



UFG

**Universidade Federal de Goiás
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Biologia**

Benedito Rodrigues da Silva Neto

**Malato sintase de *Paracoccidioides brasiliensis* é uma proteína ligada à superfície
que se comporta como uma *anchorless* adesina.**

Orientadora: Dra. Maristela Pereira



Goiânia - Goiás
Abril de 2009



UFG

**Universidade Federal de Goiás
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Biologia**

Benedito Rodrigues da Silva Neto

Malato sintase de *Paracoccidioides brasiliensis* é uma proteína ligada à superfície que se comporta como uma *anchorless* adesina.

Orientadora: Dra. Maristela Pereira

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Goiás como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular

Goiânia - Goiás
Abril de 2009

DISSERTAÇÃO DESENVOLVIDA NO LABORATÓRIO DE BIOLOGIA MOLECULAR, DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR, INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS, UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS, COMO REQUISITO PARCIAL PARA A OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR.

APOIO FINANCEIRO: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

BANCA EXAMINADORA

TITULARES

Profa. Dra. Maristela Pereira, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás.

Profa. Dra. Célia Maria de Almeida Soares, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás.

Prof. Dr. Henrique Leonel Lenzi, Departamento de Patologia, Instituto Oswaldo, Rio de Janeiro.

SUPLENTES

Prof. Dra. Sílvia Maria Salem Isacc, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás.

Profa. Dra. Maria José Soares Mendes-Giannini, Departamento de Análises Clínicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista.

Prof. Dr. André Kipnis, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás.

“Não sei... se a vida é curta
ou longa demais pra nós,
Mas sei que nada do que vivemos tem sentido,
se não tocamos o coração das pessoas.

Muitas vezes basta ser:
Colo que acolhe,
Braço que envolve,
Palavra que conforta,
Silêncio que respeita.

Alegria que contagia,
Lágrima que corre,
Olhar que acaricia,
Desejo que sacia,
Amor que promove.

E isso não é coisa de outro mundo,
é o que dá sentido à vida.
É o que faz com que ela
não seja curta, nem longa demais
Mas que seja intensa,
verdadeira, pura...
Enquanto durar.

Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina.”
(Cora Coralina)

Ao Autor e Consumador da minha Fé.
Aos meu pais, Osmário Rodrigues da
Silva e Aluzair Francisco Dourado, e
minha irmã, Laura Maria Gomes
Dourado que sempre confiaram,
acreditaram e depositaram sua esperança
em mim, dedico.

Dedico ainda à Maristela, orientadora
que não hesitou em apoiar e investir seu
tempo em mim, és exemplo de
responsabilidade e compromisso.

AGRADECIMENTOS

À Deus, Tua provisão me faz confiar e faz andar seguro, uma promessa que me sustenta, e um motivo que me faz levantar a cada novo dia.

À Profa. Maristela Pereira, que desde o primeiro dia demonstrou confiança em mim, me orientando e conduzindo pelo caminho do conhecimento.

À Profa. Célia Maria de Almeida Soares, sua capacidade e competência me levaram a chegar ao fim deste trabalho vislumbrando novos horizontes. Grato por todo auxílio e compreensão.

Ao Prof. Lenzi, pela maneira com que me recebeu na FIOCRUZ-RJ, tornastes um exemplo para mim, sua dedicação me inspira cada dia mais a ser não um simples pesquisador, mas de fato um cientista.

À Profa. Zezé, por todo conhecimento transmitido de forma tão graciosa naqueles dias inesquecíveis em Araraquara.

À todos da micologia da UNESP de Araraquara, Julhiany (ainda se lembra do bilhete?), Fernanda, Rô, Marcelo, Aline, Marisa, Tatiane, Roberta, Elaine e Rosângela (até a próxima festa junina!).

À Ester da FIOCRUZ - RJ por toda atenção e contribuição.

Aos professores do Mestrado e do Instituto de Ciências Biológicas, da UFG, que contribuíram tão grandemente para o meu aprendizado.

À professora Sílvia Maria Salem Isacc, por aceitar desafio de última hora.

À Kesser pelos passos iniciais no LBM, sou extremamente grato pela maneira que apoiou e “cobrou” de mim...rs. Viu só, valeu a pena. Muito obrigado!

À Aline e Patrícia Zambuzzi, espero um dia poder retribuir tudo o que fizeram por mim.

À Patrícia Kott, 05.11.2007, origem aeroporto Santa Genoveva – Goiânia; destino Galeão – Rio de Janeiro: Casa Amarela!

À Sarah, minha prima "Tu te tornas eternamente responsável por aquilo que cativas..."

Ao Rogério grande amigo e companheiro de bancada que caminhou junto comigo esses dois anos fazendo soar o velho lema: “Mais vale um mau dia de pesca do que um bom dia de trabalho”. E lógico à Flavinha pela torta de limão, rs.

Aos colegas Luiz Augusto (pescador...), Christielly, Lidiane (“oreia” obrigado garotinha!), Moniquinha, Mônica Santiago, Nadya e Lorena (chá de boldo?!rs) que deixaram saudades.

Às colegas de orientadora: Martha, Regilda, Renata, Raquel e Amanda por me suportarem.

Ao Wesley, parceiro nos experimentos finais, um exemplo que quero seguir; ao Rodrigo, quem diria hein, valeu pela força constante! às vezes exagerada em forma de leves tapinhas nas costas...rs; Nathalie, o que dizer quando faltam palavras?...florzinha!

À todos que conviveram de maneira tão agradável no laboratório: Clayton (e ai meu querido!), Alexandre & Mirelle, Elisa, Ronney, Sabrina, Daciene, Juliana, Kelly, Cristina, Ana Flávia, Patrícia Lima (Beijo me liga!), Ívian, Ademar, Leandro, Daiane, Mariana (vamos tirar uma foto?).

À Gleice, pela atenção amizade e carinho prestado durante todas as dúvidas e questões relacionadas à Pós-Graduação; assim como Fernando e Tizuko da Coordenação.

Amo “a” como ama o amor. Não “a” conheço nenhuma outra razão para amar senão amar. Que queres que te diga, além de que te amo, se o que quero dizer-te “logo” é que te amo? (parafraseando Fernando Pessoa).

À Igreja Fonte da Vida que é meu amparo e lugar seguro.

À minha família, razão pela qual cheguei até aqui e motivo que me faz acreditar em cada objetivo, cada plano, cada sonho....é o que me dá força para alcançá-los.

SUMÁRIO

RESUMO	X
ABSTRACT	XI
I – INTRODUÇÃO	12
I.1 - Paracoccidioidomicose	12
I.2 – O fungo <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	14
I.2.1 – Aspectos Gerais	14
I.2.2 - Dimorfismo	16
I.2.3 – Transcriptomas de <i>P. brasiliensis</i> em condições de contato com hospedeiro	18
I.3 – Ciclo do Glioxalato	20
I.4 – Peroxissomos	23
I.5 – Matriz Extracelular	25
I.6 – Moléculas Envolvidas no Processo de Adesão de Fungos Patogênicos	26
I.7 – Adesinas de <i>P. brasiliensis</i>	28
I.8 – Malato sintase	29
I.8.1 – Considerações Gerais	29
I.8.2 – Aspectos da enzima MLS	30
I.8.3 – MLS como Antígeno	32
I.8.4 – MLS de <i>P. brasiliensis</i>	33
II - JUSTIFICATIVA	35
III – OBJETIVOS	37
IV - Manuscrito	39
Title and general information	39
Abstract	40
Background	41
Results	42
Discussion	46
Conclusion	49
Methods	49
Author's Contributions	57
Acknowledgements	57
References	58
Figure Legends	66
Figures	70
V – CONCLUSÕES	75
VI – PERSPECTIVAS	77
VII – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78
VIII - ANEXOS	90

RESUMO

O fungo de patógeno *Paracoccidioides brasiliensis* agente causador da Paracoccidioidomicose (PCM), uma micose pulmonar adquirida pela inalação de propágulos aéreos do fungo que pode se disseminar a vários órgãos e tecidos levando a uma forma severa da doença. Dentro do hospedeiro, *P. brasiliensis* usa o ciclo do glioxalato (CG) para sobrevivência intracelular. Adesão e invasão das células do hospedeiro são passos essenciais envolvidos na internalização e disseminação do patógeno. Aqui, nós evidenciamos que malato sintase de *P. brasiliensis* (PbMLS) é secretada, e é localizada na parede da célula. PbMLS foi superexpressa em *Escherichia coli*, e o anticorpo policlonal contra esta proteína foi obtido. Usando Microscopia Laser Confocal (CLSM) e análise de *Western blot*, PbMLS foi encontrada no citoplasma e na parede da célula na fase leveduriforme de *P. brasiliensis* nas células mãe e broto. PbMLSr e o respectivo anticorpo policlonal produzido contra esta proteína inibiram a interação de *P. brasiliensis* com células epiteliais A549 cultivadas *in vitro*. Estas observações indicariam que MLS associada à parede da célula de *P. brasiliensis* pode estar mediando a ligação do fungo às células, contribuindo assim com a adesão do fungo aos tecidos hospedeiros e para a disseminação da infecção.

ABSTRACT

The pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* causative of Paracoccidioidomycosis (PCM), a pulmonary mycose acquired by inhalation of fungal airborne propagules, which may disseminate to several organs and tissues leading to a severe form of the disease. Adhesion and invasion to host cells are essential steps involved in the internalization and dissemination of pathogens. Inside host, *P. brasiliensis* use the glyoxylate cycle for intracellular survival. Here, we provide evidence that malate synthase of *P. brasiliensis* (*PbMLS*) is localized on the cell wall, and is secreted. *PbMLS* was overexpressed in *Escherichia coli*, and polyclonal antibody against this protein was obtained. By using Confocal Laser Scanning Microscopy and Western blot analysis, *PbMLS* was detected in the cytoplasm and the cell wall of the yeast phase of *P. brasiliensis* of mother and bud yeast cells. *PbMLSr* and the respective polyclonal antibody produced against this protein inhibited the interaction of *P. brasiliensis* to *in vitro* cultured epithelial cells A549. These observations indicated that cell wall-associated MLS of *P. brasiliensis* could be mediating the binding of fungal cells, thus contributing to the adhesion of fungus to host tissues and to the dissemination of infection.

Introdução



I – INTRODUÇÃO

I.1 – Paracoccidioidomicose

Paracoccidioidomicose (PCM) é uma micose humana sistêmica causada pelo fungo *P. brasiliensis*. A doença foi inicialmente descrita em São Paulo por Adolpho Lutz (Lutz 1908). A PCM é geograficamente restrita à América Latina, sendo o Brasil o maior centro endêmico, onde causa aproximadamente 200 mortes por ano (COUTINHO *et al.*, 1998). Nas áreas onde a PCM é altamente endêmica, a incidência da doença é estimada em aproximadamente 1 a 3 casos clínicos para cada 100.000 habitantes por ano (RESTREPO, 1985). Coutinho *et al.* (2002), em estudo de revisão, verificou que, no Brasil, PCM é a oitava causa de morte entre as doenças crônicas e a primeira entre as micoses sistêmicas. A taxa de mortalidade média é de 1,45/milhão de habitantes ao ano, considerando ambos os sexos. No entanto, a PCM atinge preferencialmente trabalhadores rurais do sexo masculino, entre 30 a 60 anos de idade (VILLAR *et al.*, 2000). O trabalho com o solo e plantações em área rural é fator ocupacional predisponente para a aquisição da PCM (FRANCO, 1987). A incidência da doença até à puberdade é a mesma em ambos os sexos, porém na fase adulta, mais de 80% dos pacientes são do sexo masculino (MARTINEZ, 1997). Acredita-se que esse fato seja explicado pela ação protetora que os hormônios estrógenos conferem à mulher (CLEMONS & STEVENS, 1990; SANO *et al.*, 1999), e pela ausência ou menor contato com as fontes de infecção (MARQUES *et al.*, 1983).

A doença é adquirida através da via respiratória, quando propágulos da fase miceliana do fungo são inalados (McEWEN *et al.*, 1987). A partir dos pulmões, o fungo pode se disseminar por todo o corpo, através da corrente sanguínea ou linfática. O

contato inicial do hospedeiro com o fungo aparentemente evolui para uma infecção subclínica ou assintomática (PCM infecção). Se há progressão da infecção, ocorre o estabelecimento da doença, que apresenta duas formas clínicas distintas: a forma aguda ou tipo juvenil e a forma crônica ou adulta (FRANCO *et al.*, 1987).

A forma juvenil (aguda ou subaguda) representa 3 a 5% dos casos descritos da doença, sendo a maioria dos pacientes constituídos por crianças ou adultos jovens (REIS *et al.*, 1986; BRUMMER *et al.*, 1993). O quadro da doença caracteriza-se por um desenvolvimento rápido e por marcante envolvimento de órgãos como baço, fígado, gânglios linfáticos e medula óssea. Apesar de não haver manifestações clínicas ou radiológicas de comprometimento pulmonar evidente, pode-se isolar o fungo do lavado brônquico, evidenciando a participação do pulmão como porta de entrada do patógeno (SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 2006).

A forma crônica ou adulta representa mais de 90% dos casos, sendo a maioria dos pacientes constituída por homens adultos. Ao contrário da forma aguda, o quadro clínico apresenta um desenvolvimento lento com comprometimento pulmonar evidente (BRUMMER *et al.*, 1993). Com frequência, ocorrem lesões nas mucosas orais e nasais, pele e gânglios linfáticos. Menos frequentemente, podem ocorrer envolvimento ocular, destruição óssea, e comprometimento dos sistemas nervoso e vascular (SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 2006).

A PCM é a principal causa de incapacidade e morte entre os trabalhadores rurais durante a idade mais produtiva. A alta frequência de seqüelas e o índice de mortalidade em PCM são fortemente influenciados por condições econômicas e sociais da população alvo, a maioria representada por trabalhadores rurais de baixa renda e com limitado acesso ao sistema de saúde. Ambos os aspectos contribuem para prejudicar a resposta do hospedeiro à infecção e detecção pelo sistema de saúde de pacientes

infectados nos estágios iniciais da doença (TRAVASSOS *et al.*, 2008). O trabalho agrícola é a atividade mais importante nos Estados de Goiás, Mato Grosso, e Mato Grosso do Sul, na região do Cerrado, onde o número de casos tem aumentado (PANIAGO *et al.*, 2003).

Nos últimos anos, a PCM tem sido apontada como uma doença oportunista quando associada a pacientes com AIDS; a mortalidade entre esses pacientes tem sido considerada alta (SILVA-VERGARA *et al.*, 2003; GOLDANI *et al.*, 1991).

I.2 - O FUNGO *Paracoccidioides brasiliensis*

I.2.1 - Aspectos Gerais

P. brasiliensis apresenta forma leveduriforme nos tecidos do hospedeiro ou quando cultivado *in vitro* a 36°C, e forma miceliana (infectiva), em condições saprobióticas no meio ambiente, ou quando cultivado em temperaturas inferiores a 28°C (BAGAGLI *et al.*, 2006). Quanto ao habitat, sugere-se que o fungo viva saprobioticamente na natureza, próximo a ambientes de água fresca, tais como rios ou córregos e de forma temporária no solo (BAGAGLI *et al.*, 2006; TERÇARIOLI *et al.*, 2007), o isolamento do fungo a partir de duas espécies de tatus, o *Dasypus novemcintus* e o *Cabassou centralis* reforça esta hipótese (CORREDOR *et al.*, 2005).

A característica marcante das leveduras de *P. brasiliensis* são os brotamentos múltiplos formados pela evaginação da célula-mãe, onde pode-se observar uma célula central circundada por várias células periféricas dando à célula um aspecto parecido com a roda de leme de um navio. As colônias leveduriformes apresentam-se macroscopicamente com coloração creme, de aspecto cerebriforme, não aderidas ao

meio e com crescimento evidente após sete dias de incubação a 37°C (CARBONELL & RODRIGUES, 1965). As células leveduriformes apresentam morfologia oval ou alongada, em diferentes tamanhos (4 a 30 µm), contendo múltiplos núcleos (2 a 5 por células), nucléolo e cromatina evidentes (LACAZ, 1994). Sua parede celular é espessa (LACAZ *et al.*, 1991), a membrana plasmática é composta por três camadas e apresenta múltiplas invaginações que constituem vesículas e estruturas tubulares; também apresenta escasso retículo endoplasmático, vários vacúolos, gotas de lipídios proeminentes, ribossomos e mitocôndrias (BRUMMER *et al.*, 1993).

Os filamentos septados com conídeos terminais ou intercalares são as características que nos permitem identificar a forma miceliana (QUEIROZ-TELLES, 1994; RESTREPO-MORENO, 2003). Macroscopicamente, o fungo produz colônias pequenas, duras, planas, irregulares, de coloração bege, cobertas por micélio aéreo e curto que freqüentemente aderem-se ao ágar (BRUMMER *et al.*, 1993). Quando examinadas ao microscópio óptico, observam-se hifas finas e septadas, com clamidoconídios terminais ou intercalares (FRANCO *et al.*, 1989). Ao microscópio eletrônico, as hifas apresentam um envoltório celular constituído de três camadas: uma interna, a membrana plasmática; uma camada mais espessa, a parede celular, e uma externa de aspecto finamente granular, a membrana basal (MINGUETTI *et al.*, 1985). As hifas são multinucleadas, com cromatinas finas dispersas no nucleoplasma. No citoplasma podem ser vistos ribossomos, mitocôndrias esféricas ou alongadas, retículo endoplasmático e vacúolos (SAMSONOFF *et al.*, 1991).

Análises comparativas de seqüências de genes conservados evolutivamente em fungos sugerem que *P. brasiliensis* se aproximaria filogeneticamente dos ascomicetos (MARGULIS & SCHARWATZ, 1998). De acordo com San-Blas *et al.* (2002), em estudo de revisão, *P. brasiliensis* poderia ser agrupado ao filo Ascomycota,

subdivisão Euascomycotina, classe Plectomyceto, sub-classe Euascomycetidae, ordem Onygenales, família Onygenaceae, subfamília Onygenaceae Anamórficos, gênero *Paracoccidioides*, espécie *Paracoccidioides brasiliensis*.

Através da via respiratória, por inalação de propágulos do micélio, como conídios, *P. brasiliensis*, usualmente, alcança o hospedeiro. Esses propágulos se convertem para a fase leveduriforme nos pulmões, de onde podem disseminar-se para diferentes órgãos e tecidos (SAN-BLAS *et al.*, 2002). Independentemente do órgão afetado, a PCM usualmente é associada à formação de fibrose, o que pode interferir permanentemente na qualidade de vida dos pacientes (TOBÓN *et al.*, 2003). Devido aos diversos tecidos que podem ser colonizados e infectados pelo fungo, mecanismos que o tornem capaz de aderir, extravasar e invadir barreiras impostas pelos tecidos do hospedeiro devem ter sido desenvolvidos pelo *P. brasiliensis* (MENDES-GIANNINI *et al.*, 1994; LENZI *et al.*, 2000).

Nos tecidos do hospedeiro o aspecto morfológico do fungo também foi descrito, observando-se que durante a infecção ativa, as lesões contêm um elevado número de leveduras, sendo que 24 – 33% dessas apresentam múltiplos brotamentos (RESTREPO, 2000). Lutz (1908) observou as diferentes formas de *P. brasiliensis* no hospedeiro e em culturas à temperatura ambiente, descrevendo assim, o dimorfismo do fungo.

I.2.2 – Dimorfismo

O dimorfismo é considerado um mecanismo de defesa importante para a adaptação de fungos às condições adversas do hospedeiro humano à invasão de tecidos e ao estabelecimento da doença (KUOKAWA *et al.*, 1998; SAN-BLAS *et al.*, 2002).

Fatores nutricionais podem interferir no processo dimórfico de *P. brasiliensis*. A adição de soro fetal bovino aos meios de cultura complexo e quimicamente definido permitiu preservar a expressão fenotípica de leveduras, a 25°C (VILLAR *et al.*, 1988), entretanto a temperatura é um dos estímulos mais notórios no dimorfismo de *P. brasiliensis* (SAN-BLAS *et al.*, 2002).

A transição da fase miceliana para leveduriforme é o que torna eficaz o processo de instalação do fungo no hospedeiro, assim o estudo de genes/proteínas com expressão diferencial durante a transição dimórfica do fungo, tem sido alvo estudo de diversos pesquisadores. Nesse sentido, Silva *et al.* (1994) avaliaram o processo de transição celular no isolado *Pb01*, mostrando ser caracterizado por alterações na síntese de proteínas durante os estágios iniciais do processo. Cunha *et al.* (1999) detectaram proteínas diferencialmente expressas em *P. brasiliensis* em ambas as fases. Os autores destacaram as proteínas *PbM46*, similar à enolase (proteína de 46 kDa presente em maior quantidade na fase miceliana) e *PbY20* (proteína de 20 kDa presente somente na fase leveduriforme).

O Projeto Genoma Funcional e Diferencial de *P. brasiliensis*, desenvolvido por pesquisadores da região Centro-Oeste do Brasil, resultou no seqüenciamento de 6.022 genes expressos nas fases miceliana e leveduriforme do isolado *Pb01*, possibilitando a detecção de genes diferencialmente expressos (FELIPE *et al.*, 2003; 2005). A diferenciação celular em *P. brasiliensis* requer mudança na temperatura, o que pode ser associado com a resposta ao estresse. Dessa forma, foram identificados 48 transcritos codificando chaperonas ou proteínas envolvidas no processo de estresse, sendo oito desses transcritos diferencialmente expressos. A análise do transcriptoma também revelou alguns prováveis componentes das vias de sinalização e seqüências gênicas consideradas como potenciais alvos para drogas antifúngicas em *P. brasiliensis*, visto

que não possuem homólogos no genoma humano. Entre esses podem ser citados a quitina deacetilase, quitina sintase I, II e IV, isocitrato liase, α -1,3-glicana sintase, β -1,3-glicana sintase, α -1,2-manosiltransferase, urease e malato sintase.

Felipe *et al.* (2003; 2005b) seqüenciaram 25.511 clones derivados de bibliotecas de cDNAs das fases micélica e leveduriforme, resultando em 6.022 grupos que representam cerca de 80% do genoma total do fungo (FELIPE *et al.*, 2005b). Após categorização pelo COG (categorias de ortólogos funcionais), concluiu-se que 29% desses genes estão envolvidos no metabolismo celular, 12% na transcrição, 10% na síntese de proteínas, 9% na produção de energia e 4% no controle da organização celular. Cerca de 4% do número total de genes anotados estão envolvidos em mecanismos de transdução de sinal e comunicação celular, vias que têm sido relacionadas com a diferenciação celular de fungos dimórficos/patogênicos (FELIPE *et al.*, 2005b).

Nunes *et al.* (2005), através de microarranjos de DNA, avaliaram a expressão de genes de *P. brasiliensis*, isolado Pb18, durante a transição de micélio para levedura e identificaram vários genes diferencialmente expressos durante o processo. Estão inclusos entre esses, genes que codificam enzimas envolvidas no metabolismo de aminoácidos, transdução de sinal, síntese de proteínas, metabolismo da parede celular, estrutura do genoma, resposta ao estresse oxidativo, controle do crescimento e desenvolvimento do fungo.

O perfil transcricional de outro isolado de *P. brasiliensis*, isolado Pb01 durante a diferenciação morfológica de micélio para levedura foi avaliado por Bastos *et al.* (2007). Vários genes potencialmente relacionados com a síntese de membrana e parede celulares mostraram-se aumentados durante a diferenciação celular de micélio para levedura após 22 horas de indução da transição, sugerindo que *P. brasiliensis* favorece o

remodelamento da membrana e parede celulares nos estágios iniciais da morfogênese. Nesse estudo, genes envolvidos na via de assimilação do enxofre, como a sulfito redutase, mostraram-se super expressos durante a transição, sugerindo o envolvimento do metabolismo do enxofre durante o processo de diferenciação em *P. brasiliensis*. Durante a transição também foi verificada a indução de genes codificantes para enzimas que participam do ciclo do glioxalato, mostrando que essa via metabólica é funcional durante o processo. Genes envolvidos em vias de transdução de sinal tais como MAPK, serina/treonina quinase e histidina quinase, também foram induzidos, sugerindo que a transição morfológica em *P. brasiliensis* é mediada por vias de transdução de sinal que provavelmente controlam a adaptação do fungo ao ambiente externo.

I.2.3-Transcriptomas de *P. brasiliensis* em condições de contato com hospedeiro

Projetos transcriptomas de *P. brasiliensis* têm sido desenvolvidos no sentido de identificar um maior número de genes expressos. Goldman *et al.* (2003) identificaram 4.692 genes expressos em leveduras após infecção em camundongos. Esses genes foram categorizados funcionalmente em: genes envolvidos com resposta à estresse (1%), metabolismo celular (8%), metabolismo de proteínas (4%), síntese de RNA (2%), estrutura celular (5%), divisão celular (1%) e proteínas hipotéticas (60%).

Análises do cDNA de *P. brasiliensis*, isolado de camundongo infectado, realizadas por Bailão *et al.* (2006) mostraram que proteínas envolvidas nos processos de síntese protéica, fatores de elongação e processos pós-traducionais são super expressas nesta condição. Transcritos que codificam tirosinase e aminoácido L-aromático descarboxilase (DDC) foram supra-regulados, sugerindo a ocorrência da síntese ativa de melanina durante o processo infectivo. A tirosinase é a enzima responsável pela

primeira etapa da síntese de melanina (ARREDONDO *et al.*, 2005), e está associada com a patogenicidade de algumas infecções microbianas, como a criptococose, causada pelo fungo *Cryptococcus neoformans* (WALTON *et al.*, 2005).

Recentemente, o transcriptoma de *P. brasiliensis*, fase leveduriforme, recuperado de fígado de animais experimentais (camundongos B10) foi descrito por Costa *et al.* (2007). Foram seqüenciadas 4.932 ESTs no processo infectivo, sendo 37,47% relacionadas a novos genes e 23,75% pertencentes a genes super expressos. Os genes identificados foram categorizados em processos metabólicos, transporte celular e energia. Do total de ESTs geradas neste estudo, 65,53% das seqüências identificadas, também estavam presentes no transcriptoma de levedura e micélio de células obtidas de cultura *in vitro*, descrito por Felipe *et al.* (2005). A demonstração do perfil gênico das células leveduriformes de *P. brasiliensis* recuperadas de animais infectados é um requisito essencial para o estudo do genoma funcional de modo a esclarecer os mecanismos de patogenicidade e virulência fúngica.

Na fase leveduriforme, o metabolismo é desviado para a produção de etanol, refletindo seu comportamento anaeróbico (RESTREPO *et al.*, 1981). Várias vias que fornecem substratos para o ciclo do glioxalato (CG) são super-reguladas em células leveduriformes de *P. brasiliensis*. A enzima isocitrato liase redireciona o fluxo metabólico utilizando etanol e acetato como fonte com dois carbonos para gerar oxaloacetato, que pode ser reconvertido para glicose (FELIPE *et al.*, 2005a).

I.3 – Ciclo do Glioxalato

A glicose é a fonte de carbono preferencial para muitos organismos, podendo ser convertida em um açúcar contendo cinco carbonos ou ser catabolisada a

acetil-CoA através da glicólise. Entretanto, não é sempre que a glicose está disponível como fonte de carbono para os microrganismos, sendo necessário a atuação de outras vias metabólicas para suprir as necessidades energéticas de acordo com a fonte de carbono disponível no ambiente. Esses microrganismos possuem um sistema regulatório que facilita a conversão de vários nutrientes em componentes do metabolismo central, e dessa forma, levando à produção de energia para transformação de substratos, biossíntese de compostos, e crescimento (COZZONE, 1998).

Uma dessas vias é o Ciclo do Ácido Tricarboxílico (TCA). O TCA resulta na geração de moléculas produtoras de energia, e também atua como reservatório de precursores metabólicos essenciais para a síntese de aminoácidos, ácidos graxos e açúcares. Esse ciclo pode ser regulado, e as enzimas envolvidas podem ser induzidas ou suprimidas de acordo com a necessidade da célula (HAMEL & APPANNA, 2001).

Outra via de grande importância no processo regulatório é o Ciclo do Glioxalato (Figura 01), originalmente descrito por Kornberg e Krebs (1957) em bactérias crescidas em acetato. O ciclo trata-se de uma via alternativa do TCA, oxidando acetato aos ácidos dicarboxílicos succinato, malato e oxaloacetato (FLAVELL *et al.*, 1971). A função do Ciclo do Glioxalato é sintetizar compostos contendo 4 carbonos a partir de compostos contendo 2 carbonos, tais como acetato e etanol (KORNBERG, 1966).

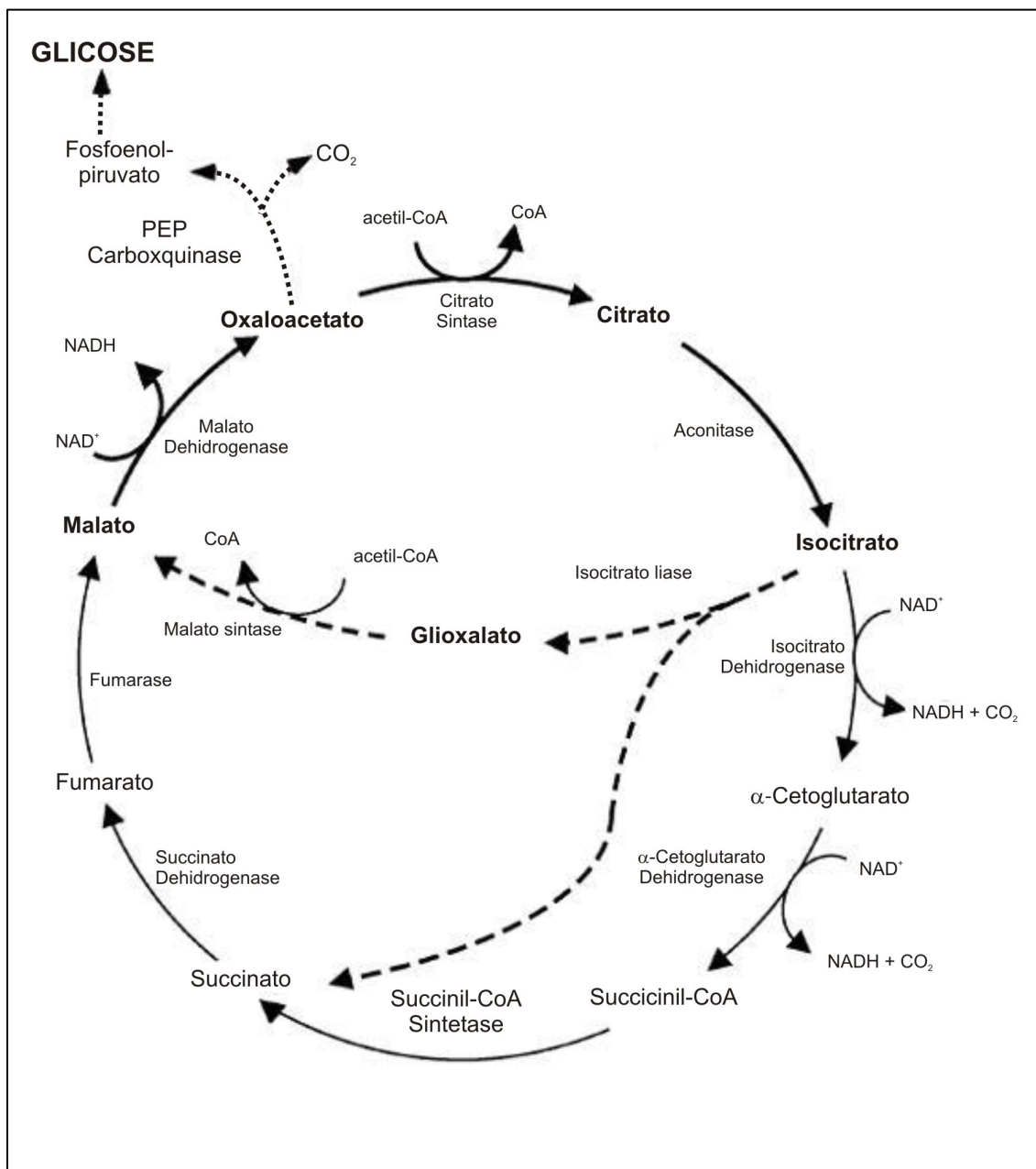


Figura 01 – Esquema representativo do ciclo do ácido tricarboxílico, ciclo do glioxalato e gliconeogênese. Estão evidenciados os passos enzimáticos básicos no ciclo do ácido tricarboxílico (linhas finas), o qual é comum para todos os organismos; passos no ciclo do glioxalato (linhas tracejadas), o qual é comum para microrganismos e plantas; passos compartilhados pelos dois ciclos (linhas grossas); e a reação inicial de gliconeogênese (linhas sombreadas). Fonte: LORENZ & FINK (2002). Life and Death in a Macrophage: Role of the Glyoxylate Cycle in Virulence. *Eukaryotic Cell*. 657-662.

O acetil-CoA entra no TCA, onde é convertido, através de oito passos enzimáticos, em intermediários que alimentam numerosas vias biossintéticas, incluindo as vias para a síntese de aminoácidos, ácidos graxos e glicose (LORENZ & FINK, 2002). Nesse processo participam enzimas comuns ao TCA e também as específicas do Ciclo do Glioxalato, a isocitrato liase (ICL) e a malato sintase (MLS). A enzima ICL catalisa a reação de clivagem do isocitrato a succinato e glioxalato. Em seguida, a enzima MLS condensa o glioxalato, com acetil coenzima A formando malato (KORNBERG, 1966).

O Ciclo do Glioxalato possui um papel importante na gliconeogênese (KORNBERG & BEEVERS, 1957), visto que o primeiro passo comprometido na gliconeogênese é a conversão de oxaloacetato à fosfoenolpiruvato através da enzima fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEP carboxinase) (Figura 01). Essa enzima e a frutose-1,6-bifosfatase são as mais importantes na gliconeogênese por atuarem como regulatórias na produção de glicose. Em *Saccharomyces cerevisiae*, sob fagocitose, frutose-1,6-bifosfatase (*FBP1*) é altamente induzida (LORENZ & FINK, 2001), validando a idéia de que o primeiro objetivo na indução do Ciclo do Glioxalato é a produção de glicose.

As enzimas do Ciclo do Glioxalato são induzidas após a fagocitose de *C. albicans* e *S. cerevisiae*, possibilitando a sobrevivência desses microrganismos no interior de macrófagos (LORENZ & FINK, 2002). Somente as enzimas exclusivas do ciclo do Glioxalato são induzidas durante o processo de infecção embora existam enzimas comuns ao TCA (MINARD & MCALISTER-HENN, 1991). Entretanto, o mesmo não é observado em resposta a meios condicionados, estresse oxidativo, ou contato com macrófagos inativados por aquecimento (LORENZ & FINK, 2001). De acordo com Cozzone (1998), o macrófago é pobre em compostos carbônicos

complexos, e rico em ácidos graxos e seus produtos de degradação, primeiramente acetil-CoA, os quais são assimilados somente através do Ciclo do Glioxalato, confirmando ser a única rota de síntese de glicose nesse ambiente.

Tem sido descrito que o Ciclo do Glioxalato e as enzimas ICL e MLS são importantes para a virulência de muitos patógenos, como *Candida albicans* (LORENZ & FINK, 2002), *Cryptococcus neoformans* (RUDE *et al.*, 2002) e o fungo fitopatogênico *Leptosphaeria maculans* (IDNURM & HOWLETT, 2002).

Estudos recentes utilizando isolados de *C. albicans* coletados de três grupos de pacientes apresentando candidíase em regiões diferentes do corpo, mostraram a atividade das enzimas ICL e MLS em todos os casos analisados, confirmando a presença do CG como fator de virulência para o fungo. Entre os três grupos de pacientes analisados, os níveis de atividade dessas enzimas se mostraram alterados dependendo do local da infecção. Estudos utilizando isolado de *C. albicans* proveniente de pacientes diabéticos desenvolvendo candidíase vulvovaginal apresentaram níveis de atividade das enzimas ICL e MLS mais elevados quando comparado a isolado obtido da cavidade orofaríngea dos pacientes HIV/AIDS e da pele de pacientes queimados (LATTIF *et al.*, 2006).

I.4 – Peroxissomos

Os peroxissomas são organelos existentes em virtualmente todas as células eucarióticas, compreendendo também os glioxissomas das plantas e dos fungos, os glicossomas dos cinetoplastídeos, e os corpos de Woronin de *Neurospora crassa*. Este último tipo de peroxissoma contém um núcleo cristalóide hexagonal, e está envolvido no estancamento de perdas de citosol em fungos filamentosos (JEDD & CHUA, 2000). São conhecidos apenas alguns seres eucarióticos unicelulares que não possuem

peroxissomas, sendo considerados formas de vida eucariótica primitiva ou descendente de eucariotas com peroxissomas (MULLER, 1969). Os peroxissomas foram descritos pela primeira vez na década de 50 por Rhodin (RHODIN, 1954).

Inicialmente os peroxissomas foram designados por microcorpos (*microbodies*), sendo que essa designação foi alterada para peroxissoma, após a descoberta da respiração baseada no peróxido de hidrogénio, característica dessas organelas (De DUVE & BAUDHUIN, 1966). Os peroxissomas desempenham várias funções metabólicas, como é o caso da oxidação de vários tipos de lípidos (WELLER *et al.*, 2003), vários passos da síntese de plasmalogénios e da síntese *de novo* de colesterol, metabolismo de isoprenóides (BIARDI *et al.*, 1994), conversão de ácido fitânico a ácido pristânico, oxidação de D-aminoácidos e poliaminas (Weller *et al.*, 2003), síntese de ácido docosahexanóico (WANDERS & WATERHAM, 2006), síntese de ácidos biliares e catabolismo de purinas (AZEVEDO *et al.*, 2006). Em plantas, o ciclo do glioxilato (sementes) e a fotorrespiração (folhas) ocorre nos peroxissomas (ECKERT & ERDMANN, 2006). Em leveduras, vários passos do ciclo do glioxilato também ocorrem no peroxissoma, bem como a biossíntese de lisina, e a degradação de aminoácidos, metanol, peróxido de hidrogénio e ácidos gordos (MANNAERTS & VAN VELDHoven, 1993), sendo que nestes organismos a β -oxidação é um processo exclusivamente peroxissomal (VEENHUIS *et al.*, 1987).

Peroxisomos são pequenos microcorpos, normalmente esféricos envoltos por uma única bicamada lipídica (KERSSEN *et al.*, 2006), eles apresentam capacidade de replicação por fissão, mas não contém DNA ou aparato de expressão de gene, além de que tem sido elucidado que eles são derivados do retículo endoplasmático, gerando novas questões sobre sua origem endossimbiótica (HOEPFNER *et al.*, 2005). Os peroxissomos contêm características de oxidoredutases que transfere elétrons de

reductos diretamente para oxigênio molecular para formar peróxido de hidrogênio e catalase para degradar o peróxido de hidrogênio à água e oxigênio. Peroxissomos contém também enzimas típicas da β -oxidação de ácido graxos (PURDUE & LAZAROW *et al.*, 2001).

Proteínas chamadas *peroxins* têm sido identificadas por estratégias genéticas e proteômicas e caracterizadas na biogênese de peroxissomos, algumas responsáveis na topogênese de proteínas peroxissomais. Tem-se investigado também que a membrana peroxissomal e proteínas matriz são sintetizadas em ribossomos livres no citosol e são importadas pós-traducionalmente dentro de organelas pré-existentes (INESHEILAND & EDMAN, 2005).

I.5 – Matriz Extracelular

A matriz extracelular (MEC) é uma rede complexa de macromoléculas que proporciona um arcabouço físico para a estabilização da estrutura tecidual. A MEC é importante para as interações célula a célula e fornece um substrato às mesmas para aderirem e proliferarem, modulando diretamente a forma e funções celulares. A MEC de mamíferos é composta por duas classes principais de macromoléculas: as glicosaminoglicanas (GAG), encontradas normalmente ligadas às proteínas formando proteoglicanas, e as proteínas fibrosas, que desempenham funções estruturais e adesivas, incluindo nessa classe, laminina, fibronectina e colágeno (VERSTREPEN & KLIS, 2006). A composição da MEC varia em diferentes tecidos e durante fases de injúria, inflamação e reparo tecidual (KOTTON *et al.* 2003).

Colágeno é o principal constituinte da MEC e representa um importante alvo para adesão de muitas espécies de microrganismos. Vários tipos de colágeno foram caracterizados, entre eles o colágeno tipo IV, encontrado principalmente na membrana basal e o colágeno tipo I é abundante na matriz intersticial (GIL *et al.*, 1996).

Fibronectina é uma glicoproteína dimérica de 440 kDa presente na forma solúvel no plasma sanguíneo e outros fluídos corporais e na forma fibrilar na MEC. A fibronectina provavelmente atua como molécula de adesão em células de mamíferos, um processo que envolve a ligação de receptores específicos da superfície celular com domínios presentes na molécula de fibronectina (MOHRI *et al.*, 1996).

Laminina é uma glicoproteína de 900 kDa presente na membrana basal e nos pulmões. Essa glicoproteína pode ser exposta quando o tecido sofre algum dano que pode ser provocado por toxinas bacterianas, drogas ou por processo inflamatório. A interação com laminina é crucial para vários processos biológicos, os quais requerem adesão celular, tais como, diapedese, coesão celular dentro do tecido, metástase de células cancerosas e infecções (BECK *et al.*, 1990). De fato, receptores de laminina foram descritos em células que normalmente interagem com a membrana basal, tais como células epiteliais ou endoteliais, células musculares e neurais. Células que extravasam da corrente sanguínea, como por exemplo, macrófagos, leucócitos, e células tumorais, também podem exibir esses receptores (BOUCHARA, 1997).

Tanto o *P. brasiliensis* (MENDES-GIANNINI *et al.*, 2000), quanto vários fungos de importância clínica, a exemplo *Cryptococcus neoformans* (GANENDREN *et al.*, 2006), *Penicillium marneffei* (SRINOULPRASERT *et al.*, 2006), *Histoplasma capsulatum* (McMAHON *et al.*, 1995), *Coccidioides immitis* (HUNG *et al.*, 2002) e *C. albicans* (FILLER, 2006), possuem mecanismos que possibilitam sua adesão à MEC, uma vez que esse processo implica em que o patógeno reconheça carboidratos ou

proteínas ligantes na superfície da célula do hospedeiro ou proteínas constituintes da membrana basal (PATTI *et al.*, 1994). A adesão de microrganismos patogênicos aos tecidos do hospedeiro é considerada indispensável para o início da colonização e futura disseminação.

I.6 – Moléculas Envolvidas no Processo de Adesão de Fungos Patogênicos

Partindo do princípio de que o primeiro passo para o estabelecimento do processo infectivo nos tecidos do hospedeiro seria a adesão de microrganismos às proteínas da MEC, torna-se necessário o estudo de moléculas que se comportam como adesinas em fungos patogênicos. A habilidade de vários fungos de aderir a uma variedade de superfícies do hospedeiro representa uma característica importante no desenvolvimento da infecção fúngica e na patogênese de micoses. A adesão é mediada por componentes superficiais da célula fúngica chamadas de adesinas, as quais freqüentemente se ligam a componentes da MEC (LENZI *et al.*, 1991; PATTI *et al.*, 1994).

Em *C. albicans* uma manoproteína de 65 kDa (MP65) foi caracterizada como uma adesina. A propriedade adesiva de MP65 foi evidenciada pelo fato do anticorpo produzido contra MP65 ser capaz de inibir a adesão do fungo à placas de polietileno. Em adição mutante de *C. albicans* que não expressa MP65 na parede celular apresentou menor capacidade de adesão, quando comparado com o tipo selvagem (SANDINI *et al.*, 2007).

A atividade da enzima fosfolipase tem sido descrita como fator de aderência de diversos patógenos às células epiteliais. Foi demonstrado que a fosfolipase B1 (PLB1) é um fator de virulência em *Cryptococcus neoformans*, e que estaria envolvido

no início da criptococose pulmonar (SANTANGELO *et al.*, 2004). A deleção do gene que codifica PLB1 inibiu significativamente a capacidade de adesão de *C. neoformans* à culturas de pneumócitos (linhagem A549) (GANENDREN *et al.*, 2006).

Em *A. fumigatus*, duas proteínas de parede celular de 37 e 72 kDa apresentaram capacidade de ligação à laminina. Em adição outros dois peptídeos de massa molecular de 23 e 30 kDa foram capazes de interagir com fibronectina (PENALVER *et al.*, 1996; TRONCHIN *et al.*, 1997).

Experimentos de adesão em que o fungo *H. capsulatum* foi colocado em contato com laminina imobilizada mostraram que esse fungo interage com a proteína de maneira rápida e específica; a presença do anticorpo anti-laminina inibiu significativamente a adesão do fungo. A adesão foi mediada possivelmente por uma glicoproteína de 50 kDa identificada na parede celular de *H. capsulatum*. O anticorpo anti-proteína de 50 kDa e o peptídeo IKVAV, presente na molécula de laminina, foram capazes de inibir a adesão do fungo à molécula de laminina (McMAHON *et al.*, 1995).

Estudos de interação entre *S. schenckii*, o agente etiológico da esporotricose, e proteínas da MEC mostraram que o fungo foi capaz de aderir à laminina, colágeno e fibronectina, e que essa interação foi mediada por proteínas de 90 e 135 kDa localizadas na superfície do fungo. A interação entre *S. schenckii* e proteínas da MEC foi avaliada através de experimentos de competição entre peptídeos presentes na fibronectina e laminina (LIMA *et al.*, 2004).

I.7 – Adesinas de *P. brasiliensis*

O fungo *P. brasiliensis* possui capacidade de aderir, atravessar e invadir barreiras impostas pelos tecidos do hospedeiro (MENDES-GIANNINI *et al.*, 2000).

Segundo Hanna *et al.* (2000), a capacidade de aderência e invasão do fungo está relacionada à virulência. Recentes estudos têm caracterizado componentes da MEC envolvidos na interação de *P. brasiliensis* com o hospedeiro (MENDES-GIANNINI *et al.*, 2006). A laminina é uma das principais moléculas que promovem a adesão de *P. brasiliensis* facilitando a sua patogenicidade (MENDES-GIANNINI *et al.*, 2008).

Vicentini *et al.* (1994) descreveram a primeira adesina de *P. brasiliensis*, a glicoproteína de 43 kDa com a capacidade de interagir com laminina. A gp43 interage com laminina (VICENTINI *et al.*, 1994; GESZTESI *et al.*, 1996) e fibronectina (MENDES-GIANNINI *et al.*, 2006).

P. brasiliensis também apresenta em sua superfície celular duas proteínas com massas moleculares de 19 e 32 kDa que interagem com proteínas da MEC, tais como laminina, fibrinogênio e fibronectina (GONZÁLEZ *et al.*, 2005). Ensaios realizados com conídeos de *P. brasiliensis* pré-incubados com anticorpo monoclonal anti-32 kDa demonstraram a inibição da aderência do fungo às proteínas da MEC de maneira dose-dependente (GONZÁLEZ *et al.*, 2005). Uma adesina de 30 kDa isolada por Andreotti *et al.* (2005) apresentou capacidade de ligação à laminina, mas não a outros componentes da MEC; a adesão de *P. brasiliensis* às células epiteliais foi inibida após tratamento das células epiteliais com essa proteína.

Enzimas da via glicolítica de *P. brasiliensis*, como a triose fosfato isomerase (TPI) (PEREIRA *et al.*, 2007) e gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) (BARBOSA *et al.*, 2006), foram também caracterizadas como prováveis adesinas do fungo. Recentemente foi descrita outra molécula presente na superfície do fungo que apresenta capacidade de aderir às proteínas da MEC, a *PbDfg5p*. Essa proteína caracterizada como pertencente à família das glicosil hidrolases estaria relacionada com

a formação e manutenção da parede celular de fungos apresentando capacidade de se ligar a laminina, fibronectina, colágenos tipo I e tipo IV (CASTRO *et al.*, 2008).

I.8 – Malato sintase

I.8.1 – Considerações gerais

A enzima MLS (EC 2.3.3.9) catalisa a reação de condensação que produz malato a partir de acetil-CoA e glioxalato; essa reação é altamente específica para esses substratos e requer Mg^{2+} como um cofator (NOGALES *et al.*, 2004). A MLS é uma enzima fundamental do Ciclo do Glioxalato, e também está envolvida na degradação de purinas, convertendo o glioxalato produzido do ácido urico, alantoina e ácido alantoico, em malato (HARTIG *et al.*, 1992) que pode participar do TCA ou ciclo do ácido dicarboxílico (DAC) (ORNSTON & ORNSTON, 1969).

As MLSs são classificadas em três famílias baseadas no tamanho da sequência de aminoácidos. A maioria das MLSs conhecidas de fungos, bactérias e plantas superiores se agrupam no clado das MLSs com tamanho intermediário (HOWARD *et al.*, 2000). Com base nas características das sequências de aminoácidos, as MLSs podem se dividir ainda, em duas principais famílias, isoformas A (MSA) e G (MSG). MSA, com massa molecular em torno de 65 kDa, ocorre em bactérias, como por exemplo, *E. coli* (KORNBERG, 1966), em fungos, como *S. cerevisiae* (LORENZ & FINK, 2001); e plantas superiores, como o pepino (*Cumcumis sativus*) (EASTMOND & GRAHAM, 2001); MSG, possui massa molecular em torno de 80 kDa, ocorrendo somente em bactérias (NAKAZAWA *et al.*, 2005).

I.8.2 – Aspectos da enzima MLS

Em plantas, tem se identificado a presença da enzima MLS em diferentes estágios de crescimento e situações (LEWIS & DOYLE, 2001). Estudos com pepinos (*Cucumis sativus*) mostraram que a MLS apresenta sua atividade alterada durante os diferentes estágios de crescimento da planta (GRAHAM *et al.*, 1992). A expressão do gene *MS* nessa planta é influenciada pelo estado metabólico intracelular; sua indução está intimamente relacionada com a baixa concentração de sacarose, glicose e frutose intracelular (GRAHAM *et al.*, 1994).

Alguns microrganismos possuem duas classes de MLSs, sendo codificadas por genes diferentes. Exemplificando, em *E. coli*, *aceB* codifica a forma A, a qual é predominante em células crescidas em meio contendo acetato, e *glcB* codifica a forma G, uma proteína monomérica induzida pelo glicolato (MOLINA *et al.*, 1994). Em *E. coli*, o operon *aceBAK* contendo os genes ICL (*aceA*) e MLS (*aceB*) é reprimido por glicose e induzido por acetato ou ácidos graxos (CLARK & CRONAN, 1996).

Nakazawa *et al.* (2005) purificaram uma proteína com massa molecular de 116 kDa, como a MLS de *Euglena gracilis* crescida na presença de etanol. Entretanto, sua localização é mitocondrial, e não glioxissomal, como descrito em fungos (SZABO & AVERS, 1969) e plantas superiores (BEEVERS, 1980). Essa localização mitocondrial de EgGCE é confirmada pela presença do peptídeo sinal de endereçamento para a mitocôndria. Em contraste, Woodcock & Merret (1978) isolaram outra MLS de *E. gracilis* crescida na presença de acetato; essa proteína apresenta massa molecular de 175 kDa e está localizada em glioxissomos (LIU *et al.*, 1995).

A estrutura tridimensional de MSG de *E. coli* foi elucidada através de Ressonância Magnética Nuclear (NMR) (TUGARINOV *et al.*, 2002). MSG é uma

proteína globular multimérica apresentando uma estrutura TIM barril $\beta 8/\alpha 8$. O sítio ativo de MSG está localizado em uma cavidade na interface entre a região C-terminal e os *loops* no final da região C-terminal das folhas β do TIM barril (HOWARD *et al.*, 2000). Essa posição do sítio ativo está coerente com as posições descritas em outras enzimas que contêm o TIM barril; o sítio ativo está localizado dentro dos *loops* no final do barril (BRANDEN & TOOZE, 1991). Em *E. coli*, os resíduos conservados do sítio ativo, Glu427 e Asp455, os quais se ligam ao íon magnésio, Arg338 que uni o hidrogênio ao oxigênio aldeídico do glioxalato, e a base catalítica proposta, Asp631, são conservados entre as seqüências de MLSs conhecidas. Os domínios críticos para a atividade de MLS, parece ser o domínio do barril e a ligação C-terminal que cobre o sítio ativo, e que também contribui para a base catalítica proposta (Asp631). O domínio C-terminal é composto por 589 resíduos; o *loop*, formado pelos resíduos 577-588 parece ser flexível, permitindo o movimento do domínio para o restante da enzima. Tal movimento permite a abertura do sítio ativo para entrada do substrato e liberação do produto (HOWARD *et al.*, 2000).

Na bactéria marinha *Colwellia maris*, a MLS é descrita como uma enzima dimérica composta por subunidades de 76,3 kDa, que apresenta temperatura ótima de 45° C, característico de enzima mesofílica, e possui parâmetros cinéticos alterados após a redução da temperatura (WATANABE *et al.*, 2001). Nas bactérias *Acinetobacter calcoaceticus* e *Corynebacterium glutamicum* MLS se apresenta como uma proteína monomérica com massa molecular de 75 kDa (PARK *et al.*, 1986) e 82 kDa (REINSCHIED *et al.*, 1994), respectivamente. Em *Fomitopsis palustris*, um fungo basidiomiceto, a MLS apresenta-se na forma de um octâmero, com massa molecular de 520 kDa, distribuídas em oito subunidades de 65 kDa. Essa enzima apresentou

afinidade para ambos os substratos, glioxalato (K_m de $45\mu\text{M}$) e acetil-CoA (K_m de $2,2\mu\text{M}$) (MUNIR *et al.*, 2002).

Em sementes de algodão (*Gossypium hirsutum* L.), a enzima MLS se encontra presente no glioxissomo até o período que precede a germinação da planta. Após esse período, ocorre o acúmulo de mRNA nos cotilédones (MAHAN, 2000). No arroz (*Zea mays*), a enzima MLS apresentou atividade aumentada nas pontas das raízes (DIEUAIDE *et al.*, 1992).

Kunze *et al.* (2002) mostraram que Mls1p encontrava-se presente no citoplasma quando células de *S. cerevisiae* foram crescidas na presença de etanol. Entretanto, quando as células eram crescidas na presença de ácido oléico, Mls1p apresentou localização peroxissomal. Em *Corynebacterium glutamicum*, MLS e ICL são essenciais para seu crescimento na presença de acetato, pois utiliza preferencialmente, esse substrato como fonte de energia (WENDISCH *et al.*, 2000).

I.8.3 – MLS como antígeno

As enzimas do ciclo do Glioxalato, MLS e ICL, tem sido descritas como fatores de virulência em vários patógenos humanos (OLIVAS, *et al.*, 2007; RUDE *et al.*, 2002; LORENZ and FINK, 2002), particularmente em *Mycobacterium tuberculosis* (GRAHAM and CLARK-CURTISS, 1999; DUBNAU *et al.*, 2002). Genes que codificam essas enzimas são induzidos na fagocitose em *C. albicans* e *S. cerevisiae* (LORENZ and FINK, 2002).

Singh *et al.* (2004) através de amostras de soro de pacientes infectados com HIV antes da manifestação clínica da tuberculose, mostraram o perfil de *M. tuberculosis* e

suas proteínas de filtrado de cultura. Anticorpos para MLS estava presente em 90% dos casos testados, podendo considera-la útil em testes de diagnóstico.

Estudos com pacientes da Índia revelaram que MLS é um antígeno imunodominante reconhecido por 80% dos pacientes imunodeficientes, evidenciando que o ensaio de sorodiagnóstico baseado na MLS pode servir como suplemento à microscopia no diagnóstico rápido da tuberculose (ACHKAR *et al.*, 2006)

Wanchu *et al.* (2008) mostraram que anti-MLS de *M. tuberculosis* tem alta sensibilidade e especificidade para o diagnóstico de tuberculose de pacientes em regiões endêmicas, além de um grande potencial para identificar a tuberculose subclínica em pacientes considerados de alto risco para a doença.

I.8.4 – MLS de *P. brasiliensis*

A sequência codificante para a *PbMLS*, foi clonada e caracterizada por Zambuzzi-Carvalho *et al.* (2009). O cDNA apresenta 1882 pares de bases, incluindo uma ORF de 1617 pares de bases. A sequência deduzida da proteína é constituída por 539 resíduos de aminoácidos com uma massa molecular predita de 60 kDa e *pI* de 8.45. A proteína apresenta assinatura característica da família das MLSs, resíduos catalíticos essenciais para a atividade enzimática, e sinal PTS1 de localização peroxissomal/glioxissomal (ZAMBUZZI-CARVALHO *et al.*, 2009).

Análises do cDNA de *P. brasiliensis*, isolado de camundongo infectado, mostraram que proteínas envolvidas nos processos de síntese proteica, fatores de alongação e processos pós-traducionais são super expressas nessa condição (BAILÃO *et al.*, 2006)

Pbmls tem motivos que poderiam indicar sua regulação por fontes de carbono e nitrogênio. Além disso, todas as enzimas envolvidas no metabolismo de purinas para formar glioxalato foram encontrados em transcriptomas de *P. brasiliensis* (COSTA *et al.*, 2007, BASTOS *et al.*, 2007).

Os dados sugerem que *PbMLS* condensa acetyl-CoA de duas fontes de carbono. Na presença de fontes de nitrogênio, o glioxalato produzido do metabolismo de prolina e purina foi condensado com acetil-CoA produzindo malato por ação de *PbMLS*. O regulamento de *Pbmls* por fontes de carbono e de nitrogênio é reforçado pela presença de motivos reguladores encontrados na região de promotora do gene (ZAMBUZZI-CARVALHO *et al.*, 2009)

O estudo do transcriptoma de *P. brasiliensis* tem auxiliado no entendimento global do metabolismo de ambas as formas micélio e levedura (FELIPE *et al.*, 2005a). Em geral, o padrão dos genes induzidos na fase miceliana sugere que essa forma possua um metabolismo aeróbico, ao contrário da forma leveduriforme. Os genes isocitrato dehidrogenase e succinil-CoA sintetase, os quais são os principais pontos regulatórios do ciclo do citrato são induzidos em micélio. (FELIPE *et al.*, 2005a).

No presente trabalho foi demonstrado que *PbMLS* está associada à parede de *P. brasiliensis*, onde é capaz de se ligar a componentes da matriz extracelular, como fibronectina e colágeno tipo I e IV. Além disso, foi demonstrado que a *MLS* é capaz de mediar a aderência e internalização de *P. brasiliensis* às células cultivadas *in vitro*, o que sugere o seu papel potencial no estabelecimento da doença.

Justificativa



II – JUSTIFICATIVA

A importância do estudo da PCM não resulta somente de sua prevalência relativamente alta, mas também da severidade de suas formas clínicas, considerando o fato de que essa é a micose sistêmica de maior prevalência na América Latina, com o maior número de relatos de casos no Brasil. A doença varia em severidade, em geral apresenta evolução crônica, de caráter recidivante e pode deixar seqüelas anatômicas e funcionais. O número de doentes que necessitam de assistência médica de longo prazo nas regiões de maior endemicidade é muito grande, tornando a moléstia, por sua prevalência, um importante problema de saúde pública (MARTINEZ, 1997). O coeficiente de mortalidade no período de 1980 a 1995, para o Brasil e para a região Centro-Oeste foi, respectivamente, 1.488 e 2.428/1 milhão de habitantes (COUTINHO *et al.*, 1998).

A caracterização de algumas proteínas que aparentemente influenciam na interação com o hospedeiro, conferindo um fenótipo mais patogênico, por permitir ao fungo aderir com maior facilidade aos tecidos do hospedeiro, invadir novos compartimentos, evadir da resposta imune, bem como outras interações hospedeiro-específicas, vem colaborando para o entendimento da instalação do fungo e desenvolvimento da PCM.

A disponibilidade do transcriptoma de *P. brasiliensis* possibilita a obtenção de moléculas presentes no fungo, porém ausentes em humanos, como novos alvos antifúngicos. O Ciclo do Glioxalato não é descrito em humanos assim, acredita-se que inibidores desse ciclo sejam potentes antifúngicos sem efeitos colaterais no homem.

Desta forma, a partir das seqüências completas de cDNA codificantes para a proteína *PbMLS*, realizamos a expressão heteróloga em *E. coli*, bem como a produção de soro