

## DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DE VESÍCULAS INTRACELULARES DE LEVEDURAS DE *Paracoccidioides brasiliensis* TRATADAS COM CICLOSPORINA A

**Adriana C. Sousa<sup>1</sup>, Leandro Raniero<sup>2</sup>, Rosana Alberici<sup>3</sup>, Marcos Eberlin<sup>3</sup>, Claudia B. L. Campos<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Laboratório de Biologia Molecular e Celular de Fungos, Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP), madry\_sjc@yahoo.com.br, cbcampos@univap.br

<sup>2</sup> Laboratório de Espectroscopia Vibracional, Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP), Iraniero@univap.br

<sup>3</sup> Laboratório Thomson, Departamento de Química, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)

**Resumo-** O *Paracoccidioides brasiliensis* é um fungo termo-dimórfico, causador da paracoccidioidomicose, micose endêmica sistêmica prevalente na América Latina. A transição dimórfica do micélio para levedura ocorre pelo aumento da temperatura de 25°C para 37°C e é um importante fator de virulência. No *P. brasiliensis* sabe-se que a calcineurina é essencial para o dimorfismo de micélio para levedura. A calcineurina pode ser inibida pelo imunossupressor ciclosporina A, que além de inibir o crescimento, estimula o acúmulo de vesículas intracelulares. Neste trabalho utilizando técnicas de coloração, análises de espectroscopia vibracional de FTIR e espectroscopia de massa, essas vesículas foram identificadas como vesículas lipídicas. A análise de FTIR mostrou que existem diferenças na qualidade dos lipídios entre o grupo controle e os grupos tratados com inibidor de calcineurina. Na espectroscopia de massa foi constatado que no grupo controle há mais fosfolipídio que triglicérides e que no grupo tratado com ciclosporina A há mais triglicérides que fosfolipídios. Dados preliminares mostram que as vesículas têm propriedades estimuladoras da proliferação quando adicionadas em culturas de leveduras do *P. brasiliensis*.

**Palavras-chave:** *P. brasiliensis*, calcineurina, vesículas, lipídios.

**Área do Conhecimento:** Farmácia.

### Introdução

Em 1908, a paracoccidioidomicose (PCM) foi descrita pela primeira vez por Adolfo Lutz como micose endêmica sistêmica, cujo agente etiológico é o *Paracoccidioides brasiliensis*. O *P. brasiliensis* é um fungo termo-dimórfico, isto é, pode se desenvolver como leveduras ou sob a forma de micélio dependendo da temperatura que se encontre (GOMES et al., 2000). A PCM apresenta grande incidência na América Latina e distribuição heterogênea, havendo área de baixa e alta endemicidade. A maioria dos casos registrados são no Brasil, Venezuela, Colômbia e Argentina. (ALBORNOZ, 1971; SAN-BLAS; NINO-VEGA, 2001).

A porta de entrada do *P. brasiliensis* é a via inalatória e a infecção ocorre quando o fungo se encontra na forma filamentosa, que é a forma encontrada no ambiente. Quando em contato com a temperatura corpórea, os propágulos ou fragmentos de micélio inalados pelo hospedeiro se transformam em levedura (forma infectante). Indivíduos do sexo masculino são os mais acometidos, principalmente aqueles com idade entre 30 e 50 anos e já se sabe que a menor incidência em mulher está relacionada com fatores hormonais (ARISTIZABAL et al., 1998).

A PCM representa um importante problema de Saúde Pública devido à quantidade de mortes prematuras que provoca e ao seu alto poder incapacitante, principalmente entre trabalhadores rurais. Entre as muitas vertentes dos estudos epidemiológicos sobre a paracoccidioidomicose, uma das linhas de pesquisa busca identificar fatores que levam o indivíduo infectado a manifestar a doença (MARQUES, 2003).

A transição dimórfica do micélio para levedura ocorre pelo aumento da temperatura de 25°C para 37°C e é um importante fator de virulência (SAN-BRAS et al., 2002). Sabe-se que o sistema Ca<sup>2+</sup>/calmodulina/calcineurina é essencial para virulência de alguns fungos patogênicos (STEINBACH et al., 2007). No *P. brasiliensis* foi mostrado que a calcineurina é essencial para o dimorfismo de micélio para levedura deste fungo (CAMPOS et al., 2008). A hipótese é que esta enzima seja importante para garantir a manifestação das modificações necessárias para a adaptação do fungo ao aumento da temperatura.

A calcineurina pode ser eficientemente inibida pelo imunossupressor ciclosporina A (CsA). O nosso grupo observou que, ao submeter o *P. brasiliensis* ao tratamento com a CsA, ocorreu bloqueio da proliferação das leveduras. Observou-se também que a CsA estimula o acúmulo de

vesículas intracelulares de composição até então não definida (CAMPOS et al., 2008). Inicialmente essas vesículas intracelulares poderiam ter conteúdos e funções diversificadas. Por exemplo, poderiam ser vesículas secretórias (que podem conter enzimas para degradação de nutrientes), sinalizadores parácrinos ou autócrinos, vesículas lipídicas (podem conter lipídios de armazenamento ou de sinalização) e vesículas ácidas, como endossomos precoces, endossomos tardios ou lisossomos. O objetivo deste trabalho foi determinar a composição das vesículas que se acumulam em leveduras de *P. brasiliensis* e compará-las às vesículas encontradas em leveduras não tratadas. Além disso, buscamos determinar a ação das vesículas sobre a proliferação de leveduras *in vitro*.

## Metodologia

A cepa 18 de *P. brasiliensis* (Pb18) utilizada nesse projeto foi fornecida pelo professor Zoilo P. Camargo (UNIFESP, São Paulo). Estoques desta cepa sob a forma de levedura foram mantidos em meio sólido de YPD (1% de extrato de levedura, 2% de peptona, 2% de dextrose e 2% de agar) a 4°C. Para a realização dos experimentos, uma alçada do estoque de Pb18 foi inoculada em 10 mL de YPD líquido e cultivada a 37°C sob agitação orbital por aproximadamente 5 dias para produzir os pré-inóculos. Em seguida, aproximadamente 1 mL deste pré-inóculo foi acrescentado em um frasco contendo 20 mL de YPD fresco. Após mais 2-3 dias a 37°C, entre 5-10 mL dessa cultura foram expandidos para 80 mL que foram divididos em 4 grupos experimentais de 20 mL cada: 1 controle e 3 concentrações crescentes de CsA (0,5 µg/ml, 2 µg/ml e 5 µg/ml). Dependendo do experimento, os grupos foram incubados entre 2 e 7 dias a 37°C.

Para a realização do experimento de coloração das vesículas lipídicas com Oil Red O, foi preparada a solução estoque do corante utilizando 0,03 g do Oil Red O dissolvido em 6 ml de isopropanol, que foi reservado. Em seqüência, 1 ml da cada cultura foi transferida para microtubos e em seguida centrifugados a 6.000 rpm por 5 min e lavados 3x com água destilada gelada. Após a última lavagem foi retirado o excesso de água e os fungos foram fixados em paraformaldeído 4% a 4°C por 24h. Em seguida, as amostras foram lavadas novamente 3x com água e retirado o excesso. Antes de iniciar a coloração, o corante Oil Red O foi diluído na proporção 6:4 em água destilada (600 µL de solução estoque + 400 µL de água destilada), mantido em temperatura ambiente por 1h para somente então ser adicionado aos fungos. A mistura corante-fungos foi deixada em repouso por

mais 24h, novamente lavadas 3x com água destilada e montadas em lâminas para a microscopia ótica.

Para a realização das análises de espectroscopia vibracional, 1 ml de cada cultura, tanto o controle quanto os tratados, foi transferido para microtubos e em seguida centrifugados e lavados 3x com água destilada gelada. Após a última lavagem foi retirado o excesso de água e acrescentado 1 ml de isopropanol 60% que foi mantido a 4°C por 24h. Posteriormente, as quatro amostras foram lavadas novamente 3x com água destilada, e em seguida foram transferidos 20 µL de cada amostra para uma matriz (chamadas de "janelas") de fluoreto de cálcio, que foram levadas para liofilizar por ~ 45 min. Após a liofilização as janelas foram levadas para a análise no FTIR e com os dados obtidos foi realizado um dendograma a partir da análise de Cluster para obter os resultados.

Para a análise de espectroscopia de massa, leveduras de *P. brasiliensis* foram cultivadas 24 horas na ausência e presença de 2 µg/mL de ciclosporina A, lavadas 3x com água geladas e congeladas a -80°C. Os fungos foram mantidos congelados até o momento da extração de lipídios totais. Para tal, foram adicionados aos fungos uma mistura de clorofórmio:metanol:água (1:2:0,8), sendo que nestas concentrações os solventes coexistem em uma solução homogênea. Logo em seguida os tubos foram colocados no agitador rotatório a 4°C por 30 minutos. Em seguida, foi adicionado mais um volume de clorofórmio e um volume de água à mistura e deixado agitar por mais 2 min. A mistura foi centrifugada a 1000 rpm por 2 min a 4°C para a separação das fases. A fase clorofórmio contendo os lipídios foi transferida pra outro tubo e seca sob argônio. Os lipídios foram mantidos secos até o momento da análise de massa, quando foram dissolvidos em clorofórmio. Aproximadamente 20 µL da solução de lipídios foi colocado sobre papel de filtro e analisados por *Easy Ambient Sonic-Spray Ionization Mass Spectrometry* (EASI-MS) de acordo com Simas et al. (2010).

Para testar a ação das vesículas lipídicas sobre a proliferação de leveduras de *P. brasiliensis in vitro*, foi obtido as vesículas purificadas. Para o isolamento das vesículas 20 mL do pré inóculo foi transferido para um frasco contendo 400 mL de YPD líquido e posteriormente dividido em dois grupos experimentais contendo aproximadamente 210 mL cada, que foram deixados a 37°C sob agitação por 48h. Após as 48h um dos grupos foi tratado com ciclosporina A na concentração de 2µg/ml e deixado na mesma condição por mais 24h. Em seqüência as culturas foram separadas em tubos de 50 mL para realizar a centrifugação.

As amostras foram centrifugadas a 5000 rpm por 5 minutos a 4°C e retirado o meio de cultura, em seqüência os pellets foram agrupados em apenas 2 frasco e lavados 2 vezes com o tampão 1 (20 mmol/L Tris, 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L EGDA, 100 mmol/L KCl pH 7.4 e na hora de utilizar o tampão 1 foi adicionado 1 µg/mL de pepstatina, 0,1 mmol/L PMSF e 2 µG/mL de aprotinina). Após a segunda lavagem foi adicionada mais 3 mL do tampão 1 para resuspenção das células. Em seguida aproximadamente 650 µL de pérolas de vidro foi colocado no tubo e completado o volume para 1,5 mL com o homogenato de fungo e levado ao microagitador por duas vezes (tempo 2) para cada amostra, sempre alterando as amostras para não esquentar muito. Após esse procedimento as amostras foram transferidas para tubos de 15 mL e adicionado na amostra o mesmo volume de tampão 2 (20 mmol/L Tris, 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L EGDA, 100 mmol/L KCl pH 7.4, 0,7 µg/mL de pepstatina, 0,1 mmol/L PMSF, 1,08 mol/mL de sacarose e 2 µG/mL de aprotinina) e centrifugados novamente a 1800 rpm, a 4°C por 5 minutos para remover os núcleos. O sobrenadante foi separado e transferido para os tubos da ultracentrifuga onde sobre a amostra foram adicionados os demais tampões na ordem: tampão 3 (20 mmol/L Tris, 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L EGDA, 100 mmol/L KCl pH 7.4, 0,7 µg/mL de pepstatina, 0,1 mmol/L PMSF, 0,27 mol/mL de sacarose e 2 µG/mL de aprotinina) e tampão 4 (20 mmol/L Tris, 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L EGDA, 100 mmol/L KCl pH 7.4, 0,7 µg/mL de pepstatina, 0,1 mmol/L PMSF, 0,135 mol/mL de sacarose e 2 µG/mL de aprotinina). Os tubos foram levados para centrifugar a 35000 rpm por 1h a 4°C. Após a centrifugação observamos 1 banda superficial correspondente as vesículas lipídicas que foram coletadas e reservadas a 4°C. Para testar a ação das vesículas foi preparado 100 mL de cultura a partir do pré-inóculo que foram divididos em 5 grupos experimentais de 20 mL cada: 1 foi deixado como controle e em dois separadamente foi adicionado o equivalente a 4 e 40 µg de proteínas vesiculares purificadas do controle e nos outros dois restantes o equivalente a 4 e 40 µg de proteínas vesiculares purificadas do fungo tratado. A taxa de proliferação foi estimada pela medida da densidade ótica da cultura em 600 nm em leitor de placas ao longo de 6 dias de cultura.

## Resultados

Na Figura 1 são mostradas leveduras de *P. brasiliensis* em meio de cultura na ausência (A) e presença de 2 µg/mL de ciclosporina A (B). Pode-se notar na figura A que os fungos são ovais, apresentam brotos alongados e poucas vesículas. Na figura B condição em que a levedura

recebeu tratamento com CsA, observou-se mudança na morfologia das leveduras, que se apresentaram mais arredondadas, com brotos menores e acúmulo de vesículas intracelular de fácil visualização.

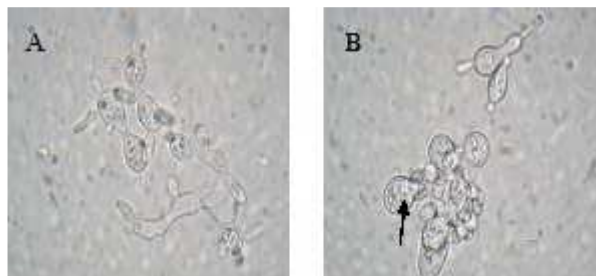


Figura 1- Fotomicrografia de leveduras de *P. brasiliensis* em aumento 1.000x. A- Leveduras controle cultivadas por 48 h a 37°C em meio YPD líquido. B- leveduras tratadas com 2 µg/mL de CsA como descrito em A. Vesículas intracelulares apontadas pela seta.

Na Figura 2 são mostradas vesículas lipídicas de leveduras de *P. brasiliensis* não tratadas (CTR) e tratadas com o inibidor de calcineurina (CsA), após coloração com oil O. Observa-se que o grupo controle apresenta vesículas em menor quantidade e com diâmetro menor quando comparadas com as vesículas dos grupos tratados. Também nota-se uma diferença na intensidade da coloração entre os dois grupos experimentais.

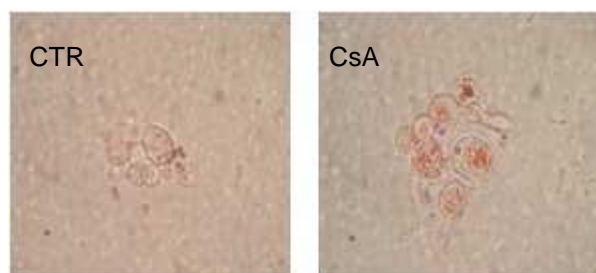


Figura 2- Fotomicrografia de leveduras de *P. brasiliensis* em aumento 1000x coradas com Oil Red O. CTR - Leveduras controle cultivadas por 48h a 37°C em meio YPD líquido. CsA- leveduras tratadas com 2 µg/mL de CsA como descrito em A.

Na Figura 3 são mostradas as análises obtidas da Espectroscopia vibracional FTIR. Os resultados obtidos da análise mostraram que os espectros entre os comprimentos de onda de 900-1250 nm e 2800-3000 nm, referentes a faixas dos lipídios, apresentou diferença significativa entre o grupo controle e os grupos tratados.



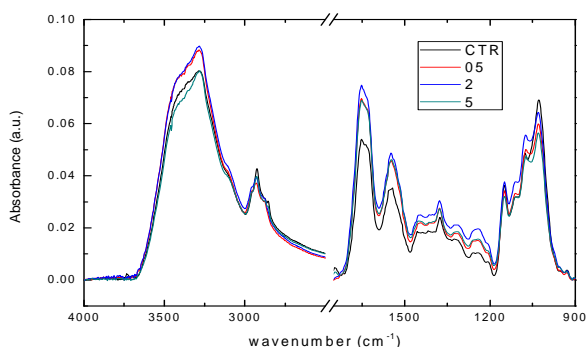


Figura 3- Análise de FTIR. Picos em preto são referentes a amostra CTR. Demais picos referentes aos grupos que receberam tratamento com CsA. Vermelho (0,5 µg/mL). Azul (2 µg/mL). Verde (5 µg/mL).

A Figura 4 mostra a análise estatística realizada nos resultados obtidos por FTIR. Pode-se observar que as amostras foram agrupadas em duas raízes distintas e que também houve uma diferença entre os grupos tratados conforme a concentração da droga. Este resultado mostra que há uma diferença na qualidade dos lipídios.

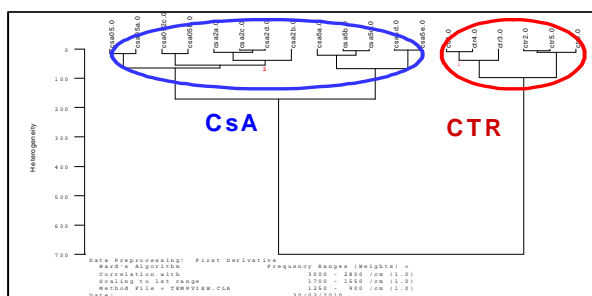


Figura 4- Dendrograma realizado apartir da análise de Cluster, utilizando o algoritmo de Word's e o coeficiente de Pearson.

Na Figura 5 é mostrado os resultados obtidos por espectroscopia de massa modo positivo e na Figura 6 no modo negativo.

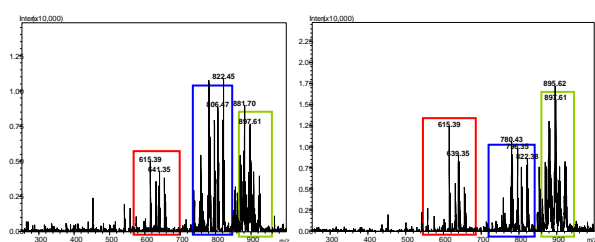


Figura 5- Espectroscopia de massa, modo positivo. Quadrados em azul fosfolipídios. Quadrados em verde triglicérides. Quadrados em vermelho diacilglicerol.

No modo positivo, pode-se observar que no grupo controle (espectro a esquerda) a proporção relativa de fosfolipídios (picos enquadrados em azul) foi maior que a de triglicérides (picos em verde). Por outro lado, no grupo tratado com CsA (espectro a direita) a proporção relativa de triglicérides (picos em verde) foi maior que a de fosfolipídios (picos em azul).

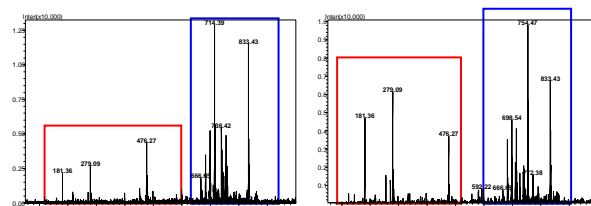


Figura 6- Espectroscopia de massa, modo negativo. Quadrados em vermelho ácidos graxos. Quadrados em azul fosfatidil etanolamida e esfingosina

No modo negativo a proporção de ácidos graxos (picos em vermelho) em relação a fosfatidil etanolamida e a esfingosina (picos em azul) é maior nas leveduras controle (espectros a esquerda) do que nas tratadas com CsA (espectros a direita).

Esses resultados confirmam os dados obtidos por FTIR de que o conteúdo lipídico das leveduras foram alterado pela inibição da calcineurina.

A Figura 7 mostra o gráfico, que representa a proliferação do fungo ao adicionar as vesículas lipídicas ao meio de cultura.

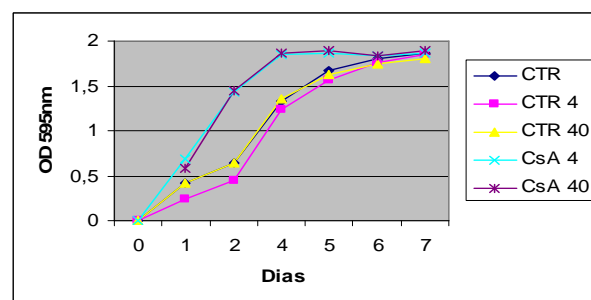


Figura 7- Curva de crescimento, com adição das vesículas purificadas. Taxa de proliferação estimada pela medida da densidade ótica da cultura em 600 nm em leitor de placas ao longo de 6 dias de cultura.

Pode-se notar que os grupos experimentais que receberam as vesículas purificadas do grupo tratado com CsA (linhas azul e magenta) apresentaram uma taxa de proliferação maior, embora pequena, em relação aos grupos que receberam as vesículas purificadas do grupo

controle (linhas rosa e amarela) e até mesmo maior que o controle que não recebeu vesículas.

## Discussão

Estudos anteriores realizado por nosso grupo mostraram que ao inibir a calcineurina com a droga CsA formavam-se vesículas de composição até então desconhecida. Esse resultado também foi visto neste trabalho ao reproduzir o experimento no qual os fungos tratados com ciclosporina A, independente das concentrações utilizadas, apresentaram acúmulo de vesículas intracelulares com morfologia e provavelmente composição diferente do controle. Vesículas são normalmente produzidas e secretadas por microorganismos, inclusive fungos, e podem apresentar funções diversas (ALBUQUERQUE et al., 2008). Por exemplo, podem conter enzimas hidrolíticas que auxiliam na degradação de moléculas do ambiente (lipases, proteases, fosfolipases). Resultados preliminares mostrados neste trabalho sugerem que uma das funções das vesículas presentes na levedura do Pb possa ser de sinalização, pois ao adicionar as vesículas purificadas a cultura houve alteração na proliferação.

O mecanismo através do qual essas vesículas são formadas ainda não foi determinado, porém, o fato de se acumularem em resposta à inibição da calcineurina sugere o envolvimento desta fosfatase no processo. Não há descrição na literatura que indique que a calcineurina tenha ação sobre a formação dessas vesículas ou até mesmo no metabolismo dos lipídios. Hipóteses foram levantadas para sugerir o mecanismo de ação da calcineurina. Um conhecido alvo da calcineurina é uma proteína chamada dineína que atua em processos de fisão e fissão da membrana mitocondrial em resposta a estímulos variados. Além disso, no sistema nervoso central de mamíferos, a ativação da calcineurina leva a fusão de vesículas sinápticas a membrana celular para a exocitose de neurotransmissores (OH-HORA; RAO, 2009). Uma das hipóteses é que a calcineurina controle fisão e fissão de vesículas de forma análoga no *P. brasiliensis* (JAIN et al., 1993).

É possível também que a calcineurina controle o metabolismo lipídico, uma vez que a composição lipídica total dos fungos se altera pelo tratamento com ciclosporina A. Também foi verificado se a formação de vesículas estava relacionada ao meio de cultivo, e resultados preliminares nos mostrou que mesmo reduzindo 10x a concentração de dextrose conseguimos obter os mesmos resultados anteriores. Este resultado sugere que o acúmulo das vesículas não estão relacionados a

fonte de carbono (glicose) oferecida ao fungo pelo do meio de cultura. Todas as hipóteses serão verificadas no futuro.

## Conclusão

Concluiu-se que a inibição da calcineurina com ciclosporina A leva ao acúmulo de vesículas intracelulares de conteúdo lipídicos em leveduras de *P. brasiliensis* e sugere a ação desta fosfatase no metabolismo lipídico.

## Agradecimentos

Agradeço a Deus e a todas as pessoas que me ajudaram direta ou indiretamente a concluir esse trabalho.

## Referências

- ALBORNOZ MB. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from rural soil in Venezuela. **Sabouraudia**. v. 9, p. 248-252. 1971.
- ABUQUERQUE, P.C.; NAKAYASU, E. S.; RODRIGUES, M. L.; FRASES, S.; CASADEVALL, A.; OLIVEIRA, R. M. Z.; ALAMEIDA, I. C.; NOSANCHUK, J. D. Vesicular transport in *Histoplasma capsulatum*: an effective mechanism for trans-cell wall transfer of proteins and lipids in ascomycetes. **Cell Microbio**, 10(8): 1695–1710. 2008.
- ARISTIZABAL, B.H.; CLEMONS, K. V.; STEVENS, D.A.; RESTREPO, A. Morphological transition of *Paracoccidioides brasiliensis* conidia to yeast cells: in vivo inhibition in females. **Infect immune**, 66 (11): 5587-91. 1998.
- CAMPOS, C.B.; DI BENEDETTE, J.P.; MORAIS, F.V.; OVALLE, R.; NOBREGA, M.P. Evidence for the role of calcineurin in morphogenesis and calcium homeostasis during mycelium-to-yeast dimorphism of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Eukaryot Cell**., v.7, p.1856-1864. 2008.
- GOMES, G.M.; CISALPINO, P.S.; TABORBA, A.P.; CAMARGO, Z.P. PCR for Diagnosis of *Paracoccidioidomycosis*. **Journal Clinical Microbiology**. p.3478-3480. 2000.
- JAIN, J.; MCCAFFREY, P.G.; MINER, Z.; KERPPOLA, T.K.; LAMBERT, J.N.; VERTINE, G.L.; CURRAN, T.; RAO, A. The T-cell transcription factor NFATp is a substrate for calcineurin and interacts with Fos and Jun. **Nature** 365:352-355. 1993.

- MARQUES, A.S. Paracoccidiodomicose: Atualização Epidemiológica, Clínica e Terapêutica. **An bras Dermatol** 78 (2): 135-150, 2003.

- OH-HORA, M., RAO, A. The calcium/NFAT pathway: role in development and function of regulatory T cells. **Microbes Infect.** 11:612-619. 2009.

- SAN-BLAS, G., AND G. NIÑO-VEGA. *Paracoccidioides brasiliensis*: virulence and host response. In R.L. Cihlar and R.A. Calderone (eds.), *Fungal pathogenesis: principles and clinical applications*, Marcel Dekker, Inc. New York, N.Y. p. 205-266. 2001.

- SAN-BLAS, G.; NINO-VEGA, G.; ITURRIAGA, T. *Paracoccidioides brasiliensis* and paracoccidiodomycosis: molecular approaches to morphogenesis, diagnosis, epidemiology, taxonomy and genetics. **Med Mycol.** V.40, p.225-242. 2002.

- SIMAS, R.C.; CATHARINO, R.R.; CUNHA, I.B.; CABRAL, E.C.; BARRERA-ARELLANO, D.; EBERLIN, M.N.; ALBERICI, R.M. Instantaneous characterization of vegetable oils via TAG and FFA profiles by easy ambient sonic-spray ionization mass spectrometry. **Analyst.** V.135, n.4. p.738-744, 2010.

- Steinbach WJ, Reedy JL, Cramer RA Jr, Perfect JR, Heitman J. Harnessing calcineurin as a novel anti-infective agent against invasive fungal infections. **Nat Rev Microbiol.** 5:418-30. 2007.