



FACULDADE UNIÃO DE GOYAZES
CURSO DE FARMÁCIA

Rayane Oliveira Cruz Veríssimo

**SECRETOMA DE *Paracoccidioides lutzii* EM CONDIÇÕES DE DEPLEÇÃO
DE NITROGÊNIO.**

TRINDADE-GO

2015

FACULDADE UNIÃO DE GOYAZES
CURSO DE FARMÁCIA

**SECRETOMA DE *Paracoccidioides lutzii* EM CONDIÇÕES DE DEPLEÇÃO
DE NITROGÊNIO.**

Rayane Oliveira Cruz Veríssimo

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Faculdade União
de Goyazes como requisito
parcial à obtenção do título de
Bacharel em Farmácia.

Orientadora: Esp. Aline Brito de Sousa

TRINDADE-GO

2015

Rayane Oliveira Cruz Veríssimo

**SECRETOMA DE *Paracoccidioides lutzii* EM CONDIÇÕES DE DEPLEÇÃO
DE NITROGÊNIO.**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Faculdade União de
Goyazes como requisito parcial à
obtenção do título de Bacharel em
Farmácia aprovada pela seguinte
banca examinadora:

Prof. Especialista Aline Brito de Souza

Faculdade União de Goyazes

Prof. Doutor Clayton Luiz Borges

Prof. Ms. Stefani Garcia Rezende

TRINDADE-GO

14/12/2015

SECRETOMA DE *Paracoccidioides lutzii* EM CONDIÇÕES DE DEPLEÇÃO DE NITROGÊNIO.

Rayane Oliveira Cruz
Verissimo¹

Clayton Luiz Borges²

Aline Brito de Sousa²

RESUMO

Fungos pertencentes ao gênero *Paracoccidioides spp* são agentes etiológicos causadores da micose sistêmica humana paracoccidioidomicose (PCM). Esses fungos são termodimórficos e possuem a capacidade de transitar da forma saprobiótica para a forma de levedura à temperaturas em torno de 37°C. A aquisição de nutrientes pelos fungos são processos essenciais para a manutenção do seu crescimento, no qual possuem papel fundamental na formação da biomassa. Sendo assim, os mecanismos de regulação desse status nutricional são necessários para a adaptação oportunista desse patógeno. O presente estudo tem objetivo caracterizar as proteínas secretadas de *Paracoccidioides lutzii* em condições que mimetizam a depleção de nitrogênio, condições estas impostas pelas células hospedeiras.

PALAVRAS-CHAVE: *Paracoccidioides lutzii*; Secretoma; Proteínas; Repressão Catabólica do Nitrogênio.

APOIO FINANCEIRO: FAPEG e Laboratório de Biologia Molecular-UFG.

1- Acadêmica do Curso de Farmácia da Faculdade União de Goyazes.

2- Orientador: Prof. Dr. Clayton Luiz Borges, Universidade Federal de Goiás.

SECRETOME OF *Paracoccidioides lutzii* INTERMS OF NITROGEN DEPLETION.**ABSTRACT**

Fungi of the genus *Paracoccidioides spp* are etiological agents of human systemic mycosis paracoccidioidomycosis (PCM). These fungi are therdimorphic and have the ability to move the saprobiotic way for the yeast form at temperatures around 37 ° C. The acquisition of nutrients the fungi are essential processes for the maintenance of its growth, in which it has a fundamental role in the formation of biomass. Thus, the mechanisms of regulation of this nutritional status are required for adapting this opportunistic pathogen. The objective of this study is to characterize the secreted proteins of *P. lutzii* under conditions that mimic the depletion of nitrogen, conditions imposed by the host cells.

KEYWORDS: *Paracoccidioides lutzii*; Secretome; Proteins; Catabolic Repression Nitrogen.

FINANCIAL SUPPORT: FAPEG and Molecular Biology Laboratory-UFG

1 INTRODUÇÃO

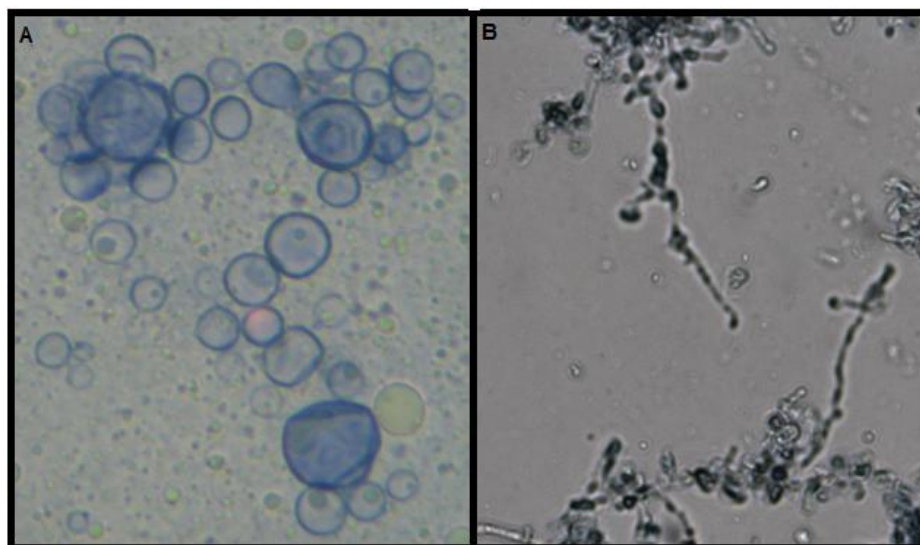
1.1 Aspectos gerais do fungo *Paracoccidioides* spp

Paracoccidioides são fungos termodimórficos que causam a infecção fúngica Paracoccidioidomicose (PCM), inicialmente o fungo era composto apenas por uma espécie *P. brasiliensis*, logo após estudos com polimorfismo genético mostraram uma divisão em três espécies filogenéticas (S1, PS2 e PS3) (MATUTE et al., 2006). Com a ampliação das técnicas de biologia molecular foi identificada a linhagem 01 de *P. brasiliensis*, se diferenciando das outras espécies, assim surgindo um quarto grupo filogênico Pb01-like (CARRERO et al., 2008).

Em seguida foi denominada de *Paracoccidioides lutzii* então uma nova classificação foi empregada, compreendendo assim duas espécies, *P. brasiliensis* e *P. lutzii* (BOCCA et al., 2013). O habitat natural de *P. brasiliensis* ainda é desconhecido, mas pressupõe-se que o fungo possui dois nichos ecológicos. O primeiro é comparado ao seu estado filamentoso, em que o fungo é encontrado no solo e plantas. O segundo se refere à associação patógeno com hospedeiro (homem e alguns animais domésticos e silvestres) (RESTREPO et al., 2001). Mas, estudos elucidaram que o organismo humano deve ser considerado hospedeiro acidental e não reserva natural do fungo, pois o mesmo é acometido pela doença (CONTI-DIAZ, 2007).

Fungos termodimórficos são caracterizados pela mudança de forma filamentosa multicelular para unicelular de acordo com a variação de temperatura. Entre 22°C a 25°C são encontrados sob a forma de micélio caracterizada macroscopicamente por colônias brancas, pequenas e irregulares (Figura 1B) e vista de forma microscópica é composta de hifas finas e septadas, enquanto que de 35°C a 37°C, como leveduras, apresentando-se macroscopicamente como colônias moles e rugosas, e microscopicamente por células ovais ou alongadas possuindo múltiplos brotamentos (Figura 1A)(BRUMMER et al., 1993; MARQUES, 2005).

Figura 01. Morfologia microscópica do *Paracoccidioides brasiliensis*. **A.** Levedura. **B.** Micélio.

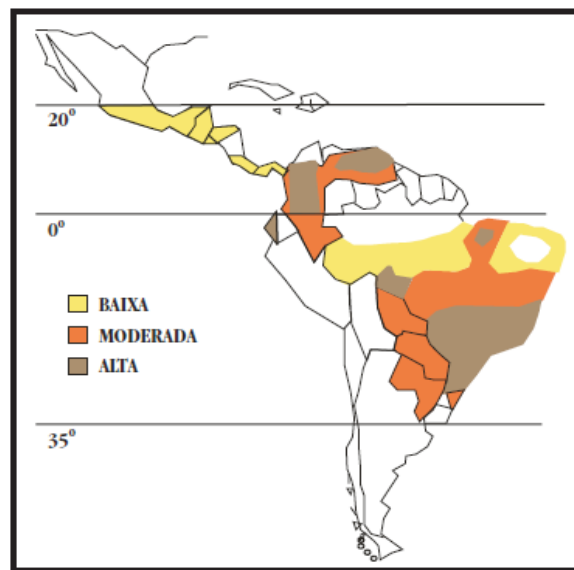


Adaptado: Restrepo et al., 1978

1.2 Paracoccidioidomicose (PCM)

A PCM está geograficamente localizada na América Latina, principalmente no Brasil, onde apresenta grande prevalência de óbitos entre micoses sistêmicas (RESTREPO et al., 1983). A micose ainda foi descrita em países, como Chile, Guatemala, Belize e Antilhas, como casos isolados (Figura 2) (SHIKANAI-YASUDA et al., 2006). Nesses países cerca de 10.000 pessoas já foram infectadas e apenas 2% desses indivíduos desenvolveram a doença (RAMOS, SILVA-SARAIVA, 2008).

Figura 02. Distribuição da PCM em países da América Latina



Adaptado: Shikanai-Yasuda et al., 2006

Também foi detectada a presença de *P.brasiliensis* em animais selvagens, mortos em estradas e rodovias, por meio de técnicas moleculares. O fungo foi encontrado em tatu (*Dasyopus sp.*), preá (*Caviaaperea*), porco espinho (*Sphigurrusspnosus*), guaxinim (*Procyonancrivoros*), cachorro (*Canis familiares*) e furão (*Gallictisvittata*) (RICHINI-PEREIRA et al., 2008).

A infecção ocorre após a inalação de propágulos produzidos por micélios, esses atingem a via respiratória e se instalam nos alvéolos pulmonares, através da temperatura do hospedeiro ocorre a transformação subsequente de micélio para levedura, fase na qual ocorre a infecção (MARQUES, 2005; GROSSKLAUS, 2012; SILVA, 2010). Existem duas formas clínicas da PCM identificadas como aguda ou sub-aguda e forma crônica. A forma aguda também é conhecida como juvenil e é a forma mais severa, apresenta-se 43% de lesões na região do rosto, pescoço e do tronco, é caracterizada por uma rápida disseminação (semanas a meses) e pelo envolvimento do sistema retículo endotelial (baço, fígado, linfonodos, medula óssea). A função imune é muito comprometida nesses pacientes, a maioria deles sendo crianças e jovens. Além disso, a forma juvenil também é diagnosticada em indivíduos infectados com HIV, independentemente de idade (SHANKAR et al., 2011).

A forma crônica, também conhecida como forma adulta ocorre em 90% dos pacientes, sendo, a maioria deles, indivíduos do sexo masculino, pois durante estudos realizados por Restrepo et al. (1984), foram detectados no citosol de micélio e levedura de *P. brasiliensis* receptores para 17- β -estradiol, este hormônio feminino inibe a transição do fungo na fase miceliana para fase leveduriforme no tecido hospedeiro, o que responde a maior incidência de PCM que compromete mais de 80% dos homens. A doença progride de forma mais lenta e pode levar meses ou anos para se estabelecer, em aproximadamente 25% dos casos, os pulmões são os únicos órgãos clinicamente afetados (forma unifocal) raramente outros órgãos são afetados. Já em outros casos a infecção ocorre primeiramente nos pulmões a partir do qual se dissemina via corrente sanguínea e sistema linfático para outros órgãos (Figura 3) e sistemas caracterizando a forma disseminada da PCM (forma multifocal) (BRUMMER et al., 1993).

Figura 03. Paracoccidioidomicose forma aguda mostrando ampliada linfonodos, com aspecto inflamatório e formação de abscesso, pálpebra com pontos hemorrágicos na mucosa.



Adaptado: Alencar et al., 2013

1.3-Importância da aquisição de nutrientes durante o processo infeccioso

Para organismos patogênicos o ambiente hostil enfrentado por eles é o hospedeiro, em esse organismo precisa garantir sua adaptação e sobrevivência a fim de promover o estabelecimento da doença, modulando seu padrão de expressão gênica em resposta ao ambiente do hospedeiro (BAILÃO et al., 2006). O sucesso da infecção por *Paracoccidioides sp.* depende da disponibilidade de nutrientes no ambiente, aos que estão limitados no hospedeiro. Desta forma, o fungo necessita desenvolver estratégias

metabólicas para se adaptar e sobreviver no hospedeiro. Compostos de carbono, nitrogênio e fósforo são importantes elementos que fazem parte do estado nutricional da célula. Nesse sentido o fungo precisa captar nutrientes, dentre eles o nitrogênio que é um elemento importante na composição das proteínas, aminoácidos, ácidos nucleicos e compostos nitrogenados na célula (HUERGO, 2006; BOLTON; THOMMA, 2008). No entanto, no hospedeiro há limitação desse composto, devido às barreiras formadas pelo sistema imunológico (COUTO et al., 1994; TAYLOR; DUARTE-ESCALANTE 1995; MACHADO et al., 2004).

A amônia, oriundo da fixação do nitrogênio, é considerada ponto de partida para o metabolismo anabólico de nitrogênio e sua incorporação em moléculas orgânicas pode ser realizada por diversos sistemas, entre eles destacam-se: sistema glutamato sintase (GOGAT) e glutamina sintetase (GS) ou sistema glutamato desidrogenase (GDH) (MERRICK; EDWARDS 1995; PEREIRA et al., 2003).

O nitrogênio atua como uma molécula sinal que é capaz de induzir a regulação de genes em resposta à disponibilidade deste nutriente no ambiente, então desenvolvem estratégias metabólicas para se adaptarem à condição em que se encontram. Quando o nitrogênio é escasso, as células retardam o seu crescimento, resultando na expansão da fase G1 do ciclo celular (BROACH et al., 2012).

A regulação metabólica pelo nitrogênio ocorre com dois eventos: Repressão Metabólica do Nitrogênio-NMR na qual favorece a utilização de fontes primárias de nitrogênio como a amônia e L-glutamina, ao passo que reprime a utilização de outras fontes secundárias de nitrogênio como nitrato, peptídeos ou outros aminoácidos livres, e Repressão Catabólica do Nitrogênio-NCR que é um mecanismo de utilização de fontes secundarias de nitrogênio regulado pós-transcricionalmente pela ativação de fatores GATA com dois ativadores de transcrição, Gln3 e GAT1 (Nil1 e Mep80), e dois repressores, Dal80 e Gzf3 (Deh1 e Nil2) (BROACH, et al., 2012). Esses fatores estão presentes em diversos organismos como mamíferos, aves e fungos. Em fungos filamentosos e levedura eles são reguladores responsáveis pela síntese de

enzimas e permeases necessárias para captação dessas fontes não preferenciais de nitrogênio (FRASER et, 2001; STARICH et al.,1998). Levando em consideração a importância do nitrogênio para o fungo e sua infecção, as análises proteômicas e do secretoma do *Paracoccidioides spp* pode esclarecer possíveis estratégias metabólicas utilizadas, para se adaptar às condições encontradas no hospedeiro, o qual contribuirá para compreender relação entre parasito-hospedeiro e virulência.

1.4- Proteoma e Secretoma

O proteoma é definido como uma análise de expressão gênica que se baseia em proteínas expressas por um genoma de uma célula, o mesmo permite a análise qualitativa e quantitativa de um grande número de proteínas em diferentes situações fisiológicas, o que reflete em diferentes momentos metabólicos (WILKINS et al. 1996; WITTMANN-LIEBOLDE et al. 2006; BARROS et al. 2010).

O secretoma constitui um conjunto de proteínas secretadas, que representam até 30% do proteoma de uma organismo. A maior parte dessas proteínas secretadas são enzimas hidrolíticas que participam na digestão de substratos, que envolve classes de moléculas como citoquinas, quimiocinas, hormônios, enzimas digestivas, anticorpos, toxinas e peptídeos antimicrobianos, e também proteínas importantes na interação entre patógeno-hospedeiro que são indispensáveis para a patogenicidade dos micro-organismos (RANGANATHAN & GARG, 2009;BRAAKSMA et al, 2010).

A capacidade de fungos patogênicos para desenvolver respostas multifacetadas para a ampla variedade de estressores presentes no ambiente do hospedeiro é de extrema importância para a virulência e patogênese, essas respostas incluem uma gama de moléculas que facilitam a adesão, invasão, inativação das defesas do hospedeiro e alteração ou destruição das células do hospedeiro (NOMBELA et al., 2006; RANGANATHAN & GARG, 2009; HOLBROOK et al., 2011). Proteínas secretadas podem estar envolvidas diretamente ou indiretamente na comunicação molecular com células do

hospedeiro, capacitando sua sobrevivência, multiplicação e disseminação (SILVA et al., 2011).

Em células eucarióticas, a via clássica de secreção envolve o reconhecimento da sequência sinal das proteínas a serem secretadas através do Complexo de Golgi (SCHATZ & DOBBERSTEIN, 1996). Em adição à via clássica de secreção, tem sido descrito a existência de vários tipos distintos de rotas de transporte não clássica (Figura 3) (NOMBELA et al., 2006). E também várias proteínas, sem a sequência sinal e funcionalmente ativas, tem sido descritas no meio extracelular (Nombela *et al.*, 2006; Cuervo *et al.*, 2009; Chaves *et al.*, 2009).

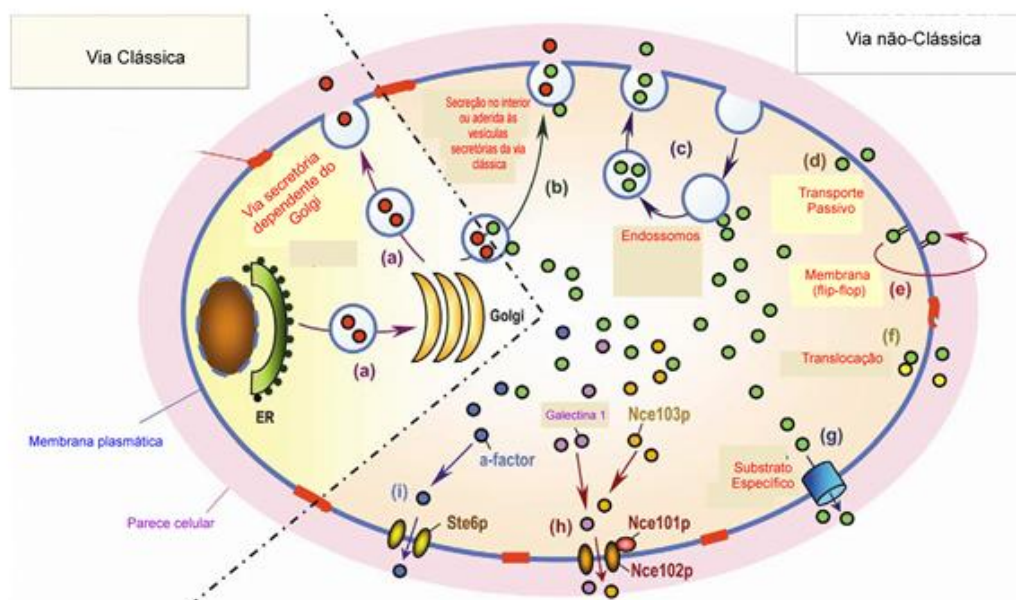


Figura 04. Repertório de mecanismos hipotéticos para proteínas que não têm um sinal de secreção N-terminal através da membrana do plasma para o exterior da célula. (Adaptado: NOMBELA et al., 2006).

Análises proteômicas do conteúdo de vesículas extracelulares em *Cryptococcus neoformans* e *Histoplasma capsulatum* demonstraram que o transporte através de vesículas é um mecanismo geral para transportar macromoléculas relacionadas à virulência e desempenham um papel importante na interação patógeno-hospedeiro (RODRIGUES *et al.*, 2008; ALBUQUERQUE *et al.*, 2008). Mais recentemente, foi descrito em *P. brasiliensis* vesículas extracelulares transportando moléculas como a gp43 que é uma glicoproteína segregada onde provoca respostas antigênicas que foram reconhecidas por soro de pacientes com PCM (VALLEJO *et al.*, 2011).

Análises de secretoma em *P. brasiliensis* (isolado 18) revelaram grande quantidade de proteínas secretadas pela via clássica e via não-clássica. Proteínas secretadas apresentam importante papel em diversos processos biológicos, tais como, metabolismo de carboidratos e proteínas, tradução, repostas ao estresse, sinalização, divisão celular, oxidação / redução e transporte. Dentre as principais proteínas descritas nesse estudo estão a superóxido dismutase, a aminopeptidase, a proteína GTP-binding RHO1, a enolase, a formamidase e a tioredoxina. Tais funções são importantes para a virulência, pois auxiliam na sobrevivência e disseminação do fungo durante a infecção (VALLEJO et al., 2012).

Estudos realizados por Weber et al em 2012, demonstraram que o secretoma de *Paracoccidioides sp* identificou proteínas com função de defesa celular, como a peroxissomalcatalase; de desintoxicação contra estresse oxidativo, como a glutationa-S-transferase; proteção contra espécies reativas de oxigênio, como a superóxido dismutase; regulação de vias de sinalização, como a proteína 14-3-3; e ligação e internalização com as células do hospedeiro, como a GAPDH que foram secretadas por vias clássicas e a maioria por vias não-clássicas, também, nesse estudo, a formamidase foi preferencialmente secretada na fase de micélio. Essa enzima é importante na captação de fontes secundárias de nitrogênio onde atua na hidrólise da formamida em formato de amônia, a indução da formamidase em *Aspergillus nidulans* está diretamente relacionada a disponibilidade de nitrogênio do ambiente e sua regulação desencadeada por fatores de transcrição da família GATA (FRASER et al, 2001).

A complexidade de interações entre *P. brasiliensis* e o hospedeiro humano sugere que o fungo apresenta mecanismos que possibilitam sua adaptação ao ambiente encontrado no hospedeiro. Estudos transcricionais demonstram que a expressão de uma ampla gama de genes é induzida durante condições de infecção. Dentre os genes induzidos estão aqueles considerados como fatores de virulência clássicos, transporte de nutrientes, adesão e genes envolvidos com metabolismo central, tais como gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) e formamidase, dentre outros (BAILÃO et al., 2006; BORGES et al., 2010; BORGES et al., 2005).

Borges et al (2005), identificaram e caracterizaram a formamidase em *P. brasilienses* na qual demonstrou que esta enzima induz a produção de anticorpos em tecidos infectados, revelando sua propriedade antigênica. Outra proteína importante, secretada em *Paracoccidioides* é a serino protease, importante, na clivagem de peptídeos e como fator de virulência para o hospedeiro, ensaios enzimáticos e análises *in silício* demonstraram que esta proteína é regulada pelas condições limítrofes de nitrogênio e sendo induzidas por fatores de transcrição da família GATA ortólogos de *areA* em *A. nidulans* e *nit-2* de *Neurospora crassa* (DAVIS & HYNES, 1987; PARENTE et al, 2010; FRASER et al, 2011). Neste contexto, considerando a importância de *Paracoccidioides spp.* este trabalho tem o objetivo de identificar as proteínas secretadas por *P. lutzii*, reguladas durante a depleção de nitrogênio, o qual possibilitará a identificação de possíveis fatores de virulência/moléculas de interação parasito-hospedeiro e possíveis estratégias metabólicas de adaptação.

2-METODOLOGIA

2.1 Cultivo e Manutenção de *Paracoccidioides sp*

O isolado de *P. lutzii* (ATCCMYA-826) foi utilizado em todos os experimentos deste estudo. A fase de levedura foi mantida *in vitro* por crescimento a 36 °C, em meio Fava-Netto sólido por 3 dias (FAVA-NETTO, 1955). Logo após, as células do isolado foram incubadas em meio BHI (*Brain Heart Infusion*) líquido (sem adição de ágar) por 48 horas à 150 rpm e temperatura de 36°C.

2.2 Cultivo do fungo em Meio Mínimo (RAMACHANDRA et al., 2014)

Na segunda etapa, as células do fungo foram lavadas transferidas para o meio mínimo (MvM) líquido (Ramachandra et al.,2014) em agitação constante de 150 rpm. O meio controle continha glutamina como fonte primária de nitrogênio a uma concentração de 20mM, enquanto que o meio tratado as fontes de nitrogênio foram minimizadas seguindo protocolo do artigo citado

acima. As células foram mantidas por 12 e 24 horas nos respectivos meios, de acordo com o protocolo abaixo:

Reagentes	Quantidades
Glicose (2g/100mL)	2%
Fosfato de Potássio Monobásico (KH ₂ PO ₄)	4,0g
Sulfato de Magnésio Hepta-hidratado (MgSO ₄ 7H ₂ O)	0,7g
Fosfato Monobásico de Sódio NaH ₂ SO ₄	3,2g
Sulfato de Amônia (NH ₄ SO ₄)	10,0g
Solução de vitaminas*	1200µL
Solução de elementos traços**	300µL
Água bidestilada q.s.p.	1000mL

*Solução de Vitaminas 0,12%:

Reagentes	Quantidades
Tiamina	20mg/0,02g
Biotina B8	2mg/0,002g
Piridoxina	20mg/0,02g
Água bidestilada q.s.p.	100mL (20mL etanol + H ₂ O)

**Solução de Elementos traços 0,03% HCl- PA:

Reagentes	Quantidades
Sulfato de Cobre Penta-hidratado (CuSO ₄ H ₂ O)	0,5g
Sulfato Ferroso (FeSO ₄ 7H ₂ O)	0,5g
Cloreto de Manganês (MnCl ₂ 4H ₂ O)	0,8g
Sulfato de Zinco (ZnSO ₄ 7H ₂ O)	0,5g
Água bidestilada q.s.p.	100mL/1mL HCl

Meio MvM descrito por Ramachandra et al, 2014 (modificado)

- O meio MvM Controle é adicionado 20mM de glutamina (fonte preferencial de nitrogênio- MM: 146,14g).

Foram colocados todos os elementos, exceto a solução de elementos traços e a solução de vitaminas que foram adicionadas depois da esterilização. pH=6,5.

2.3 Viabilidade do fungo *P-lutzii*

A fase exponencial de crescimento do fungo foi definida por citometria de fluxo, na qual foi utilizado o equipamento Guava easy cyte- Merck Millipore, o reagente Guava Via Count® e as amostras na concentração de 10^6 células/ml de *P-lutzii* para determinar a viabilidade das células, o reagente permite identificar células viáveis de células não viáveis utilizando a permeabilidade diferencial de um corante que liga ao DNA, a fluorescência emitida permite a distinguir a viabilidade das células.

2.5 Análises funcionais do gene Aminoácido permease – GAP

Para definição dos pontos de extração das proteínas secretadas, foi feita a avaliação da expressão gênica do gene aminoácido permease GAP (PAAG_09034). A expressão desse transportador é diretamente relacionado com a condição de nitrogênio na célula no qual a indução de GAP é mediada pelo fator de transcrição da família GATA areA, já descrito em *A.nidulans* (Hynes, 1974) e homólogo para o gênero *Paracoccidioides sp.* O primer do gene foi desenhado com o auxílio do software GeneRunner.exe, de acordo com a sequência a seguir: fita sense 5'GTCGGCTTTATCATATTGGGG 3' fita antisense 5' GAAAGCAGCCGTAACAAAGAC 3'.

2.6 Extração de RNA para análises funcionais do gene GAP

As células leveduriformes foram coletadas nos pontos de 0hs, 12hs, 24hs e 48hs de crescimento no meio mínimo MvM controle com acréscimo de glutamina (+N) e tratado com fontes de nitrogênio depletadas (RAMACHANDRA et al, 2014), e foi extraído o RNA total. Em tubos de extração foram colocadas glassbeads e 600 µL de célula mais 750 µL de Trizol. Depois, foram submetidas à agitação em intervalos de 30 segundos por 3 vezes no beadbeater (Biospec), nos intervalos das agitações as amostras foram mantidas nos gelo. Depois as

amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 10.000 rpm e de 2-8°C. Já fora do fluxo laminar, transferiu-se com o auxílio de uma pipeta o sobrenadante da amostra para um tubo de 1,5mL e o volume de Trizol recuperado foi registrado. Logo após, adicionou-se 0,2mL de Clorofórmio para 0,75mL de Trizol recuperado. As amostras foram homogeneizadas e ficaram de repouso em temperatura ambiente por 10 minutos. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 10.000 rpm de 2-8°C. Pipetou-se o sobrenadante para novo tubo de 1,5 mL. Depois, adicionou o mesmo volume recuperado de uma mistura de Fenol: Clorofórmio: Álcool isoamílico (25: 24: 1) em temperatura ambiente. As amostras foram agitadas, gentilmente, até que a solução se apresentasse com a coloração branca (agitou-se com cuidado para não romper mecanicamente as estruturas do RNA). Em seguida, as amostras repousaram em temperatura ambiente por 10 minutos. Depois, foram centrifugadas por 5 minutos a 10.000 rpm de 2-8°C. Em seguida pipetou-se o sobrenadante para um tubo de 1,5mL. Adicionou-se 0,25mL de isopropanol para cada 0,75mL de Trizol inicial. E metade desse volume da solução de citrato de sódio 0,4M e Cloreto de Sódio 0,8M. Depois, as amostras foram centrifugadas por 40 minutos a 10.000 rpm de 2-8°C, para precipitar o RNA. Então, foi retirado o sobrenadante com uma pipeta e descartou-se. Foi adicionado 1.0mL de Etanol 75% para cada 0,75mL de Trizol inicial. As amostras foram centrifugadas por 3 minutos a 10.000 rpm. Verteu-se lentamente o sobrenadante e, posteriormente, pipetou-se o excesso. O pellet ficou secando até perder o brilho. Depois, o pellet foi ressuspendido com água MilliQ. E estocado a -80°C. A concentração do RNA foi determinada através da absorbância relacionado ao comprimento de onda no equipamento software NanoDrop.

2.7 Produção de cDNA

Também foi realizada a síntese do cDNA dos pontos de 12 e 24h na extração de RNA seguindo o protocolo High Capacity RNA cDNA (AppliedBiosystems).

Reagentes	Quantidades
2x Buffer	Para 1 µg
20x Enzima	5µL
Amostra RNA	0,5µL
H ₂ O nucleasefree	Até 4,5µL
	q.s.p. 10µL

Primeiramente, foi adicionada a água, o RNA e depois o Mix (Buffer + Enzima transcriptase reversa). As amostras foram aliquotadas em tubos de 200µL e foram colocadas em um termociclador seguindo a seguinte reação a 37° C durante 1 hora, 95° C durante 5 minutos e mantido a 4° C, ao final do ciclo os cDNAs foram ressuspensos com 40µl de água MilliQautoclavada. Os cDNAs das amostras então foram utilizados para o reação em cadeia de polimerase.

2.8 Real Time PCR – do gene GAP

O cDNA foi quantificado por qRT-PCR (reação em cadeia de polimerase quantitativo em tempo real), usando SYBR green PCR máster mix (AppliedBiosystemsStepOne Plus PCR System). A reação de PCR em tempo real foi realizada em 40 ciclos de 95 °C por 15 s e 60 °C por 1 minuto. Os dados foram utilizando-se o gene constitutivo tubulina alpha-1 (PAAG_01647) como controle endógeno. As curvas padrões foram geradas utilizando-se uma alíquota de cDNA de cada amostra, serialmente diluídas (1:5 da diluição original a 1:125), e a expressão relativa dos níveis do gene de interesse foi calculada usando o método da curva padrão para quantificação relativa (Bookout et al, 2006). A análise estatística foi determinada pelo Teste t-Student onde $p \leq 0.05$ eram estatisticamente significativas.

2.9 Extração de Secretoma *P-lutzii*

Foram coletadas as células leveduriforme do *P. lutzii* nos pontos de 12 e 24 horas. Em cada ponto, as células foram centrifugadas por 25 minutos a 3500 rpm. O sobrenadante foi filtrado a vácuo, primeiramente por um papel filtro de 0,45 um (Milipore), posteriormente, por outro papel filtro de 0,22 um. O

sobrenadante foi filtrado em amicon 10KDa e ressuspenso em tampão de bicarbonato de amônio (NH_4HCO_3). Posteriormente foi determinada a concentração de proteínas pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976) e seu perfil qualitativo foi analisado por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).

3 RESULTADOS

3.1 Análise da viabilidade

A análise da viabilidade demonstrou que as células de *P. lutzii* tanto do meio contendo glutamina, quanto do meio que tiveram suas fontes de nitrogênio reduzidas apresentaram uma viabilidade predominantemente alta de células. As células viáveis eram em torno de 90%, isso demonstra que o meio utilizado durante os experimentos foi capaz de suportar o crescimento do fungo, permitindo assim uma resposta satisfatória quanto aos diferentes níveis de nitrogênio, como mostradas no Gráfico 01.

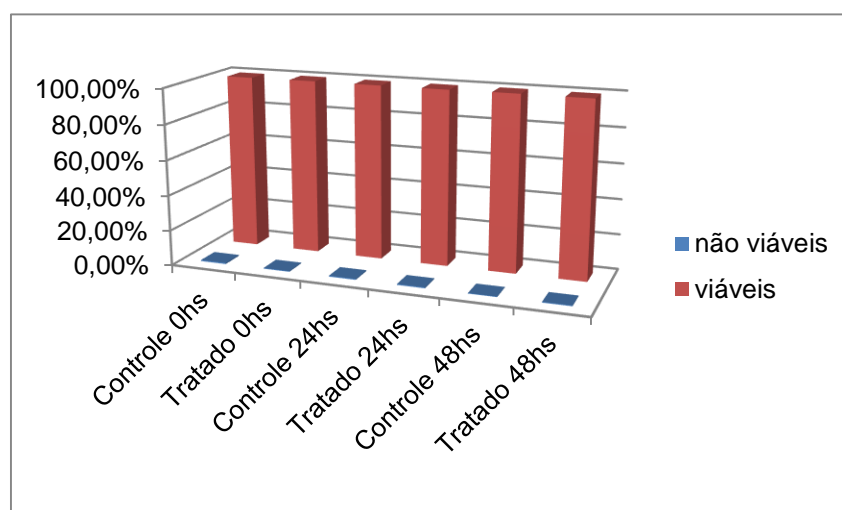


Gráfico 01. Viabilidade de *P-lutzii*: Análise das células nas condições de Controle (+N) e Tratado (-N), nos tempos de 0 hs, 24 hs e 48 hs. As células viáveis estão marcadas em vermelho e as não viáveis estão marcadas de azul.

3.2 Análise de qRT-PCR do gene *GAP* em *P-lutzii*

A análise do transportador aminoácido permease em *P-lutzii* demonstrou a indução do transportador nos tempos de iniciais de 12hs e 24hs nas condições de depleção de nitrogênio, onde foi expresso cerca de 8 vezes para

o tempo de 12hs enquanto que para 24hs a expressão foi 2 vezes (figura 02). Sendo assim GAP é inicialmente regulado após as primeiras 12hs de depleção de nitrogênio refletindo a necessidade da célula se ajustar as concentrações intracelulares de nitrogênio quando os níveis vão se tornando insuficientes na célula, como pode ser visualizado no Gráfico 02.

PCR Tempo Real_GAP

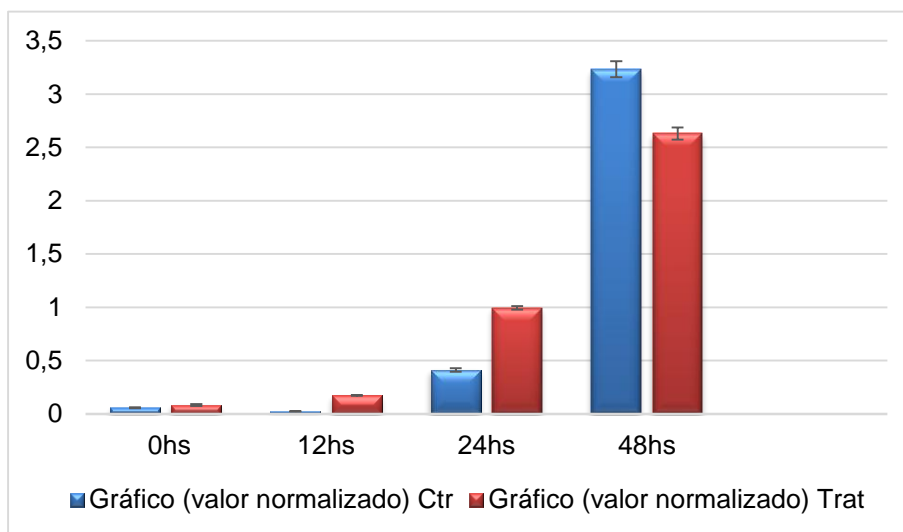


Gráfico 02. qRT-PCR do gene GAP: o transportador GAP de *P-lutzzii* foi analisado nos tempos de 0hs, 12hs, 24hs e 48hs. O tempo de 12hs do tratamento depleto de nitrogênio demonstrou ter um nível de expressão 8 vezes maior em relação ao controle que foi suplementado com glutamina. Os dados foram normalizados usando o gene constitutivo tubulina alpha -1 como controle endógeno. O meio tratado se encontra na coluna de cor azul e o meio tratado se encontra na coluna de cor vermelha.

3.2 Perfil qualitativo das proteínas secretadas pelo *P-lutzzii*

O perfil qualitativo das proteínas no tempo de 12 e 24h foram avaliados por meio do gel de poliacrilamida SDS-PAGE. Através dele é possível visualizar as bandas protéicas, mostrando a boa qualidade do extrato, figura 06.

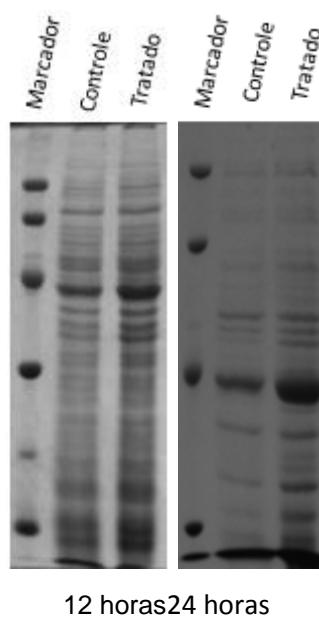


Figura 06. Análise de eletroforese em gel de Poliacrilamida SDS-Page das proteínas do fungo: *P-lutzi* sob condições de Controle (+N) e Tratamento (-N). Tendo o Marcador molecular, baixo peso- GE, KDa- Kilodalton.

3.3 Análises proteômicas

A análise das amostras vão ser realizadas por meio de cromatografia líquida de alta performance (*hplc – high performance liquid chromatography*) acoplada a espectrometria de massas no MALDI-Synapt MS™ (Waters- Micromass, Manchester, UK). No entanto, as tabelas das proteínas secretadas nos tempos de 12 e 24 horas ainda estão sendo confeccionadas para posteriormente serem feitas as identificações nos bancos de dados. Os bancos de dados utilizados para a identificação das proteínas serão: Pedant (http://pedant.helmholtzmuenchen.de/pedant3htmlview/pedant3view?Method=analysis&Db=p3_r48325 Par lutzi) que será utilizado para identificar a classificação funcional das proteínas, KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/kegg2.html>) e Uniprot (<http://www.uniprot.org/blast/uniprot/2014010852251JRJDX>) que serão utilizados para identificação de enzimas e anotação das proteínas, respectivamente. O banco de dados MIPSFuncat (<http://mips.helmholtzmuenchen.de/genre/proj/yeast/listSearch.html?order=entry>) que será utilizado para predizer a categoria funcional.

4 DISCUSSÃO

Os fungos têm capacidade de utilizar uma variedade de compostos nitrogenados, isso evidencia que em condições regulares do metabolismo, esses compostos que são facilmente obtidos pela célula é também os preferenciais, como a fonte primária de nitrogênio amônia e glutamina (CRUZ-LEITE, 2014). No entanto, esses compostos nem sempre estão facilmente acessíveis no hospedeiro em razão das barreiras formadas pelo sistema imunológico (COUTO, et al., 1994; TAYLOR; DUARTE-ESCALANTE, 1995; MACHADO, et al., 2004).Essas condições levam o patógeno a se adaptar as mudanças optando-se por fontes secundárias, para isso é necessário que ocorra uma regulação metabólica na célula para realização do catabolismo de fontes secundárias de nitrogênio para que se mantenham ao alcance do equilíbrio e cresça em meio onde há depleção do nitrogênio (FRASER et, 2001; STARICH et al.,1998).

O sistema regulatório vem seguido da transcrição de genes que são responsáveis pelo catabolismo dessas fontes secundárias. Em fungos ocorre pela Repressão Catabólica do Nitrogênio-NCR por meio da regulação pós-transcricional dos fatores de transcrição da família GATA responsável pela síntese de enzimas e permeases fundamental para captação dessas fontes não preferenciais de nitrogênio na célula (COFFMAN et al., 1997; Fraser et al., 2001; Starich et al.,1998).

A NCR em fungos é mediada pela captação de fontes de nitrogênio extracelular realizada pelo transportador aminoácido permease GAP, que é um importante mecanismo de ajuste que os micro-organismos possuem, onde a captação mediada por transportadores de fontes nitrogenados é um dos passos essenciais no crescimento para a célula fúngica (Limjindaporn et al., 2003). A expressão dos genes que codificam transportadores de compostos nitrogenados GAP1, DAL5 e UGA4 que codificam aminoácido permeasse, alantoato permeasse e ácido γ -aminobutírico permeasse, respectivamente, são sensíveis a regulação NCR em *C.albicans* e também relatado em *S. cerevisiae* (Coffman et al., 1996; Limjindaporn et al., 2003).

Neste sentido, a análise do secretoma do *P-lutzii* em condições de depleção de nitrogênio é uma ferramenta que incluirá novas informações sobre

a biologia do fungo em condições que mimetizam a privação do hospedeiro. A identificação dessas proteínas abre caminho para a elucidação de possíveis mecanismos de sobrevivência desse patógeno em tecidos hospedeiros, bem como mecanismo de interação patógeno-hospedeiro.

5 CONCLUSÃO

O presente trabalho demonstra as primeiras modificações na regulação do metabolismo de nitrogênio em *P. lutzii*, onde as análises da expressão do gene transportador de aminoácido permeasse que é um marcador para a NCR foi identificado no fungo. Esses primeiros estudos servem para o suporte da elucidação de novas proteínas e enzimas que participam ativamente do catabolismo das fontes não preferenciais de nitrogênio na célula.

Alem disso, esses estudos podem auxiliar na busca de possíveis alvos farmacológicos e desenvolvimento para novas pesquisas em diversas áreas de conhecimento, principalmente em relação à *Paracoccidioides spp* que pouco se tem descrito sobre a influência do nitrogênio e sua regulação.

6.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBUQUERQUE, P. C. et al. Vesicular transport in *Histoplasma capsulatum*, an effective mechanism for trans-cell wall transfer of proteins and lipids in ascomycetes. *Cell Microbiol*; p.1695–1710. [PubMed: 18419773] 2008.

BAILÃO, A. M. et al. Differential gene expression by *Paracoccidioides brasiliensis* in host interaction conditions : Representational difference analysis identifies candidate genes associated with fungal pathogenesis. **Microbes and infection / Institut Pasteur**, v. 8, p. 2686–2697, 2006.

BARROS, B. H. R. et al. A proteomic approach to identifying proteins differentially expressed in conidia and mycelium of the entomopathogenic fungus *Metarhizium acridum*. **Fungal biology**, v. 114, n. 7, p. 572–9, jul. 2010.

BOLTON, M. D.; THOMMA, B. P. H. J. The complexity of nitrogen metabolism and nitrogen-regulated gene expression in plant pathogenic fungi. **Physiological and Molecular Plant Pathology**. n 72, p. 104– 108, 2008.

BORGES, C. L. et al. The antigenic and catalytically active formamidase of *Paracoccidioides brasiliensis*: protein characterization, cDNA and gene cloning, heterologous expression and functional analysis of the recombinant protein. *Microbes and infection / Institut Pasteur*, v. 7, p. 66–77, 2005.

BORGES, C. L. et al. Detection of a homotetrameric structure and protein-protein interactions of *Paracoccidioides brasiliensis* formamidase lead to new functional insights. **FEMS Yeast REs**, v. 10, p. 104–113, 2010.

BRAAKSMA et al. An inventory of the *Aspergillus niger* secretome by combining *in silico* predictions with shotgun proteomics data. **BMC Genomics** 2010, 11:584.

BROACH, J. R. Nutritional control of growth and development in yeast. **Genetics**, v. 192, n. 1, p. 73–105, set. 2012.

BRUMMER, E.; CASTANELA, E.; RESTREPO, A. *Paracoccidioidomycosis*: na update. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 6, p. 89-117, 1993.

CARRERO, L. L. ET AL. New *Paracoccidioides brasiliensis* isolate reveals unexpected genomic variability in this human pathogen. *Fungal genetics and biology: FG & B*, v. 45, n. 5, p. 605-12, mai., 2008.

COFFMAN, J. A. et al. Cross regulation of four GATA factors that control nitrogen catabolic gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of bacteriology**, v. 179, n. 11, p. e3416, 1997.

COUTO, M. A. et al. Inhibition of Intracellular *Histoplasma capsulatum* replication by murine macrophages that produce human defensin. **Infection and Immunity**, v. 62, n. 6, p. 2375-2378, 1994.

CONWAY, M. K.; GRUNWALD, D.; HEIDEMAN, W. Glucose, nitrogen, and phosphate repletion in *Saccharomyces cerevisiae*: common transcriptional responses to different nutrient signals. **G3 (Bethesda, Md.)**, v. 2, n. 9, p. 1003–17, set. 2012.

CONTI-DIAZ, I. A. (2007). On the unknown ecological niche of *Paracoccidioides brasiliensis*: our hypothesis of 1989: present status and perspectives. **Rev Inst Med Trop São Paulo** 49(2): 131-134.

CUERVO, P.; JESUS, J.B.; SABOIA-VAHIA, L.; MENDONÇA-LIAM, L.; DOMONT, G.B.; CUPOLILLO, E. (2009). Proteomic characterization of the released/secreted proteins of *Leishmania (Viannia) braziliensis* promastigotes. **Journal of Proteomics**. 73, p. 79-92.

CHAVES, D. F. S.; SOUZA, E. M.; MONTEIRO, R. A.; PEDROSA, F. O. (2009). A two-dimensional electrophoretic profile of the proteins secreted by *Herbaspirillum seropedicae* strain Z78. **Journal of proteomics**. 73, p. 50-56.

DAVIS, M. A.; HYNES, M. J. Complementation of *areA*- regulatory gene mutations of *Aspergillus nidulans* by the heterologous regulatory gene *nit-2* of *Neurospora crassa*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 84, n. June, p. 3753–3757, 1987.

FRASER, J. A.; DAVIS, M. A.; HYNES, M. J. The Formamidase Gene of *Aspergillus nidulans*: Regulation by Nitrogen Metabolite Repression and Transcriptional Interference by an Overlapping Upstream Gene. **Genetics**, v. 157, p. 119–131, 2001.

GODARD, P. et al. Effect of 21 different nitrogen sources on global gene expression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular and cellular biology**, v. 27, n. 8, p. 3065–86, abr. 2007.

GROSSKLAUS, D. A. Perfil proteômico de leveduras de *Paracoccidioides* após estresse oxidativo. xii, 109p. **Tese (doutorado) – Universidade de Brasília, Faculdade de Medicina, Pós-Graduação em Patologia Molecular**, 2012.

HOLBROOK, E. D.; EDWARDS, J. A.; YOUSEFF, B. H., RAPPLEYE, C. A. (2011). Definition of the extracellular proteome of pathogenic-phase *Histoplasma capsulatum*. **Journal of proteome research**, 10(4), p. 1929–1943.

HUERGO, L. F. Regulação do Metabolismo de Nitrogênio em *Azospirillum brasiliense*. **Tese de Doutorado em Ciências – Bioquímica. Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Paraná**, p. 187. Curitiba, 2006.

LEE, I. R.; MORROW, C. A.; FRASER, J. A. Nitrogen regulation of virulence in clinically prevalent fungal pathogens. **FEMS microbiology letters**, v. 345, n. 2, p. 1–8, ago. 2013.

MACHADO, P.R.L. et al. Mecanismos de resposta imune às infecções. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 79, n. 6, p. 647-664, 2004.

MATUTE, D. R.; MCEWEN J. G.; PUCCIA, R.; MONTES, B. A.; SAN-BLAS G.; BAGAGLI, E.; RAUSCHER, J. T.; RESTREPO, A.; MORAIS, F.; NINO-VEGA, G.; TAYLOR, J. W. **Cryptic speciation and recombination in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* as revealed by gene genealogies**. *Mol Biol Evol* 23: 65-73, 2006.

MARQUES, E. R. **Caracterização molecular de genes preferencialmente expressos na fase leveduriforme patogênica de *Paracoccidioides brasiliensis* através das técnicas de “Macroarray” e de SSH (“Suppression Subtractive Hybridization”)**. Ribeirão Preto, (2005). 140p. : II.; 30 cm.

MERRICK, M. J.; EDWARDS, R. A. Nitrogen control in bacteria. **Microbiological reviews**, v. 59, p. 604 – 622, 1995.

MATUTE, D. R. et al. Cryptic speciation and recombination in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* revealed by gene genealogies. **Molecular biology and evolution**, v. 23, n. 1, p. 65–73, jan. 2006.

NOMBELA, C.; Gil, C.; CHAGGIN, W. L. (2006). Non-conventional protein secretion in yeast. **Trends Microbiol.** 14(1), p. 15-21.

PARENTE, J. A. et al. A secreted serine protease of *Paracoccidioides brasiliensis* and its interactions with fungal proteins. **BMC Microbiology**, v. 10, n. 1, p. 292, 2010.

RAMACHANDRA, S.; LINDE, J.; BROCK, M. **Regulatory Networks Controlling Nitrogen Sensing and Uptake in *Candida albicans***, p. 1-11, 2014

RAMOS E SILVA, M.; SARAIVA, L.(2008). **Paracoccidioidomycosis**. *Dermatol Clin* 26: 257–269.

RANGANATHAN, S.; GARG, G. (2009). Secretome: clues into pathogen infection and clinical applications. *GENOME MED.* 1(11), p.113.

RESTREPO-MORENO, A.; GREER, D. L. (1983). "Paracoccidioidomycosis. In: **AF Di-Salvo, Occupational Mycoses, Philadelphia: Lea &Febiger**". 43-64.

RESTREPO, A.; SALAZAR, M. E.; CANO, L. E.; STOVER, E. P.; FELDMAN, D.; STEVENS, D. A. Estrogens inhibit mycelium – to – yeast transformation in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*: implications for resistance of females to paracoccidioidomycosis. **Infection and Immunity**, v. 46, n. 2, p. 346-353, 1984.

RESTREPO A, MCEWEN, J. G.; CASTAÑEDA, E. The habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*: how far from solving the riddle? **MedMycol.** 2001 Jun; 39 (3):233-41.

Restrepo, A. (1978). **Paracoccidioidomycosis**. *Acta. Med. Colomb.* 3: 33-36.

RICHINI-PEREIRA, V. B.; BOSCO S. D.; GRIESE, J.; THEODORO, R. C.; MACORIS, S. A.,; DA SILVA, R. J.; BARROZO; L.; TAVARES, P. M.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R. M.; ANDBAGAGLI, E. Molecular detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in roadkilled wild animals. **MedMycol.** 2008 Feb; 46(1):35-40.

RODRIGUES, M. L.; NAKAYASU, E. S.; OLIVEIRA, D. L.; NIMRICHTER, L.; NOSANCHUK, J. D.; ALMEIDA, I. C.; CASADEVALL, A. **Extracellular vesicles produced by *Cryptococcus neoformans* contain protease components associated with virulence**. *Eukaryot Cell.* 2008; 7(1):58–67. [PubMed: 18039940].

SAN-BLAS, G.; SAN-BLAS, F.; RODRIGUEZ, L. E. & CASTRO, C. J. (1987). A model of dimorphism in pathogenic fungi: *Paracoccidioides brasiliensis*. **Acta Cient Venez** 38(2), p. 202-211.

SILVA, M. G. **Ensaio de duplo-híbrido e Pull-down no estudo de interações moleculares da Beta-1,3-glicosiltransferase 3 de *Paracoccidioides brasiliensis***.(2010). xv, 81 f. : Il., figs, tabs. Goiânia-GO.

SILVA, A. S. et al. Proteomic analysis of the secretions of *Pseudallescheria boydii*, a human fungal pathogen with unknown genome. **J Proteome Res**, v. 2012, n. 11, p. 172-188, 2011.

SHATZ, G. AND DOBBERSTEIN B.(1996) Common principles of protein translocation across membranes. "Science 271 (5255): 1519-1526 Restrepo-Moreno, A.; Greer, D.L.; (1983). "Paracoccidioidomycosis. In: **AF Di-Salvo, Occupational Mycoses, Philadelphia: Lea &Febiger**". p. 43-64.

Shikanai-Yasuda MA, Filho FQT, Mendes RP, Colombo AL, Moretti ML e Grupo de Consultores do Consenso em Paracoccidioidomicose. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, mai-jun, 2006, p. 297-310

STARICH, M. R. et al. The solution Structure of a Fungal AREA Protein-DNA Complex: An Alternative Binding Mode for the Basic Carboxyl Tail of GATA factors. **Mol. Biol.**, v. 277, p. 605-620, 1998.

TAYLOR, M. L.; DUARTE-ESCALANTE, E. Strategies of *Histoplasma capsulatum* for evading the cytotoxic mechanisms of phagocytes. **Rev invest clin**, v. 47, n. 6, p. 499-506, 1995.

VALLEJO, M. C.; MATSUO, A. L.; GANIKO, L.; MEDEIROS, L. C.; MIRANDA, K.; SILVA, L. S.; FREYMULLER-HAAPALAINEN E.; SINIGAGLIA-COIMBRA, R.; ALMEIDA, I. C.; PUCCIA, R. **The pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* exports extracellular vesicles containing highly immunogenic alpha-Galactosyl epitopes**. *Eukaryot Cell*. 2011; 10(3):343–351. [PubMed: 21216942].

VALLEJO, M.C. et al. Vesicle and vesicle-free extracellular proteome of *Paracoccidioides brasiliensis*: comparative analysis with other pathogenic fungi. **J Proteome Res**, v. 11, n.3, p. 1676-85, 2012.

WEBER, S. S. et al. Analysis of the secretomes of *Paracoccidioides mycelia* and yeast cells. **PloS one**, v. 7, n. 12, p. e52470, jan. 2012.

WILKINS, M. R. et al. Progress with Proteome Projects: Why all Proteins Expressed by a Genome Should be Identified and How To Do It. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v. 13, n. 1, p. 19–50, dez. 1996.

WITTMANN-LIEBOLD, B.; GRAACK, H. R.; POHL, T. Two-dimensional gel electrophoresis as tool for proteomics studies in combination with protein

identification by mass spectrometry. **Proteomics**, v. 6, n. 17, p. 4688–703, set. 2006.