

## ANÁLISE METALÔMICA DO *Paracoccidioides brasiliensis* DURANTE A INFECÇÃO EM MACRÓFAGOS

Leandro do Prado Assunção<sup>1</sup>  
Aline Brito de Souza<sup>2</sup>  
Alexandre de Melo Bailão<sup>3</sup>

### RESUMO

Várias espécies de fungos têm emergido como patógenos humanos e tem ganhado atenção especial na saúde pública. Entre estas, uma em particular tem sido muito bem descrita, a paracoccidioidomicose (PCM), uma micose sistêmica causada pelo fungo *Paracoccidioides brasiliensis*. Durante a infecção o *Paracoccidioides* precisa de uma variedade de elementos dentro do hospedeiro para sobrevivência. Os micronutrientes metálicos são elementos requeridos para homeostase em vários microrganismos e são essenciais para manter homeostase celular e tem uma boa participação em inúmeros processos metabólicos. Neste trabalho foi realizada análise metalômica quantitativa do *P. brasiliensis* durante a infecção em macrófagos e, posteriormente, procedeu-se à análise *in silico* para identificação dos domínios de ligação a metais das proteínas identificadas. Usando a cromatografia líquida alta afinidade acoplada ao espectrômetro de massas, foram detectadas mudanças significativas nos níveis de magnésio, manganês e zinco em leveduras recuperadas de macrófagos. Também foi detectada uma diferença significativa nos níveis de cálcio e cobalto em macrófagos J774 infectados quando comparados com os não infectados. Esses resultados indicam que a limitação de Mg, Mn, Zn, Cu e Fe podem ser um mecanismo que os macrófagos desenvolveram para impedir a sobrevivência de fungos durante a infecção. Houve um aumento significativo nos níveis de cálcio e cobalto em macrófagos infectados, indicando que esses micronutrientes podem desempenhar importante papel nos mecanismo de defesa contra *P. brasiliensis*. Estes resultados sugerem que outros metais, além dos já descritos ferro e cobre, desempenham funções cruciais na interação *P. brasiliensis*-macrófago e sua homeostase poderiam ser alvos de estudos e tratamentos.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Paracoccidioides brasiliensis*, Análise Metalômica e Infecção de Macrófagos.

APOIO FINANCEIRO: CNPq e FUNAPE

---

<sup>1</sup>Acadêmico do Curso de Farmácia da Faculdade União de Goyazes.

<sup>2</sup>Orientadora: Prof. Esp. Aline Brito de Souza da Faculdade União de Goyazes.

<sup>3</sup>Co-Orientador: Prof. Dr. Alexandre Melo Bailão da Universidade Federal de Goiás.

## **Metalloimic Analysis of *Paracoccidioides brasiliensis* during macrophage infection**

### **ABSTRACT**

Several fungal species have been emerging as human pathogens and have gained special attention in public health. Among these, *Paracoccidioides brasiliensis* presents as the causative agent of the systemic mycosis called Paracoccidioimycosis (PCM). It is a dimorphic pathogen which presents two forms, yeast at 37°C and mycelium at 25°C. During infection *Paracoccidioides* needs a variety of elements to survive within the host. The metallic micronutrients are essential elements required for the cell homeostasis in virtually all organisms. Metals have a great participation in countless metabolic processes, such as DNA metabolism, regulation of protein synthesis, virulence, DNA synthesis, amino acid metabolism, the post transcriptional mechanism and others. In this work it was performed a quantitative metalloimic analysis of *P. brasiliensis* during infection of bone marrow derived macrophages (BMDM) and J774 immortalized lineage. Also it was evaluated the importance of iron availability in fungus-macrophage interaction. Fungal cells recovered from macrophages, treated with iron citrate, revealed higher survival rate compared with non-treated ones. Using Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS), we detected a significant change in magnesium, manganese and zinc levels in yeast cells recovered from macrophages. Additionally, a clear decrease in copper and iron amounts was also seen. It was also detected a significant increase in the levels of calcium and cobalt in infected J774 macrophages when compared with non infected ones. These results indicate that the limitation of Mg, Mn, Zn, Cu and Fe might be a mechanism of macrophages to hinder the fungal survival during infection. It was observed an increase of calcium and cobalt amounts in infected macrophages indicating that those micronutrients might be important to an efficient immune response against *P. brasiliensis*. These findings suggest that other metals, beyond iron and copper, play crucial functions in the *P. brasiliensis*-macrophage interaction and their homeostasis could be targets for further studies and treatments.

**KEYWORDS:** *Paracoccidioides brasiliensis*, Metalloimic Analysis and Macrophage Infection.

FINANCIAL SUPPORT: CNPq and FUNAPE

## 1-INTRODUÇÃO

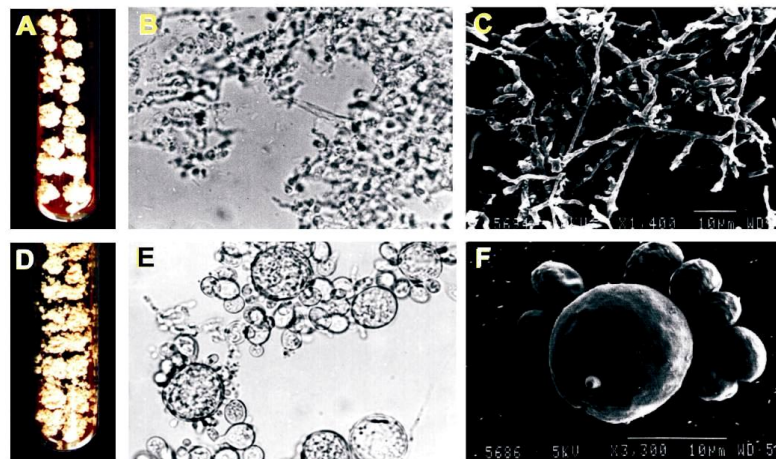
### 1.1-Aspectos gerais do fungo *Paracoccidioides brasiliensis*

Os fungos são microrganismos caracterizados por se apresentarem em todos os ecossistemas. Podem ser de vida livre e saprobiótica, sendo um agente fundamental nas bases das cadeias e teias alimentares, fazendo a decomposição de matéria orgânica. Esses microrganismos tem papel fundamental na saúde dos animais, causando desde micoses classificadas como cutâneas até micoses sistêmicas (MURRAY et al. 2004; SCHAECHTER et al. 2002). Embora existam aproximadamente 100.000 espécies fúngicas, apenas uma pequena parcela apresenta risco para a saúde humana (SAN-BLAS & NIÑO, 2004). Dentro desse pequeno grupo de fungos patogênicos estão os fungos dimórficos, que são responsáveis pela maior parte das infecções fúngicas sistêmicas de humanos e outros mamíferos (CHEN et al., 2007; NEMECK et al., 2007). O processo da doença é marcado pela mudança de morfologia, onde o fungo transita da forma infecciosa não patogênica, presente no ambiente, para a forma patogênica, encontrado no tecido hospedeiro.

Os organismos causadores de micoses sistêmicas humanas são especificamente virulentos, como é o caso do *Paracoccidioides brasiliensis*, agente etiológico da Paracoccidioidomicose, doença restrita à América Latina que foi descrita pela primeira vez por Adolph Lutz, em 1908, que isolou o fungo de pacientes que apresentavam granulomas ganglionares e lesões na mucosa. O *P. brasiliensis* pertence ao filo *Ascomycota*, Subdivisão *Euascomycotina*, subclasse *Euascomycetidae*, Ordem *Onygenales*, Família *Onygenaceae* do qual também fazem parte os fungos *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis*, *Blastomyces dermatitidis* e *Penicillium marneffeii* (SAN-BLAS e NIÑO Veja, 2004; NEMECK et al., 2006; SANTOS et al. 2011).

Todos esses microrganismos apresentam algumas características em comum como, por exemplo, termodimorfismo, onde a sua morfologia varia de acordo com a temperatura. Esses microrganismos podem se apresentar de duas formas: micélio, encontrado em temperatura entre 25 e 27°C no ambiente ou cultivado *in vitro* em laboratório, também na forma de levedura, encontrada em temperaturas

que variam de 35 a 37°C no tecido do hospedeiro ou cultivada *in vitro* em laboratório (PETERSON e SINGLER, 1998). Além da temperatura, fatores nutricionais também podem influenciar no dimorfismo do fungo onde experimentos realizados por Villarl, em 1998, mostraram que a adição de soro fetal bovino tanto à meio de cultura complexo quanto à meio quimicamente definido permitiu preservar a expressão fenotípica de leveduras a 25° C. A forma miceliana do *P. brasiliensis* é caracterizada por hifas septadas, com a presença de conídios. Já as células leveduriformes são caracterizadas por serem constituídas por múltiplos brotamentos, originados de uma célula-mãe, onde uma célula central é grande e circundada por células periféricas menores, apresentando uma estrutura semelhante a uma roda de leme de navio como mostrado na figura 01 (RESTREPO et al, 2008).



**Figura 01.** Aspectos morfológicos macro e microscópicos de *P. brasiliensis*. A, B e C referem-se à forma miceliana enquanto D, E e F à forma leveduriforme (Modificada de Brito, 1996).

## 1.2-Paracoccidioidomicose (PCM)

A PCM é caracterizada por ser uma micose sistêmica granulomatosa (RAMOS; SILVA & SARAIVA, 2008), que pode evoluir de duas formas principais. A forma aguda, também conhecida como forma juvenil, é a evolução mais grave da doença e acomete principalmente jovem e crianças, representando de 3 a 5% dos casos. A forma adulta ou crônica tem progressão mais lenta e representa mais de 90% dos casos (MONTENEGRO 1986; FRANCO et al. 1987). O processo infeccioso causado por esse fungo se dá por meio da inalação de propágulos presentes no

ambiente que tem como destino os alvéolos pulmonares, onde o fungo transita da forma miceliana para a forma de levedura e, quando dentro do organismo, o microrganismo pode ter dois destinos, ser destruído totalmente ou persistir se disseminar no organismo a partir dos pulmões. O fungo pode alcançar órgãos e sistemas, como fígado, baço e sistema nervoso central, tanto por meio da via hematogênica, quanto através da via linfática (SAN-BLAS, 1993; VALERA et al., 2008). No Brasil, essa micose foi considerada a oitava moléstia entre infecções crônicas e doenças parasitárias que levam o indivíduo a óbito (TABORDA et al., 2008). A referida micose ainda foi descrita em países como Chile, Guatemala, Belize e Antilhas, como casos isolados (RAMOS; SILVA & SARAIVA, 2008).

Relatos atuais indicam que, em países Latino-Americanos, cerca de 10.000 pessoas já foram infectadas e 2% desses indivíduos desenvolveram a doença (RAMOS; SILVA & SARAIVA, 2008). Dentre esses que desenvolveram a doença, mais de 80% são adultos do sexo masculino. Esse fato ocorre pela influência do hormônio  $\beta$ -estradiol no processo de transição do fungo na fase miceliana para a fase leveduriforme no tecido hospedeiro. A relação entre o hormônio feminino e a inibição da transição dimórfica *in vitro* foi relatada por Restrepo e colaboradores em 1984 e foi confirmada por experimentos de infecção em camundongos fêmeas, onde foi possível observar a inibição da transição dimórfica (ARISTIZABAL et al, 1998), sugerindo o efeito protetor do  $\beta$ -estradiol. Embora o hormônio  $\beta$ -estradiol tenha um papel fundamental na incidência de casos de PCM em indivíduos do sexo masculino, não é o único fator envolvido na proteção de indivíduos do sexo feminino contra a infecção pelo fungo *P. brasiliensis*. Estudos realizados por Pinzan e colaboradores em 2010, mostraram uma maior produção das citocinas IL-12, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  por células do baço de camundongos fêmeas em resposta à paracoccina de *P. brasiliensis*. Uma glicoproteína encontrada na superfície celular, sendo capaz de estimular os macrófagos a produzir citocinas e óxido nítrico, podendo influenciar a resposta imune contra o patógeno. Já em células de camundongos machos, apresentaram maior produção de IL-10, sugerindo respostas imunológicas diferentes entre os sexos. A partir dos estudos realizados por Pinzan e colaboradores, pode-se observar que a maior proteção apresentada por indivíduos do sexo feminino contra a infecção por *P. brasiliensis* ocorre tanto pela influência hormonal quanto pela resposta imunitária diferenciada.

### 1.3-Importância da aquisição de nutrientes durante o processo infeccioso

Os microrganismos patogênicos, durante a infecção, precisam de uma variedade de elementos obtidos do hospedeiro para suprir suas necessidades e persistir no organismo (BROCK, 2009). Os micronutrientes são alguns desses elementos necessários para a homeostase do organismo, como é o caso dos íons metálicos (SHEFTEL et al., 2012). Os íons metálicos são elementos essenciais para manter o funcionamento celular, já que esses íons tem grande participação em inúmeros processos metabólicos como, por exemplo, no metabolismo de DNA, regulação da síntese proteica e no processamento pós-transcricional da maioria das proteínas (NELSON, 1999). Dessa maneira, na célula, são encontrado mecanismos homeostáticos que garantem as concentrações necessárias dos metais para a sobrevivência celular (RUTHERFORD et al., 2004). Em meio intracelular, desenvolvem-se dois mecanismos de homeostase de metais, onde estes são transportados para o lúmen de organelas ou imobilizados em vacúolos (DESBROSSES et al, 2005). Os metais são captados pela célula por transportadores específicos presentes na membrana celular como, por exemplo, os transportadores TfR, Zrt e Ctr pertencentes aos íons Fe, Zn e Cu. Esses três íons são os mais abundantes em sistemas biológicos (RUTHERFORD et al, 2004). Estudos realizados em *Saccharomyces cerevisiae* mostram uma grande quantidade de genes que atuam em transportadores de íons metálicos como, por exemplo, os genes que ativam a Aft1p que estão direta ou indiretamente envolvidos na captura de ferro em nível de membrana plasmática onde essa proteína é regulada pela concentração de ferro no ambiente intracelular, uma vez que, em condição de abundância de ferro, Aft1p encontra-se no citosol, enquanto que, em condições de privação de ferro, esse fator transcricional se acumula no núcleo ativando a transcrição (VAN HO et al, 2002; SHAKOURY-ELIZEH et al, 2004). Estudos realizados por Rutherford e Bird (2004), demonstraram que mecanismos regulatórios da captação de metais funcionam em rede, mais tarde comprovados pelos estudos de Dainty et al, (2008) que mostraram que a Fet4 (permease de baixa afinidade de ferro) pode ser regulada pelos íons ferro, zinco e oxigênio.

O átomo de ferro é o elemento mais abundante no organismo e possui a capacidade de doar e receber elétrons. A partir dessa propriedade, pode ser encontrado em dois estados ionizantes,  $Fe^{3+}$  (íon férrico/estado oxidado) sendo esse

insolúvel, portanto não reativo e  $\text{Fe}^{2+}$  (íon férrico/estado reduzido), sendo esse estado solúvel e reativo (IBRAHIM et al, 2008). Essa habilidade de óxido-redução apresentada pelo ferro permite a esse elemento realizar reações químicas para manter a homeostase em sistemas biológicos (GANZ & NEMETH 2006). Dessa forma, o ferro desempenha um papel fundamental em processos celulares vitais como as reações de transferência, conservação de energia, síntese de biomoléculas e reparo de DNA (ROSCH et al. 1987; LUKIANOVAN & DAVID 2005; LILL & MUHLENHOFF 2008). No entanto, essa alta reatividade é responsável pela toxicidade elevada desse íon. Os íons ferro, quando livres no ambiente, reagem oxidando as moléculas orgânicas e formando radicais livres, que são compostos altamente reativos capazes de provocar graves danos ao organismo (ANDERSON et al, 2007). Devido a essas características de alta toxicidade e ser um elemento essencial em diversos sistemas biológicos, são encontrados na célula mecanismos de transporte e armazenamento para manter a homeostase desse elemento (DOHERTY, 2007). O transporte de ferro na célula tem grande importância para regular a quantidade da concentração desse íon no meio intracelular, uma vez que esse elemento, em grande quantidade, pode causar danos ao organismo (ANDERSON et al, 2007). A captação desse elemento é feita por receptores específicos na membrana, como por exemplo, o Trf, um transportador específico da transferrina que regula a endocitose do ferro ligado a esta proteína e também desempenha outras funções (AISEN, 2004). O armazenamento desses íons também é dependente de moléculas proteicas. Em mamíferos, esse processo é mediado, principalmente, pela ferritina (proteína globular encontrada no citoplasma, mitocôndria e núcleo), que é a mais importante reserva de ferro do organismo. Essas moléculas estão envolvidas na homeostase de ferro também em bactérias, plantas e outros animais. Todos esses mecanismos de transporte e armazenamento de ferro em mamíferos tem como principal função impedir a oxidação de moléculas orgânicas e manter a concentração extracelular desse íon baixa podendo potencializar mecanismos de defesa contra microrganismos (BULLEN et al, 2005). Uma vez que a capacidade de adquirir ferro de um microrganismo no ambiente hospedeiro é determinante para o estabelecimento da infecção, tanto que estratégias utilizadas para captar ferro no tecido hospedeiro são consideradas um fator de virulência (KORNITZE, 2009). A aquisição desse elemento por microrganismos ocorre de três maneiras: secreção de sideróforos, redução do  $\text{Fe}^{3+}$  a

$\text{Fe}^{2+}$  e sequestro de ferro de proteínas férricas (JACOBSON et al, 1998). Em contra partida, o hospedeiro impõe ao patógeno a limitação da disponibilidade de ferro como estratégia para diminuir a eficiência da colonização e assim dificultar o estabelecimento da infecção (DENIC & AGARWAL, 2007).

O cobre é um íon metálico quimicamente semelhante ao ferro, que também apresenta potencial redox, onde transita da forma  $\text{Cu}^{1+}$  a  $\text{Cu}^{2+}$  (VAN HO et al, 2002). A importância desse elemento nos processos biológicos é a grande quantidade de proteínas e enzimas dependentes desse metal como, por exemplo, na respiração, crescimento celular, aquisição de ferro, pigmentação (melanização) e outros processos biológicos complexos. Assim como o íon ferro, o cobre também apresenta toxicidade em grandes quantidades ou quando se tornam reativos ao oxigênio causando danos aos lipídeos, proteínas e ao DNA. Consequentemente, os organismos criaram mecanismos para manter a homeostase de cobre no meio intracelular, desenvolveram transportadores específicos, onde estudos realizados com *S. cerevisiae* permitiram propor um modelo de transporte de cobre de alta afinidade (CTR) em células eucarióticas onde o cobre extracelular é reduzido de  $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{Cu}^{1+}$  pelas redutases férricas de superfície celular Fre1 e Fre2 (BEAUDOIN & LABBE, 2007). Em fungos, uma resposta comum das células aos níveis elevados de cobre é reprogramar a transcrição de genes que são importantes para a captura de cobre, de modo a manter as concentrações de cobre dentro dos limites homeostáticos, permitindo que a quantidade do mesmo seja suficiente para servir como cofator e impedir sua acumulação a níveis citotóxicos (BEAUDOIN et al, 2009). As proteínas da família CTR apresentam três domínios transmembrânicos ricos em metioninas onde as proteínas CTR1 e CTR3 são encontradas na membrana da célula regulando o transporte de cobre do meio extracelular para o intracelular. Experimentos com imunofluorescência realizados em *S. cerevisiae* mostram que a proteína CTR2 está localizada no vacúolo onde ela regula o excesso de cobre intracelular, transportando e armazenando esse íon no vacúolo. Estudos realizados por KIM et al, 2008 com *C. neoformans* mostraram outros mecanismos de captação de cobre, onde este atravessa a membrana plasmática e se ligam a pequenas moléculas solúveis que promovem o transporte do cobre até o alvo.

O zinco é um metal essencial nos sistemas biológicos. Apesar de não possuir características de oxido-redução, apresenta-se como um forte ácido de Lewis que tem a capacidade de formar complexos com vários tipos de geometria



(ALBERTS et al,1998). Essa característica mostra que o zinco é um importante regulador de vários processos bioquímicos, onde pode atuar como co-fator de inúmeras enzimas como, por exemplo, a RNA polimerase, sendo importante no processo de transcrição (GAITHER & EIDE, 2001). A aquisição de zinco é reconhecida como chave nos processos infectivo sem qualquer patógeno, onde estudos com *S. cerevisiae* demonstraram que o transporte desse íon metálico não é dependente somente da concentração de zinco, mas de fatores como temperatura e saturação do metal em meio intracelular (GAITHER & EIDE, 2001). A captação desse íon para o meio intracelular é através de moléculas específicas presentes na membrana como, por exemplo, as Zrt1 e Zrt2 estudadas em *S. cerevisiae* (KIM et al, 2008). Nesse estudo, foi mostrada que *Candida albicans* apresenta um fator de transcrição zinco-responsivo, *Crs1* (*Candida Supressor of ROK1/zinc-responsivetranscriptionfactor*), sintetizado por um gene homólogo ao gene *Zap1* em *S. cerevisiae* que regula a expressão dos genes codificantes para transportadores de zinco de alta (*zrt1*) e baixa afinidade (*zrt2*), sendo de extrema importância para o crescimento filamentosos e patogenicidade do fungo (ZHAO & EIDE, 1996). Estudos realizados por BAILÃO et al., 2006 mostraram que metaloproteínas específicas também podem ser reguladas por mais de um íon metálico como, por exemplo, permeasemembranar de zinco/ferro (ZRT1) e uma oxidase multi-cobre.

Além de Fe, Cu e Zn, outros metais como selênio, molibdênio e manganês também desempenham um importante papel nas funções celulares. Por exemplo, manganês apresenta-se como um importante ácido de Lewis, com propriedades de oxidação e redução, mas diferentemente do Fe e Cu, esse metal se apresenta de forma instável no seu potencial redox, principalmente em meios ácidos. Adicionalmente, como todos os metais de transição com potencial redox, o Mn também forma reativos de oxigênio. Além das propriedades óxido-redutivas, também tem grande participação nas reações metabólicas da fotossíntese em que desempenha papel chave no fotossistema 2 para oxidação da água em oxigênio (BLEACKLEY; MACGILLIVRAV, 2011). Em microrganismos, a importância desse elemento está relacionada com estresse oxidativo onde vários estudos relatam proteínas e outras moléculas dependentes de Mn como, por exemplo, a superóxido dismutase, catalases e peroxidases (BLEACKLEY; MACGILLIVRAV, 2011). Com a baixa concentração desse elemento no meio intracelular, a célula criou mecanismos

de armazenagem de manganês em organelas celulares específicas como mitocôndria, vesículas e peroxissomos.

#### **1.4- Metalômica e Metaloproteínas**

Metalômica e metaloproteômica são áreas que contribuem significativamente para o entendimento de sistemas biológicos. Estas áreas de estudo permitem investigar o papel, captação, transporte e estocagem de metais em sistemas biológicos (SHI & CHANCE, 2008). A metalômica é definida como a análise do total de metais em uma determinada amostra, tecido ou organismo e a metaloproteômica tem como foco explorar proteínas que se associam a metais (SHI & CHANCE, 2008). Os estudos destas duas áreas permitem conhecer a quantidade de metais em nível intracelular, a localização e a função que estes exercem quando associados a proteínas. A compreensão destas áreas auxilia no entendimento de sistemas biológicos mais complexos como, por exemplo, em um processo infeccioso (ZERKLE et al., 2005). O estudo da metalômica é feito através de diversas técnicas, que permitem uma abordagem *in vivo* e *in vitro* (CHAN, 2011). Dentre estas diversas técnicas, destacam-se três. A primeira é a espectrometria de massa (MS), com ionização por plasma (ICP) sendo denominada de ICP-MS. Essa técnica é muito sensível, capaz de detectar pequenas quantidades de metais e, além disso, múltiplos elementos metálicos simultaneamente. O ICP-MS se baseia no acoplamento de uma fonte de ionização por plasma, que permite a ionização das moléculas da amostra em altas temperaturas, com um espectrômetro de massas para separar e detectar os íons da devida amostra. A segunda técnica é a absorção espectroscópica de raios-X em larga escala, essa técnica faz análise direta de metaloproteínas e metais em tecidos e células (SHI et al., 2008; LOBINSKI et al., 2006). A terceira técnica é a busca de domínios conservados de proteínas que se ligam a metais, utilizando ferramentas de bioinformática, por meio da pesquisa direta no genoma do organismo ou pela análise de suas sequências proteicas, identificando, assim, a função e localização das metaloproteínas analisadas (BERTINI & CAVALLARO, 2009; ANDREINI et al., 2004). Além disso, podemos obter especificamente o tipo de metal ligante e a estruturação tridimensional das metaloproteínas. Portanto, este trabalho tem como objetivo realizar análise

metalômica e metaloproteômica do fungo patogênico *P. brasiliensis* durante a infecção de macrófagos.

## **2-MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1- Cultivos de *P. brasiliensis***

Foi utilizado o isolado 01 (ATCCMYA-826) e 18 de *P. brasiliensis*, tanto na forma de levedura como de micélio. As células leveduriformes foram cultivadas em meio Fava-Neto a 37°C por 7 dias (FAVA-NETO, 1995) e as micelianas a 22°C por 15 dias.

### **2.2- Obtenção e cultivos de macrófagos murinos e J774**

#### **2.2.1- Cultivo de macrófagos murinos**

Foram submetidos a eutanásia camundongos BALB/c machos, de 4-12 semanas de idade. Para a obtenção dos macrófagos, os fêmures foram lavados com PBS 1x (FORTIER e FALK, 2006). O preparado de células foi cultivado numa estufa a 37°C sob 5% de atmosfera de CO<sub>2</sub> em RPMI suplementado com soro fetal bovino (10%), aminoácidos não essenciais, GM-CSF 100 ng/mL e gentamicina 10 µg/mL e adicionamos GM-CSF nas células no 2º dia, no 6º dia e a partir do 8º dia as células já poderam ser utilizadas para infecção.

#### **2.2.2- Cultivo de macrófagos eternizados J774**

A linhagem de macrófagos J774 (ATCC TIB-67) foi cultivada em meio RPMI suplementado de soro fetal bovino, INF-gama, gentamicina e solução de vitaminas durante três semanas a 37°C em estufa de CO<sub>2</sub> a 5% até o seu crescimento. Posteriormente, foi realizado o repique do macrófagos até obtermos uma quantidade de 1x10<sup>6</sup> células/mL para infecção com *P. brasiliensis*.

### **2.3- Infecções dos macrófagos murinos e dos macrófagos eternizados J774**

Após oito dias de cultivo, o meio contendo as células não aderentes foi descartado e as células aderentes foram lavadas duas vezes com PBS 1x. Posteriormente, as células foram tratadas com tripsina a 37°C por 5 minutos. Os macrófagos foram removidos e lavados com PBS 1x. As células foram coletadas por centrifugação a 2.500 rpm por 10 minutos e ressuspendidas em RPMI 1640 na concentração de  $2 \times 10^6$  células/mL. Para os ensaios de infecção, foram adicionados  $2,5 \times 10^6$  células de *P. brasiliensis* em placa de 24 poços contendo em cada poço  $1 \times 10^6$  células/mL de macrófagos. Após 24 horas de co-cultivo na estufa de CO<sub>2</sub> 5%, as leveduras não fagocitadas foram descartadas e os macrófagos infectados lavados duas vezes com PBS 1x para completa remoção das células leveduriformes não aderidas. Os macrófagos infectados foram lisados com água ultra pura. As células fúngicas foram coletadas por centrifugação, lavadas duas vezes com PBS 1x e, posteriormente, o fungo recuperado e o sobrenadante foram submetidos à análise metalômica.

### **2.4- Obtenções de extratos proteicos de *P. brasiliensis***

Os extratos proteico de levedura e micélio foram obtidos a partir do cultivo do fungo em meio Fava-Neto (FAVA-NETO, 1995) semi-sólido por 7 dias e, posteriormente, as células foram transferidas para o meio Fava-Neto líquido e incubado por 72 horas a 37°C, para levedura, e 7 dias a 22°C, para micélio, sob agitação, a 150 rpm. Posteriormente, as células foram centrifugadas (4000 rpm), lavadas com PBS 1x duas vezes em tubos, ressuspendidas com tampão PBS 1x e transferidas para tubos de extração contendo micro pérolas de vidro, onde foram agitadas com *Beadbeater*. O lisado foi centrifugado duas vezes para retirada de restos celulares. O extrato proteico foi quantificado pelo método do Bradford (BRADFORD, 1976).

### **2.5- Quantificação com ICP- MS**

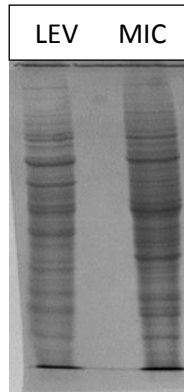
Para a análise de metais, foi utilizado o espectrômetro de massas ICP-MS 7500ce (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Este equipamento é equipado

com uma célula octapolo e pode ser operado com ou sem gás de colisão. Um nebulizador *Meinhard*, uma câmara de *spray* refrigerada Peltier (2°C) e uma fonte de excitação ao estado de plasma constituem o sistema de introdução de amostras sob condições de plasma padrão (WINTERS et al, 2010).

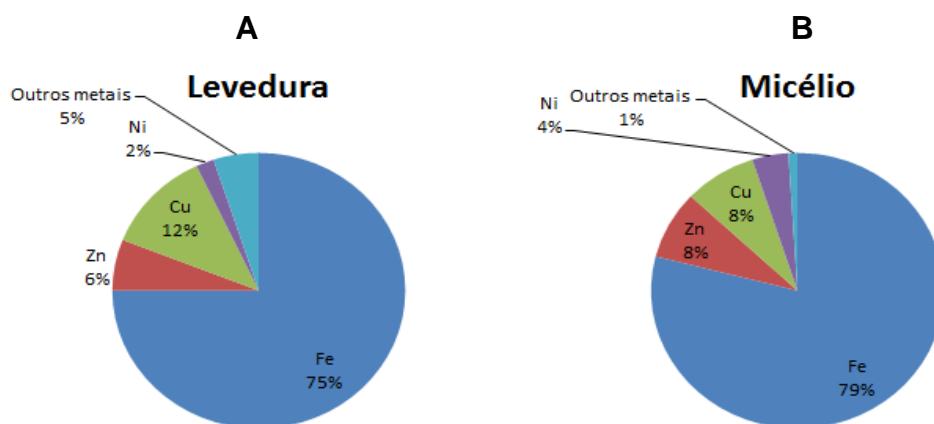
### 3-RESULTADOS E DISCUSSÕES

Segundo Bailão et al. (2006), os mecanismos de captação de micronutrientes como ferro, cobre e zinco por *P. brasiliensis* ainda não são conhecidos, mas dados transcricionais demonstraram prováveis estratégias para captação de tais metais pelo fungo. Posteriormente, Silva, et al (2011) demonstrou que fungos patogênicos como *Paracoccidioides brasiliensis*, *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* apresentam um complexo mecanismo de homeostase de metais. Além disso, *Paracoccidioides brasiliensis* desenvolveu mecanismos de produção de sideróforos, responsáveis pela captura de íons férricos livres, na forma insolúvel ( $\text{Fe}^{+3}$ ) reduzindo-o à forma solúvel ( $\text{Fe}^{+2}$ ). Metais de transição, tais como cobre, ferro e zinco, desempenham funções importantes nos seres vivos. Um exemplo são as proteínas que apresentam sítios ativos para metais. Essas proteínas desempenham papel catalítico em diversas rotas metabólicas, como é o caso da enolase, uma enzima que contem sítio ligante de zinco e participa da 9ª etapa da via glicolítica, convertendo o 2-fosfoglicerato em fosfoenolpiruvato (ANDREINI et al, 2006). Proteínas contendo íons metálicos intrínsecos são uma das classes com maior diversidade, desempenhando papéis estruturais e regulatórios críticos para função protéica, como mostrada por Winters (2010) que 30% das proteínas possuem alguma afinidade a íons metálicos (DEGTYARENKO, 2000). Com objetivo de iniciar estudos sobre metaloproteínas do fungo, foram obtidos extratos proteicos de ambas as formas de *P. brasiliensis*. Os extratos proteicos que foram obtidos a partir do cultivo do fungo em meio Fava-Neto a 23°C para micélio e 36°C para levedura e analisados em gel SDS-PAGE no intuito de verificar a integridade dos extratos, como mostrado na figura 01. Os extratos proteicos obtidos submetidos às análises de ICP-MS para estudo de metaloproteínas estão demonstrados na figura 02. Pode-se observar que o íon ferro é o metal mais abundante presente no extrato de *Paracoccidioides sp.*. Tal observação é suportada

pelo fato do íon ferro ser o metal mais abundante nos organismos vivos seguidos por zinco e cobre (ANDREINI et al., 2006).



**Figura 01.** Extratos proteicos citoplasmáticos extraídos do fungo *P. brasiliensis* das duas formas, levedura (LEV) e micélio (MIC).



**Figura 02.** Análise quantitativa dos metais presentes nos extratos proteicos do *P. brasiliensis* 01 nas formas de levedura (gráfico A) e micélio (gráfico B). É possível observar que, em levedura, o íon ferro é o metal mais abundante seguido por zinco e cobre. Já no extrato de micélio, observa-se uma maior abundância do íon ferro, mas com a mesma proporção de zinco e cobre.

Tanto macrófagos quanto fungos necessitam de metais para sobrevivência, estudos destes micronutrientes podem ser a chave para entender mecanismos complexos da interação parasito-hospedeiro. Como mostrado por Winters et al (2010), há mecanismos pelos quais o INT-gama inibe o crescimento intracelular do *Histoplasma capsulatum* pela restrição de ferro. Neste mesmo trabalho, é mostrado que a restrição de zinco tem importante influência na ação do

GM-CSF na diferenciação celular dos macrófagos. Estudos semelhantes ao do Winters, realizado por Sutak, et al (2008), revela que a disponibilidade de ferro no hospedeiro tem importante papel no mecanismo de invasão do fungo uma vez que quantidades reduzidas deste elemento é considerado um fator de virulência. Segundo Raja, et al (2013), a alteração dos níveis de cobre também podem influenciar na capacidade de sobrevivência dos patógenos. Adicionalmente, estudos *in vitro* com *Cryptococcus neoformans* demonstraram que este organismo consegue se adaptar a condições elevadas de cobre alterando sua morfologia e virulência. Além disso, o fungo pode sequestrar quantidades mais elevada deste metal em relação a outros microrganismos.

Neste trabalho, nós detectamos (Tabela 01) uma diminuição significativa nos níveis de magnésio, manganês e zinco nas células de levedura recuperadas da infecção dos macrófagos. Houve também uma clara diminuição nos níveis de cobre e ferro nas células fagocíticas depois da infecção.

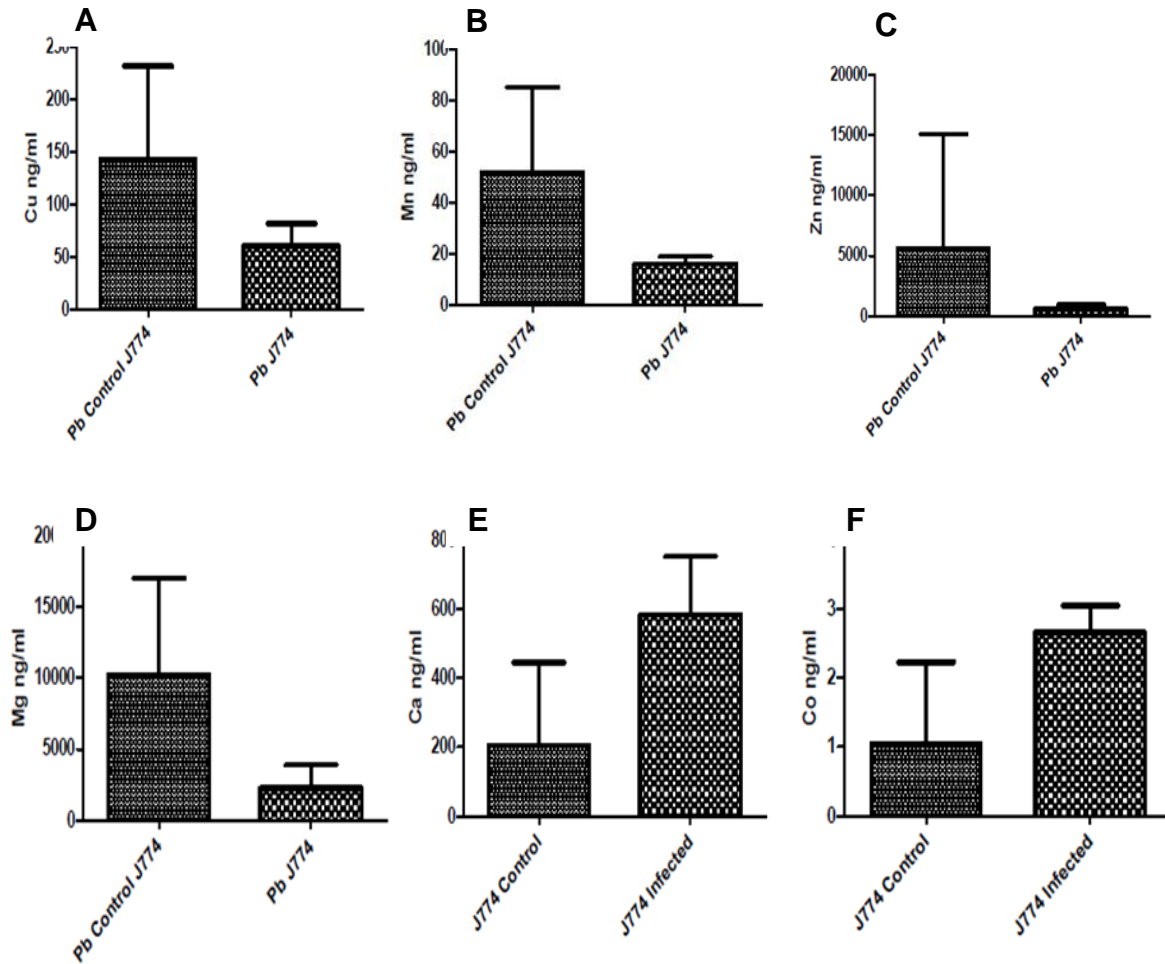
**Tabela 1. Quantificação de metais em células de *P. brasiliensis* e macrófagos (BMDM e J774).**

<sup>a</sup>Diferença significativa com 95% de confiança, teste t. Os dados foram expressos em ng/mL

Metais	J774 controle	J774 infectado	Pb J774 controle	Pb J774 infectado	BMDM controle	BMDM infectado	Pb BMDM controle	Pb BMDM infectado
Mg	330,96	382,56	10174,86	2245,69 <sup>a</sup>	4576,95	2487,87	102,06	109,5
Ca	204,80	583,30 <sup>a</sup>	1344,91	1215,34	1518,33	1150,69	42,18	53,44
Mn	2,93	3,03	51,42	15,88 <sup>a</sup>	36,04	20,17	0,77	0,54
Fe	332,43	383,65	1641,97	1350,86	875,28	2238,27	32,99	34,59
Co	1,04	2,66 <sup>a</sup>	11,74	5,61	1,44	1,57	0,38	0,04
Ni	21,39	51,74	95,46	84,61	24,65	16,11	2,81	2,65
Cu	34,76	18,93	142,10	60,19	154,10	66,22	1,32	8
Zn	140,87	124,53	5583,12	571,64 <sup>a</sup>	3848,98	1022,16	9,52	22,35
Mo	-	-	5,94	4,51	27,33	-	5,57	0,15

Estudos semelhantes aos nossos, realizados por WINTERS e colaboradores (2010) visando à quantificação de metais durante a infecção de *Histoplasma capsulatum* em macrófagos, mostraram que os níveis de metais como magnésio, zinco, cobre, manganês e cálcio estavam alterados em relação ao controle. Estes resultados sugerem que o fungo desenvolveu mecanismos de defesa para sobreviver ao ambiente hospedeiro. Além disso, foi detectado também um aumento significativo nos níveis de cálcio e cobalto nos macrófagos J774 infectados quando comparados com os não infectados. O aumento de Ca e Co nos macrófagos

infectados indica que estes micronutrientes são importantes para uma eficiente resposta imune contra o *P. brasiliensis*.



**Figura 02. Análise quantitativa de metais presentes em células fúngicas durante a infecção.** A, B, C e D mostram uma clara diminuição nos níveis de Cu, Zn, Mn e Mg, sugerindo mecanismos de sobrevivência desenvolvidos pelo fungo. E e F mostram um aumento nos níveis de Ca e Co, sugerindo mecanismos de defesa criado pelo hospedeiro para eliminar os patógenos, apresentando diferença significativa, com  $P < 0,05$ .

## 5- CONCLUSÕES/CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir dos resultados obtidos, foi possível verificar que: os níveis de metais (Mg, Ca, Mn, Co e Zn) foram alterados durante o processo infeccioso, sugerindo a participação destes elementos na complexa interação fungo-macrófago.



Na análise metalômica dos extratos proteicos foi observado que o ferro é o elemento mais abundante dentre os metais analisados seguidos de zinco e cobre.

## 7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aisen P 2004. **Transferrin receptor 1**, *Int. J Biochem Cell Biol* 36: 2137–2143. L. Alberts, K. Nadassy, S. J. Wodak, **Analysis of zinc binding sites in protein crystal structures**, *Protein science* 7, 1700-1716 (1998).

Anderson GJ, Darshan D, Wilkins, SJ, Frazer DM 2007. **Regulation of systemic iron homeostasis: how the body responds to changes in iron demand**. *Biometals* 20: 665–674.

Andreini, C, Banci, L, Bertini, I and Rosato, A (2006). **Counting the zinc-proteins encoded in the human genome**. *J Proteome Res* 5(1): 196-201.

Bailao, A. M., Schrank, A., Borges, C. L., Dutra, V., Molinari-Madlum, E. E. W. I., Felipe, M. S. S., Mendes-Giannini, M. J. S., Martins, W. S., Pereira, M. and Soares, C. M. A. (2006). **Differential gene expression by *Paracoccidioides brasiliensis* in host interaction conditions: representational difference analysis identifies candidate genes associated with fungal pathogenesis**. *Microbes Infect* 8(12-13): 2686-2697.

Beaudoin, J. and Labbe, S. (2007). **Crm1-mediated nuclear export of the *Schizosaccharomyces pombe* transcription factor Cuf1 during a shift from low to high copper concentrations**. *Eukaryot Cell* 6(5): 764-775.

BRITO WA. **Identificação e caracterização de antígenos do fungo *Paracoccidioides brasiliensis***. 1996. 102f. Dissertação (Mestrado em Biologia – Área de Concentração: Bioquímica e Biologia Molecular) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 1996.

Brock, M. (2009). **Fungal metabolism in host niches**. *Curr Opin Microbiol*.

Chen, D, Janganan, TK, Chen, G, Marques, ER, Kress, MR, Goldman, GH, Walmsley, AR and Borges-Walmsley, MI (2007). **The cAMP pathway is important for controlling the morphological switch to the pathogenic yeast form of *Paracoccidioides brasiliensis***. *MolMicrobiol* 65(3): 761-779

Degtyarenko, K. (2000). **Bioinorganic motifs: towards functional classification of metalloproteins.** *Bioinformatics* **16**(10): 851-864.

Desbrosses-Fonrouge, A. G., Voight, K., Schoder, A., Arrivault, S., Trhoemine, S e Kramer, u. (2005). **Arabidopsis thaliana MTP1 is a Zn transporter in the vacuolar membrane wich mediates Zn detoxification and drives leaf Zn accumulation.** *FEBS Lett* **579**(19): 4165-74.

Fava-Netto, C. (1955). **Estudos quantitativos sobre a fixação do complemento na blastomicose sul-americana com antígeno polissacarídeo: 56.**

Gaither, L. A. and Eide, D. J. (2001). **Eukaryotic zinc transporters and their regulation.** *Biometals***14**(3-4): 251-270.

Gancz, H., Censini, S. and Merrell, D. S. (2006). **Iron and pH homeostasis intersect at the level of Fur regulation in the gastric pathogen *Helicobacter pylori*.** *Infect Immun***74**(1): 602-614.

Jacobson, E. S., Goodner, A. P. and Nyhus, K. J. (1998). **Ferrous iron uptake in *Cryptococcus neoformans*.** *Infect Immun* **66**(9): 4169-4175.

Kornitzer, D. (2009). **Fungal mechanisms for host iron acquisition.** *Curr Opin Microbiol.*

Lill R, Mühlenhoff U 2008. **Maturation of Iron-Sulfur Proteins in Eukaryotes: Mechanisms, Connected Processes, and Diseases.** *Annu Rev Biochem* **77**: 669–700.

Lukianova OA, David SS 2005. **A role for iron–sulfur clusters in DNA repair.** *Curr Opin Chem Biol* **9**: 145–151

Nelson, N. (1999). **Metal ion transporters and homeostasis.** *EMBO J* **18**(16): 4361-71

Nemecek, JC, Wuthrich, M and Klein, BS (2006). **Global control of dimorphism and virulence in fungi.** *Science* **312**(5773): 583-588.

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

Peterson SW, Singler L 1998. **Molecular genetic variation in *Emmonsia crescens* and *Emmonsia parva*, etiologic agents of adiaspiromycosis, and their phylogenetic relationship to *Blastomyces dermatitidis* (*Ajellomyces dermatitidis*) and other systemic fungal pathogens.** *J Clin Microbiol* **36**: 2918-2925.

Restrepo, A., Bernad, G., de Castro, C. C., Agudelo, C. A. e tobon, A. M. (2008). **Pulmonary Paracoccidioidomycosis**. *Semin Respir Crit Care Med* 29: 182-97

Rutherford, J. C. e Bird, A. J. (2004). **Metal-Responsive Transcription Factors That Regulate Iron, Zinc, and copper Homeostasis in Eukaryot Cell** 3(1): 1-13.

San-Blas, G. (1993). **Paracoccidioidomycosis and its etologic agent Paracoccidioidis brasiliensis**. *J Med Vet Mycol* 31(2):99-113.

Sheftel AD, Mason AB, Ponka P. (2012). **The long history of iron in the Universe and in health and disease**. *BiochimBiophysActa* 1820(3):161-87.

Shi, W. and Chance, M. R. (2008). **Metallomics and metalloproteomics**. *Cell Mol Life Sci* 65(19): 3040-3048.

Tjalsma, H.; Antelmann, H.; Jongbloed, *et al.* (2004). **Proteomics of Protein**

Valera, E. T., Mori, B. M., Engel, E. E., Costa, I. S., Brandão, D. F., Nogueira-Barbosa, M. H., Queiroz, R. G., Silveira, V. D., Scrideli, C. A. e Tone, L. G. **Fungal infection by Paracoccidioidis brasiliensis mimicking boné tumor**. *Pediatr Blood Cancer*. (2008).

Van Ho, A., Ward, D. M. and Kaplan, J. (2002). **Transition metal transport in yeast**. *Annu Rev Microbiol* 56: 237-261.

Weber, S.S.; Parente, A.F.A.; Parente, J.A.; Borges, C.L.; Bailão, A.M.; Soares, M.A. **Analise Proteomica de Proteias Secretadas por Paracoccidioides brasiliensis**.

Winters, M. S., Chan, Q., Caruso, J. A. e Deepe, G. S. (2010). **Metallomic Analysis of Macrophages Infected With Histoplasma capsulatum Reveals a fundamental Role for Zinc in Host Defences**. *JID* 2010:202.

Zhao, H. e Eide, D. (1996a). **The yeast ZRT1 gene encodes the Zinc transporter protein of a high-affinity uptake sytem inuced by Zinc limitation**. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 2454-58.

Zhao, H. e Eide, D. (1996b). **The ZRT2 Gene Encondes the Low Affinity Zinc Transporter in Saccharomyces cerevisiae**. *J Biol Chhem* 271(38): 23203-2010.