

ANÁLISE DE *Paracoccidioides spp* DURANTE A PRIVAÇÃO DE NITROGÊNIO

Mirlene Gonçalves Santos¹, Sabrina Fonseca Ingento Moreira Dantas²,
Clayton Luiz Borges³

¹ Mestranda em Genética e Biologia Molecular - Universidade Federal de Goiás

² Prof^a. Dr^a/Coordenadora – ICS- Faculdade Alfredo Nasser

³ Prof. Dr./Orientador –ICB2- Universidade Federal de Goiás

mirlenegs@gmail.com, sabrina@unifan.edu.br, clbluiz2@gmail.com

Palavras-chave: *Paracoccidioides*. Privação de nitrogênio. Secretoma.

1 INTRODUÇÃO

Paracoccidioides spp é um fungo termodimófico, que tem são caracterizados pela mudança de uma fase filamentosa multicelular para uma fase leveduriforme unicelular, quando infectam os tecidos do hospedeiro (RAPPEYE; GOLDMAN, 2006). Em condições ambientais e de cultivo *in vitro*, o fungo cresce na temperatura de 22 a 27°C como micélio (LACAZ, 1994). O nitrogênio (N) é um elemento químico importante na nutrição de microrganismos, participa da síntese de proteínas, ácidos nucléicos e outras biomoléculas essenciais (HUERGO, 2006). Em função da importância dos estudos referentes aos mecanismos de escape deste fungo quando cultivado em privação de N. O presente trabalho objetivou a análise e identificação de proteínas do secretoma deste isolado em condições de privação de nitrogênio para compreendermos possíveis fatores de virulência/moléculas de interação parasito-hospedeiro, que poderão contribuir com os estudos relacionados à biologia e virulência do fungo.

2 METODOLOGIA

O cultivo do isolado *Pb01* (ATCC MYA-826) na fase de levedura foi mantida *in vitro* por crescimento por 3 dias a 36 °C, em meio Fava-Netto sólido (Fava-Netto, 1955). Depois inoculados no meio de cultura Fava-Neto líquido (sem adição de ágar) sob agitação de 150 rpm por 48 horas a 36°C. As células foram submetidas a centrifugação 3.000 rpm por 30 min, lavadas 3 vezes com Tampão Fosfato Salino e as células foram inoculadas para realizar os experimentos na condição de privação de nitrogênio para isso utilizou-se o meio líquido definido por McVeigh & Morton (MMcM). Conforme sugerido por Restrepo; Jimenez, (1980), de acordo com a condição.

Para a determinação das curvas de crescimento e viabilidade as células foram removidas na etapa do meio líquido Fava-Netto após as 48 horas, realizou-se a etapa da diluição 1/200 para saber a quantidade de células a ser inoculada, utilizando cálculos adequados. Realizou-se a contagem com o auxílio da Câmara de Neubauer e do corante de azul de Tripán. O procedimento foi realizado em tempo de 0, 3, 6, 9, 12 e 24h.

Após a escolha do melhor ponto para extrair o extrato protéico, repetiu a etapa inicial e manteve durante 6 horas, sob agitação de 150 rpm e temperatura de 36°C. Os métodos usados para obtenção dos sobrenadantes de cultura foi realizada conforme já descrito por Tacco et al. (2009), com modificações. Realizou-se a dosagem das proteínas pelo método Bradford (BRADFORD, 1976). Para validar a extração, confirmar a presença das proteínas, comparar e visualizar a expressão obtida em diferentes condições de cultivo foi submetido à eletroforese unidimensional em gel de poliacrilamida Dodecil Sulfato de Sódio a 10% (SDS-PAGE), aplicou-se 30µg de cada amostra, a primeira corrida foi utilizando voltagem de 100 V por cerca de 30 min e em seguida 150 V até o fim da corrida. Depois corado por azul de Coomassie (Plus One Coomassie Tablets Fase Gel Blue R-350, GE Healthcare) de acordo com as instruções do fabricante. Enfim observamos e registramos imagem das proteínas que diferencialmente expressas, por meio do Software ImageMaster (GE Healthcare ®).

4 RESULTADOS

A curva de viabilidade e crescimento é extremamente necessária, para validar as condições usadas no experimento. Na curva de viabilidade a população de células viáveis é alta sendo de 93% e conforme o esperado a depleção de nitrogênio no meio afeta as células ocasionando uma mortalidade, devido a condição de estresse que o fungo foi submetida. Compreendendo que o experimento deve ser realizado com um significativo número de células viáveis após ter sofrido o impacto da depleção do nutriente, escolheu-se o ponto de 6 horas de incubação, onde as células apresentaram boa viabilidade e tempo suficiente para fornecer informações durante a incubação em depleção de nitrogênio. Após essa etapa foi observado à qualidade das proteínas através do gel unidimensional de poliacrilamida unidimensional, visualizou-se várias bandas mais expressas e outras reprimidas no tratado comparado ao controle.

5 CONCLUSÃO

Paracoccidioides spp é o agente patológico da PCM, uma doença crônica que apresenta uma das principais causas de mortes por micoses sistêmicas. Nesse trabalho foi possível padronizar o tempo adequado com células jovens para a extração do secretoma, utilizando a curva de viabilidade e a curva de crescimento da espécie em estudo na condição submetida. Nas análises obtidas nos estudos do secretoma de *Paracoccidioides spp* aliadas as análises *in silico* forneceram informações importantes sobre comportamento do fungo na depleção de nitrogênio confirmando trabalhos que já havia sido publicado e autenticando a presença de moléculas proteicas diferencialmente expressas na privação de nitrogênio, colaborando com novos trabalhos que surgiram a partir dessas informações para a compreensão de fatores que possam estar relacionados à virulência/patogenicidade de *Paracoccidioides spp*.

REFERÊNCIAS

- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v.72, p.248-254, 1976.
- FAVA-NETTO, C. Estudos quantitativos sobre a fixação de complemento na blastomicose sul-americana, com antígeno polissacarídico. **Arq. Cir. Clin. Exp.**, v.18, p.197-254, 1955.
- HUERGO, L.F. **Regulação do Metabolismo de Nitrogênio em *Azospirillum brasiliense***. Tese de Doutorado em Ciências – Bioquímica. Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Paraná. p.187. Curitiba, 2006.
- LACAZ, C.S. *Paracoccidioides brasiliensis*: morphology, evolutionary cycle; maintenance during saprophytic life; biology, virulence, taxonomy. In: FRANCO, M.; LACAZ, C.S.; RESTREPO-MORENO, A. & DEL NEGRO, G., ed. **Paracoccidioidomycosis**. Boca Raton, CRC Press, p.13-22, 1994.
- RAPPLEYE, C. A.; GOLDMAN, W. E. Defining virulence genes in the dimorphic fungi. **Annu Rev Microbiol**, v.60, p.281-303, 2006.
- RESTREPO, A; JIMÉNEZ, B.E. Growth of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast phase in a chemically defined culture medium. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 12, n. 2, p. 279-81, 1980.

- TACCO, B.A., et al. Characterization of a secreted aspartyl protease of the fungal pathogen *Paracoccidioides brasiliensis*. **Med Mycol**, v.47, n.8, p.845-854, 2009.