

Mapa Proteômico de Diferentes Isolados do Fungo *Paracoccidioides brasiliensis*.

Laurine L. PIGOSSO^{1*}; Célia M. A. SOARES¹; Ana F. A. PARENTE¹; Alexandre M. BAILÃO¹; Clayton L. BORGES¹; Juliana A. PARENTE¹.

¹ Laboratório de Biologia Molecular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Goiás, Brasil.

* laurinefarma@yahoo.com.br

PALAVRAS- CHAVE: *Paracoccidioides brasiliensis*, espécies filogenéticas, proteômica.

1- INTRODUÇÃO

Paracoccidioides brasiliensis é um fungo termodimórfico, agente etiológico da paracoccidioidomicose (PCM), uma micose sistêmica humana, crônica e progressiva, geograficamente restrita a América Latina (BRUMMER *et al.*, 1993). O fungo cresce como levedura, a 36 °C no hospedeiro humano ou quando cultivado *in vitro* e como micélio, forma infectiva e saprobiótica, no ambiente em temperaturas inferiores a 28 °C. Esse dimorfismo característico, bem como a tolerância térmica são considerados fatores de virulência importantes para a adaptação do patógeno às condições ambientais do hospedeiro, como alta temperatura, influência hormonal e a resposta imune (BAGAGLI *et al.*, 2006).

Os diversos isolados de *P. brasiliensis* podem diferir em suas características bioquímicas, bem como na habilidade para causar a doença nos seres humanos, o que justifica a necessidade de um meio eficiente para caracterizá-los (RESTREPO *et al.*, 2001). Estes isolados têm sido classificados dentro de uma espécie única, entretanto, é notável a diferença entre eles, ocorrendo tanto em nível genético, quanto em virulência (SINGER-VERMES *et al.* 1989, MOLINARI-MADLUN *et al.* 1999).

Para caracterizar a variação genética natural do fungo, MATUTE e colaboradores (2006) através de análises de polimorfismos de sequências gênicas, demonstraram que *P. brasiliensis* é composto de pelo menos três espécies filogenéticas distintas: S1 (com 38 isolados), PS2 (com 6 isolados, sendo cinco de

regiões do Brasil e um da Venezuela) e PS3 (com 21 isolados, composto unicamente de isolados colombianos). Contudo, segundo CARRERO *et al* (2008), o status taxonômico de um dos isolados melhor estudado (*Pb01*) de *P. brasiliensis*, permanece sem solução, devido às suas diferenças genômicas dessas três espécies já descritas. TEIXEIRA e colaboradores (2009) através de estudos filogenéticos utilizando o método de concordância genealógica identificaram significantes divergências entre o isolado *Pb01* e as três espécies já identificadas (*PS2*, *PS3* e *S1*) e sugeriram a descrição formal de uma nova espécie dentro do gênero *Paracoccidioides*.

Tendo em vista a exposição acima, a caracterização proteômica de isolados do gênero *Paracoccidioides* é de grande relevância.

IV-METODOLOGIA

IV.1 – Manutenção de *P. brasiliensis*

Os isolados *Pb01* (ATCCMYA-826), *Pb2* (MATUTE *et al.*, 2006), *Pb339* (MATUTE *et al.*, 2006; CARRERO *et al.*, 2008) e *PbEpm83* (THEODORO *et al.*, 2008) de *P. brasiliensis*, são utilizados em todos os experimentos deste estudo. A fase de levedura é mantida *in vitro* por crescimento a 36 °C, em meio Fava-Netto por 7 dias (FAVA-NETTO, 1955).

IV.2 - Análise proteômica dos isolados de *P. brasiliensis*

IV.2.1 – Preparação dos extratos celulares citoplasmáticos dos isolados de *P. brasiliensis*.

As células leveduriformes de cada isolado são crescidas em meio sólido Fava-Netto a 36°C até a fase estacionária de crescimento (6 dias). A partir dessas células é feita uma suspensão em solução salina (NaCl 0,9%). Faz-se então a contagem das células em câmara de Neubauer e inocula-se 10⁶ células/mL em meio Fava- Netto liquido, incubando sob agitação 150rpm, 36°C por 72 horas, até o início da fase exponencial.

A cultura é então centrifugada e o precipitado ressuspendido em tampão de extração (20mM Tris-HCl, pH8.8, 2mM CaCl₂ com inibidor de proteases e nucleases). Essa suspensão é distribuída em tubos com adição de pérolas de vidro. O material é agitado em aparelho tipo bead beater em 5 ciclos de 30 segundos, no

gelo. O produto da extração é centrifugado seqüencialmente até ausência de sedimento. O extrato límpido é estocado à -20°C. As dosagens dos extratos protéicos obtidos são realizadas com reagente de Bradford (Sigma Aldrich), utilizando albumina de soro bovino como padrão.

IV.2.2 – Análise protéica por eletroforese bidimensional

Os géis de análise bidimensionais (2D) são realizados de acordo com o método de RABILLOUD (1998) com adaptações. Amostras contendo as diferentes frações protéicas são solubilizadas em tampão de lise contendo uréia 7 M, tiouréia 2M, CHAPS 2% p/v, 65 mM DTT, anfólitos pH 3-11 e azul de bromofenol. As amostras são aplicadas em fitas *immobiline* (13 cm, *GE Healthcare Biosciences*) pH 3-11. A focalização isoeétrica é realizada em sistema IPGphor onde as fitas são reduzidas com 1% de DTT p/v e alquiladas em 2,5 % de iodoacetamina p/v em tampão de equilíbrio (uréia 6 M, pH 6.8; 30 % de glicerol v/v e 2 % de SDS p/v) (BJELQVIST *et al.*, 1993). A segunda dimensão é realizada em gel de poliacrilamida segundo LAEMMLI (1970). Os géis de poliacrilamida são corados por azul de *Coomassie*, segundo metodologias padrão. As imagens dos géis 2D, em triplicatas, são capturadas e processadas em sistema de fotodocumentação. Através da utilização do software *Imagemaster Platinum* (*GE Healthcare*) são realizadas a detecção, a quantificação volumétrica, a edição de massas moleculares e pontos isoeletricos das proteínas identificados nos géis.

IV.2.3 – Dessanilização, redução, alquilação e digestão das amostras protéicas

Os spots protéicos de interesse são removidos manualmente dos géis bidimensionais e tratados com acetonitrila 100% v/v e lavadas duas vezes com acetonitrila 50 % v/v e 25 mM de NH₄HCO₃. O processo de redução das amostras é realizado pelo uso de DDT (10 mM) em NH₄HCO₃ (25 mM) por 30 min e alquilação com iodoacetaminada (55 mM) em NH₄HCO₃ (25 mM), sob ambiente escuro. A digestão enzimática é realizada pela incubação das amostras em tampão de digestão contendo tripsina (12.5 ng/μL) (Roche, *Mol Bioch*) e NH₄HCO₃ (25 mM). Os peptídeos digeridos são extraídos por tratamento em 50 % de acetonitrila v/v, 1 % de ácido trifluoracético v/v e posteriormente em acetonitrila 100 % v/v. Os peptídeos resultantes são analisados para produção de espectros de massas e identificados através de MALDI-MS/MS utilizando o aparelho SYNAPT Q-TOF

(Waters®). A busca em bancos de dados é realizada utilizando o software MASCOT (<http://www.matrixscience.com>) contra o banco de dados do GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os extratos protéicos foram obtidos de cada isolado e as dosagens realizadas em equipamento leitor de Elisa, utilizando reagente de Bradford (Sigma Aldrich). As amostras apresentaram uma concentração média de 8µg/µl de proteína.

Os géis de análise bidimensionais (2D) foram obtidos conforme a metodologia citada e realizados em triplicatas para cada isolado. As imagens dos géis foram adquiridas no equipamento Image Scanner III (GE Healthcare) usando Labscan software (GE Healthcare).

A análise dessas imagens foi realizada utilizando o software Image Master, no qual os géis foram alinhados e a intensidade dos spots normalizada. As triplicatas de cada um dos isolados foram combinadas separadamente elegendo-se um gel *master*, e, posteriormente o *master* de cada isolado foi combinado com os demais, utilizando-se como referência o isolado *Pb01*.

A correspondência dos géis foi verificada manualmente e corrigida quando necessário. Os spots detectados foram quantificados e normalizados utilizando o critério de volume. Os valores da relação do volume dos spots pareados serão utilizados para as devidas análises estatísticas.

CONCLUSÕES

O trabalho está em andamento, e essa análise comparativa pode demonstrar que a utilização de técnicas de proteômica pode contribuir para elucidar e caracterizar os isolados de cada clado filogenético do gênero *Paracoccidioides*, bem como ressaltar diferenças entre os isolados que podem estar relacionadas com virulência, localização geográfica, dentre outros fatores específicos.

VII-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAGAGLI E, BOSCO SM, THEODORO RC, FRANCO M (2006). Phylogenetic and evolutionary aspects of *Paracoccidioides brasiliensis* reveal a long coexistence with animal hosts that explain several biological features of the pathogen. *Infect Genet Evol*, 6: 344-51.

BJELQVIST, B., SANCHEZ, J. C., PASQUALI, C., RAVIER, F., PAQUET, N., FRUTGER, S., HUGHES, G. J., & HIOCHASTRASSER, D. (1993). Microoperative two-dimensional gel electrophoresis allowing the separation of samples containing milligram amounts of proteins. *Electrophoresis*, 14 (3): 1375-78.

BRUMMER E, CASTANEDA E, RESTREPO A (1993). Paracoccidioidomycosis: an update. *Clin Microbiol Rev*, 6: 89-117.

CARRERO, L. L., NINO-VEGA, G., TEIXEIRA, M. M., CARVALHO, M. J., SOARES, C. M., PEREIRA, M., JESUINO, R. S., MCEWEN, J. G., MENDOZA, L., TAYLOR, J. W., FELIPE, M. S. & SAN-BLAS, G. (2008). New *Paracoccidioides brasiliensis* isolate reveals unexpected genomic variability in this human pathogen. *Fungal Genet Biol*, 45(5): 605-12.

FAVA-NETTO, C. (1955). Estudos quantitativos sobre a fixação de complemento na blastomicose sul-americana, com antígeno polissacarídico. *Arq Cir Clin Exp*, 18: 197-254.

LAEMMLI, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. *Nature*, 227(3): 680-85.

MATUTE, D. R., SEPULVEDA, V. E., QUESADA, L. M., GOLDMAN, G. H., TAYLOR, J. W., RESTREPO, A. & MCEWEN, J. G. (2006). Microsatellite analysis of three phylogenetic species of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Clin Microbiol*, 44(6): 2153-57.

MOLINARI-MADLUM EEWI, FELIPE MSS, SOARES CMA (1999). Virulence of *Paracoccidioides brasiliensis* isolates can be correlated to groups defined by random amplified polymorphic DNA analysis. *Med Mycol* 37: 269-76.

PASTORELLI R, CARPI D, CAMPAGNA R, AIROLDI L, POHJANVIRTA R, VILUKSELA M, HAKANSSON H, BOUTROS PC, MOFFAT I. D, OKEY A. B, FANELLI R. (2006). Differential expression profiling of the hepatic proteome in a rat model of dioxin resistance: correlation with genomic and transcriptomic analyses. *Mol Cell Proteomics*, 5: 882-94.

RABILLOUD, T. (1998). Use of thiourea to increase the solubility of membrane proteins in two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis*, 19 (3): 758-60.

RESTREPO, A., MCEWEN, J. G. AND CASTAÑEDA, E. (2001). The habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*: how far from solving the riddle? *Med Mycol*, 39(3): 233-41.

SINGER-VERMES LM, BURGER E, FRANCO MF, DI-BACCHI MM, MENDES-GIANNINI MJ, CALICH VL (1989). Evaluation of the pathogenicity and immunogenicity of seven *Paracoccidioides brasiliensis* isolates in susceptible inbred mice. *J Med Vet Mycol*, 27: 71-82.

TEIXEIRA MM, THEODORO RC, CARVALHO MJA, FERNANDES L, PAES HC, HAHN RC, MENDONZA L, BAGAGLI E, SAN-BLAS G, FELIPE MSS (2009). Phylogenetics analysis reveals a high level of speciation in the *Paracoccidioides* genus. *Mol Phylogenet Evol*, 52: 273-83.

THEODORO RC, BAGAGLI E, OLIVEIRA C (2008). Phylogenetic analysis of PRP8 intein in *Paracoccidioides brasiliensis* species complex. *Fungal Genet Biol*, 45: 1284-91.