

## Influência das condições de cultura sobre a produção de hemolisinas secretadas por *Paracoccidioides brasiliensis* e *P. lutzii*

## Influence of culture conditions on the production of hemolysins secreted by *Paracoccidioides brasiliensis* and *P. lutzii*

*Fernando Cezar-dos-Santos, Fernanda Conceição de Oliveira Souza, Mario Augusto Ono, Eiko Nakagawa Itano*

Departamento de Ciências Patológicas, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina.

### Endereço para Correspondência

Fernando Cezar-dos-Santos

Laboratório de Imunologia Aplicada, CCB

Universidade Estadual de Londrina. Cx Postal 10.011 - CEP 86.057-970 - Londrina - PR

E-mail: fernando.bmed@gmail.com

### Resumo

A paracoccidioidomicose (PCM) é uma micose sistêmica endêmica na América Latina e é causada pelos fungos termodimórficos *Paracoccidioides brasiliensis* e *P. lutzii*. Várias espécies fúngicas conseguem produzir hemolisinas, exotoxinas capazes de desestruturar a membrana de células e eritrócitos, mecanismo que permite a aquisição do íon ferro, necessário para vias metabólicas. O presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito do tempo e tipo de meio de cultivo na produção de hemolisinas por *Paracoccidioides brasiliensis* e *P. lutzii*. CFAs (antígeno livre de células) obtidos dos meios Ágar Sabouraud e Ágar Sabouraud-BHI e exoantígenos obtidos dos meios RPMI e caldo BHI, ambos obtidos em intervalos de 3 dias em um período de 30 dias, apresentaram diferentes perfis hemolíticos e *P. brasiliensis* apresentou maior atividade hemolítica que *P. lutzii*. Mais estudos são necessários para melhor caracterização destes fatores de virulência.

**Palavras-chave:** Paracoccidioidomicose; hemólise; fatores de virulência.

### Abstract

Paracoccidioidomycosis (PCM) is an endemic systemic mycosis in Latin America and is caused by thermo dimorphic fungi *P. brasiliensis* and *P. lutzii*. Several fungal species may produce hemolysins, exotoxins able to destroy cells and erythrocytes membranes, mechanism that allows the acquisition of iron ion, required for metabolic pathways. This study aimed to evaluate the effect of time and type of culture medium on production of hemolysins by *P. brasiliensis* and *P. lutzii*. CFAs (cell-free antigen) obtained from SDA and S-BHI media and exoantigens obtained from RPMI and BHI broth, both obtained in a 3-day interval over a period of 30 days, showed different hemolytic profiles, however *P. brasiliensis* showed greater hemolytic capability

compared to *P. lutzii*. Further studies are needed in order to better characterize these virulence factors.

**Key words:** Paracoccidioidomycosis; hemolysis, virulence factors.

## INTRODUÇÃO

Os fungos termodimórficos *Paracoccidioides brasiliensis* (espécies S1, PS2 e PS3) e *Paracoccidioides lutzii* são os agentes etiológicos da Paracoccidioidomicose (PCM), uma micose sistêmica que se distribui em vários países da América Latina<sup>(1,2)</sup>. O Brasil é o país que apresenta o maior número de casos de PCM, constituindo a oitava causa de morte no país considerando as doenças infecciosas e parasitárias predominantemente crônicas<sup>(3,4)</sup>. Por não ser uma doença de notificação compulsória, estima-se sua incidência através de inquéritos epidemiológicos e relatos de casos<sup>(5)</sup>. Na região Centro-oeste há maior prevalência de infecções por *P. lutzii*, porém há casos descritos na região Norte, enquanto que nas regiões Sul e Sudeste, *P. brasiliensis* é a espécie predominante<sup>(6)</sup>.

A PCM é caracterizada por inflamação granulomatosa e é causada pela inalação de conídeos de *Paracoccidioides* que facilmente alcançam os alvéolos pulmonares e podem disseminar-se pela via linfohematogênica<sup>(7)</sup>. Diversas outras manifestações clínicas e imunológicas são observadas, variando desde infecção assintomática à forma disseminada e severa. De acordo com a classificação atual, existem duas formas principais: PCM infecção, observada em indivíduos saudáveis e assintomáticos que vivem em áreas endêmicas e são reativos à intradermoreação com paracoccidioidina; PCM doença, forma sintomática que divide-se em forma crônica/adulta e forma aguda/juvenil. A forma crônica apresenta alta frequência de comprometimento pulmonar, cutâneo e de mucosas e afeta indivíduos adultos, enquanto que a forma aguda é caracterizada por envolvimento sistêmico de linfonodos, hepatoesplenomegalia e lesões na medula óssea, afetando jovens de ambos os sexos<sup>(5)</sup>. A literatura ainda descreve uma forma clínica residual ou sequelar, caracterizada por manifestações cicatriciais (i.e., opacidades e cavitações pulmonares) que se seguem ao tratamento da micose<sup>(5)</sup>.

Estudos preliminares realizados por nosso grupo de pesquisa demonstraram que *P. brasiliensis* e *P. lutzii* são hemolíticos quando inoculados em ágar sangue humano e que preparações antigênicas feitas a partir de culturas de *P. brasiliensis* são capazes de lisar eritrócitos humanos<sup>(8,9)</sup>. Além disso, Schneider<sup>(10)</sup> verificou que frações obtidas por cromatografia presentes no CFA (antígeno livre de células) de *P. brasiliensis* que possuem massa molecular entre 30 e 50 kDa podem lisar eritrócitos de carneiro.

Hemolisinas são exoenzimas produzidas por bactérias e fungos e possuem funções pleiotrópicas. São tipicamente encontradas em conformação  $\beta$ -folha e possuem efeitos citotóxicos em membranas de eritrócitos e fagócitos, podendo formar poros e destruir outras células eucarióticas e estruturas celulares. Além disso, estudos indicam que estas proteínas possuem especificidade por domínios lipídicos presentes em membranas celulares<sup>(11)</sup>.

Considerando que *Paracoccidioides* pode produzir hemolisinas, este estudo teve como objetivo avaliar a influência de diferentes tipos de meios e tempos de cultura na produção de hemolisinas por *Paracoccidioides*.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### ***Isolados de Paracoccidioides spp.***

A fim de restaurar a virulência dos isolados, células leveduriformes de *P. brasiliensis* (B-339) foram inoculadas em camundongos Swiss machos, re-isoladas e então utilizadas para a produção de antígenos e ensaios *in vitro*. Uma vez que encontramos dificuldade em re-isolar *P. lutzii* (LDR2) de modelos animais, optamos por reativar seus fatores de virulência utilizando uma estratégia *in vitro*. Resumidamente, esplenócitos de camundongos Swiss foram incubados em placas de cultura a  $0,5 \times 10^7$  células/mL em meio RPMI suplementado com soro fetal bovino 10% em um volume final de 50  $\mu$ L. Suspensões de células de *P. lutzii* foram preparadas em concentrações variando de  $0,5 \times 10^5$  a  $0,5 \times 10^7$  e 50  $\mu$ L destas suspensões foram adicionadas às células imunes. As placas foram então incubadas a 37°C por 48hrs. Após este período, os sobrenadantes foram semeados em ágar Infusão Cérebro Coração (BHI) (Acumedia, Lansing, Michigan, EUA) e *P. lutzii* foi re-isolado. Pb339 e LDR2 foram cultivados em ágar Sabouraud Dextrose (SDA) (Acumedia, Lansing, Michigan, EUA) e mantidos por sub-cultivo à 35°C a cada 5 dias.

### ***Obtenção de Antígenos Livre de Células (CFAs)***

CFAs de B-339 e LDR2 foram obtidos de acordo com o método descrito por Camargo et al.<sup>(12)</sup>, com algumas modificações. A massa fúngica foi diluída em salina tamponada com fosfato (PBS) (0,15 M, pH 7,4) com inibidor de serino-proteases fluoreto de fenilmetilsulfonil 2,5mM (PMSF) (P7626 Sigma, St. Louis, MO, EUA) e timerosal 0,02%, agitadas por 60s em vórtex-mixer e imediatamente centrifugadas à 1005g, 4°C por 15 min (5804R74 Centrífuga Eppendorf, Hamburgo, Alemanha). Os sobrenadantes (CFAs) foram coletados e então foram imediatamente congelados à -80°C.

### ***Obtenção de Exoantígenos (ExoAg)***

Os isolados B-339 e LDR-2 foram cultivados em agitação à 37°C em meio RPMI 1640 incompleto (Invitrogen, Grand Island, NY, EUA) e caldo BHI (Acumedia, Lansing, Michigan, EUA) à concentração final de  $2 \times 10^7$  células/mL. Alíquotas foram coletadas nos dias 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27 e 30, e os sobrenadantes da cultura foram obtidos por centrifugação à 1005 g, 4°C por 15 min (5804R74 Centrífuga Eppendorf, Hamburgo, Alemanha).

### ***Eritrócitos Humanos***

Sangue humano foi obtido de um indivíduo saudável por venopunção sem anticoagulante e imediatamente diluído 1/1 em solução de Alsever. Eritrócitos foram lavados por centrifugação (3 vezes em PBS, 175 g à 4°C por 10 min) (5804R74 Centrífuga Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) e ajustados à concentração de 1% em PBS. O presente estudo foi aprovado pela Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina.

### ***Teste de hemólise com CFAs e Exoantígenos (ExoAgs) produzidos em diferentes tempos e tipos de meios de cultivo***

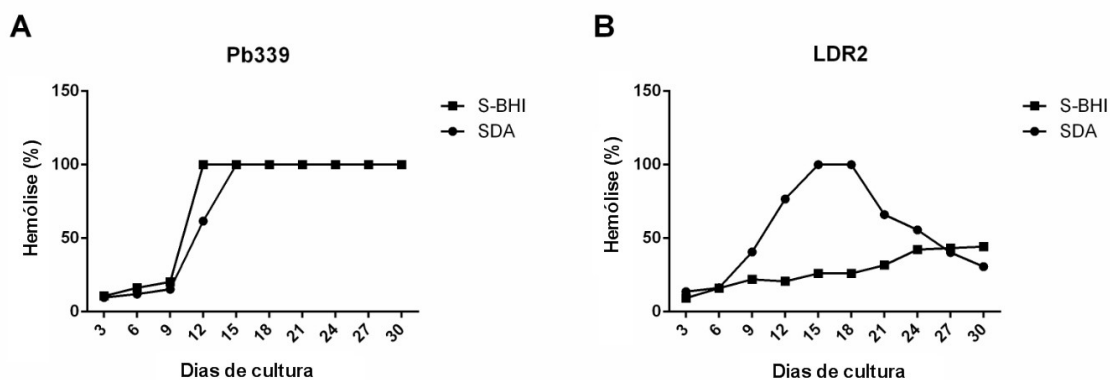
Os isolados de B-339 e LDR-2 foram cultivados em tubos individuais com meios SDA (Acumedia, Lansing, Michigan, EUA) e SDA+BHI (S-BHI) (Merck, Darmstadt, Alemanha) por 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27 e 30 dias. A massa fúngica dos dois tubos de cada meio selecionados randomicamente foi coletada (~200 g) e o CFA

foi obtido de acordo com o método descrito acima. Para o teste de hemólise, amostras de CFA e ExoAgs foram incubadas 1:1 em placas de 96 poços com fundo “V” em um volume total de 100 µl com suspensão de eritrócitos humanos 1% à 37°C por 5h. PBS foi usado como controle negativo e água destilada foi usada como controle positivo para hemólise. As placas foram centrifugadas (155 g, 4 °C por 10 min), e os sobrenadantes foram analisados à 550 nm (Multiskan EX, Uniscience – Labsystems, Helsinki, Finlândia) para avaliação da porcentagem de hemólise. Gráficos representando o perfil hemolítico dos isolados foram construídos utilizando-se o software GraphPad Prism v. 6.0 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, EUA).

## RESULTADOS

### *Teste de hemólise com CFAs produzidos em diferentes tempos e tipos de meios de cultivo*

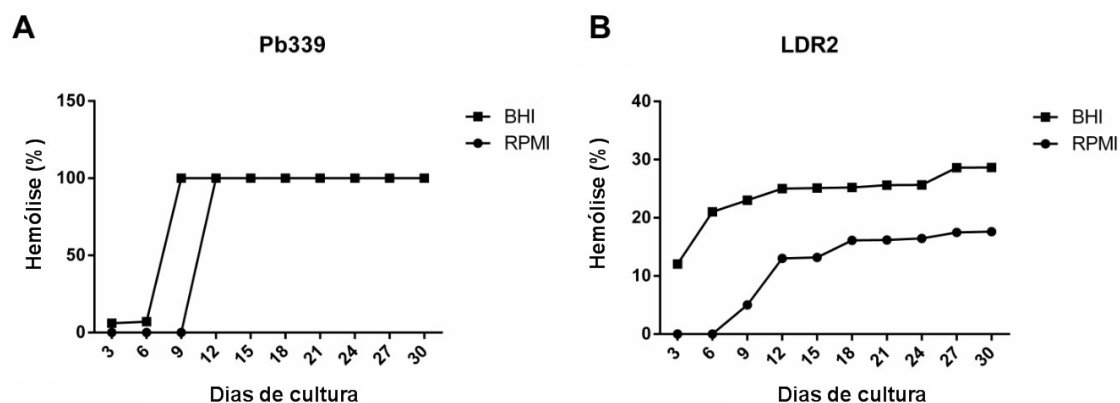
O perfil hemolítico observado no teste de hemólise com CFAs é apresentado na Figura 1. O CFA de B-339 apresentou baixa atividade hemolítica nos dias 3, 6 e 9 de cultura em meio SDA, aumentando consideravelmente no dia 12 de cultura. A partir do dia 15, 100% de hemólise foi detectada. O CFA de B-339 derivado do meio S-BHI apresentou comportamento similar, mas alcançou 100% de hemólise a partir do dia 12 de cultura (Figura 1-A). Quando usamos CFA de LDR2, a atividade hemolítica aumentou a partir do terceiro dia de cultura em meio SDA, alcançando um pico de 100% de hemólise nos dias 15 e 18, e então houve um declínio. Com CFA obtido do meio S-BHI, atividade hemolítica foi aumentada, alcançando um pico de 44% no dia 30 de cultura (Figura 1-B).



**Figura 1.** Avaliação da atividade hemolítica em CFAs produzidos em diferentes tempos e tipos de meios de cultivo. CFAs de *P. brasiliensis* B-339 (A) e *P. lutzii* LDR2 (B) obtidos a cada 3 dias de cultura nos meios Saboraud (SDA) e Saboraud+BHI (S-BHI) foram incubados com eritrócitos humanos 1% v/v à 37°C por 5h. O experimento foi realizado em duplicata, e a média da densidade óptica de cada condição experimental foi usada para calcular a porcentagem de hemólise em relação ao controle positivo (água destilada).

### Teste de hemólise com ExoAgs produzidos em diferentes tempos e tipos de meios de cultivo

O perfil hemolítico observado no teste de hemólise com ExoAgs é apresentado na Figura 2. Os ExoAgs de *P. brasiliensis* B-339 (Figura 2-A) e *P. lutzii* LDR2 (Figura 2-B) obtidos dos meios RPMI e caldo BHI promoveram hemólise de maneira tempo-dependente, porém a atividade hemolítica foi maior no ExoAg de B-339.



**Figura 2.** Teste de hemólise com ExoAgs de diferentes dias e meios de culturas. Sobrenadantes de cultura de B-339 (A) e LDR2 (B) coletados a cada 3 dias do meio RPMI incompleto e caldo BHI contendo células leveduriformes de B-339 e LDR2 foram incubados com eritrócitos humanos 1% v/v à 37°C por 5h. O experimento foi realizado em duplicata, e a média da densidade óptica de cada condição experimental foi usada para calcular a porcentagem de hemólise em relação ao controle positivo (água destilada).

## DISCUSSÃO

Neste trabalho foi avaliada a produção de hemolisinas por *P. brasiliensis* e *P. lutzii* em diferentes meios e diferentes tempos de cultura, objetivando otimizar a produção destes fatores hemolíticos e investigar se existem diferenças entre as duas espécies. Os resultados mostraram diferenças no perfil hemolítico de acordo com o meio ou tempo de cultura de LDR2, sugerindo que fatores nutricionais inerentes ao meio e período de cultura podem afetar a produção e secreção de hemolisinas por *Paracoccidioides* spp. A produção de hemolisinas foi observada a partir dos dias 9-12 em cultura de *P. brasiliensis* B-339, e o nível foi mantido por todo o período de investigação, independente do meio de cultura. A produção de hemolisinas de *P. lutzii* LDR2 foi menor que a de *P. brasiliensis* B-339.

Bailão e colaboradores<sup>(13)</sup> observaram que células leveduriformes de *P. brasiliensis* e *P. lutzii*, quando incubadas diretamente com eritrócitos de carneiro, são capazes de lisar essas células. Os autores verificaram que *P. brasiliensis* provocou uma maior hemólise quando comparado ao *P. lutzii*.

A capacidade de causar hemólise por meio da produção de hemolisinas é um mecanismo utilizado pelo fungo para ter acesso ao íon ferro, que é complexado ao grupamento heme da hemoglobina presente nos eritrócitos e é essencial para vias biossintéticas fúngicas, especialmente durante a infecção<sup>(11)</sup>. De fato, *P. brasiliensis* transcreve uma proteína hemolisina-like<sup>(14)</sup>, sugerindo que o fungo produz um fator hemolítico que pode ser solúvel ou ancorado à parede celular.

O atual estado da arte sugere que hemolisinas são toxinas formadoras de poros que interagem com ligantes específicos na superfície de várias células alvo, especialmente lipídios, como colesterol e esfingomielina<sup>(15,16)</sup>. Embora extensivamente estudadas em muitas espécies bacterianas, hemolisinas tem sido reportadas em fungos, plantas, invertebrados e mamíferos (nestes, conhecidas como perforinas, responsáveis por mediar a morte celular apoptótica)<sup>(17,18,19,20)</sup>. Hemolisinas bacterianas tem sido bem caracterizadas devido ao papel destas proteínas na patogênese, seus detalhes estruturais, mecanismos moleculares de hemólise, diferenças entre ligantes específicos nas células alvo e potencial diagnóstico. Em contraposição, pouco se conhece sobre hemolisinas fúngicas. As aegerolisinas, o maior grupo conhecido, geralmente são pequenas (15-20 kDa), possuem estrutura  $\beta$ -folha, contendo resíduos de cisteína conservados e um grande número de resíduos ácidos e aromáticos<sup>(21)</sup>. Ostreolisinas possuem conformação  $\beta$ -folha, mas se desdobra em uma estrutura  $\alpha$ -hélice após a permeabilização de membranas<sup>(22)</sup>. Outras hemolisinas também foram caracterizadas, como nigerlisina, terrelisina e asp-hemolisina, no entanto nigerlisina não possui conformação  $\beta$ -folha, o que parece ser essencial para a ligação inicial e indução de poros nas células alvo<sup>(11)</sup>.

Em contraste com hemolisinas bacterianas que são conhecidamente secretadas, a origem de hemolisinas fúngicas não é elucidada. No entanto, nosso delineamento demonstra que *Paracoccidioides* é capaz de secretar hemolisinas, mas o mecanismo pelo qual este evento ocorre ainda não é entendido. Estudos que utilizaram *A. fumigatus* mutante para o gene codificador de glicofosfatidilinositol mostraram que asp-hemolisina foi ausente de frações secretadas provenientes do micro-organismo mutante<sup>(23)</sup>, sugerindo que proteínas GPI ancoradas à membrana podem contribuir para a secreção de hemolisinas.

## CONCLUSÃO

*P. brasiliensis* e *P. lutzii* apresentam a capacidade de secretar hemolisinas. Esta secreção é influenciada por condições de cultura como tempo e meios de cultura. Estudos futuros são necessários no sentido de elucidar características bioquímicas e funcionais de hemolisinas secretadas por *Paracoccidioides* spp.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Restrepo M. A.. The ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*: a puzzle still unsolved. *Medical Mycology*, 23: 323-334, 1985.
2. Teixeira, M. M. et al. Phylogenetic analysis reveals a high level of speciation in the *Paracoccidioides* genus. *Mol Phylogenet Evol*, 52: 273-283, 2009.
3. Fornajeiro, N. et al. Inquérito epidemiológico sobre a paracoccidioidomicose utilizando a gp43 em dois municípios do noroeste do Paraná, Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop*, 38: 191-3, 2005.
4. Paniago, A. M. M. et al. Paracoccidioidomycosis: a clinical and epidemiological study of 422 cases observed in Mato Grosso do Sul. *Rev Soc Bra Med Trop*, 36: 455-459, 2003.
5. Shikanai-Yasuda, M. A. et al. Consenso em paracoccidioidomicose. *Rev Soc Bras Med Trop*, 39: 297-310, 2006.
6. Gegembauer, G. et al. Serology of paracoccidioidomycosis due to *Paracoccidioides lutzii*. *PLoS Neg Trop Dis*, 8: e2986, 2014.
7. San-Blas, G. Paracoccidioidomycosis and its etiologic agent *Paracoccidioides brasiliensis*. *Medical Mycology*, 31: 99-113, 1993.
8. Gonçalves, A. J. M. Análise da atividade hemolítica de *Paracoccidioides brasiliensis*. Monografia (Especialização em Biologia Aplicada à Saúde) Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina. Londrina, 1999.
9. Gonçalves, A. J. M.; Ono, M. A.; Itano, E. N. Atividade hemolítica de *Paracoccidioides brasiliensis*. *Revista Biosaúde*, 3: 5-9, 2001.
10. Schneider, L. H. G. Fator hemolítico de *Paracoccidioides brasiliensis*: Análise por fracionamento. Monografia (Especialização em Biologia Aplicada à Saúde) Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina. Londrina, 2000.
11. Nayak, A. P.; Green, B. J.; Beezhold, D. H. Fungal hemolysins. *Med Mycol*, 51: 1-16, 2013.
12. Camargo, Z. P. et al. The use of cell-free antigens of *Paracoccidioides brasiliensis* in serological tests. *Journal of Medical and Veterinary Mycology*, 29: 31-38, 1991.
13. Gonzalez, M. R. et al. Bacterial pore-forming toxins: the (w) hole story? *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65: 493-507, 2008.
14. Bastos, Karinne P. et al. The transcriptome analysis of early morphogenesis in *Paracoccidioides brasiliensis* mycelium reveals novel and induced genes potentially associated to the dimorphic process. *BMC Microbiology*, 7: 1, 2007.

15. Sepčić, K. et al. Ostreolysin, a pore-forming protein from the oyster mushroom, interacts specifically with membrane cholesterol-rich lipid domains. *FEBS Letters*, 575: 81-85, 2004.
16. Nayak, Ajay P. et al. Development of monoclonal antibodies to recombinant terrelysin and characterization of expression in *Aspergillus terreus*. *Journal of Medical Microbiology*, 61: 489-499, 2012.
17. Sousa, Marcelo V. et al. Homology between the seed cytolysin enterolobin and bacterial aerolysins. *Journal of Protein Chemistry*, 13: 659-667, 1994.
18. Maček, P. Polypeptide cytolytic toxins from sea anemones (Actiniaria). *FEMS Microbiology Immunology*, 5: 121-129, 1992.
19. Pipkin, M. E.; Lieberman, J. Delivering the kiss of death: progress on understanding how perforin works. *Current Opinion in Immunology*, 19: 301-308, 2007.
20. Berne, S.; Lah, L.; Sepčić, K. Aegerolysins: structure, function, and putative biological role. *Protein Science*, 18: 694-706, 2009.
21. Wallace, A. J. et al. *E. coli* hemolysin E (HlyE, ClyA, SheA): X-ray crystal structure of the toxin and observation of membrane pores by electron microscopy. *Cell*, 100: 265-276, 2000.
22. Li, H. et al. Glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor is required in *Aspergillus fumigatus* for morphogenesis and virulence. *Molecular Microbiology*, 64: 1014-1027, 2007.