

A GENÔMICA NA ELUCIDAÇÃO DOS MECANISMOS DE AÇÃO DOS ANTIFÚNGICOS UTILIZADOS PARA TRATAMENTOS DAS PATOLOGIAS CAUSADAS POR FUNGOS PATOGÊNICOS HUMANOS

Data de aceite: 03/04/2023

Benedito Rodrigues da Silva Neto

Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Goiás, Brazil
<http://lattes.cnpq.br/5082780010357040>

RESUMO: As patologias causadas por fungos se distribuem e classificam-se de acordo com os tecidos e órgãos afetados, tais como as micoses superficiais; micoses da pele, unhas e pêlos; micoses subcutâneas e micoses sistêmicas ou profundas. O desenvolvimento e progressão destas enfermidades, em sua maioria, estão correlacionadas principalmente com as capacidades imunológicas do hospedeiro, assim como com as habilidades dos microrganismos escaparem tanto das defesas inatas do organismo quanto das drogas utilizadas no tratamento. Com o avanço tecnológico, o desenvolvimento de novas estratégias para formulação de fármacos evoluiu, principalmente baseado nas informações advindas dos sequenciamentos e análises do material genômico dos patógenos. Deste modo torna-se cada vez mais relevante o desenvolvimento de estratégias de

combate aos agentes agressores baseadas em análises genéticas, bancos genômicos e ferramentas tecnológicas baseadas na análise acurada do material genético.

KEYWORDS: Genética, Genômica, RDA, Patologia, Antifúngicos, Tratamento.

ABSTRACT: Pathologies caused by fungi are distributed and classified according to the affected tissues and organs, such as superficial mycoses; mycoses of the skin, nails and hair; subcutaneous mycoses and systemic or deep mycoses. The development and progression of these diseases, for the most part, are mainly correlated with the host's immunological capabilities, as well as with the abilities of microorganisms to escape both the innate defenses of the organism and the drugs used in the treatment. With technological advances, the development of new strategies for formulating drugs has evolved, mainly based on information derived from sequencing and analysis of genomic material from pathogens. Thus, the development of strategies to combat aggressive agents based on genetic analysis, genomic banks and technological tools based on the accurate analysis of genetic material becomes increasingly relevant.

KEYWORDS: Genetics, Genomics, RDA, Pathology, Antifungals, Treatment.

INTRODUÇÃO

A diversidade de patologias fúngicas é diretamente relacionada com a amplitude de agentes causadores e suas habilidades para colonizar diferentes regiões do organismo humano. correlacionadas as patologias existe um reduzido número de drogas utilizáveis na prática clínica. Uma vez que, os agentes antifúngicos são limitados em suas especificidades e em seus espectros, temos um real problema de saúde pública. Em suma, as sulfonamidas foram os primeiros fármacos utilizados no tratamento de micoses sistêmicas, seguidas pela utilização da anfotericina B, que pela eficácia e espectro antifúngico ainda hoje é tida como referência no controle de infecções viscerais e disseminadas. Alguns anos depois a 5-fluorocitosina, foi considerada como droga sinérgica da anfotericina B. Mais recentemente (1970) as drogas azólicas ocasionaram impacto na terapia, principalmente pelo seu largo espectro de ação e facilidade de administração oral. Vinte anos depois uma nova evolução trouxe à cena os os triazólicos com maior biodisponibilidade e atividade mais intensa, abrindo caminho o voriconazol, o posaconazol dentre outros. As alilaminas, assim como as equinocandinas tem sido muito estudadas, do mesmo modo que as formulações lipídicas de anfotericina B, a utilização de carreadores e, vislumbrando o futuro, as inúmeras possibilidades oferecidas pela nanotecnologia.

Os agentes antifúngicos exercem sua atividade através de uma variedade de mecanismos, alguns dos quais são pouco entendidos. Novas abordagens para caracterizar o mecanismo de ação de agentes antifúngicos são úteis no processo de desenvolvimento de drogas antifúngicas. Um dos caminhos pelos quais as células se ajustam a mudanças ambientais é através da alteração do padrão de expressão de genes (Liu *et al.*, 2005; Agarwal *et al.*, 2003).

Assim, a medida de mudanças na expressão de genes sob exposição a drogas pode ajudar a determinar como as drogas e candidatos a drogas trabalham em células e organismos. Nesse sentido, alterações no perfil de expressão de genes de fungos têm sido estudadas (Ferreira *et al.*, 2006; Yu *et al.*, 2007).

A fim de estudar a expressão diferencial de genes em um determinado organismo ou identificar quais genes estão envolvidos em um determinado processo ou tratamento diversas técnicas tem sido utilizadas. Essas técnicas permitem detectar as mudanças na expressão de mRNAs sem qualquer conhecimento prévio de informações da sequência dos genes específicos em questão (Hubank & Schatz, 1994). Um dos métodos utilizados para clonar genes diferencialmente expressos é a técnica da Análise Representacional Diferencial (RDA) que pretendemos descrever, em primeiro lugar exemplificando o potencial dos estudos genômicos na observação dos mecanismos utilizados pelos microrganismos como escape aos tratamentos convencionais, e em segundo caracterizando como

ferramenta útil nas pesquisas de busca de novos alvos antifúngicos para o tratamento das patologias.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Utilizando esse enfoque, baseado na utilização de técnicas que de forma acurada consigam determinar as informações a nível de RNAm e DNA, estudos do perfil genômico foram realizados para avaliar o efeito da anfotericina B, 5-FC, e vários azoles em *Saccharomyces cerevisiae* e *Candida albicans* (Bammert & Fostel, 2000; De Backer *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2002a; 2002b). Esses estudos forneceram uma excelente visão geral dos genes com alteração no perfil de expressão em resposta ao tratamento com essas drogas, além de orientar e estimular novos estudos que partam da premissa das concentrações destas drogas atualmente utilizadas em pacientes.

Visando fazer uma análise comparativa entre as drogas utilizadas num mesmo estudo, os genes de *S. cerevisiae* foram investigados em resposta a representantes das classes dos polienos, pirimidinas, azoles, e equinocandinas. Nesse estudo foi demonstrado que diferenças nas condições ambientais, tais como meio de crescimento, concentração da droga, e período de exposição à droga pode contribuir para alterações na expressão dos genes. Foram identificadas alterações classe-específica e mecanismo-independente. Genes responsivos a cetoconazol, caspofungina, e 5-FC indicaram efeitos droga-específico. A exposição do cetoconazol afetou genes primariamente envolvidos na biossíntese e captação do ergosterol; exposição à caspofungina afetou genes envolvidos na integridade da parede celular; e 5-FC afetou genes envolvidos na síntese de proteína e DNA, reparo a dano no DNA, e controle do ciclo celular. Ao contrário, alterações induzidas por anfotericina B na expressão de genes foram relacionadas ao estresse celular, reconstrução de membrana celular, transporte, captação de fosfato, e integridade da parede celular. Embora tenham sido identificados genes com maior especificidade para uma droga em particular (genes droga-específicos), também foram encontrados genes sem especificidade para as classes de drogas. Os resultados obtidos forneceram novas informações sobre o mecanismo de ação dessas classes de agentes antifúngicos e demonstraram o potencial de utilização do perfil de expressão de genes no desenvolvimento de drogas antifúngicas (Agarwal *et al.*, 2003).

Estudos similares foram desenvolvidos para *C. albicans* utilizando as mesmas classes de antifúngicos e condições similares de crescimento. Foram encontradas similaridades, mas também diferenças, entre *S. cerevisiae* e *C. albicans*, na resposta a esses agentes antifúngicos. Os experimentos do perfil de expressão gênica revelaram respostas droga-específica consistente com seu mecanismo de ação, respostas indicativas de outras vias que devem ser afetadas por esses agentes, e respostas que refletem mecanismos conhecidos e potenciais de resistência a esses agentes antifúngicos (Liu *et al.*, 2005).

Análise do transcriptoma de *Aspergillus fumigatus*, um fungo filamentosos, exposto a voriconazol revelou que a expressão do mRNA de vários genes é dependente da via de sinalização por proteína quinase-AMP cíclico conservada evolutivamente, auxiliando no entendimento de como o fungo se torna resistente ao voriconazol (Ferreira *et al.*, 2006). Estudos utilizando microarranjos com o objetivo de avaliar o perfil transcricional de *Trichophyton rubrum* em resposta a cetoconazol e anfotericina B revelaram resultados consistentes com os mecanismos de ação conhecidos. Entretanto, houveram também achados específicos em *T. rubrum* que diferiram dos resultados obtidos em trabalhos anteriores para outros fungos (Yu *et al.*, 2007).

S. cerevisiae é um excelente organismo modelo para estudar ação de antifúngicos devido ao seu genoma ter sido totalmente seqüenciado e bem caracterizado, e também ao desenvolvimento de microarranjos, possibilitando monitorar globalmente alterações na expressão de genes em resposta a uma variedade de condições experimentais. Em adição, existe a disponibilidade de estoque de mutantes com genes deletados, facilitando a validação de novas hipóteses geradas pelos experimentos de microarranjos (Viscoli *et al.*, 1999). Entretanto, os trabalhos acima demonstraram a importância da realização desses estudos em outros fungos de relevância.

O mapeamento dos genes expressos por *P. brasiliensis* em diferentes condições tem sido objetivo de vários projetos transcriptomas deste fungo. O Projeto Genoma Funcional e Diferencial foi desenvolvido visando uma melhor compreensão do metabolismo de *P. brasiliensis*, isolado *Pb01*, na fase de micélio e levedura. Nos transcriptomas relativos às fases leveduriforme e miceliana foram seqüenciados um total de 6.022 ESTs. Dentre os transcritos encontrados foram observados genes relacionados à virulência e potenciais alvos para drogas, como quitina deacetilase, isocitrato liase e α -1,3-glicana sintase, uma vez que eles não possuem homologia em humanos. As análises do transcriptoma também revelaram alguns prováveis componentes das vias de sinalização, como Ca^{2+} calmodulina-calcineurina, MAPKs e AMPc/proteína quinase, (Felipe *et al.*, 2005a; Felipe *et al.*, 2003).

A técnica de RDA é um processo de subtração acoplado à amplificação, originalmente desenvolvido para uso com DNA genômico como um método capaz de identificar as diferenças entre dois genomas complexos (Hubank & Schatz, 1994). A fim de permitir análise de populações de mRNA diferencialmente expressos, Lisitsyn 1995 modificou o processo. Baseado em rounds sucessivos de hibridização subtrativa, seguido por PCR (reação em cadeia da polimerase), esta técnica possui a vantagem de elimina fragmentos presentes em ambas as populações de mRNAs, deixando apenas os genes expressos diferencialmente. O RDA se baseia na geração, por digestão com enzima de restrição e amplificação por PCR, de versões simplificadas dos transcriptomas sob investigação conhecidas como “representações”. Se um fragmento de restrição amplificável (o alvo) existe numa representação (tester) e está ausente em outra (driver – controle), um enriquecimento cinético do alvo pode ser alcançado por hibridização subtrativa do tester

na presença de um excesso de driver. Sequências com homólogos no driver não são amplificadas, enquanto o alvo hibridiza apenas com ele mesmo e retém a habilidade de ser amplificável por PCR. Interações sucessivas da subtração e o processo de PCR produzem fragmentos de cDNA visíveis num gel de agarose correspondendo ao alvo enriquecido (Hubank & Schatz 1994).

Na técnica de RDA as populações de cDNA podem ser fracionadas por um número de enzimas de restrição com sequências curtas de reconhecimento para produzir conjuntos de cDNAs. Este aspecto do RDA melhora grandemente as chances de se clonar com sucesso espécies diferencialmente expressas. Além disso, pelo fato de que cada cDNA é restringido no seu comprimento para produzir fragmentos, o procedimento de RDA oferece múltiplas chances de se recuperar um gene de interesse. No entanto, assim como acontece em outras técnicas de obtenção de genes expressos diferencialmente, a técnica de RDA pode apresentar algumas desvantagens, como o aparecimento de falsos-positivos, porém trata-se de um procedimento relativamente barato e rápido (Pastorian *et al.*, 2000).

CONCLUSÕES

Tendo em vista o desenvolvimento amplo das técnicas e ferramentas moleculares, como fruto do avanço biotecnológico, para diagnóstico de patologias e tratamento eficaz destas, as técnicas que se configurem acuradas para a avaliação de genes *upregulated* ou *downregulated* tornam – se de extrema relevância. Os custos da utilização de técnicas de última geração são de fato um fator limitante, principalmente quando se requer a compra e manutenção de equipamentos. Assim, novas técnicas que possibilitem estas observações com menos gastos e possibilidade de utilização de equipamentos que os laboratórios já possuam, tornam-se relevantes para o estudo do mecanismo de ação dos fármacos e das respostas dos agentes infecciosos.

REFERÊNCIAS

Agarwal, A.K., Rogers, P.D., Baerson, S.R., Jacob, M.R., Barker, K.S., Cleary, J.D., Walker, L.A., Nagle, D.G., Clark, A.M. 2003. Genome-wide expression profiling of the response to polyene, pyrimidine, azole, and echinocandin antifungal agents in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*. 278:34998-35015.

Bammert, G.F., Foster, J.M. 2000 Genome-wide expression patterns in *Saccharomyces cerevisiae*: Comparison of drug treatments and genetic alterations affecting biosynthesis of ergosterol. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 44:1255-1265.

De Backer, M.D. Ilyina, T., Ma, X.J., Vandoninck, S., Luyten, W.H.M.L., Bossche, H.V. 2001. Genomic profiling of the response of *Candida albicans* to itraconazole treatment using a DNA microarray. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 45:1660-1670.

Felipe MSS, Andrade RV, Petrofeza SS, Maranhão AQ, Torres FAG, Albuquerque P, Arraes FBM, Arruda M, Azevedo MO, Baptista AJ, Bataus LAM, Borges CL, Campos EG, Cruz MR, Daher BS, Dantas A, Ferreira MAS, Ghil GV, Jesuino RSA, Kyaw CM, Leitão L, Martins CR, Morais LMP, Neves EO, Nicola AM, Alves ES, Parente JA, Pereira M, Poças-Fonseca MJ, Resende R, Ribeiro BM, Saldanha RR, Santos SC, Silva-Pereira I, Silva MAS, Silveira E, Simões IC, Soares, RBA, Souza D P, De-Souza MT, Andrade EV, Xavier MAS, Veiga HP, Venancio EJ, Carvalho MJA, Oliveira AG, Inoue MK, Almeida MF, Walter MEMT, Soares CMAS, Brígido MM 2003. Transcriptome characterization of the dimorphic and pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* by EST analysis. *Yeast*. 20:263-271.

Felipe MS, Andrade RV, Arraes FB, Nicola AM, Maranhão AQ, Torres FA, Silva-Pereira I, Poças-Fonseca MJ, Campos EG, Moraes LM, Andrade PA, Tavares AH, Silva SS, Kyaw CM, Souza DP, Pereira M, Jesuino RS, Andrade EV, Parente JA, Oliveira GS, Barbosa MS, Martins NF, Fachin AL, Cardoso RS, Passos GA, Almeida NF, Walter ME, Soares CM, Carvalho MJ, Brígido MM; PbGenome Network. Transcriptional profiles of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* in mycelium and yeast cells.

Ferreira, M.E.S., Malavazi, I., Savoldi, M., Brakhage, A.A., Goldman, M.H.S., Kim, S., Nierman, W.C. and Goldman, G. 2006. Transcriptome analysis of *Aspergillus fumigatus* exposed to voriconazole. *Curr Genet*. 50:32-34.

Hubank M, Schatz AG 1994. Identifying differences in mRNA expression by representational difference analysis of cDNA. *Nucleic Acids Res*. 22:5640.

Lisitsyn NA 1995 *Trends Genet*. 11:303–307.

Liu, T.T., Lee R.E.B., Barker, K.S., Lee, R.E., Wei, L., Homayouni, R., Rogers, D. 2005. Genome-wide expression profiling of the response to azole, polyene, echinocandin, and pyrimidine antifungal agents in *Candida albicans*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 49:2226-2236.

Pastorian K, Havell III L, Byus CV 2000. Optimization of cDNA Representational Difference Analysis for the identification of differentially expressed mRNAs. *Anal Biochem*. 283:89-98

Viscoli, C., Girmenia, C., Marinus, A., Collet, L., Martino, P., Vandercam, B., Doyen, C., Lebeau, B., Spence, D., Kremery, V., De Pauw, B. and Meunier, F. 1999 Candidemia in cancer patients: a prospective, multicenter surveillance study by the Invasive Fungal Infection Group (IFIG) of the European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC). *Clinical Infectious Diseases*. 28:1071-1079.

Yu, L., Zhang, W., Wang, L., Yang, J, Liu, T., Peng, J., Leng, W., Chen, L., Li, R., Jin, Q. 2007. Transcriptional profiles of the response to ketoconazole and amphotericin B in *Trichophyton rubrum*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 51:144-153.

Zhang, L., Zhang, Y., Zhou, Y., An, S., Zhou, Y., Cheng, J. 2002a Response of gene expression in *Saccharomyces cerevisiae* to amphotericin B and nystatin measured by microarrays. *Journal Antimicrobial Chemotherapy*. 49:905-915.

Zhang, L., Zhang, Y., Zhou, Y., Zhao, Y., Zhou, Y., Cheng, J. 2002b Expression profiling of the response of *Saccharomyces cerevisiae* to 5-fluorocytosine using a DNA microarray. *International journal of antimicrobial agents*. 20:444-450.