

Respostas transcrpcionais de *Paracoccidioides brasiliensis* ao estresse nitrosativo

Priscila Elias Campos NAVES; Célia Maria de Almeida SOARES; Juliana Alves PARENTE

Laboratório de Biologia Molecular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Goiás, Brazil – pcamposk@hotmail.com

Palavras-chave: Estresse nitrosativo, patogênese, transcriptoma

1-Introdução

O fungo *Paracoccidioides brasiliensis* é o agente etiológico da infecção sistêmica Paracoccidioimicose (PCM), que, no Brasil, é considerada a maior causa de mortalidade entre as doenças infecciosas (Coutinho, 2002). A principal forma de aquisição da doença é através da inalação de propágulos da forma infectante. Uma vez que o fungo se estabelece nos pulmões, são causadas lesões pulmonares e, subsequentemente, a doença se dissemina para outros órgãos e tecidos através dos vasos linfáticos ou do sangue (Borges-Walmsley, 2002; Ramos-e-Silva, 2008).

Entre os mecanismos de controle descritos para a PCM, os macrófagos desempenham o papel principal, constituindo a primeira linha de defesa do organismo (Brummer *et al.*, 1990). Células do sistema imune possuem uma variedade de mecanismos de defesa contra patógenos, como a produção e liberação de óxido nítrico (NO). O óxido nítrico é uma das moléculas mais importantes entre os intermediários reativos de nitrogênio (RNI) e é gerado por duas reações sequenciais catalisadas por uma isoforma induzível da enzima NO sintase (iNOS ou NOS2) (Nascimento *et al.*, 2002; Gonzalez *et al.*, 2007). Estímulos inflamatórios induzem a expressão de iNOS, o que resulta em grandes quantidades de NO, os quais causam danos no DNA e na membrana, inibição da replicação e da respiração e inativação de enzimas celulares (Nittler *et al.*, 2005). Estudos realizados por Gonzalez *et al.* (2000) demonstraram que a produção de NO em macrófagos é capaz de restringir o crescimento intracelular de *P. brasiliensis* e a transição de conídio em levedura.

Fungos patogênicos possuem mecanismos de respostas a efeitos adversos do NO que reparam danos moleculares e ajudam estes a sobreviverem ao contato inicial com o sistema imunológico do hospedeiro, o que é essencial para o estabelecimento da doença (Brown *et al.*, 2009). Entre estes mecanismos de defesa

ao NO, os patógenos podem detoxificá-lo através de enzimas como flavohemoglobinas, reparar danos produzidos pelo mesmo e modular a produção desta molécula pelo hospedeiro (Nathan & Shilon, 2000). Estudos sobre as respostas transcricionais de *P. brasiliensis* ao estresse por óxido nítrico se tornam importantes, pois a habilidade do fungo em sobreviver a esta condição contribui para a sua patogênese.

2-Materiais e Métodos

Células leveduriformes de *P. brasiliensis* foram transferidas para 100 mL de meio Fava-Netto (Fava-Netto, 1955) líquido e crescidas por 72 horas a 36°C e 180 rpm. A viabilidade das células foi avaliada utilizando o ensaio com XTT (sodium 3'-[1-(phenylamino-carbonyl)-3,4-tetrazolium]-bis(4-methoxy-6-nitro)- traduzir o nome do composto benzene-sulfoic acid hydrate) em meio Fava-Netto pH 4,0 na presença de 500µM de nitrito de sódio (NaNO₂) durante 2 horas.

O RNA total foi extraído através do reagente Trizol (Invitrogen Life Technologies), de acordo com as instruções do fabricante. A purificação do mRNA foi feita de acordo com o protocolo do Oligotex Direct mRNA Mini Kit (Quiagen Sample and Assay Technologies). A biblioteca de cDNA foi construída de acordo com os protocolos da Superscript plasmid system with Gateway technology (Invitrogen Life Technologies). Os cDNAs obtidos foram clonados no vetor de clonagem pCMVSPORT 6 e utilizados para a transformação de células de *Escherichia coli* XL1 Blue. O sequenciamento de DNA foi realizado em sequenciador automático MegaBACE 1000 (GE Healthcare), resultando na obtenção de ESTs. As sequencias foram comparadas contra o banco de dados de *P. brasiliensis* Pb01 no National Center for Biotechnology Information, disponível em http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/paracoccidioides_brasiliensis/MultiHome.html. As sequencias foram comparadas também contra os bancos de dados Gene Ontology (<http://www.geneontology.org/GO>) e InterPro's (<http://www.ebi.ac.uk/InterProScan/>). Para acessar categorias funcionais foi utilizado o MIPS Comprehensive Yeast Genome Database (CYGD) (<http://mips.gsf.de/>).

3-Resultados e Discussão

3.1-Efeito do tratamento com nitrito de sódio sobre a viabilidade celular

A viabilidade das células de levedura de *P. brasiliensis* foi reduzida para 58% na presença de NaNO_2 durante os primeiros 40 minutos do tratamento, após o que não houve redução significativa no tempo analisado de 2 horas (Figura 01). As análises transcricionais foram realizadas após 1 hora de incubação na presença de $500\mu\text{M}$ de NaNO_2 .

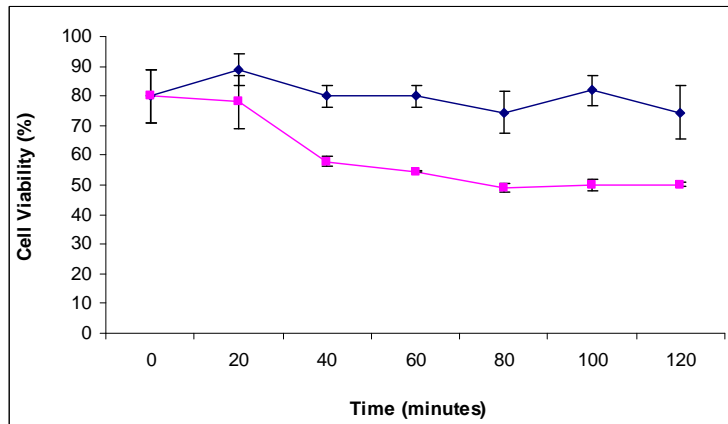


Figura 01: Viabilidade de células leveduriformes de *P. brasiliensis*. Para análise do efeito da adição de NaNO_2 na viabilidade, células (10^6 células/mL) foram incubadas em meio Fava-Netto pH 4.0 contendo $500\mu\text{M}$ de NaNO_2 (linha rosa).

3.2- Obtenção de mRNA

O RNA total de células controle e tratadas foi obtido e utilizado para purificação de mRNAs. A Figura 02 apresenta o perfil de migração dos RNAs em gel de agarose e coloração por brometo de etídeo.

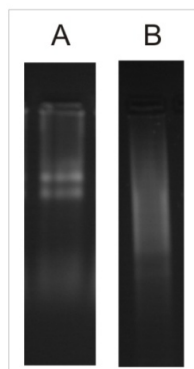


Figura 02: Extração do RNA total e purificação do mRNA. O RNA total foi obtido e sua integridade foi confirmada por análises em gel de agarose na presença de brometo de etídeo (linha A). Um total de $500\mu\text{g}$ dos RNA total foi usado para obtenção de mRNA (linha B).

3.3-Sequenciamento de DNA e obtenção de ESTs

Foi sequenciado um total de 4.800 clones de cDNA os quais geraram 3.629 etiquetas de sequencias expressas (ESTs). Após as análises de qualidade realizadas através dos algoritmos Phred/CAP3, um total de 2.197 ESTs foram agrupadas em 357 *contigs* e 1.053 *singlets*.

Entre as ESTs mais abundantes identificadas em *P. brasiliensis* durante o estresse nitrosativo, 40 codificam proteínas relacionadas a processos transcricionais, como proteínas ribossomais e fatores de transcrição (Tabela 01). Foram identificadas 34 ESTs codificando proteínas relacionadas a processos traducionais e 22 ESTs codificando proteínas relacionadas ao endereçamento de proteínas e processos de degradação. Do total de ESTs, 4,37% são relacionadas a processos transcricionais e traducionais e sugere que estes processos são positivamente regulados em resposta ao estresse nitrosativo. Um total de 7,24% das ESTs identificadas está relacionado ao transporte de membrana apresentando produtos gênicos como transportador de fosfato, transportador de amônia, transportador de sulfito Ssu1, transportador de peptídeo PTR2 e transportador multidrogas ABC. Esses produtos gênicos estão relacionados à resposta ao estresse nitrosativo por fungos (Nittler *et al.*, 2005). Produtos gênicos relacionados à defesa celular, como superóxido dismutase e proteínas Y20, também foram identificados e estão relacionadas à resposta aos estresses nitrosativo e oxidativo, sugerindo a importância dessas proteínas na resposta de *P. brasiliensis* ao óxido nítrico.

Tabela 01 – ESTs mais abundantes identificadas em células leveduriformes de *P. brasiliensis* durante estresse nitrosativo.

CATEGORIAS FUNCIONAIS	Produto Gênico	Números de ESTs
METABOLISMO		
Metabolismo de aminoácidos		
XP_002796555.1	Decarboxilase de aminoácidos aromáticos	10
C-compound and carbohydrate metabolism		
XP_002796991.1	Glucosamina-frutose-6-fosfato aminotransferase	4
XP_002795695.1	Glicerofosfodiester fosfodiesterase GDE1	4
Metabolismo de nitrogênio e enxofre		
XP_002794788.1	Formamidase	4
Metabolismo de nucleotídeos		
XP_002795157.1	Ribose-fosfato pirofosfoquinase	4
XP_002794019.1	Nucleosídeo difosfato quinase	4
Metabolismo de lipídeos, ácidos graxos e isopreníodes		
XP_002794129.1	Acil-CoA desaturase	6

ENERGIA			
Glicólise e Gliconeogênese			
EEH46313.1	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase		5
XP_002796107.1	Frutose-bisfosfato aldolase		4
Fermentação			
XP_002797863.1	Alcool desidrogenase		15
Ciclo do glioxalato			
XP_002791040.1	Isocitrato liase		4
Transporte de elétron e conservação de energia associada à membrana			
XP_002789296.1	NADH:ubiquinona subunidade	oxidoreductase	6
XP_002795560.1	NADH:ubiquinona subunidade	oxidoreductase	5
TRANSCRIÇÃO			
XP_002797093.1	Proteína ribossomal 60S L20		5
XP_002794223.1	Proteína ribossomal 40S S4		5
XP_002790673.1	Ribonucleoprotein nucleolar U3 IMP3		4
EFZ01262.1	Proteína ribossomal 60S L37		4
XP_002797191.1	Proteína ribossomal 60S L30		4
EEH48204.1	Proteína endoribonuclease L-PSP da família (Hmf1)		4
XP_002794777.1	Proteína ribossomal 40S S20		4
SÍNTESE DE PROTEÍNA			
Tradução			
XP_002792522.1	Proteína ribossomal 40S S21		5
XP_002789006.1	Proteína de tumor traducionalmente controlada		4
XP_002796769.1	Alanil-tRNA sintetase		7
XP_002796136.1	Fator de elongação 1-alpha		12
XP_002794483.1	Fator de elongação 1-beta		6
Controle da tradução			
XP_002795343.1	Proteína ligante de ácido nucleico engD dependente de GTP		5
Endereçamento de proteínas			
Empacotamento			
EEH16269.1	Peptidil-prolil cis-trans isomerase		4
XP_002797012.1	Proteína de choque térmico 30 kDa		7
XP_002793006.1	Proteína mitocondrial de choque térmico 10 kDa		4
Degradação proteolítica			
XP_002791169.1	Ubiquitina		7
DEFESA, VIRULÊNCIA E RESGATE CELULAR			
XP_002793892.1	Superoxido dismutase		6
AAL50803.1	Proteína Y20		8
TRANSPORTE CELULAR E MECANISMOS DE TRANSPORTES			
Transporte transmembrana			
XP_002789623.1	Transportador de fosfato inorgânico		130
EEH18587.1	Transportador de amônia		8
XP_002798029.1	Transportador de sulfito Ssu1		5
XP_002793116.1	Transportador de cobre de alta afinidade		4
XP_002791363.1	Transportador de peptídeo PTR2		4
EEH23444.1	Transportador de efluxo multidrogas ABC		4
EEH47152.1	Transportador ABC CDR4		4
Transporte nuclear			
XP_002793741.1	Proteína nuclear ligante de GTP GSP1/Ran		5

4-Conclusões

Os resultados obtidos da análise do perfil transcricional de células de levedura de *P. brasiliensis* são importantes para a identificação de produtos gênicos e interações moleculares que garantem a sobrevivência do fungo na presença de intermediários reativos de nitrogênio e que são relevantes para a interação entre patógeno e hospedeiro.

5-Referências Bibliográficas

- BORGES-WALMSLEY, MI; CHEN, D; SHU, X; WALMSLEY, AR. The pathobiology of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Trends Microbiol.** 10(2): 80-87. 2002.
- BROWN, AJP; HAYNES, K; QUINN J. Nitrosative and oxidative stress responses in fungal pathogenicity. **Curr. Opin. Microbiol.** 12(4): 384–391. 2009.
- BRUMMER, E; SUN, SH; HARRISON, JL; PERLMAN, AM; PHILPOTT, DE; STEVENS, DA. Ultrastructure of phagocytosed *Paracoccidioides brasiliensis* in nonactivated or activated macrophages. **Infect. Immun.** 58(8):2628-36. 1990.
- COUTINHO, ZF; SILVA, D; LAZÉRA, M; PETRI, V; OLIVEIRA, RM; SASBROZA, PC; WANKE, B. Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980-1995). **Cad. Saúde Publica.** 18, p1441-54. 2002.
- NASCIMENTO, FRF; CALICH, VLG; RODRÍGUEZ, D; RUSSO, M. Dual Role for Nitric Oxide in Paracoccidioimycosis: Essential for Resistance, but Overproduction Associated with Susceptibility. **The Journ. of Immun.** 168, p4593-4600. 2002.
- GONZALEZ, A; RESTREPO, A; CANO, LE. Role of iron in the nitric oxide-mediated fungicidal mechanism of IFN- γ -activated murine macrophages against *Paracoccidioides brasiliensis* conidia. **Rev. Inst. Med. Trop.** 49(1):11-16. 2007.
- GONZALEZ, A; GREGORI, W; VELEZ, D; RESTREPO, A; CANO, LE. Nitric Oxide Participation in the Fungicidal Mechanism of Gamma Interferon-Activated Murine Macrophages against *Paracoccidioides brasiliensis* Conidia. **Infect Immun.** 68(5): 2546–2552. 2000.
- NITTLER, MP; HOCKING-MURRAY, D; FOO, CK; SIL, A. Identification of *Histoplasma capsulatum* transcripts induced in response to reactive nitrogen species. **Mol. Biol. Cell.** 16, p4792– 4813. 2005.
- RAMOS-E-SILVA, M; LES, S. Paracoccidioidomycosis. **Dermatol. Clinics,** 26(2):257-269. 2008.