

FUNÇÃO DO SISTEMA Ca^{+2} /CALCINEURINA SOBRE DIFERENTES TIPOS DE ESTRESSES AMBIENTAIS E CONDIÇÕES NUTRICIONAIS EM LEVEDURAS DO *Paracoccidioides brasiliensis* **Roberta S. Prado, Cláudia B.L. Campos.**

Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento (IP&D), Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP), Brasil,
Av. Shishima Hifume, N°2911, 12244-000, S.J. Campos, SP, Brasil.
robertasprado@ig.com.br, cbcampos@univap.br

Resumo – O fungo *Paracoccidioides brasiliensis* submetido à mudança de temperatura de 25°C para 37°C sofre dimorfismo de micélio para levedura, que está relacionado a sua patogenicidade. Há evidências que a fosfatase calcineurina esteja envolvida na adaptação de fungos a diferentes tipos de estresses e que controle tais processos no *P. brasiliensis*. Este projeto propõe submeter o *P. brasiliensis* a diferentes tipos de estresses para avaliar a contribuição da calcineurina na adaptação do fungo. O *P. brasiliensis* foi cultivado à 37°C (levedura) na ausência ou presença de diferentes concentrações de ciclosporina A, um inibidor da calcineurina, e em seguida submetido a agentes estressantes diversos (estresse salino, osmótico e nutricional). Nossos resultados mostraram que o *P. brasiliensis* apresentou maior crescimento quando cultivado em 0,2% de dextrose, o que supostamente seria um estresse nutricional, mesmo os fungos tratados com CsA, e que são sensíveis a concentrações de NaCl e sorbitol normalmente toleradas por outros fungos.

Palavras-chave: *Paracoccidioides brasiliensis*, calcineurina, estresse.

Área do Conhecimento: Farmácia.

Introdução

O agente etiológico da Paracoccidioidomicose (PCM), *Paracoccidioides brasiliensis*, é um fungo termodimórfico. A distribuição geográfica da paracoccidioidomicose é restrita à América Latina, sendo encontrada do México a Argentina (BRUMMER et. al., 1993). A PCM é a micose profunda mais importante da América Latina. No Brasil, o estado de Minas Gerais tem o maior número de casos descritos, porém a prevalência real da PCM não é estabelecida por não ser de notificação compulsória (RODRIGUES & RESENDE, 1996). A PCM acomete indivíduos de todas as faixas etárias, mas as formas progressivas da doença tem maior frequência entre adultos de 30 à 50 anos. A infecção que era praticamente rural, em indivíduos que exercem atividade agrícola, vem atingindo a zona urbana, mesmo em indivíduos que nunca saíram dos grandes centros, atacando todas as profissões (LACAZ, 1992). A infecção é adquirida pela via inalatória através da inspiração de esporos que atingem os alvéolos pulmonares, onde ocorre sua transformação para leveduras, que passam a se multiplicar por brotamento múltiplo (MARTINEZ, 1997). Uma vez estabelecida, a PCM pode apresentar-se sob duas formas clínicas distintas: a forma aguda ou subaguda (juvenil), que representa de 3 a 5 % dos casos, caracterizada pela rápida disseminação do fungo, com granulomas pouco organizados contendo muitos fungos; e a forma crônica (adulto), que representa mais de 90 % dos casos, sendo mais freqüente no sexo masculino na faixa etária de 29 a 49 anos. A

forma crônica caracteriza-se pelo lento e progressivo envolvimento pulmonar, podendo permanecer localizada a este único órgão (branda, moderada ou severa), ou envolver mais de um órgão ou sistema (branda, moderada ou severa), (FRANCO et. al., 1987). A disseminação ocorre através da via linfática e hematogênica. Praticamente todos os órgãos podem ser acometidos, o que coloca a PCM como uma infecção de caráter sistêmico (MARTINEZ, 1997).

O *Paracoccidioides brasiliensis* é um fungo dimórfico. Em temperatura ambiente (entre 20°C e 28°C) apresenta-se sob a forma micelial, e a 37°C desenvolve-se como levedura (MARTINEZ, 1997). Nos tecidos humanos os fungos apresentam formas esféricas (LONTERO & MELO, 1998). Sua esporulação múltipla resulta no típico aspecto de roda de leme (LACAZ, 1991), considerado a forma patogênica do fungo. Quando alguns isolados fúngicos são cultivados sob condições de privação nutricional, eles geram propágulos como conídeos. Quando os conídeos separam do micélio parental e são submetidos a temperatura de 37°C, eles exibem dimorfismo térmico e dão origem as leveduras com múltiplos brotamentos (BRUMMER, et. al., 1993).

A calcineurina, uma fosfatase dependente de Ca^{+2} e calmodulina, está envolvida na resposta a diversos estímulos ambientais e na adaptação de fungos a diferentes tipos de estresses. Em fungos patogênicos, como *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* e *Aspergillus fumigatus*, a ativação da calcineurina permite ao fungo adaptar-se ao ambiente interno do hospedeiro, que pode significar capacidade de diferenciar-se (dimorfismo), de proliferar e de expressar fatores

de virulência (STIE; FOX, 2008). A calcineurina é conhecida por conferir resistência a estresse térmico, iônico, pH, drogas antifúngicas, dentre outros, dependendo da espécie de fungo. Recentemente, nosso grupo indicou evidências de que a calcineurina também controla processos relacionados à habilidade do *P. brasiliensis* de causar patogenicidade no homem. Neste trabalho o inibidor da calcineurina, ciclosporina A, com diferentes eficiências, bloqueou a transição do micélio para levedura, o crescimento à 37°C, a proliferação e o brotamento de leveduras, além de comprometer a homeostase de Ca⁺² intracelular (Campos et. Al., 2007). O objetivo desse trabalho foi verificar se o sistema Ca⁺²/calcineurina atua sobre diferentes tipos de estresses ambientais ou condições nutricionais também no *P. brasiliensis*. Os experimentos consistiram em tratar o *P. brasiliensis* com o modulador da via Ca⁺²/calcineurina, ciclosporina A, em diferentes concentrações, e submeter o fungo a um segundo estresse (nutricional, iônico ou osmótico), para avaliar a função da calcineurina na susceptibilidade/resistência do *P. brasiliensis*.

Metodologia

O isolado Pb18 do fungo *Paracoccidioides brasiliensis* de um estoque mantido à 4°C, foi cultivado em meio YPD líquido (1% de extrato de levedo, 2% de peptona, 2% de dextrose) a 37°C por 5 dias. O inóculo foi expandido (pré-inóculo) e mantido à 37°C sob agitação por mais 3 dias. Através da microscopia foi observado que as leveduras de *P. brasiliensis* apresentavam morfologia com paredes lisas e uniformes. Desse pré-inóculo, foram retirados 12 mL de cultura e adicionados em 100 mL de meio YPD líquido, que permaneceu em agitador à 37°C por 2 horas. Em seguida, 20 mL dessa cultura foi distribuída em 4 erlenmeyers, sendo um utilizado como controle (mantido na ausência de droga) e os outros três erlenmeyers receberam diferentes concentrações de ciclosporina A: 0,5 µg/mL, 2,0 µg/mL e 5,0 µg/ml, e foram mantidos a 37°C sob agitação por mais 2 horas.

Posteriormente, foram retiradas alíquotas de 1,5 mL de cada cultura e transferidas para tubos de centrifugação em duplicata. Todas as amostras foram centrifugadas a 4.000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi retirado e as células foram ressuspendidas com 150 µL de meio YPD líquido. Os volumes dos 2 tubos de cada grupo foram concentrados em um único tubo. Em seguida, a amostra de cada grupo foi diluída: 2X (100 µL da amostra + 100 µL YPD fresco), 6X (100 µL da amostra diluída 2X + 200 µL YPD fresco), 12X (100 µL da amostra diluída 6X + 100 µL YPD fresco).

Foram utilizadas placas controles com YPD + 2% de ágar, e placas com estresse nutricional (1 % de extrato de levedo, 2% de peptone, 0,2% dextrose, 2% ágar), estresse iônico (YPD + 2% de ágar + 0,3 M de NaCl), e estresse osmótico (YPD + 2% de ágar + 2% de sorbitol).

Cinco µL de cada condição experimental (controle, ciclosporina A a 0,5 µg/mL, 2,0 µg/mL e 5,0 µg/ml), diluídas como descrito, foram depositadas em cada uma das placas em duplicatas e mantidas a 37°C por 7 dias.

Resultados

Os grupos de placas controles foram analisadas com o objetivo de avaliar como o *Paracoccidioides brasiliensis* se comporta quando submetido por 2 horas à droga ciclosporina A para, posteriormente, analisar como o fungo reage quando submetido a um segundo estresse (nutricional, osmótico ou iônico).

As leveduras do *P. Brasiliensis* não tratadas com CsA tiveram crescimento mais significativo no meio com estresse nutricional (levedo 1%, peptone 2%, dextrose 0,2%, ágar 2%), em relação ao meio controle, como mostra a Figura 1.

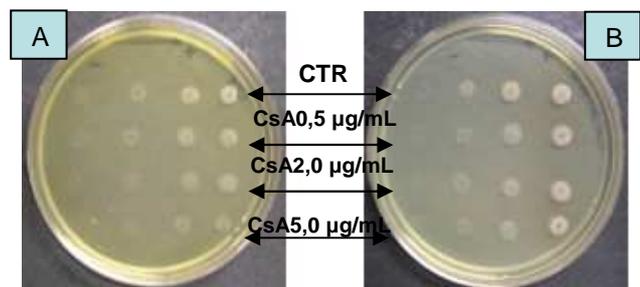


Figura 1: Em A é mostrado leveduras de *P. brasiliensis* previamente cultivadas na ausência (CTR) ou presença de concentrações crescentes de ciclosporina A e plaqueados em meio YPD controle (1% de extrato de levedo, 2% de peptona, 2% de dextrose, ágar 2%). Em B é mostrado leveduras de *P. brasiliensis* cultivadas como em A, porém foram plaqueadas em meio com 0,2% de dextrose.

Por outro lado, as leveduras foram mais sensíveis ao estresse osmótico (2% de sorbitol), e estresse iônico (0,3 M de NaCl) do que ao estresse nutricional, como mostra a Figura 2.

As leveduras tratadas com diferentes concentrações de CsA 0,5 µg/mL, 2,0 µg/mL e 5,0 µg/mL tiveram menor crescimento nos meios com ou sem estresse em relação as não tratadas, porém o crescimento entre os tratados com CsA foi semelhante.

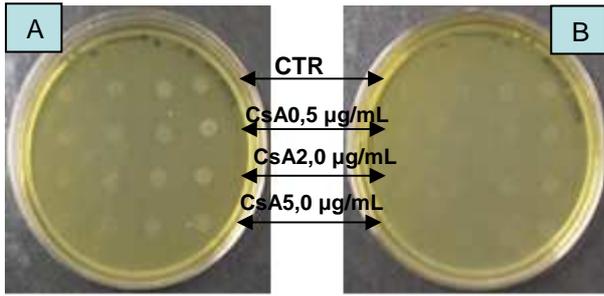


Figura 2: Em A é mostrado leveduras de *P. brasiliensis* previamente cultivadas na ausência (CTR) ou presença de concentrações crescentes de ciclosporina A e plaqueadas em meio com estresse osmótico (YPD + 2% de ágar + 2% de sorbitol). Em B é mostrado leveduras de *P. brasiliensis* cultivadas como em A, porém foram plaqueadas em meio com 0,3 M de NaCl.

Discussão

Em fungos patogênicos como *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* e *Arpergillus sp.*, ou não patogênicos, como *Saccharomyces cerevisiae* e *Neurospora crassa*, foi mostrado que a calcineurina pode controlar a proliferação, sobrevivência, patogenicidade, virulência e morfogênese, tanto sob condições fisiológicas ou em resposta adaptativa a estresses ambientais e nutricionais (Prokisch et al., 1997). Dependendo da espécie de fungo, a calcineurina confere resistência a estresse térmico, iônico (Ca^+ , Na^+ , Li^+), de pH e por drogas antifúngicas, dentre outros.

Evidências demonstram que a calcineurina é ativada de forma a garantir aos fungos alterações fisiológicas necessárias para sua adaptação a diferentes tipos de estresses. Sabe-se que a calcineurina pode ser inibida pela ciclosporina A (CsA).

Resultados recentes demonstram que a CsA bloqueia o dimorfismo de micélio para levedura em *P. brasiliensis* em temperatura à 37°C semelhante a infecção humana (Campos, 2009). Acredita-se que estímulos estressantes demandem alterações que desencadeiam processos adaptativos.

Considerando o que foi exposto acima e com base nos resultados, onde, o *P. brasiliensis* foi submetido a diferentes concentrações de CsA, e diferentes tipos de estresses, podemos avaliar a contribuição da calcineurina na adaptação e proliferação do fungo.

Na placa controle, as leveduras do *P. brasiliensis* tratadas com diferentes concentrações de CsA, tiveram pequena diferença de crescimento em relação as não tratadas com a droga, não sendo possível avaliar sua efetividade sobre a calcineurina.

A placa com estresse nutricional (0,2% de dextrose), as leveduras do *P. brasiliensis* não tratadas com CsA tiveram crescimento maior em relação ao controle. O fungo *Saccharomyces cerevisiae* na presença de açúcares fermentáveis, glicose e sacarose, aumenta a produção de cAMP com conseqüente ativação de PKA, que por sua vez, estimula a expressão de genes relacionados a proliferação celular e repressão de genes relacionados a estresse (Tamaki et. al., 2009).. É possível que o mesmo esteja ocorrendo com o *P. brasiliensis*, porém há necessidade que seja realizado novos experimentos em que faça uso de moduladores do sistema PKA. Outros estudos demonstraram que a diminuição da glicose provoca mutação em vias de sinalização deixando o fungo resistente a estresse celular. Já as leveduras tratadas com diferentes concentrações de CsA tiveram crescimento semelhante em relação as não tratadas com a droga, não sendo possível relacionar com o sistema calcineurina.

No entanto, as leveduras do *P. brasiliensis* foram sensíveis ao estresse osmótico (sorbitol) e iônico (NaCl), sendo observado uma total incapacidade de proliferação do fungo em 0,3 M de NaCl. Em experimentos realizados anteriormente com o *P. brasiliensis* na presença de NaCl 1,2 M não houve crescimento. Estudos comprovam que a ausência de alguns tipos de sais como monopotássico sulfato de magnésio inibe o crescimento do *P. brasiliensis*, contudo a falta de NaCl não interfere em seu crescimento (Minami, P. S., 1981). No entanto constatamos que a diminuição de 1,2 M à 0,3 M de NaCl, não estimulou o crescimento do fungo. Dependendo da espécie de fungo, a calcineurina confere resistência a estresse iônico. Através das diferentes concentrações de ciclosporina A que foram avaliadas no meio com estresse iônico não foi possível observar diferença entre as diferentes concentrações da droga pois não houve crescimento de leveduras, dessa forma a ação da calcineurina sobre o crescimento do *P. brasiliensis* permanece inconclusiva.

Conclusão

Neste trabalho foi mostrado que 0,2 % de dextrose favorece o crescimento do *P. brasiliensis*, e que 0,3 M de NaCl e 2% de sorbitol inibe seu crescimento, indicação de envolvimento de diferentes tipos de estresses com sistemas de proliferação do fungo.

Agradecimentos

Agradeço a minha orientadora Cláudia Campos e a colaboração de Rubia Gravito Gomes e Everton Diniz dos Santos.

Referências

- BRUMMER, E.; CASTANEDA, E.; RESTREPO, A. A Paracoccidioidomycosis: an Update. **Clinical Microbiology Reviews**. 6: 89-117 (1993).
- CAMPOS, C.B.L.; DI BENEDETTE, J.P.T.; MORAIS, F.V.; OVALLE, R.; NÓBREGA, M.P. Evidence for calcineurin role in morphogenesis and calcium homeostasis during mycelium to yeast dimorphism of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Eukaryotic Cell**. V.7, n.10, p.1856-1864 (2008).
- LACAZ, CS. *Paracoccidioides brasiliensis*. Morfologia, ciclo evolutivo, manutenção em vida saprofítica, biologia, virulência, posição sistemática. In: Del Negro G, Lacaz CS, Fiorillo A.M., **Paracoccidioidomicose Blastomicose Sul Americana**. São Paulo, Sarvier, Cap 2,11-21 (1992).
- LONTERO, AT; Melo, IS Aula 13: Paracoccidioidomicose. **Jornal Brasileiro de Medicina**, volume 55, nº 3, pg 98-111 (1998).
- MARTINEZ, R., Paracoccidioidomicose: epidemiologia e ecologia. In: Veronesi R. & Focaccia R. (eds). **Tratado de Infectologia**, Cap 84, 1080-1083, (1997).
- PROKISCH H, YARDEN O, DIEMINGER M, TROPSCHUG M, BARTHELMESS IB. **Impairment of calcineurin function in *Neurospora crassa* reveals its essential role in hyphal growth, morphology and maintenance of the apical Ca²⁺ gradient**. Mol Gen Genet. 256:104-114 (1997).
- RODRIGUES, MT; RESENDE, MA. Epidemiologic skin test survey of sensitivity to paracoccidioidin histoplasmin and sporotrichin among gold mine workers of Morro Velho Mining. Brazil. **Mycopathology**. 135:89-98 (1996).
- RESTREPO, A. The ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*: a puzzle still unsolved. **Medical Mycology** 23:323-334 (1985).
- STIE, J.; FOX, D.; Calcineurin regulation in fungi and beyond. **Eukaryotic Cell** V.7, p.177-186, (2008).
- TAMAKI H. Glucose-Stimulated cAMP-Protein Kinase A Pathway in Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. J. Biosci. Bioeng. 104:245-250 (2007).
- MINAMI P.S; THEOBALDO F.C., Rev. farm. bioquim. Univ. São Paulo; 17(1):140-4, (1981).