

Caracterização funcional e identificação de inibidores da enzima 4-hidroxifenilpiruvato dioxigenase (4-HPPD) de *Paracoccidioides brasiliensis* (isolado 18)

Juliana de Fátima dos Santos Silva¹; Daniela Leite Jabes²; Regina Costa de Oliveira³, Luiz R. Nunes⁴

1. Estudante do curso de Ciências Biológicas; e-mail: julianafsilva@outlook.com
2. Professor da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: danielajabes@umc.br
3. Professor; e-mail: reginaco@umc.br
4. Professor; e-mail: nunes1212@gmail.com

Área do Conhecimento: **Genética Molecular; Microbiologia; Bioquímica.**

Palavras-Chave: *Paracoccidioides brasiliensis*; 4-hidroxifenilpiruvato dioxigenase; clonagem gênica.

INTRODUÇÃO

O fungo termo-dimórfico *Paracoccidioides ssp.* é o agente causador da micose sistêmica paracoccidioidomicose, endêmica da América Latina (MARQUES, 2013). Seu dimorfismo é associado a variação de temperatura, pois a 24°C, possui a morfologia conidial com propágulos infectantes e, em ~37°C, apresenta-se como levedura com brotamentos (LACAZ *et al.*, 2002). Nesse sentido, a transição morfológica entre micélio e levedura é entendida como uma etapa do ciclo de vida do fungo diretamente associada à adaptação às condições de vida no interior do hospedeiro. Nesse contexto, diversos estudos foram conduzidos com vistas a compreender as alterações genéticas e fisiológicas que ocorrem em *P. brasiliensis*, à medida que o fungo assume sua forma de levedura. Em um destes estudos, NUNES e colaboradores, em 2005, através de metodologias de microarranjos de DNA e PCR em tempo real, estudaram as alterações na expressão gênica de *P. brasiliensis* durante a transição micélio-levedura. Com elevado grau de concordância entre as duas técnicas, observou-se a modulação estatisticamente significativa de 2.583 genes. Dentre eles, destaca-se aquele que codifica a enzima 4-hidroxifenilpiruvato dioxigenase ou 4-HPPD, uma vez que apresentou o padrão mais notável de superexpressão - cerca de 15 vezes mais expresso na levedura (NUNES *et al.*, 2005). A 4-HPPD, está envolvida na via catalítica da tirosina e da fenilalanina. A atividade da 4-HPPD leva ao acúmulo de ácido homogentísico, substância que possui o potencial para atuar como bloqueador de ataques oxidativos, cuja ação pode ser decisiva para garantir o sucesso da infecção por *P. brasiliensis*. Sabe-se que o composto Mesotriona atua como inibidor da atividade da 4-HPPD. No projeto PIBIC 2016/2017 intitulado "Clonagem, expressão e purificação da proteína recombinante 4-hidroxifenilpiruvato dioxigenase de *Paracoccidioides brasiliensis*" nos propusemos a clonar, expressar e purificar a proteína 4-HPPD do fungo. Neste sentido, o presente trabalho se concentrou em dar continuidade a essa linha de pesquisa de maneira a realizar ensaios funcionais com a proteína recombinante 4-HPPD, obtida no projeto anterior, a partir da metodologia de consumo de oxigênio utilizando como inibidor da proteína o composto Mesotriona. E, além disto, realizar curvas de crescimento com culturas leveduriformes de *P. brasiliensis* adicionando doses variadas do mesmo composto e, como forma de mimetizar o ambiente do hospedeiro, adicionar Paraquat®.

OBJETIVOS

Realizar ensaios enzimáticos para caracterizar funcionalmente a proteína recombinante 4-hidroxifenilpiruvato dioxigenase (4-HPPD) e realizar testes *in vitro* submetendo culturas leveduriformes de *P. brasiliensis* a estresse oxidativo (Paraquat®) para verificar a ação da Mesotriona no crescimento do fungo.

METODOLOGIA

A atividade da proteína recombinante purificada foi monitorada através do consumo de oxigênio durante a formação do homogentisato a partir do substrato 4-HPP (Sigma-Aldrich) utilizando um eletrodo do tipo Clark em um aparelho Hansatech King's Lynn (Norfolk, U.K.) cedido pelo Professor Tiago Rodrigues do Centro Interdisciplinar de Investigação Bioquímica (UMC-CIIB). A reação foi realizada de acordo com Garcia *et al.*, 2000, adicionando-se 0,1 M de Tris-acetato (pH 6,0), 0,5 mM de Ascorbato de Sódio, 123 µM de Sulfato de Ferro Amônia e 89 µM do substrato HPP para um volume final de 1 mL sendo a reação incubada por 10 minutos a 30°C. Para início da reação, os registros se basearam na taxa de consumo (nmol/min) em relação ao tempo (600 segundos) na temperatura de 30°C. Os testes foram realizados nas seguintes condições para as amostras-controle a saber: I - Controle A: a reação contendo todos os reagentes do ensaio, mas sem a presença da enzima e II - Controle B: idem ao controle anterior, mas com a presença da droga inibidora da enzima 4-HPPD, Mesotriona (480 mg/mL). Para os testes com a proteína purificada, as concentrações utilizadas foram de 290 pmol, 1450 pmol e 2900 pmol. Para os ensaios *in vitro*, foi realizada uma curva de crescimento na presença dos compostos Mesotriona e Paraquat®. A cultura de leveduras do fungo *P. brasiliensis*, em meio YPD modificado (0,5% de extrato de levedura, 0,5% de peptona, 1,5% de dextrose, 2% de ágar, pH = 6,5, agitação de 150 rpm, 37°C), foi crescida até atingir D.O.₆₀₀ 2,0 onde, posteriormente, foi adicionada ao inóculo de 720 mL de meio para padronização da D.O.₆₀₀ inicial em 0,2. Em seguida, foram distribuídos em um volume de 30 mL de cultura para frascos com as condições para as curvas: *P. brasiliensis* controle, com a adição de 0,1M de Paraquat® e Mesotriona nas concentrações de 50 µg/mL, 250 µg/mL, 500 µg/mL. Ambas as curvas foram mantidas por 7 dias em agitação de 125 RPM, 37,5°C. Os dados obtidos na curva de crescimento foram analisado pelo *Software GraphPad Prism 6*, aplicando teste t (*Teste t Student*). A Fórmula de Abbott foi aplicada para avaliar a natureza da interação entre o Paraquat e a Mesotriona (OLIVEIRA, 2013).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos ensaios de detecção de O₂, os resultados entre os diversos experimentos não permitiram uma conclusão acerca da atividade funcional da 4-HPPD recombinante de *P. brasiliensis*, uma vez que não conseguimos replicar os dados positivos encontrados no primeiro experimento. O comportamento dos controles e dos testes enzimáticos variou a cada experimento, mesmo mantendo as condições experimentais. Então, ensaios visando a clonagem da 4-HPPD na linhagem de Roseta, derivada da BL21 e projetada para otimizar a expressão de proteínas eucarióticas, estão sendo conduzidos em nosso laboratório. Dessa maneira, talvez seja possível evitar a formação de corpos de inclusão e, com isso, sermos capazes de usar a proteína nativa nos experimentos de caracterização funcional. Além disso, problemas mecânicos nas câmaras e membranas para avaliação de consumo de oxigênio podem ser empecilhos para a padronização experimental, uma vez que estes aparelhos são extremamente sensíveis e podem alterar a detecção e/ou não estabelecerem o consumo basal de determinados meios reacionais, mesmo após sensíveis calibrações. Portanto, pretendemos também usar uma abordagem alternativa para os ensaios de caracterização

funcional, uma vez que a técnica de HPLC também pode ser utilizada para avaliar a ação da 4-HPPD recombinante.

Além da caracterização funcional, nos propusemos a avaliar o crescimento do fungo na presença de um inibidor da 4-HPPD. Para tanto, culturas leveduriformes do fungo foram submetidas a concentração constante de Paraquat, de maneira a simular o *stress* oxidativo do hospedeiro, testando concentrações variadas da Mesotriona. Os resultados observados demonstraram que culturas do fungo submetidas aos compostos isolados, nas concentrações testadas, não afetam o seu crescimento de maneira estatisticamente significativa. No entanto, quando usadas em conjunto, o efeito sobre o crescimento do fungo é notadamente mais acentuado e depende da concentração de Mesotriona. Mais uma vez, a 4-HPPD, super-expressa na condição leveduriforme, parece ser fundamental para a sobrevivência do fungo. Em nossas condições experimentais, que mimetizam o ambiente do hospedeiro, a 4-HPPD parece atuar como um fator protetor contra o agente oxidante Paraquat®. Portanto, ao adicionar a Mesotriona, composto com capacidade de bloquear a ação da 4-HPPD, têm-se redução significativa no crescimento de *Paracoccidioides brasiliensis*, de maneira dose-dependente. Nesse sentido, pode-se supor que a ação da 4-HPPD estaria relacionada com a produção de piomelanina e, assim, sendo capaz de resistir ao Paraquat. Quando se adiciona Mesotriona, sua ação é bloqueada, e, sem a melanina protetora, o fungo acabaria por não resistir ao *burst* oxidativo. No entanto, essa suposição precisa ser melhor estudada, uma vez que a interação entre os compostos, aplicando a Fórmula de Abbott, se mostrou sinérgica a partir de 96 horas de tratamento. Heidrich *et al.*, 2018 observaram a susceptibilidade de diferentes gêneros de fungos ao *stress* oxidativo. Assim como em nossos experimentos, os autores ambientaram os microrganismos a condições de *stress* encontrados no hospedeiro, neste caso, utilizando peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Acreditando que o agente redutor levaria a uma melanização por parte dos fungos, como uma tentativa de se proteger contra o ataque oxidativo, adicionaram o composto Triciclazol às culturas com H₂O₂. O Triciclazol atua com o um inibidor para a síntese de DHN-melanina. Os resultados obtidos mostraram que os fungos apresentaram um decréscimo em seu crescimento, em média, de até 20,8%. Portanto, a capacidade de sintetizar melanina na presença de espécies reativas de oxigênio parece ser um mecanismo eficiente usado por fungos de maneira a sobreviver no hospedeiro.

CONCLUSÕES

Os resultados aqui apresentados foram inconclusivos quanto a detecção da atividade da enzima recombinante 4-HPPD de *P. brasiliensis*. Novos experimentos estão sendo conduzidos de maneira a obter uma proteína recombinante nativa, bem como pretendemos usar uma metodologia alternativa para a avaliação funcional da enzima.

A Mesotriona parece agir sobre leveduras de *P. brasiliensis* submetidas a *stress* oxidativo. Na ausência do composto, as leveduras crescem e sobrevivem ao ataque oxidativo gerado pelo Paraquat. No entanto, quando a Mesotriona é adicionada, as células fúngicas diminuem o seu crescimento de maneira estatisticamente significativa. Portanto, a 4-HPPD parece se confirmar como um fator determinante para a sobrevivência do fungo, inclusive, dentro do hospedeiro. Estudos ainda precisam ser desenvolvidos para compreender de que maneira a enzima atua ao gerar essa proteção.

REFERÊNCIAS

GARCIA, I.; JOB, D.; MATRINGE, M. Inhibition of p-Hydroxyphenylpyruvate dioxygenase by the diketonitrile of isoxafutole: a case of Half-Site reactivity. **Biochemistry**. ed. 39. 2000.

KEON, J.; HARGREAVES, J. Isolation and heterologous expression of a gene encoding 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase from the wheat leaf-spot pathogen *Mycopharella graminicola*. **FEMS Microbiology Letters**, 161, 337-343, 1998.

KIRKILAND, T. N. A few shared up-regulated genes may influence conidia to yeast transformation in dimorphic fungal pathogens. **University of California** San Diego, School of Medicine. Março, 2016.

LACAZ, C.S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C. Paracoccidiodomicose. **Tratado de Micologia Médica**, 9ª edição, São Paulo, Sarvier, 2002.

MARQUES, A. S. Paracoccidiodomycosis: epidemiological, clinical, diagnostic and treatment up-dating. **An Bras Dermatol**. v. 88, n. 5, p. 700-711, 2013.

NASCIMENTO, F. R. F.; CALICH, V. L. G.; RODRIGUEZ, D.; RUSSO, M.; Dual role for nitric oxide in paracoccidiodomycosis: essential for resistance, but overproduction associated with susceptibility. *Journal of Immunology*, v. 168, n.9. Maio, 2002.

NUNES, L. R.; COSTA DE OLIVEIRA, R. L. B.; LEITE, D. B.; DA SILVA, V. S.; MARQUES, E. R.; FERREIRA, M.E. S.; RIBEIRO, D. C. D.; BERNADES, L. A. S.; GOLDMAN, M. H. S.; PUCCIA, R.; TRAVASSOS, L.R.; BATISTA, W. L.; NÓBREGA, M. P.; NÓBREGA, F. G.; YANG, D. Y.; PEREIRA, C. A. B.; GOLDMAN, G. H. Transcriptome analysis of *Paracoccidioides brasiliensis* cells undergoing the Mycelium-to-Yeast transition. **Eukaryotic Cell**, v. 4, n. 12, p. 2115-2128, dezembro 2004.

OLIVEIRA, A. C. F. Estudo dos efeitos fenotiazínicos no perfil transcricional e resistência múltipla a drogas em *Paracoccidioides brasiliensis*. **Tese de Doutorado**. Mogi das Cruzes, São Paulo, 2013.

AGRADECIMENTOS

A Universidade de Mogi das Cruzes pela bolsa de estudo e a FAEP-UMC pela oportunidade de realização deste projeto. E aos amigos de laboratório e professores por toda ajuda e conhecimento compartilhado.