

## AUTOFAGIA EM *Paracoccidioides brasiliensis* MEDIANTE PRIVAÇÃO DE NUTRIENTES

**Sarah de Moura Pedroso<sup>1</sup>, Claudia B. L. Campos<sup>2</sup>, Francisco G. Nóbrega<sup>2</sup> e Flávia V. Morais<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Curso de Farmácia, Faculdade de Ciências da Saúde,  
Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP), Brasil, 12244-000  
Fone: +55 12 3947 1000, Fax: +55 12 3947 1015,  
[sarah\\_pedroso@hotmail.com](mailto:sarah_pedroso@hotmail.com)

<sup>2</sup>Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento (IP&D)  
Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP), Brasil, 12244-000  
Fone: +55 12 3947 1150, Fax: +55 12 3947 1118  
[cbc Campos@univap.br](mailto:cbc Campos@univap.br), [fgdnobre@univap.br](mailto:fgdnobre@univap.br), [flavia@univap.br](mailto:flavia@univap.br)

**Resumo** - Autofagia é um mecanismo celular altamente conservado que ocorre somente em organismos eucarióticos. Este processo proporciona a degradação, em grande escala, pelas células de macromoléculas e organelas. Atualmente, estudos científicos vêm demonstrando a importância da autofagia em diversos processos biológicos, entre os quais podemos citar: adaptação, diferenciação e desenvolvimento celular. O envolvimento mais conhecido e bem descrito do processo de autofagia é no que se refere ao controle da homeostase visando a adaptação das células a nutrientes específicos e /ou na sobrevivência do organismo em condições de estresse. O *Paracoccidioides brasiliensis* é um fungo termodimórfico responsável por causar no homem a paracoccidioidomicose. Porém, esta doença só se estabelece quando o fungo consegue se diferenciar de sua forma miceliana (infectante) para a leveduriforme (parasitária). Esta diferenciação envolve diferentes tipos de estresse, entre eles, térmico e nutricional. Sendo assim, este trabalho objetivou avaliar a ocorrência do processo de autofagia em células miceliais e leveduriformes de *P. brasiliensis*, crescidas sob diferentes tipos de estresse nutricional.

**Palavras-chave:** *Paracoccidioides brasiliensis*, autofagia, estresse nutricional

**Área do Conhecimento:** Ciências biológicas

### Introdução

A homeostase celular é controlada pelo balanceamento entre a síntese e a degradação protéica. Para se manter este balanço são necessários vários mecanismos regulatórios que permitem às células perceberem as condições do ambiente e emitirem sinais específicos que culminam em respostas relacionadas a crescimento e desenvolvimento (Reggiori & Klionsky, 2002). No caso da degradação, estas respostas normalmente estão envolvidas com adaptação dessas células a nutrientes específicos ou sobrevivência do organismo em condições de estresse (Rohde & Cardenas, 2004; Onodera & Ohsumi, 2005). Uma das maneiras que as células possuem de degradarem macromoléculas e organelas, em grande escala, é através do mecanismo de autofagia (Kim & Klionsky, 2000; Wang & Klionsky, 2003; Lum et al., 2005).

Autofagia é um processo que ocorre em todos os organismos eucarióticos onde citosol e organelas são seqüestrados por uma organela de membrana dupla, o autofagossomo, e entregues aos lisossomos/vacúolos para serem degradados (autofagolisossomos ou vacúolos autofágicos). Deste modo ocorre a reciclagem das moléculas

envolvidas para posterior utilização em novos processos celulares (Klionsky, 2005).

O fungo termodimórfico *Paracoccidioides brasiliensis* é o responsável por causar no homem uma micose sistêmica granulomatosa, a paracoccidioidomicose (PCM) (Lutz, 1908; Lacaz, 1994). Esta micose é adquirida pelo hospedeiro através do sistema respiratório. Em áreas endêmicas para a PCM (Brummer et al., 1993), o homem pode inalar células miceliais de *P. brasiliensis* que ao atingirem os pulmões podem se diferenciar de micélio (forma infectante) para levedura (forma parasitária) (McEwen et al., 1987). A alteração na temperatura é um dos fatores envolvidos nesta diferenciação que é essencial para o estabelecimento da doença (San Blas et al., 2002).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a ocorrência da autofagia em células miceliais e leveduriformes de *P. brasiliensis*, visto que as células miceliais do fungo, ao infectarem o hospedeiro humano, são submetidas à alteração de temperatura e também, ao encontrarem os alvéolos pulmonares, estão sujeitas a um estresse nutricional. Para tanto, células de *P. brasiliensis* em suas duas formas, micélio e levedura, foram crescidas em diferentes condições de estresse nutricional, na ausência do estresse térmico.

## Metodologia

Para os experimentos de autofagia células miceliais e leveduriformes isolado 18 de *P. brasiliensis* (Pb18) foram submetidas a diferentes condições nutricionais, através do crescimento das mesmas em meios de cultivo na presença e na ausência de determinados componentes, como, aminoácidos, fonte de carbono e fonte de nitrogênio. Para tanto, estas células foram cultivadas, por 5 dias, em 50 mL de meio YPD líquido a 25°C (miceliais) ou a 36°C (leveduriformes). Células fúngicas, presentes em 20 mL destas culturas, foram coletadas por centrifugação e lavadas por 3 vezes em PBS (137 mM NaCl, 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 3 mM KCl pH 7,2). Por último as células foram lavadas e ressuscitadas em 4 mL de meio sintético definido, sem fontes de aminoácidos, carbono e nitrogênio (SD -ACN). 500 µL destas células foram inoculados em 15 mL de diferentes meios, sendo eles: meio sintético definido, SD (5 mM de KCl, 8,5 mM de NaCl, 1 mM de Tris pH 6,8), 10 mM de 1 mM de MgSO<sub>4</sub>, 1 mM de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>: KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 1 mM de CaCl<sub>2</sub>, 0,3% de glicose, 0,4% de casaminoácidos e 7,5 mM de NH<sub>4</sub>Oac, pH 5,6); meio sintético definido sem aminoácidos, SD -A (SD, sem casaminoácidos); meio sintético definido sem fonte de carbono, SD -C (SD, sem glicose); e meio sintético definido sem fonte de nitrogênio, SD -N (SD, sem NH<sub>4</sub>Oac). A avaliação da autofagia nestas células, em diferentes condições de estresse nutricional, era realizada diariamente. 3 mL de cada cultura eram coletados, as células eram centrifugadas, lavadas 3 vezes em PBS e ressuscitadas em 2 mL da mesma solução. Cerca de 100 µL destas células eram reservados como células controle (não coradas por monodansilcadaverina, MDC), e o restante era incubado com 50 µM de MDC por 15 minutos a 36°C, sob agitação. Ao final da incubação, as células eram novamente lavadas por 3 a 4 vezes com PBS. Parte destas células eram imediatamente visualizada, em microscópio de fluorescência, e fotografadas com a utilização de uma câmera Olympus C-5060 acoplada ao microscópio Leica DMBL, com o filtro A (340 – 380 nm).

## Resultados

Resultados preliminares obtidos por este grupo mostraram que células miceliais (25°C) e leveduriformes (36°C) de *P. brasiliensis*, crescidas em meio de cultura rico, exibem autofagia em nível basal e que este processo torna-se ativo durante o dimorfismo deste fungo, quando células miceliais são submetidas à alteração de temperatura (25 °C para 36 °C).

Para avaliarmos se o processo de autofagia em *P. brasiliensis* torna-se ativo em condições de estresse nutricional e na ausência de estresse térmico, células miceliais e leveduriformes foram crescidas sob privação de determinados nutrientes como, aminoácidos, carbono ou nitrogênio.

A Figura 1 mostra células miceliais de *P. brasiliensis*, crescidas em diferentes meios de cultura, e coradas (A/B, C/D, E/F, G/H) ou não (I/J) por um corante específico para vacúolos autofágicos, monodansil cadaverina (MDC) (Munafó & Colombo, 2001).

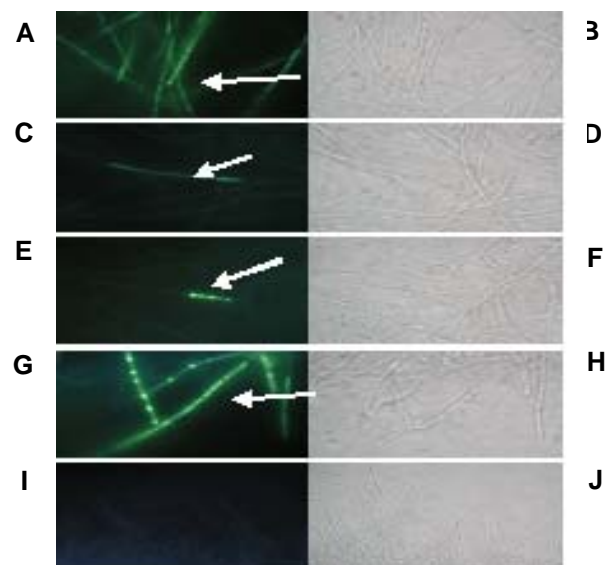


Figura 1 – Imagem de células miceliais de *P. brasiliensis* vista em microscópio Leica DMLB (250 vezes de aumento) e fotografadas com câmera Olympus C-5060 (2,5 vezes de aumento). Em B, D, F, H e J fotomicrografia de contraste de fase. Em A, C, E, G e I fotomicrografia de fluorescência (filtro 340-380 nm). As células de *P. brasiliensis* foram crescidas, à 25°C, em diferentes meios de cultura: SD -A, em A e B; SD -C, em C e D; SD -N, em E e F; SD, em G e H, foram coradas com monodansil cadaverina (MDC). Em I e J as células foram crescidas em meio SD e não foram coradas com MDC. As setas indicam regiões coradas por MDC, contendo vacúolos autofágicos.

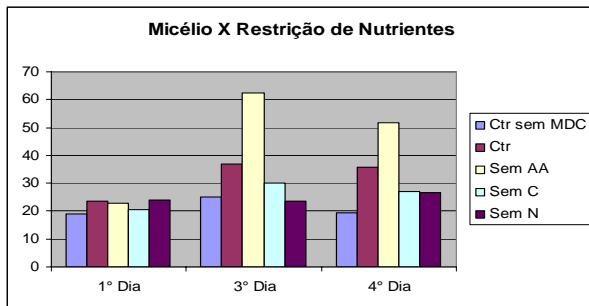


Figura 2 - Gráfico indicando a quantidade de MDC incorporada pelas células miceliais crescidas em diferentes meios, utilizando como parâmetro células controles sem MDC.

A Figura 3 mostra células leveduriformes de *P. brasiliensis*, crescidas em diferentes meios de cultura, e coradas (A/B, C/D, E/F, G/H) ou não (I/J) por MDC.

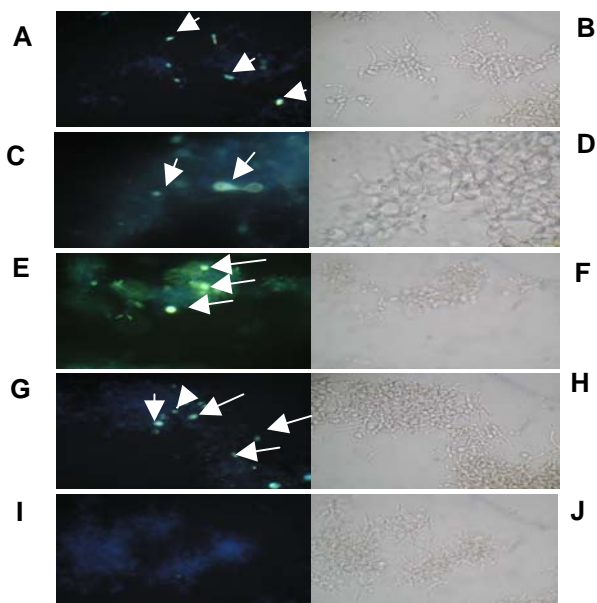


Figura 3 – Imagem de células leveduriformes de *P. brasiliensis* vista em microscópio Leica DMLB (2,5 vezes de aumento) e fotografadas com câmera Olympus C-5060 (2,5 vezes de aumento). Em B, D, F, H e J fotomicrografia de contraste de fase. Em A, C, E, G e I fotomicrografia de fluorescência (filtro 340-380 nm). As células de *P. brasiliensis* foram crescidas, à 37°C, em diferentes meios de cultura: SD -A, em A e B; SD -C, em C e D; SD -N, em E e F; SD, em G e H, foram coradas com monodansil cadaverina (MDC). Em I e J as células foram crescidas em meio SD e não foram coradas com MDC. As setas indicam regiões coradas por MDC, contendo vacúolos autofágicos.

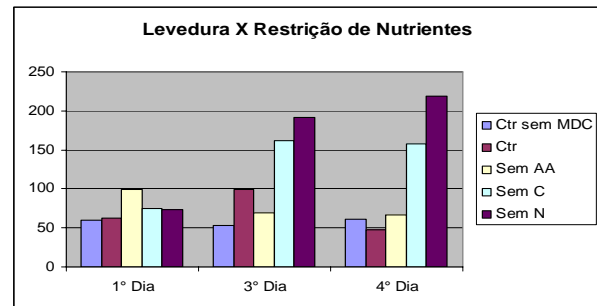


Figura 4 - Gráfico indicando a quantidade de MDC incorporada pelas células leveduriformes crescidas em diferentes meios, utilizando como parâmetro células controles sem MDC.

## Discussão

O *P. brasiliensis* é o agente etiológico de uma micose sistêmica, paracoccidiodomicose (PCM), que, antigamente, acometia apenas trabalhadores de áreas rurais que apresentavam consumo excessivo de álcool, nicotina e em sua maioria eram desnutridos (Wanke & Londero, 1994). Atualmente, com o aumento do número de casos de diversas patologias que debilitam o sistema imunológico, por exemplo, a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), esta micose vem se comportando como uma doença oportunista nestes indivíduos (Paniago et al., 2005). Deste modo, o estudo e o conhecimento detalhado dos processos biológicos do fungo, entre eles os que estão envolvidos em sua diferenciação de micélio para levedura, essencial para o estabelecimento e disseminação da doença, é cada vez mais importante e imprescindível para o combate desta doença. Resultados preliminares deste grupo de pesquisa mostram que células miceliais deste fungo exibem vacúolos autofágicos, quando submetidas à alteração de temperatura (25°C para 36°C). A autofagia é um mecanismo altamente conservado em organismos eucarióticos que está envolvida em importantes processos biológicos como: adaptação, diferenciação e desenvolvimento (Levine & Yuan, 2005). Para que a PCM se estabeleça no homem um dos requisitos necessários para o fungo é que ele seja capaz de se diferenciar de micélio para levedura. Além do estresse térmico este microorganismo também passa por um estresse nutricional quando inalado pelo homem. Nosso interesse neste trabalho foi avaliar a ocorrência de autofagia em células *P. brasiliensis*, miceliais e leveduriformes, frente a diferentes estresses nutricionais. Como mostrado na Figura 1, células miceliais exibem maior quantidade de vacúolos autofágicos quando crescidas em meio SD sem aminoácido (Figura 1A), e em meio SD contendo todos os componentes (Figura 1G), quando comparadas

àquelas crescidas em meio SD sem carbono (Figura 1C) e sem nitrogênio (Figura 1E). As células crescidas em meio SD sem aminoácidos são as que aparentemente produzem mais vacúolos autofágicos, indicando que este processo seja requerido mais prontamente nesta situação de estresse nutricional. Na Figura 2, o gráfico mostra a diferença existente entre células crescidas nos diferentes meios durante três dias. Quando células leveduriformes são submetidas a crescimentos nestes meios pode-se observar que aquelas crescidas na ausência de carbono e nitrogênio exibem maior quantidade de vacúolos autofágicos (Figura 3C e 3E) quando comparadas com as crescidas em meio SD (Figura 3G) e em meio SD sem aminoácido (Figura 3A). Na Figura 4, o gráfico mostra a diferença existente entre células crescidas nos diferentes meios durante três dias.

### Conclusão

Os resultados sugerem que o processo de autofagia ocorre em *P. brasiliensis* na forma de micélio e de levedura na presença de estresse nutricional e ausência de estresse térmico. Na forma miceliana a autofagia é aumentada quando há a restrição de aminoácidos e diminuída quando há a restrição de nitrogênio, enquanto que em sua forma leveduriforme a autofagia é aumentada quando há a restrição de nitrogênio e diminuída quando há a restrição de aminoácidos. Portanto, este mecanismo pode estar envolvido na adaptação e/ou sobrevivência deste microorganismo em condições nutricionais adversas, além de ser requerido em condições de estresse térmico.

### Referências

- BIEDERBICK, A., KERN, H.F. & ELSASSER, H. P., Monodansylcadaverine (MDC) is a specific in vivo marker for autophagic vacuoles. **Eur. J. Cell. Biol.** 66:3-14, 1995.
- BRUMMER, E., CASTANEDA, E., RESTREPO, A. , Paracoccidiodomicosys: an update. **Clin Microbiol Rev.** Apr; 6 (2): 89- 117, 1993.
- KIM, J. & KLIONSKY, D. J., Autophagy, cytoplasm-to-vacuole targeting pathway, and perophagy in yeast and mammalian cells. **Annu. Rev. Biochem.** 69, 303-342, 2000.
- KLIONSKY, D. J., The molecular machinery of autophagy: unanswered questions. **J. Cell Science** 118: 7-18, 2005.
- LACAZ, C.S. Historical evolution of the knowledge on *Paracoccidiodoides brasiliensis* .In: Franco, M., Lacaz, C.S., Restrepo-Moreno, A. , & Del Negro, G. Paracoccidiodomicosys. 2 ed. Boca Raton: CRC Press, cap. 1. p. 1-4, 1994.
- LEVINE, B., YUAN, J. Autophagy in cell cell death: an innocent convict? **J Clin Invest** Oct; 115 (10):2679-88, 2005.
- Lum, J.J., De Berardinis, R. J., & Thompson, C. B., Autophagy in metazoans:cell survival in the land of plenty. **Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.** 6: 439-448, 2005.
- LUTZ, A.,Uma mycose pseudococidica localizada na bocca e observada no Brazil. Contribuição ao conhecimento das das hyphoblastomycoses americanas, Brás- med., 22, 121, 1908.
- MCEWEN, J. G. , BEDOYA V., PATINO, M. M. , SALAZAR, M. E., RESTREPO, A. Experimental murine paracoccidiodomicosys induced by the inhalation of conidia. **J Med Vet Mycol.** Jun; 25 (3): 165- 75, 1987.
- MUNAFÓ, D. B., COLOMBO, M. I., A novel assay to study autophagy: regulation of autophagosome vacuole size by amino acid deprivation. **J Cell Sci,** Oct; 114 (Pt 20): 3619-29, 2001.
- ONODERA J., OHSUMI, Y., Autophagy is required for maintenance of amino acid levels and protein synthesis under nitrogen starvation. **J Biol Chem** 280: 31582–31586, 2005.
- PANIAGO, de F. A. C.; AGUIAR, E. S.; AGUIAR, J. I.; daCUNHA R. V.; CASTRO A. R., WANKE B., Paracoccidiodomycosis in patients with human immunodeficiency virus: review of 12 cases observed in an endemic region in Brazil. **J. Infect.** Oct; 51 (3):248-52, 2005,
- REGGIORI, F. & KLIONSKY, D. J., Autophagy in the eukaryotic cell. **Eukaryot. Cell** 1, 11-21, 2002.
- ROHDE, J. R.; CARDENAS, M. E., Nutrient signaling through TOR kinases controls gene expression and cellular differentiation in fungi. **Curr Top Microbiol Immunol.** 279: 53- 72, 2004.
- SAN BLAS G., NINO-VEGA, G. ,ITURRIAGA T., *Paracoccidiodoides brasiliensis* and paracoccidiodomicosys: molecular approaches to morphogenesis, diagnosis, epidemiology, taxonomy and genetics. **Med Mycol.** Jun; 40 (3): 225- 342, 2002.
- WANG, C. W.; KLIONSKY,D. J., The molecular mechanism of autophagy. **Mol Med.** Mar- Apr; 9(36-4):65 -76, 2003.
- WANKE, B., LONDERO, A. T., Epidemiology an Paracoccidiodomicosys. 2 ed. Boca Raton: CRC Press, cap 7 p. 110-113, 1994.

