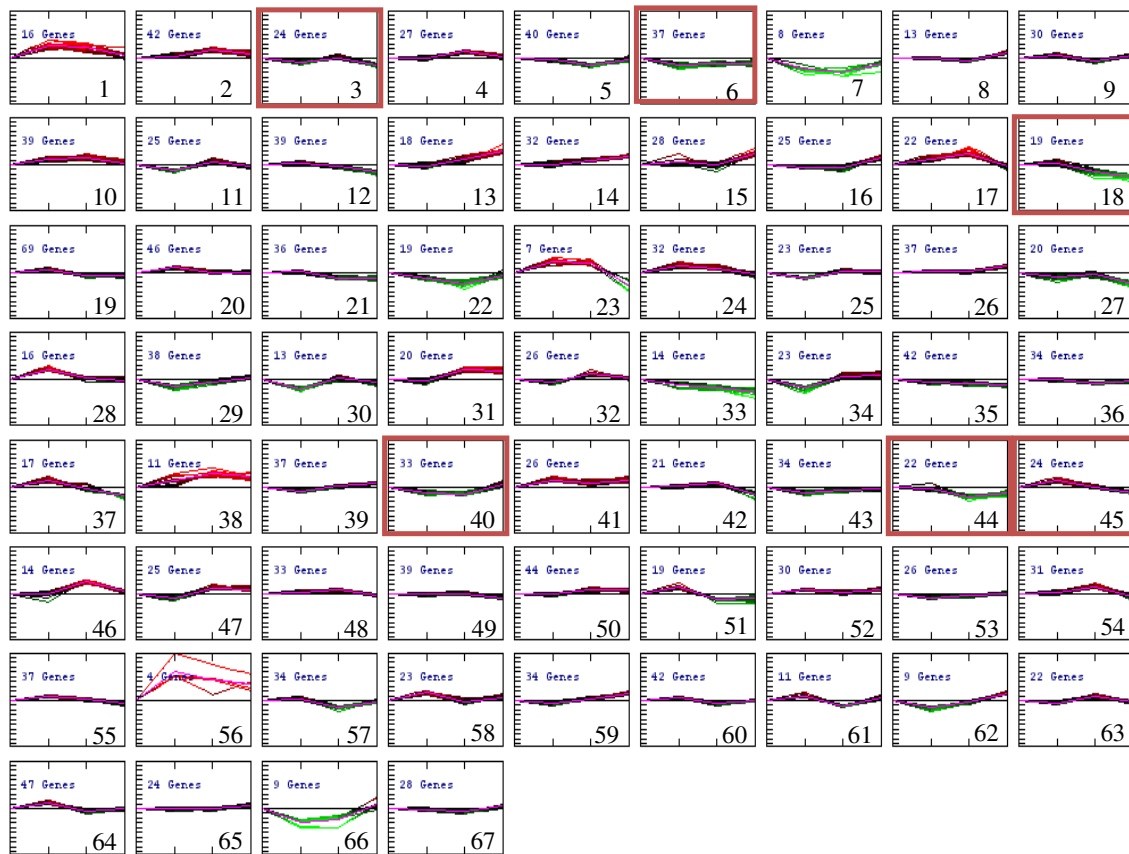


**Figura 11:** Gráfico gerado pelo algoritmo FOM para os genes significativamente modulados pela exposição à TR. O eixo y representa a média entre as variações de expressão dos genes agrupados em cada *cluster* em função do número de *clusters*, de 1 a 100 neste caso, previamente definidos. A coluna à direita apresenta, em ordem crescente, uma lista com o número de *clusters* e a respectiva média entre as variações de expressão dos genes de cada um. Está destacado na coluna o número de *clusters* selecionados, indicado no gráfico pelo cruzamento das linhas rosa.

Com a aplicação do algoritmo FOM aos 1809 genes significativamente modulados pela exposição à tioridazina, foi determinado que sua divisão em 67 *clusters* favoreceria a distribuição adequada dos genes, segundo seu perfil de expressão, **Figura 11**.

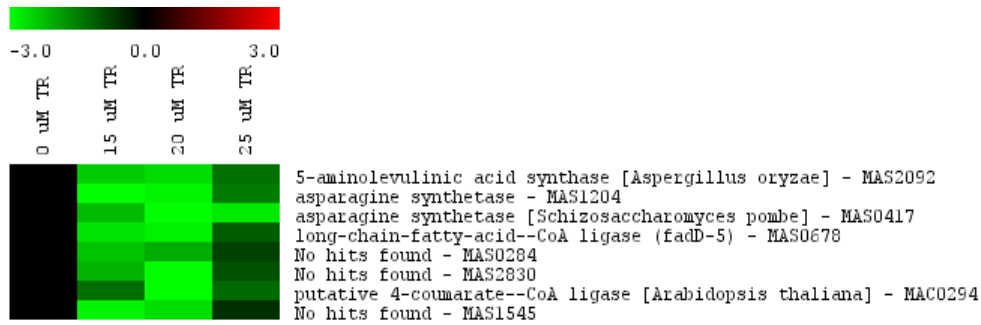
Em seguida o algoritmo *K-means* foi utilizado para subdividir os 1809 genes significativamente modulados em 67 *clusters* de acordo com semelhanças nos padrões de expressão dos genes componentes de cada grupo **Figura 12**.





**Figura 12: Agrupamento dos 1809 genes com variação estatisticamente significativa.** Os genes foram agrupados em 67 *clusters*, de acordo com as semelhanças de variação no perfil de expressão promovidas pela exposição a diferentes concentrações de TR. No eixo y a escala mostra a variação para cada cluster do logaritmo na base 2 da razão das intensidades de Cy5/Cy3. Os pontos do eixo x representam as concentrações de 0  $\mu$ M, 15  $\mu$ M, 20  $\mu$ M e 25  $\mu$ M de tioridazina, respectivamente. Os *clusters* destacados em vermelho serão discutidos individualmente. A inscrição no lado superior direito indica a quantidade de genes integrantes de cada “cluster” e numeração no canto inferior direito dá sua identificação.

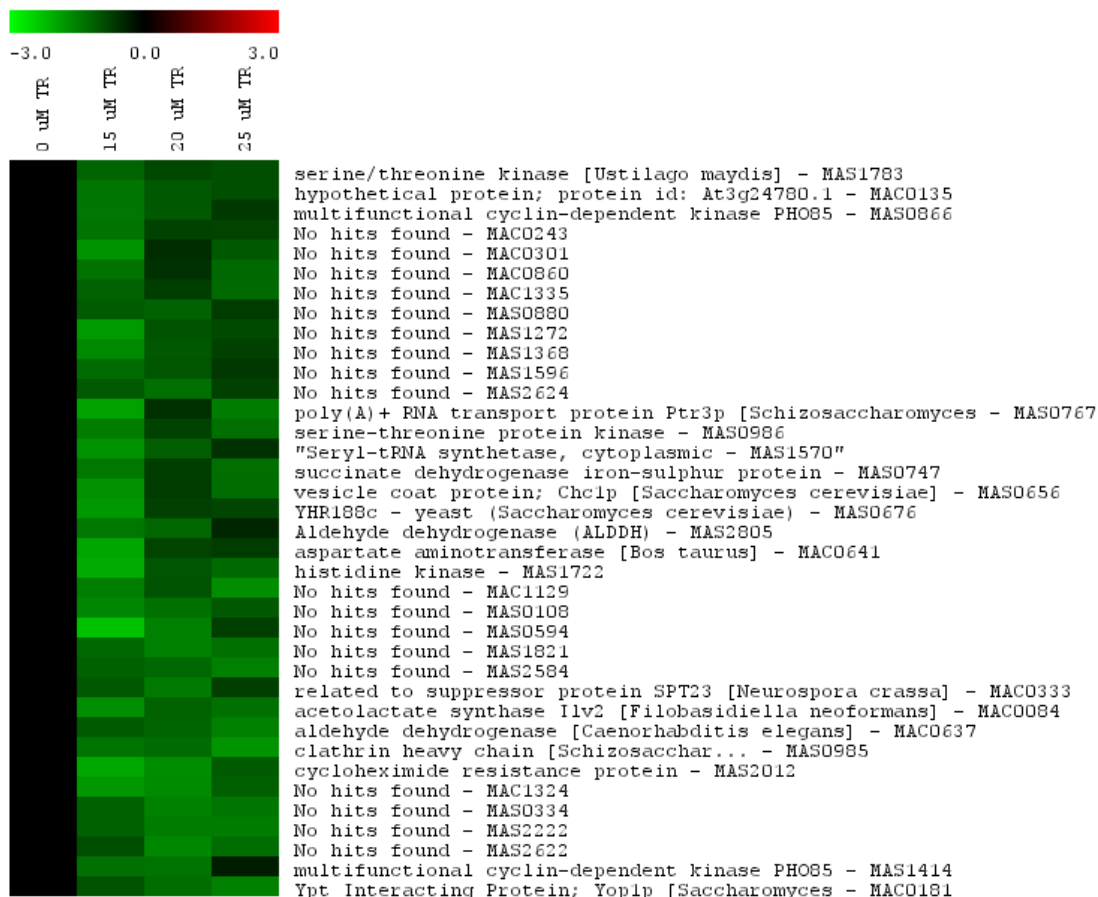
Os *clusters* destacados em vermelho na **Figura 12** serão analisados individualmente por meio das imagens de expressão geradas pelo algoritmo nas figuras 13 a 22 e foram selecionados por agruparem genes de grande relevância para a integridade celular e viabilidade fúngica modulados em resposta à exposição à TR.



**Figura 13: Cluster 7.** Na figura há uma descrição de cada gene componente do grupo, além do seu perfil de expressão de acordo com as concentrações de TR empregadas no estudo (15, 20 e 25 μM). A coluna 0 μM TR, na cor preta, representa a igualdade das intensidades de Cy5 e Cy3 e, portanto, tem como resultado do logaritmo da razão Cy5/Cy3 o valor zero. A parte superior da figura exibe a escala de cores indicativa da intensidade de modulação gênica frente às diferentes concentrações de TR, onde “-3.0” é o resultado do logaritmo de base 2 da razão Cy5/Cy3, mostrando que a expressão do gene no controle (Cy3) é oito vezes maior do que sua expressão no teste (Cy5); da mesma forma, “3.0” representa o resultado deste mesmo logaritmo quando a expressão do gene no teste (Cy5) é oito vezes maior do que sua expressão no controle (Cy3). Este grupo contém 8 genes com padrão de sub-regulação em resposta à exposição à TR e 3 deles não mostraram função conhecida na comparação com seqüências depositadas no GenBank.

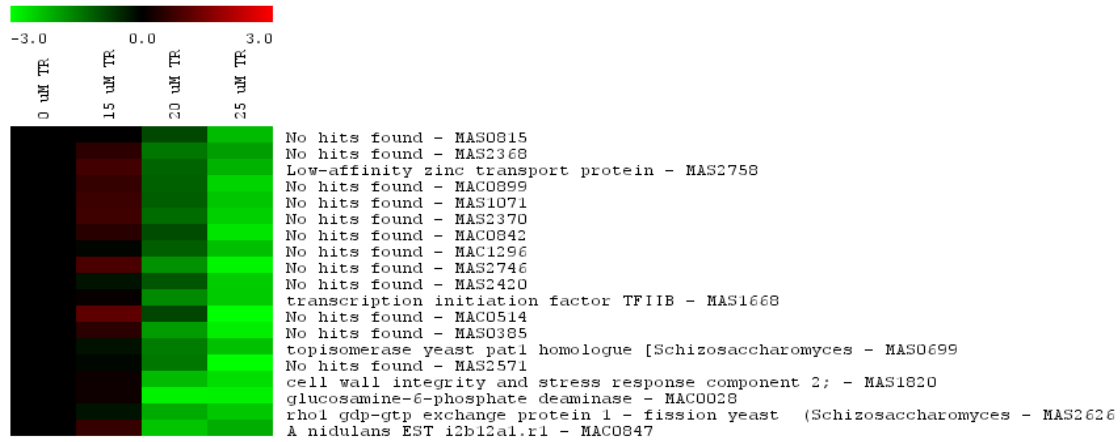
A identificação de cada seqüência presente no *chip* é determinada pela comparação com seqüências já armazenadas num banco de dados, o GenBank – NCBI, que é depositário de todas as seqüências públicas de DNA. Seqüências com similaridade a dados já depositados no GenBank são apresentadas na figura da maneira descrita no banco de dados e o organismo que aparece entre colchetes é aquele que mostra a maior semelhança na seqüência de nucleotídeos com a seqüência submetida à comparação. Quando não há similaridade a nenhuma informação já contida no banco de dados, a seqüência é apresentada como *No hits found*. Em todas as situações, a designação da seqüência de DNA termina com um código de letras e números que a identifica e a torna acessível em [http://143.107.203.68/marrayv2/mia\\_cs.html](http://143.107.203.68/marrayv2/mia_cs.html) (NUNES *et al.*, 2005).

Em seguida, foi feita uma análise individual dos *clusters* deste estudo selecionados para discussão, vale ressaltar que, em média, cada *cluster* mostra 50 % de seqüências identificadas como *No hits found*, o que significa que não houve similaridade a nenhuma informação já contida no banco de dados, e que não há função descrita ou determinada para a proteína.



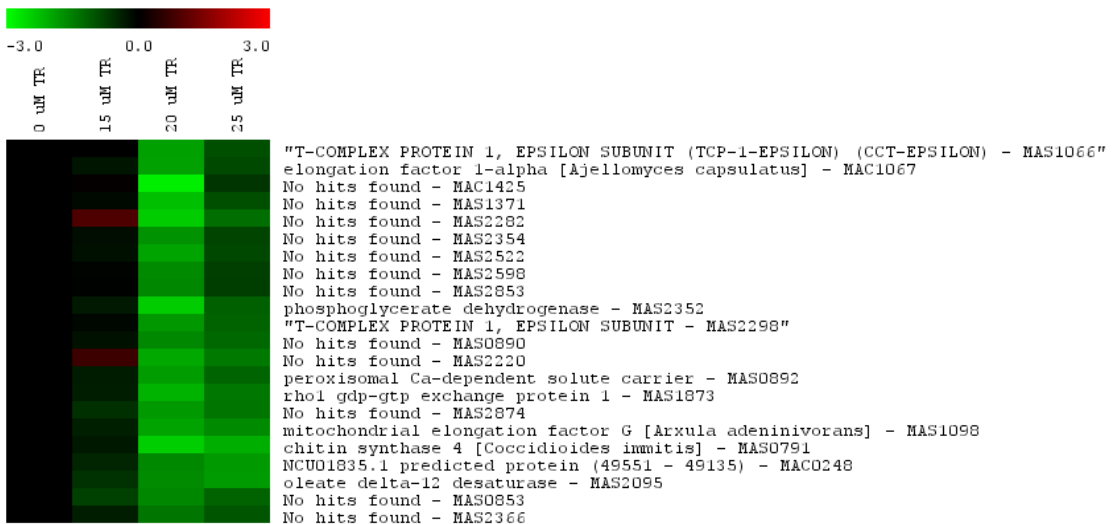
**Figura 14: Cluster 6.** Agrupamento de 37 genes com expressão diminuída em resposta à exposição às três concentrações de TR utilizadas no estudo.

A **Figura 14** mostra o *cluster 6*, no qual os genes apresentam um perfil de sub-regulação frente às diferentes concentrações de tioridazina utilizadas. Destaca-se neste *cluster* a presença de dois genes da proteína quinase dependente de ciclina Pho85 (MAS0866) e (MAS1414), envolvida no controle do ciclo celular e em diversos outros processos, além de dois genes que codificam para cadeia pesada de clatrina descritos como proteína de revestimento de vesícula (MAS0656) e cadeia pesada de clatrina (MAS0985), a clatrina é uma proteína importante envolvida no transporte celular de substâncias.



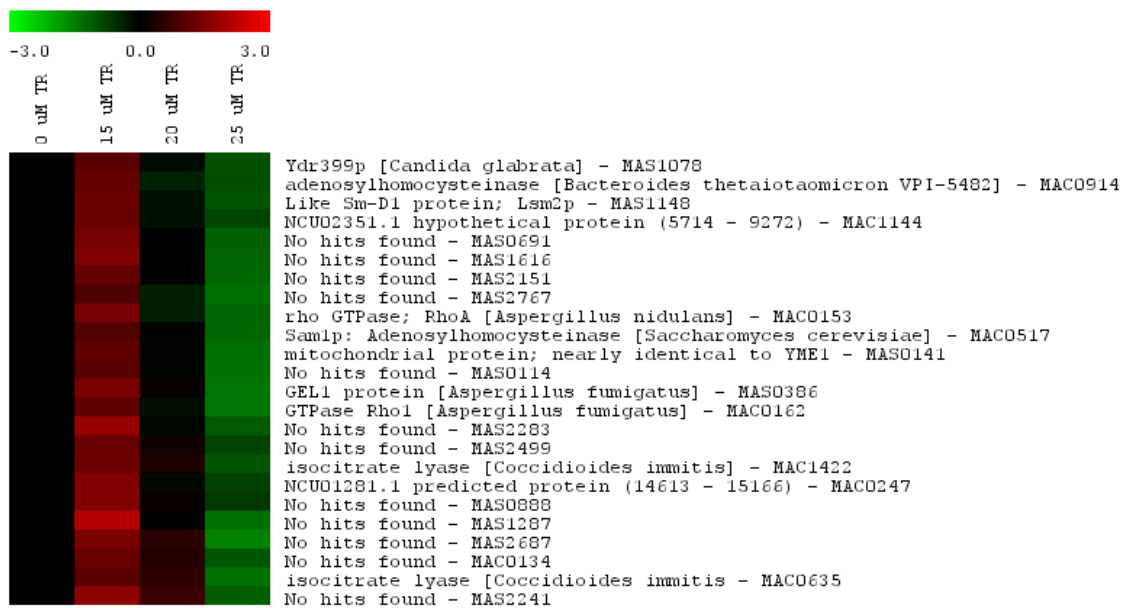
**Figura 15: Cluster 18.** Este “cluster” agrupa 19 genes super expressos frente a concentração de 15μM de TR e sub-regulados frente as demais concentrações utilizadas da droga.

A **Figura 15** exibe o *cluster* 18, que agrupa genes com característica de expressão constitutiva ou ligeira super expressão em resposta à concentração de 15μM de TR e sub-regulação para as demais concentrações utilizadas da droga. Deste grupo fazem parte o gene identificado como componente 2 de resposta a estresse e integridade de parede celular (MAS 1820) e o gene descrito por proteína de troca GDP-GTP de Rho 1 (MAS 2626), também mostrado na **Figura 16**, representativa do cluster 44 com a identificação de proteína de troca GDP-GTP de Rho 1 (MAS 1873) que codifica para Rom2, fator de troca de nucleotídeos guanósina (do inglês *Guanosine nucleotide Exchange Factors*, GEF) responsável pela fosforilação e ativação de proteína Rho1, uma GTPase envolvida em diversas vias de sinalização, incluindo aquelas relacionadas com manutenção da integridade celular.



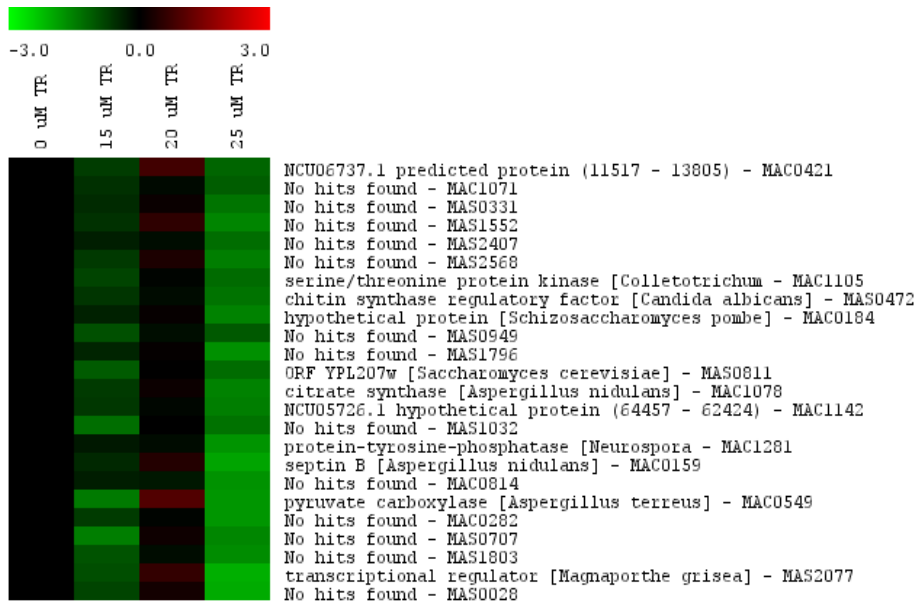
**Figura 16: Cluster 44.** Este “cluster” agrupa 22 genes predominantemente sub-regulados frente às concentrações de TR utilizadas.

Dois genes que codificam para a GTPase Rho estão presentes na **Figura 17**, que mostra o *cluster* 45, no qual os genes apresentam perfil de super expressão para a menor concentração, níveis próximos aos basais de expressão ou leve modulação para a concentração intermediária e sub-regulação para a maior concentração de tioridazina empregada no estudo.



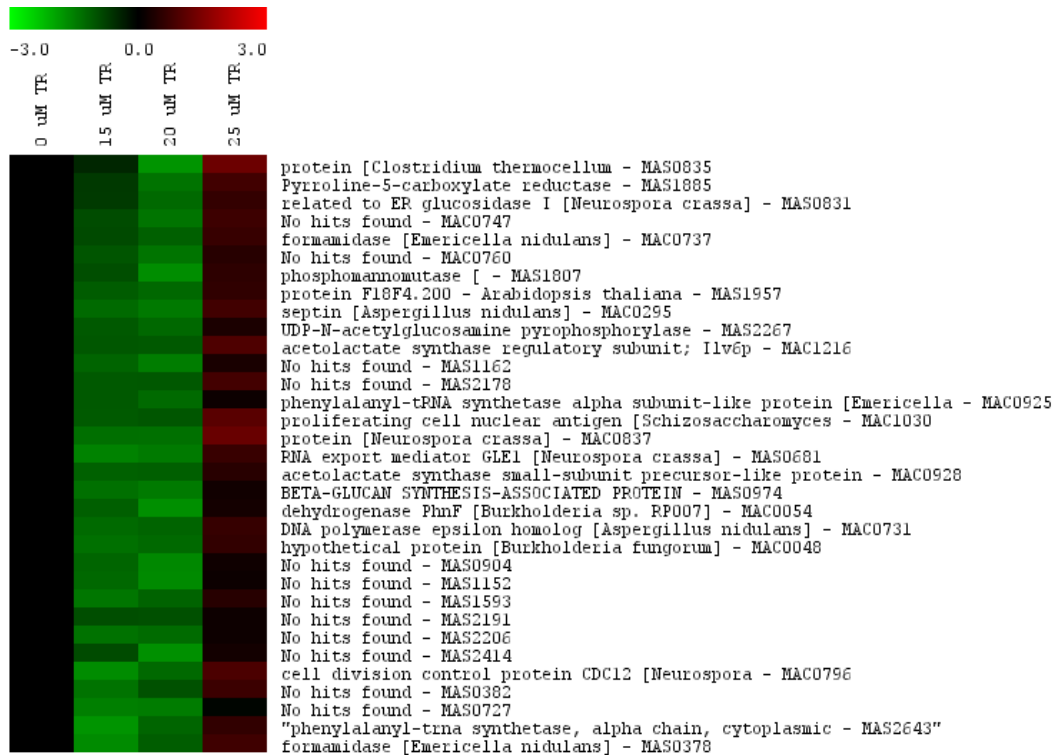
**Figura 17: Cluster 45.** Neste grupo os 24 genes têm como característica super expressão em resposta à exposição a 15 µM, expressão próxima aos níveis constitutivos com 20 µM e sub-regulação com 25 µM de TR.

O *cluster* 3, representado na **Figura 18**, é resultado do agrupamento de genes com perfil de sub-regulação nas concentrações de 15 µM e 25 µM e com padrão constitutivo ou ligeira super expressão para a concentração de 20 µM. Neste grupo destaca-se o gene que codifica para uma serina treonina quinase (MAC1105), chamada de Ypk1, que influencia o grau de velocidade de crescimento celular, a resistência a rapamicina e a outros antifúngicos e atua na fase inicial da transcrição de *S. cerevisiae* (CHEN, LEE e LEVIN, 1993; GELPERIN *et al.*, 2002). Outro gene assinalado neste *cluster* é o codificador para uma proteína integrante da família das septinas, identificado como septina B (MAC0159). Estas proteínas desempenham funções importantes na citocinese, bem como em outros processos celulares (LONGTINE e BI, 2003).



**Figura 18: Cluster 3.** Neste grupo os 24 genes têm como característica sub-regulação com 15 μM e 25 μM de TR, níveis constitutivos ou leve super expressão em resposta à exposição a 20 μM da droga.

O *cluster* 40, mostrado na **Figura 19**, caracterizado por genes que apresentam perfil de sub-regulação para as concentrações de 15 μM e 20 μM e super expressão para a concentração de 25 μM, também agrupa dois genes que codificam para septinas, um deles é designado como septina (MAC0295) e o outro como proteína de controle de divisão celular (MAC0796).



**Figura 19: Cluster 40.** Este grupo de genes mostra sub-regulação na exposição a 15 μM e 20 μM de TR e super expressão com 25 μM.

Quando há interesse em analisar um conjunto específico de genes, seu agrupamento pode ser feito manualmente pela união dos dados de expressão em um único arquivo. Este arquivo, quando submetido à análise no MEV gera uma figura do cluster de interesse, como mostrado na **Figura 20**. Nela, foram agrupados os genes integrantes da via sintética de quitina, componente importante da parede celular de fungos, incluindo *Paracoccidioides brasiliensis*. Os genes deste cluster foram arranjados na ordem em que seus produtos, as enzimas, atuam na via de síntese de quitina e todos eles mostraram-se predominantemente sub-regulados em resposta à exposição às três concentrações de TR. As seqüências descritas como codificadores para fator regulador de quitina sintase (MAC1113 e MAS0472) foram comparados ao banco de dados do GenBank – NCBI e definidos como ativadores de quitina sintase III.

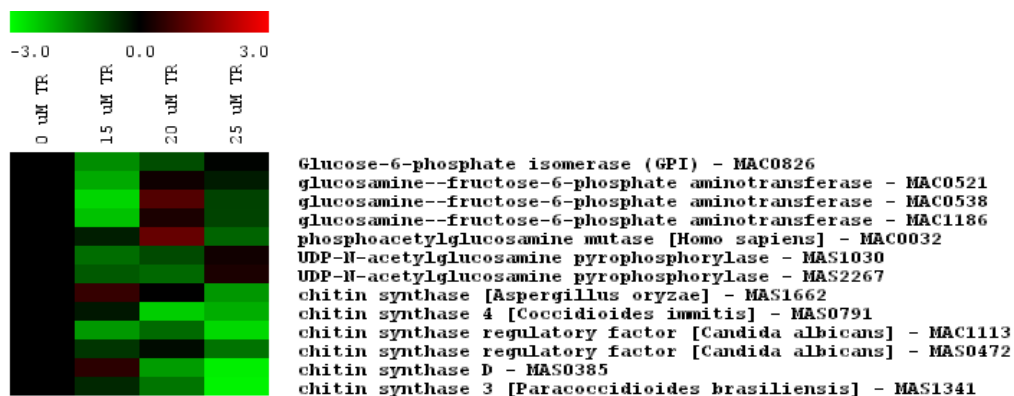


Figura 20: Agrupamento manual dos genes representativos da rota de síntese de quitina.

A Figura 21 é resultado do agrupamento manual de genes que codificam para proteínas transportadoras de membrana relacionadas ao efluxo de drogas em *P. brasiliensis*. Estes genes pertencem às famílias de transportadores ABC ou MFS, considerados os principais responsáveis pela extrusão de drogas do interior celular e conseqüentemente pela resistência aos agentes antifúngicos apresentada por microrganismos causadores de infecções fúngicas sistêmicas. Observa-se na figura que os genes mostraram um perfil de expressão variável em resposta às diferentes concentrações de droga utilizadas no estudo, existindo genes com sub-regulação consistente em resposta às três concentrações de droga e genes com expressão aumentada para 15 μM e 20 μM e diminuição de expressão para 25 μM de TR. Apesar da variação no perfil de expressão observada, a diminuição de expressão para a concentração de 25 μM de TR é evidente para todos os genes.

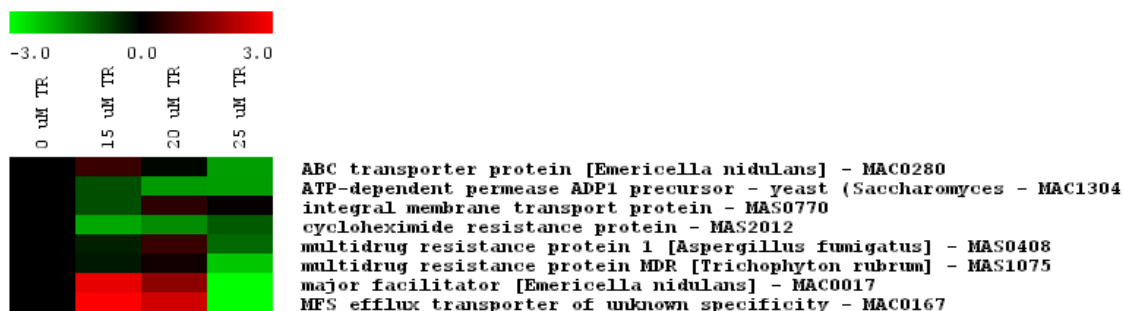


Figura 21: Agrupamento manual de 8 genes envolvidos com o efluxo de drogas modulados em resposta à exposição à TR.



## 5. DISCUSSÃO

O fungo termodimórfico *Paracoccidioides brasiliensis* é o agente etiológico da paracoccidioidomicose, micose sistêmica endêmica em países da América Latina (SHIKANAI-YASUDA, *et al.*, 2006). Estima-se que cerca de 10 milhões de pessoas estejam infectadas na América Latina e que 2 % delas irão desenvolver a doença em algum momento da vida. Do total mundial de casos, cerca de 80 % são reportados no Brasil, o que define a PCM como um importante problema de saúde pública no país (COUTINHO *et al.*, 2002; BRUMMER, CASTAÑEDA e RESTREPO, 1993).

O desenvolvimento da doença pode ocorrer muitos anos após o contato com o patógeno e está diretamente relacionado a uma resposta imunológica celular inadequada do paciente. De acordo com a gravidade de suas manifestações clínicas, a PCM pode ser classificada em forma aguda ou crônica. A primeira caracteriza-se pelo acometimento, sobretudo de crianças e adolescentes, evolução rápida e está associada ao maior risco de morte; já a forma crônica atinge predominantemente homens entre 30 e 60 anos e caracteriza-se por progressão lenta e severidade relativamente menor (SHIKANAI-YASUDA, *et al.*, 2006; BRUMMER, CASTAÑEDA e RESTREPO, 1993). Um dado alarmante a respeito da PCM é a existência, já descrita na literatura, de isolados de *P. brasiliensis* com o fenótipo de resistência a drogas (cetoconazol e sulfametoxazol-trimetoprim) classicamente utilizadas no tratamento a pacientes acometidos pela doença (HAHN *et al.*, 2003; LACAZ, 1991; COUTINHO *et al.*, 2002).

Fenotiazinas são agentes antipsicóticos historicamente utilizadas para o tratamento de desequilíbrios mentais e emocionais, incluindo esquizofrenia e outras doenças psicóticas, são também empregados na clínica por suas propriedades antieméticas e anti-histamínicas (FRIEND e CUMMINS, 1953). Uma característica interessante destes compostos está relacionada à sua ação contra microrganismos de importância clínica e seu possível papel no combate a infecções causadas por bactérias, fungos e protozoários, descritos na literatura desde a década de 1980, além de seu efeito pró-apoptótico sobre linhagens tumorais indicando sua potencial utilidade no tratamento de cânceres (EILAM *et al.*, 1987; PEARSON *et al.*, 1982; ZHELEV *et al.*, 2004; GIL-AD, 2006).

Neste trabalho, alterações sobre a transição termodimórfica, o crescimento celular e sobre o perfil transcricional de *P. brasiliensis* causadas pela exposição tioridazina, substância

pertencente ao grupo das fenotiazinas, foram avaliadas assim como sua influência sobre os mecanismos relacionados à patogenicidade do microrganismo e à manutenção da integridade celular fúngica são discutidos.

A transição dimórfica de micélio para levedura em *P. brasiliensis* ocorre tanto em culturas *in vitro* quanto em tecidos infectados de hospedeiros quando o microrganismo é exposto à temperatura de 37°C e esta transição é necessária à expressão de sua patogenicidade (BRUMMER, CASTAÑEDA e RESTREPO, 1993).

Um estudo recente mostrou que a enzima 4-HPPD (4-hidroxifenilpiruvato dioxigenase) desempenha um papel fundamental durante a transição termodimórfica e que sua super expressão é essencial neste processo, uma vez que o uso de NTBC (2-(2-nitro-4-trimetilbenzoi)-1,3-ciclohexanodiona) substância que age como inibidor competitivo específico da enzima, inibiu completamente a transição dimórfica micélio-levedura (NUNES *et al.*, 2005). Este resultado foi importante por auxiliar a compreensão de processos celulares envolvidos na transição termodimórfica de *P. brasiliensis*, além de apontar um potencial alvo para intervenção farmacológica no combate à PCM.

Para avaliar uma possível ação da TR no evento da transição do microrganismo para a forma de levedura patogênica, culturas de micélio de *P. brasiliensis* expostas a 20µM de TR foram submetidas à transição, conforme descrito no item 3.2 do Método. Não foram observados efeitos sobre a morfologia das culturas tratadas quando comparadas ao controle, assim como não foi observado bloqueio ou retardo no processo de transição nas condições experimentais empregadas, o que sugere que a TR não deve afetar de maneira significativa os fenômenos moleculares essenciais ao desenvolvimento da transição termodimórfica.

Com o propósito de avaliar o efeito de TR sobre leveduras de *P. brasiliensis* foi realizada uma curva de crescimento em que culturas do fungo foram submetidas ao crescimento na presença da droga em diferentes concentrações, como descrito no item 3.2 do Método. Este experimento mostrou que a TR foi capaz afetar o crescimento de células leveduriformes de *P. brasiliensis* em cultura de maneira dependente da concentração. Diversos estudos anteriores têm demonstrado a ação antimicrobiana das fenotiazinas contra diferentes microrganismos, incluindo atividade contra linhagens multi-resistentes de *M. tuberculosis* (AMARAL *et al.*, 2001) e ação fungioestática e fungicida contra leveduras patogênicas como *Candida albicans* (WOOD e NUGENT, 1985; EILAM *et al.*, 1987) e *Cryptococcus neoformans* (EILAM *et al.*, 1987), entretanto não há na literatura trabalhos que discutam a atividade de fenotiazinas em *P. brasiliensis*, o que impulsionou a realização deste trabalho.

Os mecanismos básicos de controle do ciclo celular são altamente conservados desde eucariotos simples, como leveduras até os organismos mais complexos. Proteínas quinases dependentes de ciclinas (Cdks) e seus reguladores associados exercem papel central no controle da divisão celular e em muitos outros processos, por meio da fosforilação, e conseqüente ativação ou inativação, de seus substratos (HUANG *et al.*, 2007).

A quinase multifuncional Pho85 atua na progressão da fase G1 do ciclo celular, polaridade celular e formação do citoesqueleto de actina, expressão gênica, metabolismo de fosfato e glicogênio e na sinalização de mudanças no ambiente extracelular (CARROLL e O'SHEA, 2002).

Nossos resultados mostraram dois genes de Pho85 (MAS0866) e (MAS1414) sub-regulados em resposta ao tratamento com tioridazina e, considerando a amplitude das funções desta proteína quinase em *S. cerevisiae*, é provável que esta contribua diretamente com os efeitos observados em *P. brasiliensis*. Embora não haja na literatura registros que mostrem diretamente a ação inibitória de TR sobre Pho85, há descrição da capacidade de fenotiazinas promoverem o prolongamento da fase G1 do ciclo celular em *Candida albicans*, sendo que o mesmo estudo aponta este efeito como um importante alvo de ação destas drogas relacionado à sua propriedade antifúngica (SHARMA, KAUR e KHULLER, 2001).

Consistente com os múltiplos papéis para Pho85 na regulação de eventos celulares, colônias de *S. cerevisiae* com deleção de *PHO85*, exibem crescimento lento com prolongamento da fase G1, morfologia anormal e defeitos associados com brotamento, polarização de actina e endocitose. Além disso, estas linhagens apresentam defeitos consideráveis na integridade da parede celular e sensibilidade aumentada ao estresse desencadeado por hipertonicidade do meio externo, altas concentrações de CaCl<sub>2</sub>, cicloheximida, geneticina e higromicina B, provavelmente devido à função vacuolar defeituosa (LEE *et al.*, 1998; HUANG, MOFFAT e ANDREWS, 2002).

No que se refere à endocitose, chama a atenção a diminuição da expressão de dois genes que codificam para cadeias pesadas de clatrin, identificados como proteína de revestimento de vesículas (MAS0656) e cadeia pesada de clatrina (MAS0985).

A clatrina é uma proteína multimérica que consiste de três cadeias pesadas e três cadeias leves não covalentemente ligadas, formando um complexo simétrico, que desempenha um papel importante tanto em processos de endocitose quanto em outros passos do transporte através de membranas, particularmente aqueles que envolvem o trans-Golgi (BAGGETT e WENDLAND, 2001). Endocitose é o processo pelo qual células internalizam porções da membrana plasmática, incluindo proteínas associadas e porções do espaço extracelular. Este

processo é comum a todas as células eucarióticas e é a rota pela qual as células absorvem nutrientes, reciclam proteínas e lipídeos de membrana, absorvem certos sinais químicos e moleculares e internalizam receptores de membrana em resposta a ligantes ou mudanças ambientais (BAGGETT e WENDLAND, 2001).

Estudos apontaram que linhagens deletadas de *CHC1*, gene que codifica para cadeias pesadas de clatrina em *Saccharomyces cerevisiae*, são viáveis em sua maioria, entretanto com crescimento 2-3 vezes mais lento quando comparado ao organismo selvagem, tomado como referência, e o principal processo prejudicado nestas linhagens foi a endocitose, reduzida para 30 a 50% em comparação às taxas do selvagem (LEMMON e JONES, 1987; PAYNE *et al.*, 1988).

A capacidade que compostos fenotiazínicos possuem de afetar a função de clatrininas e inibir processos de endocitose dependentes desta proteína é descrita na literatura e esta característica é empregada como ferramenta em estudos que avaliam o envolvimento deste mecanismo de endocitose na entrada na célula de toxinas e vírus em culturas celulares de mamíferos (DE FILIPPI, *et al.*, 2007; KANERVA *et al.*, 2007; BOSCH *et al.*, 2008; INOUE *et al.*, 2007; WANG, ROTHBERG e ANDERSON, 1993).

Do mesmo modo, apresentaram redução de expressão pelo tratamento com TR três genes de septinas: septina B (MAC0159), septina (MAC0295) e proteína de controle de divisão celular CDC12 (MAC0796). Septinas compõem uma família de proteínas eucarióticas produtoras de filamentos que exercem função durante a citocinese e septação celular por meio da formação de complexos heteroméricos septina-septina que interagem com GTP, hidrolisam-no e constituem uma estrutura de anel capaz de dar suporte à reunião localizada de outras proteínas na superfície celular. Estão presentes desde leveduras até mamíferos. Em *S. cerevisiae*, além da ação na citocinese e septação celular, são fundamentais para a seleção do local de formação do brotamento, deposição assimétrica de quitina na parede celular e progressão do ciclo celular (LONGTINE *et al.*, 2000; LONGTINE e BI, 2003).

Linhagens de *S. cerevisiae* que possuem mutação ou deleção de qualquer um dos genes que codificam para septinas são incapazes de formar o anel heteromérico e apresentam defeitos em todos os processos celulares que as envolvem (LONGTINE *et al.*, 2000).

A exposição à TR acarretou também a sub-regulação de diversos genes diretamente envolvidos com a síntese e manutenção da integridade da parede celular fúngica.

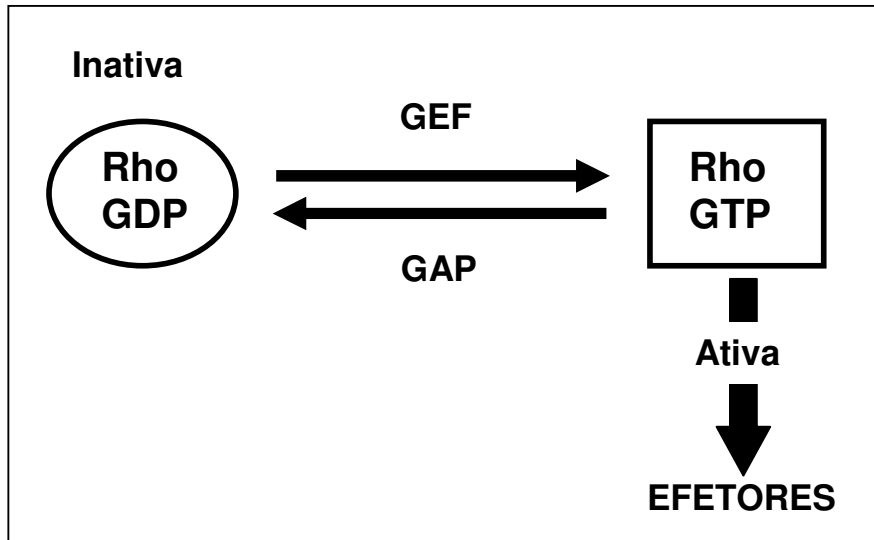
A parede celular, estrutura extremamente rígida responsável pela proteção física e por determinar a forma de células fúngicas, é de crucial importância para a manutenção da integridade celular em resposta a mudanças extremas no meio externo, especialmente no que

se refere a alterações drásticas de osmolaridade. É o componente mais externo da célula e exerce papel chave no sucesso da infecção, pois medeia a interação com o hospedeiro, incluindo a adesão a tecidos e modulação da resposta de defesa contra a invasão do parasita (FERNANDES *et al.*, 2005; LEVIN, 2005). Trata-se de uma matriz extracelular altamente dinâmica composta por complexos de polissacarídeos e proteínas, cuja composição e organização estrutural são reguladas durante o ciclo celular e em resposta a alterações ambientais e condições de estresse (SAN-BLAS e NIÑO-VEGA, 2008).

O gene identificado como componente 2 de resposta a estresse e integridade de parede celular (MAS 1820), sub-regulado em resposta às concentrações de 20 e 25  $\mu\text{M}$  de TR, é codificador para o domínio WSC, característico de uma família de proteínas transmembrana que funcionam como sensores de estresse na parede celular. Estas proteínas são responsáveis por detectar e transmitir o *status* da parede celular à Rho1, GTPase capaz de ativar diferentes efetores que coletivamente produzem respostas celulares aos estímulos externos (VAY, PHILIP e LEVIN, 2004).

Além dele, dois genes de GEF, os responsáveis pela ativação da GTPase Rho, mostraram-se sub-regulados em resposta às três concentrações de TR, enquanto dois genes da GTPase Rho propriamente dita apresentaram expressão diminuída pela exposição a 25  $\mu\text{M}$  de TR. As GTPases da família Rho pertencem à superfamília Ras de pequenas GTPases, são altamente conservadas em eucariotos e controlam alguns dos processos mais fundamentais em biologia celular, incluindo morfogênese, transporte vesicular e divisão celular (GARCÍA *et al.*, 2006).

Rho1 é homóloga em leveduras da GTPase RhoA de mamíferos, e assim como outras proteínas G, cumpre um ciclo entre uma conformação ativa, ligada a GTP, e outra inativa, ligada a GDP, **Figura 22** (QADOTA *et al.*, 1994; LEVIN, 2005). A fosforilação, responsável pela condução de Rho à sua conformação ativa é mediada pelos GEF, enquanto a desfosforilação e conseqüente inativação é mediada por GAP (do inglês, *GTPase Activating Proteins*). Em seu estado ativo, Rho interage com proteínas efetoras para desencadear respostas celulares sob sua regulação (HALL, 2005).



**Figura 22: Ciclo de ativação e inativação de Rho GTPase.** A fosforilação de Rho torna ativa e é mediada por GEFs, enquanto a desfosforilação é efetuada por GAPs. Fonte: modificado de Hall, (2005).

Existem várias vias de sinalização que contribuem para a manutenção da integridade da parede celular em resposta a desafios externos em fungos, entretanto a principal responsável por esta função é aquela descrita na levedura *S. cerevisiae* como de **via de integridade de parede celular**, que compreende uma família de sensores de superfície celular acoplados a uma proteína com função GTPase chamada Rho1, responsável pela ativação de diversos efetores que juntos regulam a síntese de quitina e glucanas da parede celular, expressão de genes importantes para a biogênese da parede, polarização do citoesqueleto de actina e até mesmo exocitose (LEVIN, 2005). A GTPase Rho1 é considerada o regulador central da via de sinalização para integridade de parede celular não somente por ser o principal receptor de sinais oriundos da superfície celular, mas também porque ela é reguladora de uma variedade de rotas envolvidas na biogênese e remodelação da parede celular em resposta a estímulos do meio externo (LEVIN, 2005).

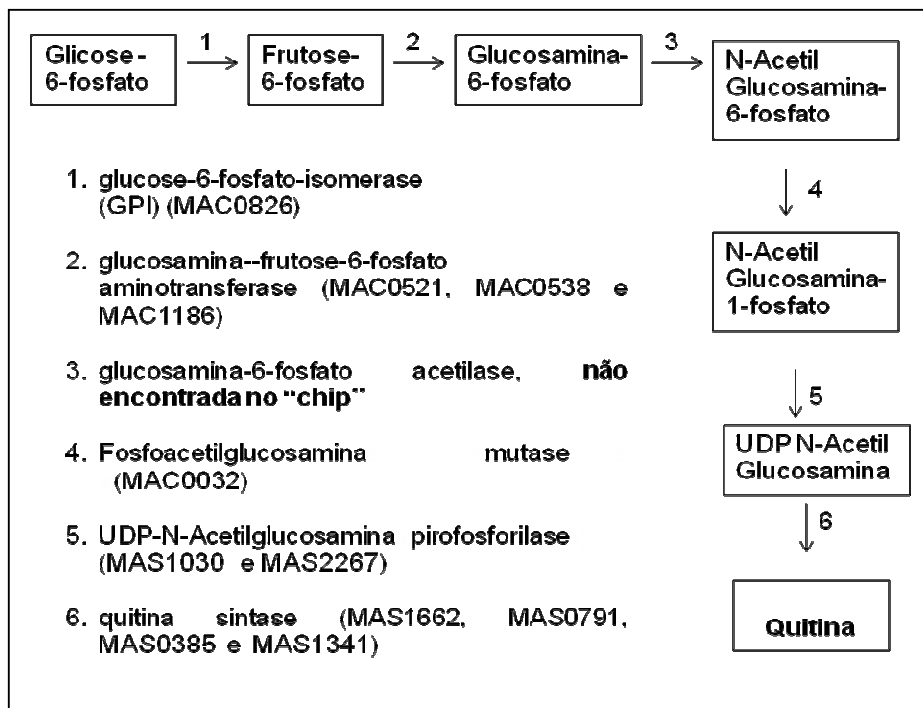
Em *S. cerevisiae* duas funções essenciais foram identificadas para Rho1. Primeiro, ela serve como uma subunidade integral regulatória do complexo 1,3- $\beta$ -glucana sintase, estimulando sua atividade; segundo, ela se liga e ativa a proteína quinase C, que regula a função da cascata de MAP quinase. A perda da função de PKC1 ou de algum dos componentes da cascata de MAP quinase sob seu controle resulta em defeitos na separação celular, atribuída a uma deficiência na constituição da parede celular (VAY, PHILIP e LEVIN, 2004).

Ainda no que se refere à parede celular, foi observada a diminuição da expressão do gene *YPK1*, codificador para a serina treonina quinase (MAC1105) em resposta principalmente às concentrações de 15  $\mu\text{M}$  e 25  $\mu\text{M}$  de TR. Em leveduras, ele codifica para uma proteína análoga funcional da quinase de mamíferos SGK (do inglês *serum- and glucocorticoid- inducible kinase*) e sua ativação está relacionada com a manutenção da integridade da parede celular (LEVIN, 2005).

Linhagens de *S. cerevisiae* com deleção do gene *YPK1* crescem vagarosamente, apresentam-se 10 vezes mais sensíveis ao efeito inibidor de crescimento da rapamicina, além de apresentarem hipersensibilidade à higromicina B, valinomicina, polioxina D e cicloheximida, sugerindo que células desprovidas desta quinase são mais permeáveis às drogas por serem portadoras de defeitos ou perturbações na parede celular. A sensibilidade às drogas retorna aos níveis comparáveis aos do selvagem quando há super expressão gene *YPK1* (ROELANTS *et al.*, 2002).

Os resultados de redução de expressão obtidos para genes diretamente envolvidos com a síntese e manutenção da integridade da parede celular fúngica sugerem que TR pode afetar mecanismos de manutenção de integridade da parede em *P. brasiliensis* determinando assim um aumento da fragilidade desta estrutura, o que seria decisivo para o comprometimento da viabilidade fúngica.

O agrupamento manual de genes é uma ferramenta que oferece a possibilidade de reunir num único *cluster* informações sobre as quais há interesse na discussão em conjunto. Este recurso foi usado para agrupar os genes integrantes da via de síntese de quitina, um componente estrutural fundamental da parede celular fúngica, modulados em resposta à exposição à TR. Neste *cluster* salienta-se o perfil predominantemente sub-regulado dos genes em resposta ao tratamento com a droga, efeito observado sobre genes codificadores para cinco das seis enzimas integrantes da via sintética de quitina. Os genes foram esquematizados na ordem em que seus produtos, as enzimas, atuam na rota sintética de quitina, conforme ilustrado na **Figura 23**.



**Figura 23: Via bioquímica de síntese de síntese quitina.** Nas caixas estão ilustrados os substratos / produtos enquanto os números indicam as enzimas responsáveis pela conversão.

O primeiro gene codifica para a enzima identificada no *chip* como glicose-6-fosfato-isomerase (GPI) (MAC0826), também chamada de fosfoglicose isomerase. Esta enzima catalisa a interconversão de glicose-6-fosfato e frutose-6-fosfato (SELITRENNIKOFF e NAKATA, 2003). Os três genes seguintes no *cluster*, identificados como glucosamina--frutose-6-fosfato aminotransferase (MAC0521, MAC0538 e MAC1186) são codificadores para a enzima responsável pela síntese glucosamina-6-fosfato a partir de frutose-6-fosfato. A etapa consecutiva, produção de N-acetil-glucosamina-6-fosfato a partir de glucosamina-6-fosfato, é catalisada pela enzima glucosamina-6-fosfato acetilase, única desta via que não está presente no *chip*. Em seguida, o gene identificado como fosfoacetilglucosamina mutase (MAC0032) catalisa a conversão de glucosamina-6-fosfato para glucosamina-1-fosfato, que é então convertida para UDP-N-acetil-glucosamina pela enzima UDP-N-acetilglucosamina pirofosforilase (MAS1030 e MAS2267) e o último passo desta via, a produção de quitina a partir de UDP-N-acetil-glucosamina é realizada pela enzima quitina sintase (MAS0385, MAS1341, MAS1662 e MAS0791).

A quitina está universalmente presente em fungos e é essencial para seu crescimento, sendo, entretanto ausente em plantas e animais superiores. Está presente na parede celular das espécies fúngicas em quantidades que podem variar de 2 % em algumas leveduras até 61 %



em alguns fungos miceliais e mesmo nos organismos em que sua quantidade é pequena sua presença é indispensável à viabilidade dos organismos (HERRERA e SAN-BLAS, 2003). Em *P. brasiliensis*, a fração de quitina totaliza 43 % do peso seco da parede celular em levedura e 13 % em micélio (SAN BLAS e SAN BLAS, 1994).

Estruturalmente, trata-se de um polissacarídeo linear feito de longas cadeias contendo milhares de resíduos de N-acetilglucosamina unidos por ligações  $\beta$ -1,4. Entre 20 e 400 cadeias de polissacarídeos são associadas por pontes de hidrogênio para montar a estrutura da microfibrila. De acordo com a orientação das cadeias de açúcar nas microfibrilas, a quitina existe na natureza em três diferentes formas cristalinas:  $\alpha$ -quitina, cujas cadeias polissacarídicas são unidas de forma antiparalela,  $\beta$ -quitina, cujas cadeias são unidas de forma paralela e  $\gamma$ -quitina, que possui associações de cadeias paralelas e antiparalelas (HERRERA e SAN-BLAS, 2003).

Teoricamente, drogas que inibem a síntese de quitina possuem potencial fungicida e mutações que causem o bloqueio em sua biossíntese são letais, uma vez que o uso dessas substâncias implica em culturas que não são viáveis sob condições normais de crescimento *in vivo* (HERRERA e SAN-BLAS, 2003; SELITRENNIKOFF e NAKATA, 2003).

A ausência de quitina em mamíferos aliada ao fato de sua presença na parede celular fúngica ser essencial para a sobrevivência do microrganismo torna sua síntese alvo potencial para o desenvolvimento de drogas antifúngicas altamente específicas, capazes de afetar mecanismos vitais para o parasita sem apresentar elevada toxicidade para as células do hospedeiro. Este efeito é altamente desejável, uma vez que uma das principais dificuldades associadas aos tratamentos para as micoses sistêmicas é a elevada toxicidade das drogas atualmente disponíveis (SAN-BLAS e NIÑO-VEGA, 2008; HERRERA e SAN-BLAS, 2003).

A inibição em *P. brasiliensis* de toda a rota sintética de quitina pela exposição à tioridazina, com exceção de uma única enzima que não analisamos por não estar presente no *chip* e, portanto, pode também apresentar-se sub-regulada por exposição à TR, é um efeito extremamente importante que traz perspectivas promissoras para o desenvolvimento de estratégias de uso desta fenotiazina no combate a micoses sistêmicas como a paracoccidioidomicose.

Nos últimos anos, infecções fúngicas sistêmicas têm se tornado um alarmante problema de saúde pública em decorrência do crescente número de afetados e da severidade do quadro apresentado pelos pacientes. Esta situação resulta do progressivo acometimento de

imunocomprometidos por infecções fúngicas oportunistas e do desenvolvimento de resistência microbiana aos agentes antifúngicos empregados (LUPETTI *et al.*, 2002).

A extrusão específica de drogas antifúngicas do interior celular por transportadores de membrana está intimamente relacionada ao fenótipo de resistência em microrganismos e o bloqueio específico de bombas de efluxo das famílias ABC e MFS é visto como um possível caminho para inibir este fenômeno em fungos (SCHUETZER-MUEHLBAUER *et al.*, 2003 e COSTA *et al.*, 2005).

Fenotiazinas constituem um grupo de agentes farmacológicos usados classicamente no tratamento de desequilíbrios mentais e emocionais que, interessantemente, possuem ação contra microrganismos de importância clínica descrita na literatura desde a década de 1980 (EILAM *et al.*, 1987; BALDESSARINI e TARAIZI, 1989). Sua contribuição na reversão da resistência de microrganismos patogênicos às drogas aplicadas em tratamentos é mostrada em bactérias gram-positivas e gram-negativas (KRISTIANSEN *et al.*, 2007), *Mycobacterium tuberculosis* (AMARAL *et al.*, 2001), em fungos como *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans* (EILAM *et al.*, 1987), protozoários como *Leishmania donovani* (PEARSON *et al.*, 1982) e em células de linhagens tumorais humanas (SOUZA *et al.*, 2003).

A ação das fenotiazinas sobre microrganismos patogênicos envolve diferentes mecanismos e, dentre eles, é de especial interesse sua capacidade de inibir transportadores de membrana ligados à resistência múltipla a drogas. Estudos recentes mostraram a efetividade de compostos fenotiazínicos, entre eles a tioridazina, na inibição de transportadores ABC em *S. cerevisiae* e que sua utilização em associação com cetoconazol foi capaz de reduzir drasticamente a concentração inibitória mínima efetiva do antifúngico (KOLACZKOWSKI, MICHALAK e MOTOHASHI, 2003).

Embora ainda incomuns, já há descrição na literatura de isolados de *P. brasiliensis* com o fenótipo de resistência a drogas (cetoconazol e sulfametoxazol-trimetoprim) em pacientes acometidos por PCM e estes foram encontrados no Brasil (HAHN *et al.*, 2003). Esta situação se torna ainda mais alarmante por a PCM ser a principal responsável por mortes em decorrência de micoses sistêmicas no país, que também concentra o maior número de áreas endêmicas e a maior parte (80 %) dos casos da doença relatados no mundo (LACAZ, 1991; COUTINHO *et al.*, 2002).

A exposição de *P. brasiliensis* à TR provocou variação de expressão de 8 genes integrantes da família de transportadores ABC ou MFS envolvidos diretamente com a extrusão de drogas do interior celular para o meio externo e todos eles mostraram expressão diminuída em resposta à concentração de 25  $\mu$ M de TR, o que demonstra que nesta

concentração a droga possui efeito inibidor sobre representantes das duas principais famílias de transportadores responsáveis pelo fenótipo de resistência a múltiplas drogas em microrganismos. Estes resultados são de extrema relevância tendo em vista o surgimento recente de isolados de *P. brasiliensis* resistentes a drogas utilizadas no combate à PCM (HAHN *et al.*, 2003) e pontuam a TR como uma droga de grande potencial como adjuvante no tratamento de infecções fúngicas sistêmicas como a PCM.

## 6. CONCLUSÕES e PERSPECTIVAS

A exposição à tioridazina provocou variação de expressão de mais de 1800 genes de *P. brasiliensis* e possibilitou o entendimento de alguns mecanismos envolvidos no efeito de inibição do crescimento de células em cultura que a droga exerceu sobre o microrganismo.

Os resultados encontrados para o grupo de genes codificadores para enzimas integrantes da rota sintética de quitina foram especialmente interessantes, pois todos eles mostraram diminuição da expressão em resposta à exposição à TR, com exceção do gene codificador para a enzima glucosamina-6-fosfato acetilase, ausente no *chip*, e que pode também ser sub-regulada em resposta à TR. O efeito de inibição da via metabólica responsável pela síntese de quitina é de extrema importância, pois sugere que a associação de TR às drogas classicamente empregadas para o tratamento de PCM e outras infecções fúngicas pode ser vantajosa, uma vez que ela atua sobre um alvo diferente daquele visado pelos antifúngicos disponíveis, afetando um componente estrutural indispensável à viabilidade celular fúngica que é ausente em células de mamíferos.

Outro grupo de genes de grande interesse que apresentou variação no perfil de expressão em resposta à exposição à TR é o que codifica para proteínas transportadoras de membrana relacionadas à extrusão de drogas do interior celular para o meio externo, consideradas as principais responsáveis pelo fenótipo de resistência a múltiplas drogas em microrganismos (COSTA *et al.*, 2005). A TR foi capaz de inibir a expressão de 8 genes codificadores para estes transportadores na concentração de 25  $\mu$ M. Este resultado tem grande relevância, já que a resistência às drogas representa o principal obstáculo ao sucesso do tratamento de pacientes acometidos por micoses sistêmicas como a PCM e neste sentido, uma substância capaz de diminuir a resistência dos microrganismos aos medicamentos utilizados no combate às infecções fúngicas traz expectativas positivas no que se refere ao desenvolvimento de associações entre antifúngicos clássicos e TR em esquemas de tratamento.

A análise das informações geradas pelas hibridações em microarranjo de DNA possibilitou uma avaliação global da modulação da expressão gênica da levedura patogênica de *P. brasiliensis* em resposta à exposição a TR e, para confirmar tais dados, a expressão de alguns genes será analisada individualmente também por RT-PCR quantitativo em tempo real,

metodologia que se baseia em uma cinética de amplificação que detecta o acúmulo do produto de PCR a partir de um RNA alvo ao longo de reações de amplificação (HEID *et al.*, 1996).

Novas curvas de crescimento associando TR e antifúngicos classicamente empregados no tratamento de PCM serão realizadas com o objetivo de verificar se a droga, nas concentrações empregadas neste estudo e em concentrações menores, aumenta a sensibilidade de *P. brasiliensis* aos antifúngicos.

Para confirmar a redução de expressão observada para os genes codificadores para enzimas integrantes da rota sintética de quitina serão realizados experimentos de determinação do conteúdo de quitina na parede celular de leveduras de *P. brasiliensis* expostas às mesmas condições experimentais empregadas nos estudos de expressão gênica.

Além disso, a grande quantidade de genes de *P. brasiliensis* modulados pela exposição à TR não abordados neste trabalho incentiva a continuação e o aprofundamento destas análises e, posteriormente, poderá ajudar a esclarecer outros mecanismos pelos quais a droga afeta diferentes processos celulares do fungo, principalmente no que se refere à inclusão desta substância em novas abordagens terapêuticas para o tratamento da PCM.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXANDER, B. D.; PERFECT, J. R. Antifungal resistance trends towards the year 2000. **Drugs**, v. 54, p. 657-678, 1997.

AMARAL, L.; KRISTIANSEN, J. E.; VIVEIROS, M.; ATOUGUIA, J. Activity of phenothiazines against antibiotic-resistant *Mycobacterium tuberculosis*: a review supporting further studies that may elucidate the potential use of thioridazine as antituberculosis therapy, **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 47, p. 505-511, 2001.

BAGAGLI, E.; THEODORO, R. C.; BOSCO, S. M. G.; MCEWEN, J. G. *Paracoccidioides brasiliensis*: phylogenetic and ecological aspects. **Mycopathologia**, v. 165, p. 197-207, 2008.

BAGAGLI, E.; BOSCO, S. M. G.; THEODORO, R. C.; FRANCO, M. Phylogenetic and evolutionary aspects of *Paracoccidioides brasiliensis* reveal a long coexistence with animal hosts that explain several biological features of the pathogen. **Infect. Genet. Evol.**, v. 6, p. 344-351, 2006.

BAGGETT, J. J.; WENDLAND, B. Clathrin function in yeast endocytosis. **Traffic**, v. 2, p. 297-302, 2001.

BALDESSARINI, R. J.; TARAZI, F.I. Drugs and the treatment of psychiatric disorders. Em: GILMAN, A.G.; RALL, T.W.; NIES, A.S.; TAYLOR, P. (eds.). **Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics**. 10 ed. New York, Mc Graw-Hill, p. 485-287, 1989.

BETHLEM, E. P.; CAPONE, D.; MARANHÃO, B.; CARVALHO, C. R. B.; WANKE, B. Paracoccidioidomycosis. **Curr. Opin. Pulm. Med.**, v. 5, p. 319-325, 1999.

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

CAETANO, W.; TABAK, M. Interaction of chlorpromazine and trifluoperazine with anionic sodium dodecyl sulfate (SDS) micelles: electronic absorption and fluorescence studies. **J. Colloid Interface Sci.**, v. 225, p. 69-81, 2000.

CANO, M. I. N.; CISALPINO, P. S.; GALINDO, I.; RAMIREZ, J. L.; MORTARA, R. A.; DA SILVEIRA, J. F. Electrophoretic karyotypes and genome sizing of the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*, **J. Clin. Microbiology**, v. 36, n. 3, p. 742-747, 1998.

CARROL, A. S.; O'SHEA, E. K. Pho85 and signaling environmental conditions. **Trends Biochem. Sci.**, v. 27, n. 2, p. 87-93, 2002.

CHEN, P.; LEE, K. S.; LEVIN, D. E. A pair of putative protein kinase genes (YPK1 and YPK2) is required for cell growth in *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol. Gen. Genet.**, v. 236, n. 2-3, p. 443-447, 1993.

CHEUNG, V. G.; MORLEY, M.; AGUILAR, F.; MASSIMI, A.; KUCHERLAPATI, R.; CHILDS, G. Making and reading microarrays. **Nat. Genet. Supplement**, v. 21, p. 15-19, 1999.

COSTA, C. da S.; ALBUQUERQUE, F. C.; ANDRADE, R. V.; OLIVEIRA, G. C., ALMEIDA, M. F., BRIGIDO, M. de M.; MARANHÃO, A. Q. Transporters in the *Paracoccidioides brasiliensis* transcriptome: insights on drug resistance, **Genet. Mol. Res.**, v. 4, n. 2, p. 390-408, 2005.

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

D'AMBROSIO, C.; GATTA, L.; BONINI, S. The future of microarray technology: networking the genome search. **Allergy**, v. 60, p. 1219-1226, 2005.

DE FILIPPI, L.; FOURNIER, M.; CAMERONI, E.; LINDER, P.; DE VIRGILIO, C.; FOTI, M.; DELOCHE, O. Membrane stress is coupled to a rapid translational control of gene expression in chlorpromazine-treated cells, **Curr. Genet.**, v. 52, p. 171-185, 2007.

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.

FERNANDES, L.; ARAUJO, M. A. M.; AMARAL, A.; REIS, V. C. B.; MARTINS, N. F.; FELIPE, M. S. Cell signaling pathways in *Paracoccidioides brasiliensis* - inferred from comparisons with other fungi. **Genet. Mol. Res.** v. 4, n. 2, p. 216-231, 2005.

FRANCO, M.; BAGAGLI, E.; SCAPOLIO, S.; LACAZ, C. S. A critical analysis of isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from soil. **Med. Mycol.**, v.38, p. 185-191, 2000.

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

GARAIZAR, J.; BRENA, S.; BIKANDI, J.; REMENTERIA, A.; PONTÓN, J. Use of DNA microarray technology and gene expression profiles to investigate the pathogenesis, cell biology, antifungal susceptibility and diagnosis of *Candida albicans*. **FEMS Yeast Res.**, v. 6, p. 987-998, 2006.

GELPERIN, D.; HORTON, L.; DECHANT, A.; HENSOLD, J. LEMMON, S. K. Loss of Ypk1 function causes rapamycin sensitivity, inhibition of translation initiation and synthetic lethality in 14-3-3-deficient yeast. **Genetics**, v. 161, p. 1453–1464, 2002.

GIANNINI, M. J.; BUENO, J. P.; SHIKANAI-YASUDA, M. A.; STOLF, A. M.; MASUDA, A.; AMATO NETO, V.; FERREIRA, A. W. Antibody response to 43 kDa glycoprotein of *Paracoccidioides brasiliensis* as a marker for the evaluation of patients under treatment. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v. 43, p. 200–206, 1990.

GIL-AD, I.; SHTAIF, B.; LEVKOVITZ, Y.; NORDENBERG, J.; TALER, M.; KOROV, I.; WEIZMAN, A. Phenothiazines induce apoptosis in a B16 mouse melanoma cell line and attenuate in vivo melanoma tumor growth. **Oncol. Rep.**, v. 15, n. 1, p.107-112, 2006.

GLASS-MARMOR, L.; MORGENSTERN, H.; BEITNER, R. Calmodulin antagonists decrease glucose 1,6-biphosphate, fructose 1,6-biphosphate, ATP and viability of melanoma cells. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 313, n. 3, p. 265-271, 1996.

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.

HALL, A. Rho GTPases and the control of cell behaviour. **Biochem. Soc. Trans.**, v. 33, parte 5, p. 891-895, 2005.

HANNA, J.; FINLEY, D. A proteasome for all occasions. **FEBS Lett.**, v. 581, p. 2854-2861, 2007.

HEID, C. A.; STEVENS, J.; LIVAK, H. J.; WILLIAMS, P. M. Real time quantitative PCR. **Genome Res.**, v. 6, n. 10, p. 986-994, 1996.

HELD, G. A.; GRINSTEIN, G.; TU, Y. Relationship between gene expression and observed intensities in DNA microarrays—a modeling study. **Nucleic Acids Res.**, v.34, n. 9, e70, 2006.

HELLER, M. J. DNA microarray technology: Devices, Systems, and Applications **Annu. Rev. Biomed. Eng.**, v. 4, p. 129-153, 2002.



HOHEISEL, J. D. Microarray technology: beyond transcript profiling and genotype analysis. **Nat. Rev. Genet.**, v. 7, p. 200-210, 2006.

HORNBY, J. M.; JACOBITZ-KIZZIER, S.M.; McNEEL, D.J., JENSEN, E.C.; TREVES, D.S.; NICKERSON, K.W. Inoculum Size Effect in Dimorphic Fungi: Extracellular Control of Yeast-Mycelium Dimorphism in *Ceratocystis ulmi*, **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 3, p. 1356-1359, 2004.

HUANG, D.; FRIESEN, H.; ANDREWS, B. Pho85, a multifunctional cyclin-dependent protein kinase in budding yeast. **Mol. Microbiol.**, v. 66, n. 2, p. 303-314, 2007.

JUNGWIRTH, H.; KUCHLER, K. Yeast ABC transporters – A tale of sex, stress, drugs and aging, **FEBS Lett.**, v. 580, n. 4, p. 1131-1138, 2006.

KANERVA, A.; RAKI, M.; RANKI, T.; SÄRKIOJA, M.; KOPONEN, J.; DESMOND, R. A.; HELIN, A.; STENMAN, U. H.; ISONIEMI, H.; HÖCKERSTEDT, K; RISTIMÄKI, A.; HEMMINKI, A. Chlorpromazine and apigenin reduce adenovirus replication and decrease replication associated toxicity. **J. Gene Med.**, v. 9, n. 1, p. 03-09, 2007.

KLEIN, B. S.; TEBBETS, B. Dimorphism and virulence in fungi, **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 10, p. 314-319, 2007.

KOLACZKOWSKI, M.; MICHALAK, K.; MOTOHASHI, N. Phenothiazines as potent modulators of yeast multidrug resistance. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 22, n. 3, p. 279-283, 2003.

KONTOYIANNIS, D. P.; LEWIS, R. E. Antifungal drug resistance of pathogenic fungi. **Lancet.**, v. 359, n. 9312, p. 1135-1144, 2002.

KRISTIANSEN, J. E.; HENDRICKS, O.; DELVIN, T.; BUTTERWORTH, T. S.; AAGAARD, L.; CHRISTENSEN, J. B.; FLORES, V. C.; KEYZER, H. Reversal of resistance in microorganisms by help of non-antibiotics. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 59, p. 1271-1279, 2007.

KUROKAWA, C. S.; SUGIZAKI, M. F.; PERAÇOLI, M. T. S. Virulence factors in fungi of systemic mycoses. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, v. 40, n. 3, p. 125-135, 1998.

LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C. Micologia Médica e Fungos, Morfologia e Biologia dos Fungos de Interesse Médico e Paracoccidiodomicose, *In: Micologia Médica*, 8<sup>a</sup> ed., São Paulo: Sarvier 1991, p. 1-13, 31-57, 248-297.

LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C. Paracoccidioidomicose, *In: Tratado de Micologia Médica*, 9ª ed., São Paulo: Sarvier 2002, p. 648-697.

LAGE, H. ABC-transporters: implications on drug resistance from microorganisms to human cancers. **Int. J. Antimicrob. Agents.**, v. 22, n. 3, p. 188-199, 2003.

LARKIN, J. E.; FRANK, B. C.; GAVRAS, H.; SULTANA, R.; QUACKENBUSH, J. Independence and reproducibility across microarray platforms. **Nat. Methods**, v. 2, n. 5, p. 329-330, 2005.

LEITE, D. B. **Análise da transição micélio-levedura do fungo patogênico humano *Paracoccidioides brasiliensis* através de hibridação em microarranjos de DNA.** Mogi das Cruzes, 2005. 74p. Dissertação de Mestrado – Universidade de Mogi das Cruzes.

LEMMON, S. K.; JONES, E. W. Clathrin requirement for normal growth of yeast. **Science**, v. 238, p. 504-509, 1987).

LEVIN, D. E. Cell wall integrity signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** v. 69, n. 2, p. 262-291, 2005.

LING, V. Multidrug resistance: molecular mechanisms and clinical relevance. **Cancer Chemother. Pharmacol.**; v. 40, suppl., p. S3-S8, 1997.

LONGTINE, M. S.; THEESFELD, C. L.; MCMILLAN, J. N.; WEAVER, E.; PRINGLE, J. R.; LEW D. J. Septin-Dependent Assembly of a Cell Cycle-Regulatory Module in *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol. Cell Biol.**, v. 20, n. 11, p. 4049–4061, 2000.

LONGTINE, M. S.; BI, E. Regulation of septin organization and function in yeast. **Trends Cell Biol.**, v. 13, n. 8, p. 403–409, 2003.

LUPETTI, A.; DANESI, R.; CAMPA, M.; DEL TACCA, M.; KELLY, S. Molecular basis of resistance to azole antifungals. **Trends Mol. Med.**, v. 8, p. 76-81, 2002.

MALHEIROS, S.V.; DE PAULA, E.; MEIRELLES, N.C. Contribution of trifluoperazine/lipid ratio and drug ionization to hemolysis. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 2, n. 1373(2) p. 332-40, 1998.

MARESCA, B.; KOBAYASHI, G. S. Dimorphism in *Histoplasma capsulatum*: a Model for the Study of Cell Differentiation in Pathogenic Fungi, **Microbiological Reviews**, v. 53, n. 2, p. 186-209, 1989.

MEDOFF, G.; SACCO, M.; MARESCA, B.; SCHLESSINGER, D.; PAINTER, A.; KOBAYASHI, G. S.; CARRATU, L. Irreversible block of the mycelial-to-yeast phase transition of *Histoplasma capsulatum*, **Science**, v. 231, n. 4737, p. 476-479, 1986.

MICHALAK, K.; WESOŁOWSKA, O.; MOTOHASHI, N.; MOLNAR, J.; HENDRICH, A. B. Interactions of phenothiazines with lipid bilayer and their role in multidrug resistance reversal. **Curr. Drug Targets**, v.7, n.9, p. 1095-1105, 2006.

MONTE, D.; SOMERVILLE, S. Isolation of total RNA from plant tissue using TRizol. In: BOWTELL, D.; SAMBROOK, J. **DNA Microarrays – A Molecular Cloning Manual**. Nova York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, protocolo 3, p. 120-123, 2002.

NEMECEK, J. C.; WÜTHRICH, M.; KLEIN, B. S. Global control of dimorphism and virulence in fungi. **Science**, v. 312, p. 583-588, 2006.

NUNES, L. R.; COSTA DE OLIVEIRA, R. L. B.; LEITE, D. B.; DA SILVA, V. S.; MARQUES, E. R.; FERREIRA, M. E. S.; RIBEIRO, D. C. D.; BERNARDES, L. A. S.; GOLDMAN, M. H. S.; PUCCIA, R.; TRAVASSOS, L. R.; BATISTA, W. L.; NÓBREGA, M. P.; NÓBREGA, F. G.; YANG, DING-YAH; PEREIRA, C. A. B.; GOLDMAN, G. H. Transcriptome analysis of *Paracoccidioides brasiliensis* cells undergoing the Mycelium-to-Yeast transition, **Eukaryot Cell**, v. 4, n. 12, p. 2115-2128, 2005.

PAULSEN, I. T.; BROWN, M. H.; SKURRAY, R. A. Proton-dependent multidrug efflux systems. **Microbiol. Rev.**, n. 60, p. 575-608, 1996.

PAYNE, G. S.; BAKER, D.; van TUINEN, E.; SCHEKMAN, R. Protein transport to the vacuole and receptor-mediated endocytosis by clathrin heavy chain deficient yeast. **J. Cell. Biol.**, v.106, p. 1453-1461, 1988.

PEARSON, R. D.; MANIAN, A. A.; HARCUS, J. L.; HALL, D.; HEWLETT, E. L. Lethal effect of phenothiazine neuroleptics on the pathogenic protozoan *Leishmania donovani*. **Science**, v. 217, n. 4557, p. 369-371, 1982.

QADOTA, H.; ANRAKU, Y.; BOTSTEIN, D.; OHYA, Y. Conditional lethality of a yeast strain expressing human RHOA in place of RHO1. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 91, p. 9317-9321, 1994.

RAMOS-E-SILVA, M.; SARAIVA, L. do E. Paracoccidioidomycosis. **Dermatol. Clin.**, v. 26, n. 2, p. 257-269, 2008.

RODRIGUES T, SANTOS AC, PIGOSO AA, MINGATTO FE, UYEMURA SA, CURTI C. Thioridazine interacts with the membrane of mitochondria acquiring antioxidant activity toward apoptosis--potentially implicated mechanisms. **Brit. J. Pharmacol.**, v. 136, p. 136-142, 2002.

RODRIGUES, T. Chemical and photochemical behavior of phenothiazines in heterogeneous media related to a diversity of biological effects, *In: Catalysis and Photochemistry in Heterogeneous Media*, 1<sup>a</sup> ed., India: Research Signpost 2007, p. 75-90.

ROELANTS, F. M.; TORRANCE, P.D.; BEZMAN, N.; THORNER, J. Pkh1 and pkh2 differentially phosphorylate and activate ypk1 and ykr2 and define protein kinase modules required for maintenance of cell wall integrity. **Mol. Biol. Cell.**, v. 13, n. 9, 2002.

ROONEY, P. J.; KLEIN, B. S. Linking fungal morphogenesis with virulence, **Cellular Microbiology**, v. 4, n. 3, p. 127-137, 2002.

SAN-BLAS, G. The cell wall of fungal human pathogens: its possible role in host-parasite relationships. **Mycopathologia**, v. 79, n. 3, p. 159-184, 1982.

SAN-BLAS, G.; NIÑO-VEGA, G. *Paracoccidioides brasiliensis*: virulence and host response. *In* R.L. Cihlar and R.A. Calderone (eds.), **Fungal pathogenesis: principles and clinical applications**, Marcel Dekker, Inc. New York, N.Y. 2001.

SAN-BLAS, G.; SAN-BLAS, F. Molecular aspects of fungal dimorphism. **Crit Rev Microbiol.**, v. 11, n. 2, p. 101-127, 1984.

SAN BLAS, G.; SAN BLAS, F. Biochemistry of *Paracoccidioides brasiliensis* dimorphism. *In*: Franco, M.; Lacaz, C.; Restrepo-Moreno, A.; Del Negro, A. (eds.), **Paracoccidioidomycosis**. Boca Raton, Florida: CRC Press; 1994, p. 49-66.

SAN-BLAS, G.; NIÑO-VEGA, G. *Paracoccidioides brasiliensis*: chemical and molecular tools for research on cell walls, antifungals, diagnosis, taxonomy. **Mycopathologia**, v. 165, p. 183-195, 2008

SANGLARD, D. Resistance of human fungal pathogens to antifungal drugs. **Curr. Opin. Microbiol.** v. 5, p. 379-385, 2002.

SANGLARD, D.; ODDS, F. C. Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. **Lancet Infect. Dis.** v. 2, p. 73-85, 2002.

SELITRENNKOFF, C. P.; NAKATA, M. New cell wall targets for antifungal drugs. **Curr. Opin. Investig. Drugs.** v. 3, n. 2, p. 200-205, 2003.

SCHENA, M.; HELLER, R. A.; THERIAULT, T. P.; KONRAD, K.; LACHENMEIER, E.; DAVIS, R. W. Microarrays: biotechnology's Discovery platform for functional genomics. **Trends Biotechnol.**, v. 16, p. 301-306, 1998.

SCHMIDT, M.; HANNA, J.; ELSASSER, S.; FINLEY, D. Proteasome-associated proteins: regulation of a proteolytic machine. **Biol. Chem.**, v. 386, p. 725-737, 2005.

SCHUETZER-MUEHLBAUER, M.; WILLINGER, B.; EGNER, R.; ECKER, G. Reversal of antifungal resistance mediated by ABC efflux pumps from *Candida albicans* functionally expressed in yeast. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 22, n. 3, p. 291-300, 2003.

SHARMA, S.; KAUR, H.; KHULLER, G. K. Cell cycle effects of the phenothiazines: trifluoperazine and chlorpromazine in *Candida albicans*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 199, p. 185-190, 2001.

SHIKANAI-YASUDA, M. A.; TELLES FILHO, F. Q.; MENDES, R. P.; COLOMBO, A. L.; MORETTI, M. L. Consenso em paracoccidioidomicose. **Rev. Soc. Bras. Méd. Trop.**, v. 39, n. 3, p. 297-310, 2006.

SOUZA, K.W.; OLIVEIRA, M.C.M.; MAIA, R.C.; RUMJANEK, V.M. Cyclosporin A and analogues as multidrug resistance modulating agents in tumor cell. **Rev. Bras. Cancerologia**, v.49, n. 2, p. 103-112, 2003.

TAVARES, A.H.; SILVA, S.S.; BERNARDES, V.V.; MARANHÃO, A.Q.; KYAW, C.M.; POÇAS-FONSECA, M.; SILVA-PEREIRA, I. Virulence insights from the *Paracoccidioides brasiliensis* transcriptome. **Genet. Mol. Res.**, v. 4, n. 2, p. 372-389, 2005.

TRAVASSOS, L. R.; RODRIGUES, E. G.; IWAI, L. K.; TABORDA, C. P. Attempts at a peptide vaccine against paracoccidioidomycosis, adjuvant to chemotherapy. **Mycopathologia**, v. 165, n. 4-5, p. 341-352, 2008.

VAY, H. A.; PHILIP, B.; LEVIN, D. E. Mutational analysis of the cytoplasmatic domain of the Wsc1 cell wall stress sensor. **Microbiology**, v. 150, p. 3281-3288, 2004.

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.

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.

WANG, E.; MILLER, L. D.; OHNMACHT, G. A.; LIU, E. T.; MARINCOLA, F. M. High-fidelity mRNA amplification for gene profiling. **Nat. Biotechnol.**, v. 18, n. 4, p. 457-459, 2000.

WANG, L. H.; ROTHBERG, K. G.; ANDERSON, R. G. Mis-Assembly of Clathrin Lattices on Endosomes Reveals a Regulatory Switch for Coated Pit Formation. **J. Cell Biol.**, v. 123, p. 1107-1117, 1993.

WHITE, T. C.; MARR, K. A.; BOWDEN, R. A. Clinical, cellular and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 11, p. 382-402, 1998.

WOOD, N. C.; NUGENT, K. M. Inhibitory Effects of Chlorpromazine on Candida Species. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 27, n. 5, p. 692-694, 1985.

ZHELEV, Z.; OHBA, H.; BAKALOVA, R.; HADJIMITOVA, V.; ISHIKAWA, M.; SHINOHARA, Y.; BABA, Y. Phenothiazines suppress proliferation and induce apoptosis in cultured leukemic cells without any influence on the viability of normal lymphocytes. **Cancer Chemother. Pharmacol.**, v. 53, p. 267-275, 2004.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)