

RESPOSTA TRANSCRICIONAL À ITRACONAZOL NO FUNGO PATOGÊNICO HUMANO *Paracoccidioides brasiliensis*.

Benedito Rodrigues da Silva NETO^{1*}; Maristela PEREIRA¹; Patrícia Fernanda ZAMBUZZI-CARVALHO¹; Nayche Santiago Pacheco de SANTANA¹; Célia Maria de Almeida SOARES¹.

¹Laboratório de Biologia Molecular, Instituto de Ciências Biológicas, UFG.

²Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, UFG.

*bio.neto@gmail.com

Palavras-chave: *Paracoccidioides brasiliensis*, Itraconazol, Resposta Transcricional.

INTRODUÇÃO

Paracoccidioides brasiliensis é um fungo ascomiceto dimórfico patogênico, endêmico da América Latina causador de doença primária em seres humanos. No solo o fungo cresce como micélio, resultando na formação de propágulos, que inicia a infecção em humanos, quando inalados pelas vias respiratórias. Posteriormente, no pulmão, os propágulos se desenvolvem em células de levedura. A transição de micélio para levedura pode ser reproduzida *in vitro* crescendo o fungo na forma miceliana em condições de temperatura elevada. A habilidade de *P. brasiliensis* de crescer na forma de micélio no solo e a mudança para a forma de levedura no hospedeiro é importante para a infecção e doença. Uma vez introduzido no hospedeiro, o propágulos micelianos tem que converter as leveduras, uma condição essencial para o fungo sobreviver e proliferar (Brummer *et al.*, 1993; Franco *et al.*, 1989; Restrepo *et al.*, 1985).

P. brasiliensis é um fungo que cresce de forma termodimórfica como levedura à 36°C e na forma de micélio à 23°C. O fungo provoca a paracoccidioidomicose (PCM), uma micose sistêmica prevalente na América Latina, cerca de 10 milhões de pessoas estão infectadas pelo agente causador da doença, a taxa de incidência anual no Brasil é de 10-30 por milhão de habitantes, e a taxa de mortalidade média é de 1,4 por milhão ao ano. Os indivíduos de áreas endêmicas são infectados por via respiratória. Assim como ocorrem em outras infecções fúngicas, a PCM necessita de um

longo tempo de tratamento. A quimioterapia atual dessa micose é baseada em sulfonamidas, anfotericina B e derivados azólicos, principalmente o itraconazol.

Itraconazol é geralmente utilizado para o tratamento de infecções linfocutâneas, enquanto a anfotericina B é indicada para infecções graves. Embora esses medicamentos geralmente sejam eficazes, a longa duração da terapia e da toxicidade faz com que seja necessário explorar novas alternativas para o tratamento de infecções graves (Bustamante *et al.*, 2004; Catalán *et al.*, 2006).

Itraconazol e fluconazol são medicamentos antifúngicos triazólicos, que são múltiplos compostos sintéticos contendo três átomos de nitrogênio no anel azol. Os medicamentos antifúngicos triazólicos são de amplo espectro e são usados atualmente para tratar infecções causadas por fungos patogênicos diversos. Esses medicamentos inibem a síntese de ergosterol, que é um componente essencial das membranas celulares de fungos, que causam alterações na permeabilidade da membrana, causando a morte da célula. Os Azóis agem bloqueando o ergosterol, um componente essencial da membrana celular, através da ligação e inibição da via biossintética da enzima lanosterol 14 α demetilase, codificada pelo gene *erg11* (*cyp51A*) (Kauffman *et al.*, 2000; Odds *et al.*, 2003). No presente estudo, nós identificamos transcritos com diferentes categorias funcionais e funções relacionadas com resposta celular de estresse, efluxo de drogas, transporte de pequenas moléculas, fatores de alongação e transcrição, parede, membrana celular e proteínas hipotéticas. A elucidação do mecanismo de ação do itraconazol pode nos fornecer informações sobre os mecanismos moleculares de crescimento, metabolismo, patogênese e resistência do fungo *P. brasiliensis*.

MATERIAL E MÉTODOS

Foi utilizado o isolado *Pb01* (ATCC MYA-826) de *P. brasiliensis* já caracterizado e padronizado em nosso laboratório. O fungo na fase leveduriforme foi cultivado por 7 dias em meio Fava Netto sólido (Fava-Netto, 1955) à temperatura de 37°C. Após este período as células leveduriformes foram extraídas dos tubos e transferidas para o meio MVM líquido à 37 °C onde foram inoculadas com a droga.

A Análise representacional Diferencial (RDA) descrita por (Pastorian *et al.* 2000).foi utilizada para hibridização subtrativa e consequente geração da biblioteca subtrativa a partir dos RNAs extraídos nas condições experimentais com e sem o antifúngico. Após o sequenciamento no MegaBACE 1000 DNA sequencer (GE Healthcare) foram realizadas análises de Bioinformática no programa Blast2GO para o processamento das ESTs. E finalmente foram analisadas em triplicatas as expressões dos genes diferenciais no aparelho StepOnePlus™ realtime PCR system (Applied Biosystems, Foster City, CA).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Um total de 1496 clones foram sequenciados, entretando destes 887 foram sequenciados com sucesso. Destes, 227 e 223 clones induzidos e reprimidos, respectivamente, foram obtidos das células leveduriformes após a incubação com itraconazol por 1 hora; 230 e 207 clones foram induzidos e reprimidos, respectivamente, após a incubação com itraconazol por 2 horas. Estes foram categorizados funcionalmente como pode-se observar na figura 01.

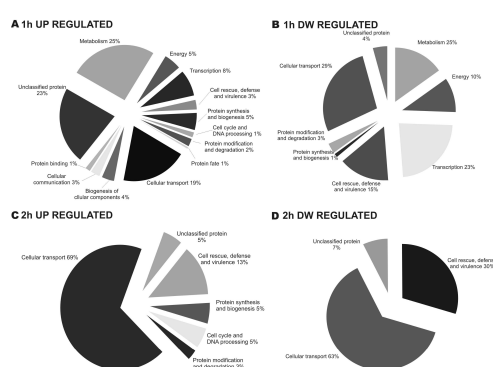


Figura 01

Nós avaliamos a expressão dos genes de *P. brasiliensis* induzidos e reprimidos após a exposição à droga através de PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR). Os valores dos genes foram estabilizados utilizando os valores de expressão do gene que codifica a proteína tubulina, corroborando assim os dados do sequenciamento onde observamos tanto genes induzidos quanto reprimidos (Figura 02).

Em seguida observamos a expressão relativa dos genes da via do ergosterol, uma vez que os azoles, incluindo o itraconazol, atuam diretamente no citocromo P450 bloqueando a lanosterol C14 α -demetilase e impedindo a via

do ergosterol. Assim, analisamos a expressão de genes ligados à via do ergosterol de forma temporal (Figura 03).

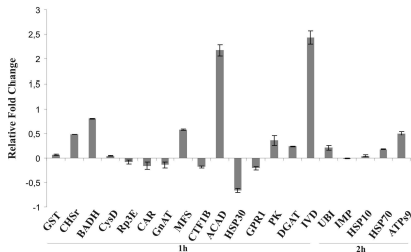


Figura 02

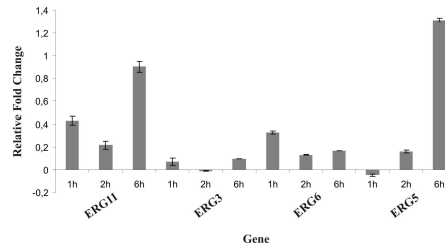


Figura 03

Uma vez que foram confirmadas as expressões dos genes de *P. brasiliensis* em resposta à itraconazol, categorizamos estes de forma funcional usando a ferramenta de bioinformática Blast2GO (Conesa et al., 2005) e MIPS (Munich Center for Protein Sequences; <http://mips.gst.de/>) (Figura 04). Finalmente propomos o modelo para as mudanças de *P. brasiliensis* após exposição à itraconazol (Figura 05), mostrando que a droga provocou mudanças nos genes de estresse celular como GST que codifica uma Glutathione S-transferase que vai atuar na desintoxicação de drogas para o exterior da célula.

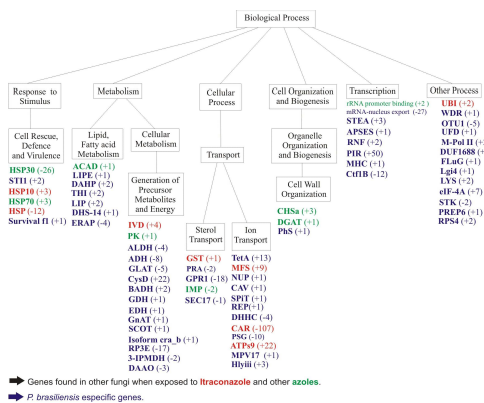


Figura 04

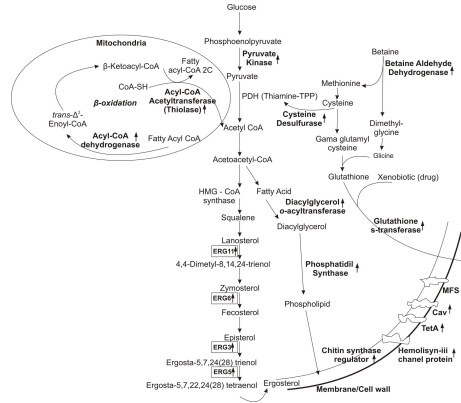


Figura 05

A resistência aos medicamentos é frequentemente associada com a indução de genes de bombas de efluxo, algumas classes destas foram encontradas como proteínas transportadoras de membrana ou pertencentes a famílias de facilitadores de transporte (MFS) ou proteínas integrais de membrana. Supomos que a desestabilização da membrana, vazamento e fluxo

de ingredientes para o meio extracelular seja devido a inibição do ergosterol, que é um componente essencial das membranas de fungos.

CONCLUSÃO

As análises indicaram a classificação de transcritos em diferentes categorias. A maioria dos genes induzidos estava envolvida no metabolismo lipídico, incluindo precursores do ergosterol, sendo que ERG11, ERG6, ERG3 e ERG5 foram induzidos temporalmente. Além disso, foram encontrados genes envolvidos na resposta celular de estresse, efluxo de drogas, transporte de pequenas moléculas, fatores de alongação e transcrição, parede, membrana celular e proteínas hipotéticas. Este é o primeiro estudo usando RDA para analisar mudanças na expressão gênica de *P. brasiliensis* após a exposição dos triazóis. O perfil da expressão gênica de *P. brasiliensis* é uma ferramenta útil para a compreensão dos mecanismos de ação e possíveis mecanismos de resistência aos agentes antifúngicos com atividade contra o fungos dimórficos patogênicos.

Suporte financeiro: CNPq, FINEP e IFS.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Brummer E, Castañeda E, Restrepo A. Paracoccidioidomycosis an update. *Clin Microbiol Rev* 1993; 6: 89–117.
- Franco, M., Mendes, R.P., Moscardi-Bacchi, M., Rezkallah-Iwasso, M.T., and Montenegro, M.R. 1989. Paracoccidioidomycosis. *Bailliere's Clin. Trop. Méd. Comum. Dis.* 4: 185-220.
- Bustamante, B.; Campos, P.E. (2004). Sporotrichosis: a forgotten disease in the drug research. *Expert Rev. Anti-Infect. Ther.*, 2, 85-94.
- Catalán, M.; Monteiro, J.C. (2006). Antifúngicos sistêmicos. *Rev. Iberoam. Micol.*, 23, 39-49.
- Kauffman, C.A.R.; Chapman, S.W. (2000). Practice guidelines for the management of patients with sporotrichosis. *Clin. Infect. Dis.*, 30, 684-687.
- Odds, F. (2003). Antifungal agents: their diversity and increasing sophistication. *Mycologist.*, 17, 51-55.
- Restrepo A (1985) The ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*: a puzzle still unsolved. *J Med Vet Mycol* 23: 323–334.