

Estudo da Proteína Tiorredoxina (*PbTRX1*) na Resposta ao Estresse Oxidativo em *Paracoccidioides brasiliensis*

CINTRA, Lorena Cardoso¹; JESUÍNO, Rosália Santos Amorim²

Palavras-chave: *Paracoccidioides brasiliensis*, Estresse Oxidativo, Tiorredoxina.

1. INTRODUÇÃO (justificativa e objetivos)

O fungo *Paracoccidioides brasiliensis* é o agente etiológico da paracoccidioidomicose. *P. brasiliensis*, assim como todos os organismos de vida aeróbia, está sujeito a danos celulares decorrentes da ação lesiva das espécies reativas de oxigênio (EROS). As EROS geralmente são produtos finais da respiração e também estão presentes no processo de infecção como na resposta do hospedeiro ao fungo. Os organismos aeróbios possuem mecanismos de defesa contra as EROS, o que inclui a síntese de moléculas antioxidantes, garantindo assim sua sobrevivência.

A tiorredoxina (TRX) é uma proteína pequena, ubiquitária e multifuncional que participa do sistema tiorredoxina que juntamente com a tiorredoxina redutase e o NADPH exercem um papel de controle da homeostase redox das células em situação de estresse. O estudo da proteína TRX1 na resposta ao estresse oxidativo no fungo patogênico humano *P. brasiliensis* permitirá um maior entendimento no que diz respeito ao processo de adaptação do fungo no hospedeiro, considerando que a sobrevivência do fungo é um fator importante para o estabelecimento da infecção.

2. METODOLOGIA

2.1 - Análise do crescimento e viabilidade de células leveduriformes de *P. brasiliensis* em condições de estresse oxidativo

Foram utilizados um grupo controle cultivado em condições normais e quatro grupos foram tratados com diferentes concentrações do agente oxidante, aos quais foram adicionados 10, 25, 50 e 75 mM de H₂O₂ ao meio de cultura (YPD). Os grupos foram submetidos a uma suave rotação a 37 °C por 3 horas, ao que se seguiu a padronização do inóculo em 5 x 10⁶ células/mL de meio. As células foram contadas em Câmara de Neubauer por 7 dias e o experimento realizado em triplicata para cada condição. A média das contagens foi utilizada para a construção de uma curva de crescimento. A viabilidade celular das células leveduriformes de *P. brasiliensis* foi determinada através do método do corante vital verde Janus (Sano *et al.*, 1993).

2.2 - Análise da diferenciação celular de micélio para levedura (MIC→ LEV) de *P. brasiliensis* em condições de estresse oxidativo

Culturas micelianas, crescidas a 26 °C, em meio líquido, foram transferidas para 37 °C. Em um tratamento adicionou-se 25 mM de H₂O₂ por 3 horas e, em seguida, as células foram lavadas e ressuspensas em meio fresco. Em outro tratamento foi mantida a incubação contínua. Alíquotas foram retiradas e procedia-se a contagem de células leveduriformes. As médias e o desvio padrão de três experimentos independentes foram utilizados para a construção de uma curva de diferenciação.

2.3 - Extração de DNA total de *P. brasiliensis*

As células leveduriformes dos isolados Pb01 (ATCC, MYA, 826), Pb8311 e Pb4940 de *P. brasiliensis* foram submetidas à extração de DNA.

2.4 - Amplificação dos fragmentos de DNA de diferentes isolados correspondentes à sequência da *PbTRX1* por PCR

Foram utilizados oligonucleotídeos específicos (sense 5' - CAC GAA TTC CAA TGG TTG TCC AC -3' e antisense 5' - CCC CTC GAG ACT TTC ATC TAC - 3') que foram desenhados com base na sequência de aminoácidos da *PbTRX1* (nº de acesso GenBank AY376435). Foi utilizado 25 ng de DNA total de cada isolado de *P. brasiliensis* e as amplificações realizadas em termociclador (Applied Biosystems – 2400) por 35 ciclos (desnaturação 94 °C por 3 min, anelamento 55 °C por 1 minuto e extensão 72 °C por 7 min).

2.5 – Ensaio da atividade enzimática da *PbTRX1*

Foram utilizados extratos protéicos (extrato bruto) de células leveduriformes de *P. brasiliensis* submetidas a condições normais e sob estresse oxidativo (25 mM de H₂O₂) para realização do ensaio enzimático. Embora a TRX tenha vários substratos possíveis, o método clássico para detectar sua atividade é a redução da insulina. A avaliação da atividade enzimática foi realizada pela taxa de precipitação a 650 nm em um intervalo de tempo de 2 min por 80 min.

2.6 - Análises computacionais

Para predição da estrutura e determinação do perfil hidropático da *PbTRX1* foram utilizados recursos de bioinformática.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 - Efeito do H₂O₂ no crescimento e viabilidade de células leveduriformes de *P. brasiliensis*

As análises de crescimento, viabilidade do fungo *P. brasiliensis* estão relacionadas ao cultivo do fungo quando submetidos à condição de estresse oxidativo ou em condições normais. Tanto o crescimento quanto a viabilidade celular, quando comparadas com a cultura controle, apresentaram um efeito dose dependente. Quanto maior a concentração de H₂O₂, maior inibição do crescimento e menor viabilidade. Os resultados demonstram que o fungo embora seja afetado pelo H₂O₂ apresenta uma alta taxa de sobrevivência e recuperação, o que demonstra a sua capacidade de defender-se contra agentes oxidantes. Este fato sugere um papel das TRXs na ação contra as EROS.

3.2 - Efeito do H₂O₂ no dimorfismo celular de micélio para levedura do fungo *P. brasiliensis*

As células de defesa do hospedeiro humano geram EROS para combater o patógeno e neste sentido quanto mais resistente o fungo for aos EROS, maior chance de se diferenciar e estabelecer-se no hospedeiro. Isto implica em uma resposta antioxidante do microrganismo contra as EROS. A diferenciação MIC → LEV na presença de 25 mM de H₂O₂ é inibida em relação ao grupo controle. O grupo tratado continuamente com H₂O₂ mostrou uma diferenciação de aproximadamente 78% no décimo quinto dia, o tratado por 3 horas de 84% e o grupo controle apresentou aproximadamente 100% das células diferenciadas. Estes dados demonstram a habilidade do fungo em responder ao estresse oxidativo sem que a transição MIC → LEV seja muito afetada.

3.3 - Amplificação do fragmento gênico correspondente à região codificadora da *PbTRX1* em isolados do fungo *P. brasiliensis*

Foi obtida a amplificação de fragmento de aproximadamente 351 pb correspondente ao gene que codifica para *PbTRX1* nos 3 isolados testados (*Pb01*, *Pb8311*, *Pb4940*). Isto reforça a presença deste gene nos diferentes isolados de *P. brasiliensis* e sugere um papel importante desta proteína nos mecanismos de defesa contra EROS.

3.4 - Avaliação da atividade enzimática da *PbTRX1*

A redução da insulina mediada pela *PbTRX1* foi determinada pela medida do aumento da absorbância (650 nm a 25 °C) gerada pela turbidez resultante da precipitação da cadeia livre (cadeia B) da insulina, que é insolúvel. A adição do extrato total (tratado) resultou em rápida precipitação depois de 5 minutos, demonstrando capacidade catalítica da TRX no fungo *P. brasiliensis*. O extrato protéico de *P. brasiliensis* apresentou atividade redutora de insulina que corresponde à ação redutora de dissulfeto da *PbTRX1*, o que ficou claro quando foi bloqueada a *PbTRX1* com anticorpo anti-TRX de *E. coli*. É importante salientar que a atividade de *PbTRX1* quando em presença de H₂O₂ em relação ao controle não tratado sofreu maior precipitação, gerando uma leitura da absorbância sempre maior. Este dado é sugestivo de uma maior indução da síntese das TRXs em presença de H₂O₂, correspondendo a uma maior redução da insulina.

3.5 - Análises computacionais

O tamanho, pI, composição de aminoácidos, perfil hidropático e provável localização são compatíveis com que tem sido descrito para as TRXs1 de outros organismos. A estrutura secundária da *PbTRX1* definida por comparação com outras TRXs demonstrou um padrão conservado, formado por 5 cadeias- β que estão envolvidas por 4 cadeias em α -hélices. O perfil hidropático da *PbTRX1* demonstra que esta proteína apresenta uma maior quantidade de regiões hidrofílicas do que hidrofóbicas, o que poderia ser explicado pelo fato desta proteína apresentar uma grande versatilidade de funções.

4. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nesse trabalho demonstraram que a TRX1 presente em *P. brasiliensis* responde ao estresse oxidativo e pode ser considerada como um possível fator de virulência. O fungo é afetado de alguma forma pelo H₂O₂ (agente oxidante), apesar disso ele apresenta uma alta taxa de sobrevivência e recuperação.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

SANO, A.; KURITA, N.; IABUKI, K.; COELHO, R.; TAKEO, K.; NISHIMURA, K.; MIYAJI, M. **A comparative study of four different staining methods for estimation of live yeast form cells of *Paracoccidioides brasiliensis***. Mycopathologia: 124(3):157-61, 1993.

FONTE DE FINANCIAMENTO – CNPq/PIBIC, FUNAPE/UFG

¹ Bolsista de iniciação científica. Instituto de Ciências Biológicas – Laboratório de Biologia Molecular, lorenabioufg@yahoo.com.br

² Orientador /Instituto de Ciências Biológicas /UFG, rosalia@icb.ufg.br