

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

BARBARA ALVES ZOLET

**IDENTIFICAÇÃO DE GENES REGULADORES DE MECANISMOS ANTIFÚNGICOS
CONSERVADOS ENTRE FAGÓCITOS DURANTE INTERAÇÃO ENTRE
Acanthamoeba castellanii E *Cryptococcus neoformans***

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Porto Alegre, RS.

2018

BARBARA ALVES ZOLET

**IDENTIFICAÇÃO DE GENES REGULADORES DE MECANISMOS ANTIFÚNGICOS
CONSERVADOS ENTRE FAGÓCITOS DURANTE INTERAÇÃO ENTRE
Acanthamoeba castellanii E *Cryptococcus neoformans***

Trabalho de Conclusão de Curso em Biotecnologia, ênfase Biologia Molecular, apresentado ao Instituto de Biociências da Universidade do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do grau de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Charley C. Staats

Porto Alegre, RS.

2018

BARBARA ALVES ZOLET

**IDENTIFICAÇÃO DE GENES REGULADORES DE MECANISMOS ANTIFÚNGICOS
CONSERVADOS ENTRE FAGÓCITOS DURANTE INTERAÇÃO ENTRE
Acanthamoeba castellanii E *Cryptococcus neoformans***

Trabalho de Conclusão de Curso em Biotecnologia, ênfase Biologia Molecular, apresentado ao Instituto de Biociências da Universidade do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para a obtenção do grau de Bacharel em Biotecnologia.

Porto Alegre, RS, 28 de junho de 2018.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Charley C. Staats

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Prof. Dr. Augusto Schrank

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Prof. Dr. Henrique B. Ferreira

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Microbiologia Molecular e Celular do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, com apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Dedico esse trabalho ao meu quinteto favorito: mãe, pai, Arthur, Vic e Nico.

AGRADECIMENTOS

Inicialmente agradeço ao Prof. Charley, pela confiança e oportunidade de fazer parte do seu grupo de pesquisa. Obrigada pela disposição e motivação constantes, tanto durante o desenvolvimento desse trabalho como ao longo de todo o meu período de graduação.

Agradeço aos meus colegas de laboratório, pela troca de experiências e momentos de descontração. Obrigada por me acolherem tão bem!

Ao Centro de Biotecnologia, pela infraestrutura disponibilizada.

Ao CNPq, por fomentar a ciência e possibilitar a realização desse trabalho.

À UFRGS, pelo ensino de excelência.

A todos os demais professores que, de alguma forma, me inspiraram como pessoa e cientista; obrigada por me ensinarem a enxergar a Biotecnologia como uma ciência encantadora.

Aos meus amigos e colegas de curso, pela parceria durante essa etapa que vivemos juntos.

Ao Ben, pelo companheirismo e sonhos compartilhados.

A meus pais, Iran e Marilene, pelo apoio e presença em cada etapa. Obrigada por me mostrarem o que é amor e cuidado; sem vocês nada disso teria sido possível. Todas as minhas conquistas são de vocês também.

RESUMO

Acanthamoeba castellanii é uma ameba patogênica de vida livre e natureza ubíqua, predadora de inúmeros fungos e bactérias. A intensa interação de *A. castellanii* com microrganismos ambientais gerou condições de pressão seletiva, estimulando o desenvolvimento de novos fatores de virulência microbianos como estratégia de sobrevivência à fagocitose amebiana. Quando comparadas amebas e macrófagos de origem mamífera, ambos apresentam-se como fagócitos dotados de ambientes intracelulares e mecanismos predatórios bastante similares. Desta forma, hipotetiza-se que exista um ancestral comum entre essas células com capacidades fagocíticas semelhantes. Ademais, diversos microrganismos patógenos predados por amebas e que demonstram estratégias de sobrevivência intracelular em *A. castellanii* também demonstram capacidade de infectar macrófagos mamíferos, como no caso da levedura *Cryptococcus neoformans*, agente etiológico da criptococose em humanos. Considerando a hipótese que atribui aspectos da infecção da criptococose em hospedeiros como adquiridas sob condições de ensaio adaptativo em relações ambientais com *A. castellanii*, esse trabalho teve como objetivo identificar processos controlados por proteínas conservadas em células de distintos organismos capazes de fagocitar *C. neoformans*. Partindo de genes conhecidamente regulados em macrófagos murinos na presença de *C. neoformans*, foram identificados ortólogos proteicos em *A. castellanii*. Com isso, sete genes ortólogos de ameba possivelmente associados a funções metabólicas importantes durante a resposta à interação com *C. neoformans* foram selecionados para análise transcricional. Dentre os resultados, os *P4hb*, *Uhrf1* e *Hells* apresentaram expressão diferencial equivalente à observada sob as mesmas condições em macrófagos murinos: *P4hb* mostrou expressão aumentada e *Uhrf1* e *Hells* foram reprimidos; esses genes codificam proteínas envolvidas em mecanismos de resposta ao estresse, reparo de danos do DNA e proliferação celular, respectivamente. Visto que a interação entre *C. neoformans* e macrófagos é complexa e ainda pouco entendida, este trabalho utiliza amebas como modelo para o estudo de mecanismos antifúngicos evolutivamente conservados entre células fagocíticas.

Palavras-chave: *Acanthamoeba castellanii*. *Cryptococcus neoformans*. Fagocitose. Genes ortólogos. *Real Time* PCR.

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

Ac	<i>Acanthamoeba castellanii</i>
AIDS	síndrome da imunodeficiência adquirida
cDNA	DNA complementar
Cn	<i>Cryptococcus neoformans</i>
Ct	<i>threshold cycle</i>
DEPC	pirocarbonato de dietila
dG	energia livre de Gibbs
DNA	ácido desoxirribonucleico
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
HK	<i>heat killed</i>
M	molar
mL	mililitro
mM	milimolar
ng	nanograma
OG	grupo de ortólogos
pb	par de bases
PBS	tampão fosfato salina
PCR	reação em cadeia da polimerase
pH	potencial hidrogeniônico
PYG	<i>peptone yeast glucose</i>
qPCR	reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real
RNA	ácido ribonucleico
rpm	rotações por minuto
RT-PCR	reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa
RT-qPCR	reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real associada à transcrição reversa
SDS	dodecil sulfato de sódio (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
v	volume
YPD	<i>yeast extract peptone dextrose</i>
μL	microlitro
μg	micrograma

LISTA DE FIGURAS, QUADROS E TABELAS

Figura 1	Imagens de microscopia durante interação entre <i>Acanthamoeba castellanii</i> e <i>Cryptococcus neoformans</i>	2
Figura 2	Comparativo entre células de <i>A. castellanii</i> e macrófago alveolar.....	3
Figura 3	Infecção de macrófagos por <i>C. neoformans</i>	4
Figura 4	Ciclo infeccioso de <i>Cryptococcus spp</i>	5
Figura 5	Distribuição de genes diferencialmente expressos frente a interação com <i>C. neoformans</i>	14
Figura 6	Avaliação da expressão do gene <i>P4hb</i> de <i>A. castellanii</i>	17
Figura 7	Avaliação da expressão do gene <i>Glrx</i> de <i>A. castellanii</i>	17
Figura 8	<i>Clusters</i> funcionais de genes diferencialmente expressos em macrófagos murinos após infecção com <i>C. neoformans</i>	21
Figura 9	Genes de <i>C. neoformans</i> modulados após fagocitose	25
Quadro 1	Genes diferencialmente expressos em macrófagos de <i>M. musculus</i> durante interação com <i>C. neoformans</i>	10
Quadro 2	Genes não codificantes diferencialmente expressos em macrófagos de <i>M. musculus</i> durante infecção por <i>C. neoformans</i>	15
Tabela 1	Sequências de <i>primers</i> para genes de <i>A. castellanii</i> utilizados em experimentos de <i>Real Time</i> PCR.....	11
Tabela 2	Genes ortólogos selecionados em <i>A. castellanii</i>	16

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
	1.1 <i>Acanthamoeba castellanii</i> E SUA INFLUÊNCIA AMBIENTAL	1
	1.2 CONSERVAÇÃO EVOLUTIVA ENTRE CELULAS FAGOCÍTICAS	2
	1.3 <i>Cryptococcus neoformans</i> E CRIPTOCOCOSE	4
	1.4 INTERAÇÕES PATÓGENO-HOSPEDEIRO E DESENVOLVIMENTO DE MECANISMOS ADAPTATIVOS	5
	1.5 <i>A. castellanii</i> COMO MODELO DE INTERAÇÕES PATÓGENO- HOSPEDEIRO.	6
2	OBJETIVOS	8
	2.1 OBJETIVO GERAL.....	8
	2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	8
3	MATERIAIS E MÉTODOS	9
	3.1 ANÁLISES <i>In Silico</i>	9
	3.1.1 Produtos gênicos murinos e Grupos de Ortólogos (OGs).....	9
	3.1.2 Proteínas de <i>A. castellanii</i> e correspondência de OGs.....	9
	3.1.3 Desenho de <i>primers</i>	9
	3.2 ANÁLISES DE EXPRESSÃO GÊNICA	11
	3.2.1 Linhagens celulares e condições de cultivo.....	11
	3.2.2 Extração de RNA de ameba em interação com <i>C.</i> <i>neoformans</i>	12
	3.2.3 RT-PCR e <i>Real Time</i> qPCR.....	12
4	RESULTADOS	14
	4.1 PROTEÍNAS DE <i>A. castellanii</i> E CORRESPONDÊNCIA DE OGs ...	15
	4.2 ANÁLISES DE EXPRESSÃO GÊNICA	16
5	DISCUSSÃO	19
6	CONCLUSÃO	26

7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	27
---	--	-----------

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Acanthamoeba castellanii* E SUA INFLUÊNCIA AMBIENTAL

A espécie protista *Acanthamoeba castellanii* é uma ameba de vida livre, capaz de parasitar humanos e com grande relevância ecossistêmica (GREUB; RAOULT, 2004). Apresenta-se sob duas formas celulares: cisto, estado dormente com atividade metabólica mínima; ou trofozoíto, forma ativa com crescimento vegetativo e fagocitose de microrganismos (GRIFFITHS, 1974). Sua possibilidade de alternar entre estruturas celulares frente a diferentes condições ambientais confere-lhe natureza ubíqua, podendo ser encontrada em solos, água ou ar. Essa característica, dentre outras, fez de *A. castellanii* predadora dos diversos microrganismos encontrados nesses ambientes, os quais são capturados e digeridos em fagolisossomos. Sua atividade fagocítica é associada a papéis ecológicos como o aumento da reciclagem de nutrientes e grande influência na estrutura da microbiota ambiental (SIDDIQUI; KHAN, 2012a).

A intensa interação de *A. castellanii* com fungos, bactérias e vírus, somada à competição por nutrientes e a influência de fatores físicos e químicos, impôs a esses microrganismos ambientais predados condições de pressão seletiva constante, exigindo a evolução para novas estratégias para sobrevivência. Essas tentativas de adaptação foram selecionando novos determinantes de virulência que, conseqüentemente, aumentaram a virulência microbiana e a resistência à predação por *A. castellanii*, tanto através do desenvolvimento de mecanismos que evitam a fagocitose como por novos métodos de sobrevivência, reprodução e escape (TOFT; ANDERSSON, 2010). Nesse contexto, surgiram microrganismos resistentes a amebas (MRAs), capazes de sobreviver em seu interior como parasitos ou de maneira endossimbionte. Essa associação, que ocorre tanto com ambos microrganismos intracelulares obrigatórios como facultativos, é uma condição bastante estável em que há reprodução microbiana (com ou sem lise celular) dentro da célula protista em trofozoíto e inclusive sobrevivência intracelular durante a fase de cisto (GUIMARAES et al., 2016).

A ocorrência desse processo, ao longo do tempo, fez com que amebas se tornassem reservatórios ambientais de microrganismos potencialmente patogênicos a mamíferos, uma vez que foram estabelecidas associações com diversas espécies

microbianas (inclusive com ocorrência simultânea). A classificação de amebas como "Trojan horses" deve-se à presença, dentre os MRAs, de patógenos responsáveis por infecções humanas importantes, como, por exemplo, as causadas pelas leveduras *Candida* spp. e *Cryptococcus* spp. (Figura 1); quando em mamíferos, esses fungos infectam macrófagos, células de defesa do sistema imune que também realizam fagocitose (GILBERT; WHEELER; MAY, 2015; STEENBERGEN; SHUMAN; CASADEVALL, 2001).

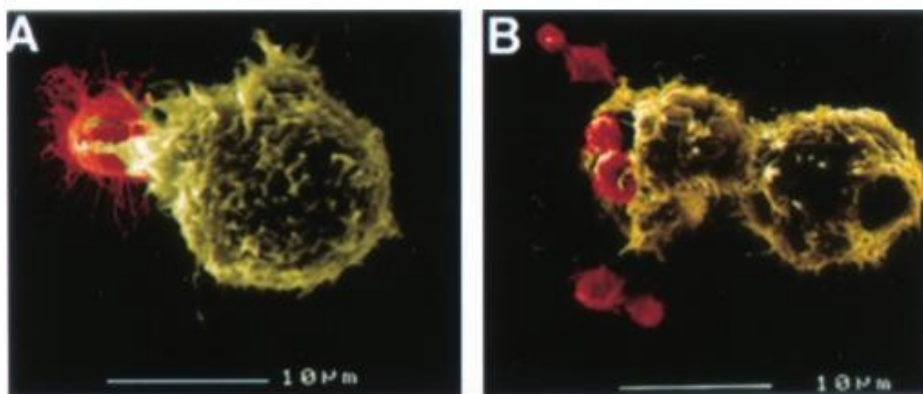


Figura 1. Imagens de microscopia durante interação entre *Acanthamoeba castellanii* e *Cryptococcus neoformans*. Análises de interação e fagocitose por microscopia eletrônica de varredura (A) 30 minutos após início da interação; (B) 90 minutos após início da interação. Adaptado de (STEENBERGEN; SHUMAN; CASADEVALL, 2001).

1.2 CONSERVAÇÃO EVOLUTIVA ENTRE CÉLULAS FAGOCÍTICAS

Apesar da distância evolutiva entre os reinos Animalia e Protista, o ambiente intracelular e as estratégias predatórias de *A. castellanii* se parecem muito com as de macrófagos de mamíferos (BRINKWORTH; PECHENKINA, 2013). A fagocitose, principal mecanismo compartilhado entre essas células, é utilizada como estratégia para sequestrar e destruir material exógeno no hospedeiro. Além disso, suas estruturas celulares, mobilidade molecular e fisiologia bioquímica também apresentam elevada similaridade (SIDDIQUI; KHAN, 2012a); algumas evidências são o compartilhamento de receptores celulares para detecção exógena, a deposição do material fagocitado em vacúolos e, posteriormente, a degradação via secreção de

enzimas lisossomais digestivas (GREUB; RAOULT, 2004) (Figura 2). Essas informações sustentam a hipótese evolutiva de um ancestral comum entre fagócitos, podendo sugerir a origem de células mamíferas com função imunológica (BRINKWORTH; PECHENKINA, 2013).

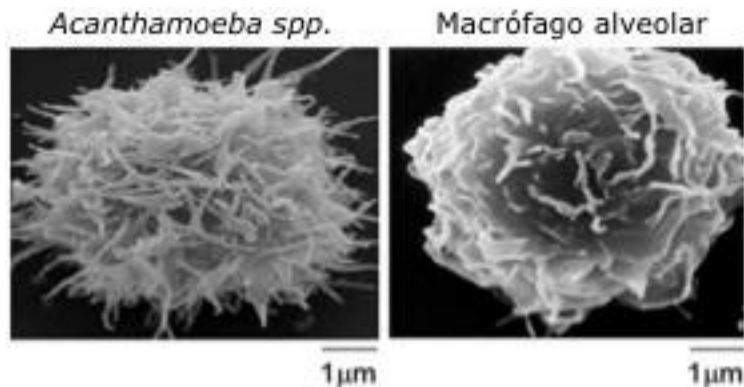


Figura 2. Comparativo da morfologia celular de *A. castellanii* e macrófago alveolar. Adaptado de (SIDDIQUI; KHAN, 2012a).

Além disso, a grande semelhança com que alguns microrganismos infectam e replicam-se em ambos fagócitos também sugere a existência de propriedades compartilhadas entre hospedeiros. Portanto, a resposta de macrófagos e amebas à exposição a patógenos pode ser outro aspecto importante a ser estudado como argumento à hipótese evolutiva. Nesse contexto, a interação com o fungo *C. neoformans* é um exemplo de infecção com reações em cascata semelhantes entre fagócitos (GUIMARAES et al., 2016), com o sucesso do processo infeccioso caracterizado pelo acúmulo de vacúolos polissacarídicos e atividade de fosfolipases conservadas como fatores de virulência em ambas as células (STEENBERGEN; SHUMAN; CASADEVALL, 2001) (Figura 3).

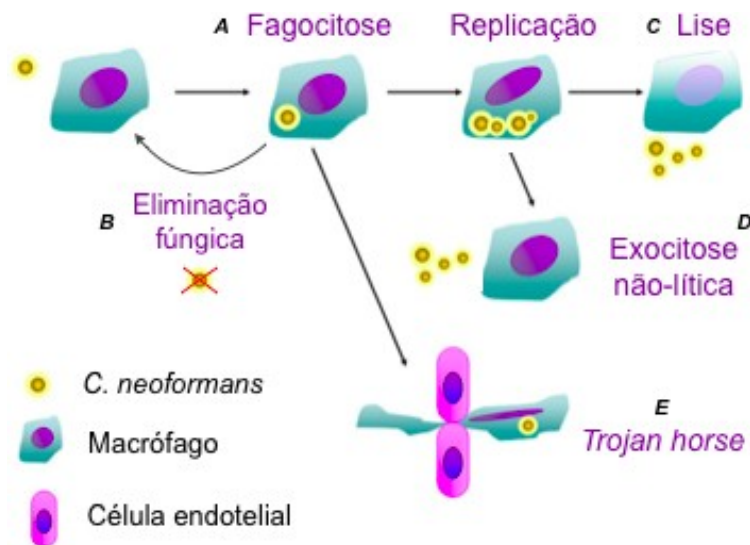


Figura 3. Infecção de macrófagos por *C. neoformans*. Após a internalização (A), é possível que (B) *C. neoformans* seja eliminado por mecanismos de defesa do macrófago; *C. neoformans* replique e escape para o meio extracelular (C) com ou (D) sem lise do hospedeiro. (E) Também se estuda a hipótese em que *C. neoformans* utiliza o macrófago como *Trojan horse* para disseminação cerebral, estratégia similar à aplicada com *A. castellanii*. Adaptado de (ZHANG; SUN; SHI, 2015).

1.3 *Cryptococcus neoformans* E CRIPTOCOCOSE

C. neoformans é uma levedura basidiomiceta saprófita encontrada em diversos ambientes, principalmente árvores e solos contaminados com excretas de pombos. Também é um patógeno não específico e não obrigatório que, em humanos, causa a criptococose, uma infecção oportunista do sistema nervoso central que pode resultar em pneumonia e meningite severa em indivíduos imunocomprometidos, tais como portadores de HIV, indivíduos recém-transplantados e pacientes sob tratamentos imunossupressores (LIN; HEITMAN, 2006). Juntamente com *Cryptococcus gattii*, outro agente etiológico da criptococose, causa aproximadamente 200.000 mortes por ano no mundo (VALLABHANENI et al., 2016).

A infecção tem início através da inalação de esporos ambientais, que se instalam no pulmão do hospedeiro antes de se disseminar pela corrente sanguínea (Figura 4) (LIN; HEITMAN, 2006). É no pulmão que macrófagos alveolares iniciam a defesa do hospedeiro com a fagocitose fúngica, tendo como barreira fatores de virulência da levedura como sua cápsula polissacarídica, a síntese de melanina e a

secreção de enzimas danosas às células hospedeiras (RIBEIRO et al., 2017). O resultado dessa interação inicial entre patógeno-hospedeiro é decisivo para a capacidade de sobrevivência intracelular de *C. neoformans*, característica fundamental para a replicação fúngica e posterior desenrolar da infecção (CHRISMAN; ALVAREZ; CASADEVALL, 2010).

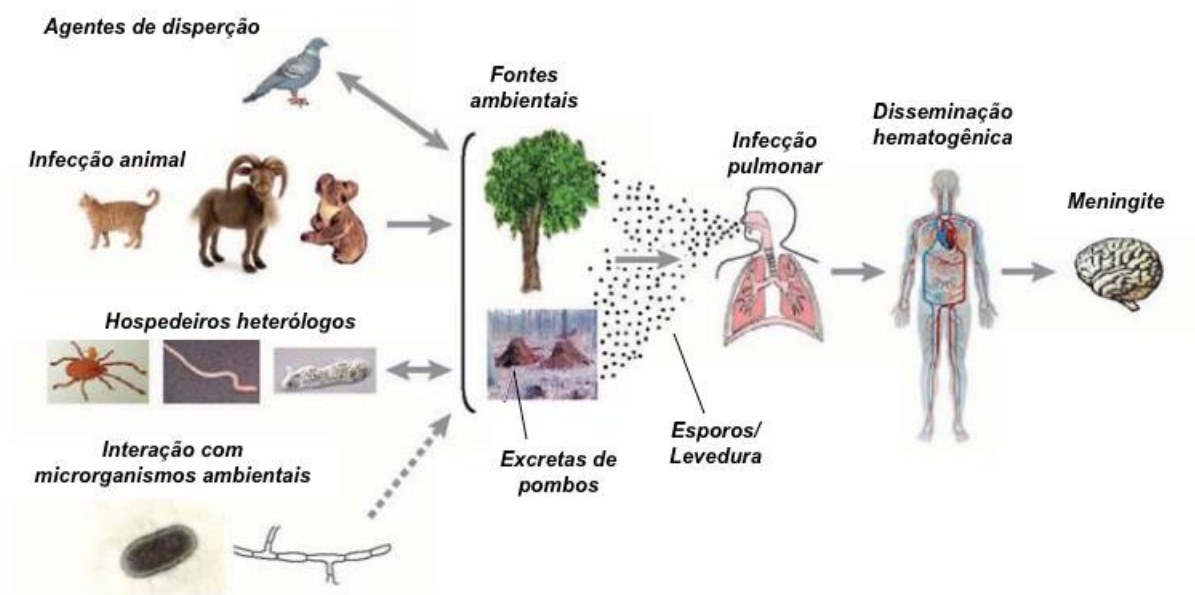


Figura 4. Ciclo infeccioso de *Cryptococcus* spp. A infecção inicial ocorre no pulmão, quando os esporos inalados do ambiente são ativados frente à condição imunocomprometida do hospedeiro. Adaptado de (LIN; HEITMAN, 2006).

1.4 INTERAÇÕES PATÓGENO-HOSPEDEIRO E DESENVOLVIMENTO DE MECANISMOS ADAPTATIVOS POR *C. neoformans*

Por ser um hospedeiro intracelular facultativo, é intrigante que a infecção por *C. neoformans* em humanos seja tão complexa e sofisticada, principalmente pelas condições de estresse oxidativo, nutricional e exposição a enzimas hidrolíticas encontradas no interior de macrófagos (SPRENGER et al., 2017); logo, questiona-se sobre a origem de tamanha inesperada virulência (DELEON-RODRIGUEZ; CASADEVALL, 2016). O ambiente em que *C. neoformans* é encontrado pode ser um local adequado para a busca de hipóteses sobre a eficiência de seu processo

infeccioso. Visto sua relação com predadores naturais amebianos, acredita-se que a condição de exposição a sucessivas interações possa ter lhe propiciado um contexto de “aprendizado”, servindo evolutivamente como ensaio adaptativo contra possíveis interações futuras com macrófagos (STEENBERGEN; SHUMAN; CASADEVALL, 2001). Portanto, aspectos da infecção criptocócica em humanos podem ter sido adequações de mecanismos já desenvolvidos por essas leveduras para lidar com a presença de amebas do ambiente. Conforme sugerido anteriormente, isto é confirmado pela similaridade do programa de expressão gênica de amebas e macrófagos infectados por *C. neoformans* (DERENGOWSKI et al., 2013).

1.5 *A. castellanii* COMO FAGÓCITO MODELO EM ESTUDOS DE INTERAÇÕES PATÓGENO- HOSPEDEIRO

Uma vez que a espécie *A. castellanii* foi inicialmente isolada como um contaminante em uma cultura de *Cryptococcus* spp. por Castellani (1930, apud MOLMERET et al., 2005), este organismo tem sido utilizado como um modelo importante para estudos de interações entre amebas e leveduras (STEENBERGEN; SHUMAN; CASADEVALL, 2001). Resultados obtidos com esse modelo podem identificar possíveis genes que codificam proteínas importantes nessa interação patógeno-hospedeiro, ampliando o entendimento dos mecanismos de adaptação de patógenos predados por *A. castellanii* e de defesa de células fagocíticas. Por isso, estudos em amebas ocorrendo em paralelo aos de macrófagos são interessantes por auxiliarem no entendimento dessas interações através da comparação entre mecanismos antifúngicos de resposta à interação com *C. neoformans* evolutivamente conservados (STRASSMANN; SHU, 2017). Além disso, o uso de amebas como modelo é de relativa facilidade de manipulação, além de possuir custo reduzido e evitar questões éticas que acompanham a infecção experimental de mamíferos (GUIMARAES et al., 2016).

Considerando o uso da interação entre *A. castellanii* e *C. neoformans* como um modelo promissor para o entendimento de estratégias de virulência da levedura e de imunidade ao parasito em macrófagos, esse trabalho buscou investigar proteínas envolvidas em mecanismos antifúngicos evolutivamente conservados entre fagócitos. Partindo da hipótese de que existe correspondência entre o padrão de

expressão gênica entre amebas e macrófagos murinos durante a infecção por *C. neoformans*, buscou-se identificar proteínas conservadas com papel importante durante a modulação da resposta antifúngica entre células fagocíticas.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Identificar processos antifúngicos regulados por genes conservados em células de distintos organismos capazes de fagocitar *C. neoformans*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Identificar em *A. castellanii* ortólogos de genes conhecidamente regulados em macrófagos murinos pela presença de *C. neoformans*;
- b) Avaliar o padrão de expressão dos genes de ortólogos em *A. castellanii* durante interação com *C. neoformans*.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANÁLISES *In Silico*

3.1.1 Produtos gênicos murinos e seus respectivos Grupos de Ortólogos (OGs)

Os 169 genes dos quais os ortólogos de *A. castellanii* deste estudo foram selecionados referem-se àqueles que possuem expressão alterada em macrófagos murinos quando estes são co-incubados com células de *C. neoformans* H99 (Quadro 1) (COELHO et al., 2015). A nomenclatura dos produtos gênicos murinos foram obtidos junto ao banco de dados ENSEMBL (SMEDLEY et al., 2015), sendo os Grupos de Ortólogos aos quais pertencem estes produtos gênicos recuperados junto ao banco de dados OrthoMCL (ALTENHOFF et al., 2013).

3.1.2 Proteínas de *A. castellanii* e correspondência de OGs

O proteoma predito de *A. castellanii* Neff foi coletado junto ao banco de dados AmoebaDB (AURRECOECHEA et al., 2011) e avaliadas quanto à anotação de Grupos de Ortólogos utilizando-se o servidor OrthoMCL (ALTENHOFF et al., 2013). Proteínas pertencentes aos mesmos Grupos de Ortólogos dos genes murinos foram então refinadas para análises de determinação de ortólogos diretos por meio da utilização de BlastP Bidirecional (WOLF; KOONIN, 2012). Também foram considerados resultados de análises de domínios conservados PFAM obtidos por buscas na plataforma InterproScan (HUNTER et al, 2014).

3.1.3 Projeto de *primers*

As sequências nucleotídicas referentes aos transcritos dos genes ortólogos selecionados foram recuperadas do banco de dados AmoebaDB e *primers* foram projetados utilizando o software OligoExplorer v1.1.2 (<http://www.softpedia.com/get/Science-CAD/Oligo-Explorer.shtml>). Parâmetros de

busca de *primers* foram configurados para resultados com tamanho entre 17 e 22 pb, amplicons de 100 a 200 pb e valor de dG até -2 kcal/mol.. Os *primers* sintetizados estão descritos na Tabela 1.

Quadro 1. Lista de genes diferencialmente expressos em macrófagos murinos quando infectados por *C. neoformans*

1810011O10Rik	<i>Chst11</i>	<i>GlrX</i>	<i>Il1r2</i>	<i>P4ha1</i>	<i>Slc25a17</i>
2810428I15Rik	<i>Cish</i>	<i>Gm10324</i>	<i>Impdh2</i>	<i>P4ha2</i>	<i>Slc2a1</i>
4930453N24Rik	<i>Clec2d</i>	<i>Gm10375</i>	<i>Itga5</i>	<i>P4hb</i>	<i>Slc2a3</i>
9230105E10Rik	<i>Ctla2b</i>	<i>Gm10679</i>	<i>Junb</i>	<i>Pdgfb</i>	<i>Slc39a10</i>
A630033H20Rik	<i>Ctse</i>	<i>Gm11428</i>	<i>Krtap5-2</i>	<i>Pdia6</i>	<i>Slc7a11</i>
<i>Acsbg1</i>	<i>Cycs</i>	<i>Gm2799</i>	<i>Lima1</i>	<i>Pgd</i>	<i>Snhg1</i>
<i>Adam4</i>	D330041H03Rik	<i>Gm2a</i>	<i>Lrp2bp</i>	<i>Pgm2</i>	<i>Snora41</i>
<i>Aff1</i>	<i>Ddit4</i>	<i>Gm4924</i>	<i>Maff</i>	<i>Phlda1</i>	<i>Snora69</i>
<i>Ankrd37</i>	<i>Dhx9</i>	<i>Gm5617</i>	<i>Mat2a</i>	<i>Pitpnc1</i>	<i>Snord115</i>
<i>Anxa2</i>	E330009J07Rik	<i>Gm8165</i>	<i>Mboat1</i>	<i>Plau</i>	<i>Snord52</i>
<i>Apex1</i>	<i>Echdc3</i>	<i>Gprc5a</i>	<i>Mir186</i>	<i>Plk3</i>	<i>Speer8-ps1</i>
<i>Apold1</i>	<i>Egln1</i>	<i>Grhpr</i>	<i>Mir297b</i>	<i>Plod2</i>	<i>Srrt</i>
<i>Appl2</i>	<i>Egr2</i>	<i>Gsdmc4</i>	<i>Mtss1</i>	<i>Ppp1r3b</i>	<i>Srsf1</i>
<i>Armcx5</i>	<i>Emp1</i>	<i>Heatr5b</i>	<i>Mudeng</i>	<i>Prelid2</i>	<i>Srsf3</i>
<i>Arrb1</i>	<i>Eno2</i>	<i>Hells</i>	<i>Mup1</i>	<i>Ptges</i>	<i>Terc</i>
<i>Arrdc3</i>	<i>Ero1l</i>	<i>Higd1a</i>	<i>Mup2</i>	<i>Rgs1</i>	<i>Tgfb3</i>
<i>Arsb</i>	<i>Exo1</i>	<i>Hist1h3a</i>	<i>Mup7</i>	<i>Rhob</i>	<i>Tiparp</i>
BC011426	<i>F10</i>	<i>Hist1h3e</i>	<i>Mxi1</i>	<i>Ripk2</i>	<i>Tmem65</i>
<i>Bhlhe40</i>	<i>Fabp4</i>	<i>Hist1h3g</i>	<i>Naglu</i>	<i>Rny3</i>	<i>Tmsb10</i>
<i>Bnip3</i>	<i>Fbxo36</i>	<i>Hist2h3c1</i>	<i>Nat6</i>	<i>Samd9l</i>	<i>Tnfrsf9</i>
<i>Brca1</i>	<i>Fdft1</i>	<i>Hmgb1</i>	<i>Ndrp1</i>	<i>Sdc3</i>	<i>Uhrf1</i>
<i>Ccl12</i>	<i>Flrt2</i>	<i>Hmox1</i>	<i>Nes</i>	<i>Selenbp1</i>	<i>Wdhd1</i>
<i>Ccl2</i>	<i>Fosl1</i>	<i>Hyal1</i>	<i>Niacr1</i>	<i>Selenbp2</i>	<i>Wdr76</i>
<i>Ccl7</i>	<i>Gas5</i>	<i>Id2</i>	<i>Nos2</i>	<i>Selk</i>	<i>Zc3h6</i>
<i>Ccng2</i>	<i>Gatsl3</i>	<i>Ier3</i>	<i>Olf263-ps1</i>	<i>Serpine1</i>	<i>Zfp229</i>
<i>Cd5</i>	<i>Gbe1</i>	<i>Ift74</i>	<i>Olf47</i>	<i>Sfpq</i>	<i>Zfp345</i>
<i>Cd86</i>	<i>Glpr1</i>	<i>Igf2bp2</i>	<i>Olf50</i>	<i>Sh3pxd2a</i>	<i>Zfp51</i>
<i>Chaf1b</i>	<i>Glpr2</i>	<i>Il13ra1</i>	<i>Olf804</i>	<i>Shmt1</i>	<i>Zfp600</i>
					<i>Zfp850</i>

Tabela 1. Sequências de *primers* para genes de *A. castellanii* utilizados em experimentos de *Real Time PCR*

<i>Primer</i>	<i>Gene</i>	<i>Sequência</i>
<i>ACA1_ACTINA</i>	<i>Actina</i>	AGGTCATCACCATCGGTAACG (F) TCGCACTTCATGATCGAGTTG (R)
<i>ACA1_065240</i>	<i>Glutarredoxina</i>	CTCGGCGTCAACTTCACTG (F) GTCGTTGCCACCAATGTG (R)
<i>ACA1_173660</i>	<i>Catepsina E</i>	TACAGGCTGCTTTTCATCG (F) CTTGGGGTTGGTCTTGAG (R)
<i>ACA1_367160</i>	<i>Zinc finger CCCH 6</i>	CGATAGCGGCAAGAGATTG (F) CGAGTAGGGGCAGAGATCAC (R)
<i>ACA1_222770</i>	<i>E3 ubiquitina ligase</i>	TGCGTACATCTGCTTTGAC (F) CCAACCGAGGTCTTCTTG (R)
<i>ACA1_144440</i>	<i>Helicase linfoide-específica</i>	CCCTTCCTCCGTTCTTC (F) AAGCCAGCAGCAGAGTAG (R)
<i>ACA1_374090</i>	<i>Prolil 4-hidroxilase unidade β</i>	TGTCCTTGCCGAGTTCTAC (F) GGTAACCCTGGATCTCAAAC (R)
<i>ACA1_219770</i>	<i>F-box 36</i>	ATCCCCATCCCATCTATCTG (F) TGTGTCCATGTCGTAATAGCC (R)

3.2 ANÁLISES DE EXPRESSÃO GÊNICA

3.2.1 Linhagens celulares e condições de cultivo

A linhagem H99 de *C. neoformans* foi empregada nesse estudo. As células fúngicas foram rotineiramente cultivadas em meio YPD (2 % glicose; 2 % peptona; 1 % extrato de levedura; 1,5 % m/v ágar, quando cultivo sólido). O pré-inóculo de *C. neoformans* foi feito em frascos *erlenmeyers* com 20 mL de meio em *shaker* orbital (200 rpm) a 30 °C durante 18 h. A linhagem Neff. de *A. castellanii* (ATCC 30010) foi utilizada nesse estudo. O cultivo das células foi realizado em garrafas de cultura

celular com meio PYG (2 % peptona; 0,2 % extrato de levedura; 1,8 % glicose; pH 6.5), em estufa a 30 °C.

3.2.2 Extração de RNA de ameba em interação com *C. neoformans*

Para avaliar a expressão gênica das células de ameba durante a interação com *C. neoformans*, 1.000.000 células de *A. castellanii* cultivadas conforme descrito foram adicionadas a placas de 12 poços contendo 1 mL de meio PYG e incubadas por 2 h a 30 °C para adesão superficial e formação da monocamada. A mesma quantidade de células de *C. neoformans* H99 previamente cultivada em YPD por 18 h foi lavada três vezes com tampão fosfato salino (PBS) e inoculada nos poços, marcando o início da interação. A placa foi incubada a 30 °C novamente e amostras retiradas após 2 h e 24 h do inóculo. Como controles, células de ameba na ausência de células leveduriformes incubadas por 2 e 24 h em meio PYG foram utilizadas.

Após lavagem (PBS) dos poços para remoção de células leveduriformes não fagocitadas, as células de ameba tiveram o seu RNA total isolado, com o emprego do reagente Trizol® (Invitrogen). Foram adicionados 750 µL de Trizol por poço, agitou-se vigorosamente para desfazer a monocamada e transferiu-se o volume para novos tubos de microcentrifuga. Foi realizada uma etapa de lavagem adicional através de centrifugação a 14.000 rpm a 10 °C por 10 minutos. Transferiu-se o sobrenadante para novos tubos de microcentrifuga adicionou-se clorofórmio gelado, seguido de agitação em vórtex por 30 segundos. Após 3 minutos a temperatura ambiente, outra etapa de centrifugação a 12.000 rpm por 15 minutos a 4 °C foi realizada. Transferiu-se a fase aquosa para um novo eppendorf seguida da adição de 500 µL de isopropanol. A precipitação ocorreu a -20 °C por 45 minutos e, após, descartou-se o sobrenadante. Uma etapa de lavagem foi feita com etanol 70 % e aguardou-se a secagem completa dos tubos. Por fim, adicionou-se 20 µL de água DEPC e as amostras foram armazenadas a -80 °C.

A quantificação foi feita por espectrofotometria (Nanodrop 2000, Thermo Scientific) e 1 µg de RNA foi tratado com 2 U da enzima RQ DNase (Promega) por 30 minutos a 37 °C e 10 minutos a 65 °C, conforme especificações do fabricante, para degradação de DNA genômico contaminante residual.

3.2.3 RT-PCR e *Real Time* qPCR

A síntese de cDNA foi realizada incubando-se o 300 ng de RNA purificado com a enzima de transcriptase reversa ImProm-II (Promega), conforme as recomendações do fabricante. PCR em tempo real foi realizado com o sistema SYBR® *Green PCR Master Mix* (Invitrogen) junto à plataforma *StepOne™ Real-Time PCR System* (Applied Biosystems) em placas de 48 poços, conforme as instruções do fabricante. O volume total por reação foi 20 µL, contendo cerca de 10 ng de cDNA. Após uma etapa inicial de desnaturação a 95 °C por 5 minutos, foram realizados 60 ciclos de 95 °C por 15 segundos, 60 °C por 15 segundos e 72 °C por 15 segundos, seguidos por uma etapa da curva de dissociação para avaliar a especificidade de amplificação.

Cada amostra das triplicatas biológicas foi avaliada em triplicatas técnicas para cada par de *primers*. Os resultados foram processados de acordo com o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001) e a normalização dos dados foi feita de acordo com os níveis de transcritos do gene codificador de actina para *A. castellanii*. Análises estatísticas foram realizadas por *One-way* ANOVA seguida de teste Tukey.

4 RESULTADOS

Considerando trabalhos anteriores que descrevem conjuntos de genes diferencialmente expressos em macrófagos murinos expostos a células de *C. neoformans* (COELHO et al., 2015), partimos de 169 genes diferencialmente expressos em macrófagos murinos frente à interação com *C. neoformans* e *C. neoformans* H99 Heat Killed (HK) (Quadro 1) a fim de identificar ortólogos em *A. castellanii*. Quando comparados com amostras controle do mesmo tempo, 35 desses genes apresentaram seus níveis de transcritos alterados após 2 h do início da interação, 92 após 24 h do início da interação, 54 após 2 h na presença de *C. neoformans* H99 HK e 10 após 24 h na presença de *C. neoformans* H99 HK (Figura 5). Além disso, 13 dos genes murinos eram não-codificadores de proteínas (Quadro 2).

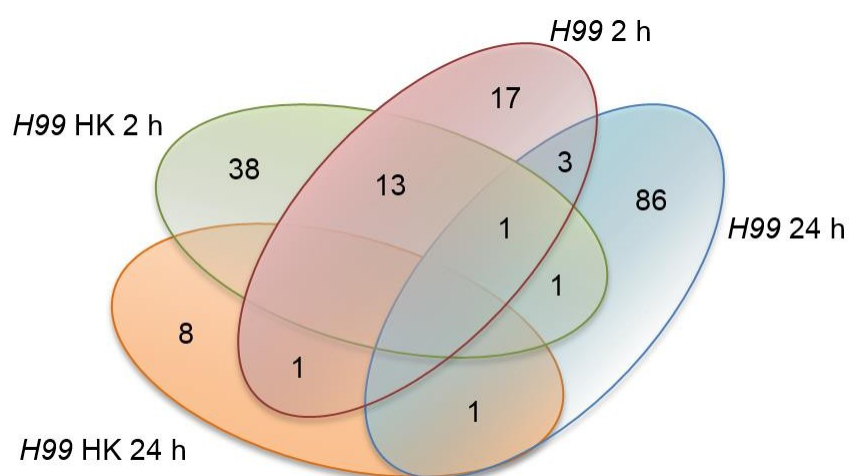


Figura 5. Diagrama de Venn ilustrando a distribuição de genes diferencialmente expressos durante interação com *C. neoformans*. São considerados os genes diferencialmente expressos em macrófagos expostos a células vivas (H99) ou mortas (H99 HK) de *C. neoformans* H99 por 2 ou 24 h comparadas a não infectadas.

Iniciamos com a identificação das proteínas codificadas por esses genes murinos e seus respectivos grupos de ortólogos. As correspondentes proteicas dos genes identificados foram obtidas do banco de dados Ensembl e a determinação dos OGs através do banco de dados OrthoMCL. Os resultados retornaram 459 proteínas

codificadas, quantidade justificada pela ocorrência de eventos de *splicing* alternativo; dentre elas, 137 foram relacionadas a algum OG e, por isso, selecionadas para os testes seguintes.

Quadro 2. Genes não codificadores de proteínas diferencialmente expressos em macrófagos de *M. musculus* durante interação com *C. neoformans*

<i>D330041H03Rik</i>	<i>Snora41</i>
<i>Gas5</i>	<i>Snora69</i>
<i>Gm10679</i>	<i>Snord115</i>
<i>Mir186</i>	<i>Snord52</i>
<i>Mir297b</i>	<i>Speer8-ps1</i>
<i>Rny3</i>	<i>Terc</i>
<i>Snhg1</i>	

4.1 PROTEÍNAS DE *A. castellanii* E CORRESPONDÊNCIA DE OGs

A seguir, realizamos a busca por todas as proteínas codificadas pelo genoma de *A. castellanii*, linhagem Neff., utilizando o banco de dados AmoebaDB. Dos 15.224 resultados obtidos, buscamos os respectivos OGs, novamente utilizando o banco OrthoMCL. Obtivemos 14.210 resultados proteicos associadas a OGs.

Buscando por grupos ortólogos compartilhados entre *A. castellanii* e *M. musculus*, identificamos proteínas parálogas e ortólogas. Foram encontradas 104 proteínas de *A. castellanii* com OGs compartilhados com 51 proteínas murinas, considerando-se 45 diferentes OGs. Em paralelo, realizamos BlastP Bidirecional entre todas as proteínas de *M. musculus* e *A. castellanii* para obtermos resultados de ortólogos diretos entre organismos; obtivemos 43 proteínas de *A. castellanii* com ortólogos diretos às proteínas de *M. musculus* selecionadas. A partir disso, selecionamos os 38 resultados que apresentaram tanto OGs compartilhados como correspondência direta via BlastP Bidirecional. Para refinar nossa seleção, buscamos por dados funcionais do banco Pfam via Interproscan como ferramenta adicional para avaliação de proteínas candidatas. Por fim, selecionamos 7 proteínas (Tabela 2) com possível papel relevante em processos de modulação da resposta antifúngica.

Tabela 2 Genes ortólogos selecionados em *A. castellanii*

Gene	Ortólogo em <i>M. musculus</i>	Padrão de expressão em <i>M. musculus</i>	Domínio conservado (PFAM)
ACA1_065240	<i>Glrx</i>	Aumento - <i>Cn</i> 24 h	Glutarredoxina
ACA1_173660	<i>Ctse</i>	Aumento - <i>Cn</i> HK 24 h	Proteinase aspártica
ACA1_367160	<i>Zc3h6</i>	Aumento - <i>Cn</i> 24 h	Proteína com domínio “dedo de Zinco”
ACA1_222770	<i>Uhrf1</i>	Redução - <i>Cn</i> 24 h	Proteína hipotética com domínio “dedo de Zinco PHD”
ACA1_144440	<i>Hells</i>	Redução - <i>Cn</i> 24 h	Proteína com domínio N-terminal da família SNF2
ACA1_374090	<i>P4hb</i>	Aumento - <i>Cn</i> 24 h	Proteína com domínio isomerase dissulfeto
ACA1_219770	<i>Fbxo36</i>	Aumento - <i>Cn</i> 24 h	Proteína com domínio Fbox

4.2 ANÁLISES DE EXPRESSÃO GÊNICA

Utilizando as amostras de cDNA de *A. castellanii*, avaliamos o perfil de expressão gênica dos sete alvos selecionados (Tabela 3) com seus respectivos pares de *primers* (Tabela 2). Dentre os genes avaliados, apenas 2 apresentaram níveis de transcritos suficientes para análises posteriores: *P4hb* e *Glrx*.

Observamos um aumento significativo na expressão de *P4hb* 24 h após o início da interação com *C. neoformans*, quando comparado com amostras controle do mesmo tempo (Figura 6). Esse aumento não foi observado nas primeiras 2 h da interação. Uma vez que esse gene também é diferencialmente expresso nas mesmas condições em *M. musculus*, o resultado sugere um possível envolvimento de *P4hb* em processos conservados relacionados à interação com *C. neoformans* entre espécies.

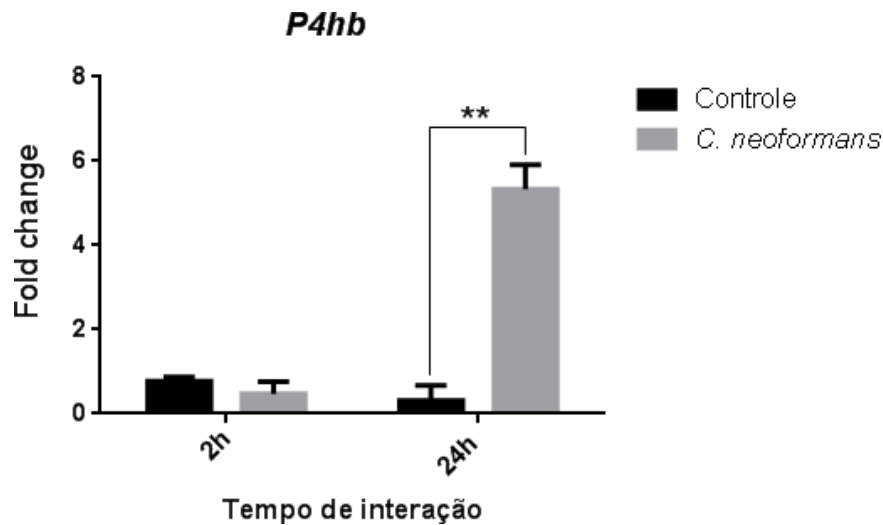


Figura 6 Avaliação da expressão do gene *P4hb* de *A. castellanii* por *Real Time* qPCR a partir de amostras de RNA extraído após 2 h ou 4 h de interação com *C. neoformans*. Os valores de *fold change* de *P4hb* foram normalizados utilizando-se resultados de *Ct* para transcritos de *Actina*. Os resultados apresentam o valor mais ou menos o desvio padrão de cada condição realizada em triplicata biológica e triplicata técnica. Análise estatística realizada por *Student t test*. ** $p \leq 0,01$.

Entretanto, o gene *Glrx* que, em *M. musculus*, também apresenta maior expressão após 24 h do início da interação com *C. neoformans*, quando avaliado em *A. castellanii* apresentou significativa redução da expressão após as primeiras 2 h da interação (Figura 7).

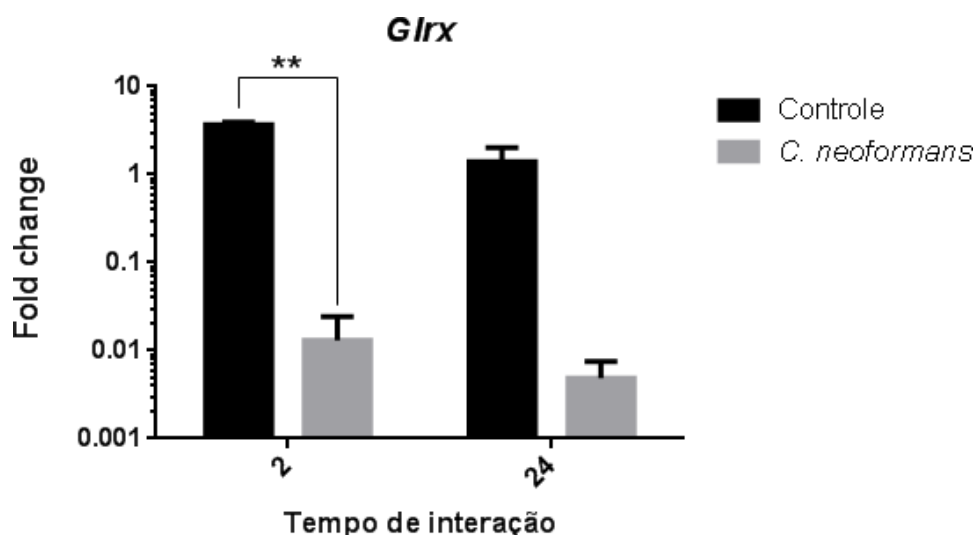


Figura 7 Avaliação da expressão do gene *Glrx* de *A. castellanii* por *Real Time* qPCR a partir de amostras de RNA extraído após 2 h ou 4 h de interação com *C. neoformans*. Os valores de *fold change* de *P4hb* foram normalizados utilizando-se resultados de *Ct* para transcritos de *Actina*. Os

resultados apresentam o valor mais ou menos o desvio padrão de cada condição realizada em triplicata biológica e triplicata técnica. Análise estatística realizada por *Student t test*. ** $p \leq 0,01$.

Os valores de *Ct* dos demais genes (*Ctse*, *Zc3h6*, *Uhrf1*, *Hells* e *Fbxo36*) não puderam ser detectados para o *Threshold* utilizado. Isso pode ter acontecido por níveis de expressão gênica muito baixos, problemas durante a fase de anelamento dos *primers* ou degradação do RNA durante o processo de extração.

5 DISCUSSÃO

É intrigante a eficiente capacidade de infecção de macrófagos mamíferos apresentada por *C. neoformans*, levedura saprófita encontrada em diversos ambientes, principalmente solos e troncos. São frequentes as notícias de mortes causadas por essa levedura oportunista (Braziliense, 2018; NORDESTE, 2018), principalmente em estados com grande incidência de AIDS como o Rio Grande do Sul (G1, 2017), o que demonstra a importância de estudos contínuos sobre mecanismos envolvidos em interações desse patógeno com o hospedeiro. No ambiente, um dos principais predadores de *C. neoformans* são amebas, protistas com as quais a levedura interage intensamente e vem desenvolvendo estratégias de sobrevivência intracelular (STEENBERGEN; SHUMAN; CASADEVALL, 2001).

Quando comparadas características da infecção de *C. neoformans* em *A. castellanii*, protista patogênico de vida livre, e em macrófagos, observam-se diversos aspectos conservados: desde o uso da fagocitose como forma de capturar microrganismos extracelulares até a grande similaridade entre estruturas celulares e ambientes intracelulares. Isso levou à sugestão da hipótese que propõe que macrófagos mamíferos e amebas têm ancestralidade compartilhada, o que explicaria a similaridade entre seus processos de interação patógeno-hospedeiro com a levedura *C. neoformans* (BRINKWORTH; PECHENKINA, 2013).

Além de *C. neoformans*, diversos microrganismos patogênicos também são capazes de interagir e sobreviver à fagocitose de amebas do gênero *Acanthamoeba*: outros fungos como *Aspergillus fumigatus* e *Candida spp.*, bactérias como *Chlamydomyxa pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Mycobacterium spp.* e inclusive vírus como os da família *Mimiviridae* (GHIGO et al., 2008; GUIMARAES et al., 2016). Essa diversidade de interações, também observada em outros gêneros de amebas, como *Hartmannella* e *Naegleria* (MOLMERET et al., 2005), reforçam a hipótese que amebas podem ser utilizadas como modelos adequados para estudos de mecanismos conservados importantes durante a infecção por patógenos.

A grande maioria de processos metabólicos relacionados ao sistema de fagocitose e defesa de células hospedeiras está associado ao funcionamento de proteínas; essas estruturas são produzidas a partir da modulação da transcrição, e posterior tradução, de genes perante a exposição a diferentes situações ambientais.

Essa regulação acontece durante interações com microrganismos, por exemplo, e tem como objetivo a manutenção da homeostase celular (ASRAT; DAVIS; ISBERG, 2015). Uma vez fagocitados, os microrganismos podem ser digeridos no interior de fagolisossomos ou utilizar estratégias de sobrevivência desenvolvidas ao longo do tempo como forma de viabilizar sua sobrevivência e replicação intracelular. Assim, diferentes proteínas são ativadas frente as condições descritas, atuando na resposta antifúngica do fagócito ou se tornando moduladas por fatores de virulência do patógeno durante sua replicação e possível exocitose celular (ZHANG; SUN; SHI, 2015). Devido à complexidade desses processos, ainda há muito a ser estudado quanto as funções proteicas associadas aos mecanismos de interação de fagócitos com patógenos.

Visto isso, utilizamos um estudo recente (COELHO et al., 2015) em que foram identificados 156 genes de macrófagos murinos que codificam proteínas com papel importante na resposta à fagocitose de *C. neoformans* H99. Nesse trabalho, foram identificados genes com expressão diferencial após 2 h ou 24 h de exposição a células de *C. neoformans* vivas ou mortas. Os 92 genes diferencialmente expressos após 24 h de interação com *C. neoformans* vivo foram agrupados em quatro *clusters* de acordo com suas funções: resposta imune, metabolismo de carboidratos, metabolismo de resposta a estresse ou proliferação, reparo do DNA e sobrevivência (Figura 8). Considerando esses *clusters* gênicos, buscamos investigar se o padrão de expressão dos ortólogos em *A. castellanii* frente as mesmas condições seria conservado com o de *M. musculus*.

Para isso, buscamos as proteínas codificadas pelos 156 genes murinos do estudo e seus respectivos grupos de ortólogos. Uma vez que proteínas de diferentes organismos pertencentes a um mesmo OG apontam para origem homóloga e função conservada, a comparação entre OGs proteicos é considerada uma maneira adequada de identificar possíveis proteínas-alvo envolvidas em mecanismos conservados em espécies distintas. Assim, buscamos por proteínas protistas e seus OGs para posterior comparação com os OGs murinos.

Inicialmente obtivemos todas as proteínas codificadas pelo genoma de *A. castellanii* Neff., linhagem utilizada por nosso grupo de pesquisa, e identificamos seus OGs correspondentes. A posterior comparação entre OGs murinos e protistas resultou em 104 proteínas de *A. castellanii*, algumas parálogas entre si, ortólogas de genes

murinos associados a funções metabólicas importantes durante a resposta à interação com *C. neoformans*.

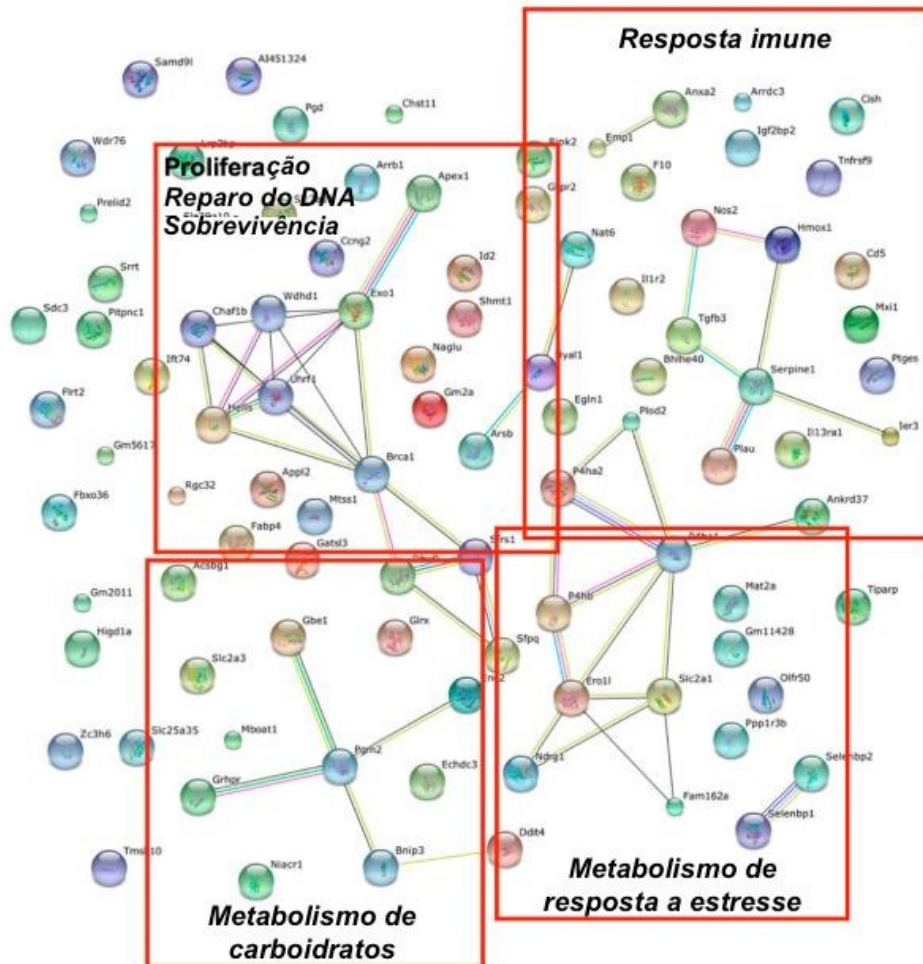


Figura 8 Clusters funcionais (em laranja) de genes diferencialmente expressos em macrófagos murinos após 24 h de infecção com *C. neoformans* vivo. Imagem obtida do banco de dados STRING. Adaptado de (COELHO et al., 2015).

Em paralelo, realizamos BlastP bidirecional de todas as proteínas de *M. musculus* e *A. castellanii*. Essa pesquisa resultou em 43 proteínas de *A. castellanii* que, quando comparadas com os resultados proteicos obtidos na etapa anterior de OGs e selecionadas as correspondentes presentes em ambas pesquisas, permitiu a redução de nossa seleção para 37 proteínas.

A fim de refinar ainda mais nossos resultados, realizamos buscas de domínios proteicos dessas proteínas-alvo no banco de dados Pfam. Dentre os domínios escolhidos, foram priorizados os que poderiam estar relacionados as funções metabólicas dos *clusters* proteicos considerados inicialmente. Foram escolhidas 6

proteínas obtidas de genes diferencialmente expressos após 24 h de interação com *C. neoformans* vivo e 1 proteína produto de gene diferencialmente expresso após 24 h de interação com *C. neoformans* HK (Tabela 3). A diferença na modulação da expressão gênica entre interações com *C. neoformans* vivo ou HK permite identificar possíveis mecanismos de defesa e ativação da resposta imune do fagócito desencadeados pela presença estrutural de *C. neoformans*, ou ainda proteínas de membrana que reconhecem a levedura e ativam a fagocitose.

A análise do padrão de expressão gênica foi realizada a partir da extração de amostras de RNA de *A. castellanii* Neff. após 2 h e 24 h de interação com *C. neoformans* H99, conforme descrito nos Materiais e Métodos. A partir do RNA, sintetizou-se o cDNA a ser utilizado nas reações de *Real Time* PCR. Normalizando os resultados com o gene de Actina e comparando-os com amostras controle de células de ameba não exposta à levedura nos diferentes tempos (2 h e 24 h), obtivemos níveis de transcritos detectáveis para 2 dos 7 genes selecionados: *prolil-4-hidroxilase* β e *glutarredoxina*.

Nossos resultados indicaram aumento da expressão de *Prolil-4-hidroxilase* β (*P4hb*) após 24 h do início da interação (Figura 6), assim como observado nos resultados de macrófagos murinos. Esses dados sugerem que *P4hb*, gene que codifica a subunidade β da enzima dissulfeto isomerase prolil-4-hidroxilase (GORRES; RAINES, 2010), tenha atividade conservada entre células fagocíticas. Agrupada ao metabolismo de resposta ao estresse nos *clusters* proteicos, essa enzima multifuncional é normalmente associada a processos redox durante a formação, quebra e isomerização de ligações dissulfeto. Está envolvida em modificações pós-traducionais irreversíveis de resíduos de prolina em diversas proteínas eucariotas, resultando em alterações na conformação proteica e nas interações entre proteínas (ADAMS et al., 2018); esse resultado nos permite hipotetizar que *P4hb* está associado ao processo de *fold*ing proteico, modulando a atividade de proteínas durante a interação com *C. neoformans*. Além disso, o domínio prolil-hidroxilase exerce papel importante para o metabolismo de oxigênio na célula, controlando assim a atividade da enzima RNA polimerase II, por exemplo (GORRES; RAINES, 2010); isso também pode indicar um possível papel de *P4hb* na modulação dos níveis de transcrição de genes durante condições de estresse, como o causado pela exposição a *C. neoformans*.

Diferentemente do resultado em macrófagos, o gene *Glutarredoxina (Glrx)* apresentou expressão reduzida quando comparada ao controle após decorridas 2 h de interação com *C. neoformans* (Figura 7). *Glrx* codifica uma enzima citoplasmática da família de glutarredoxinas, proteínas que catalisam a redução reversível de glutathione com ligações dissulfeto (MORGAN et al., 2010). Essa atividade é de grande importância uma vez que modula complexos redox e vias de sinalização celular, rotas que governam diversos processos celulares; dentre eles está a via glicolítica, motivo pelo qual *Glrx* pode ter sido associado ao metabolismo de carboidratos nos *clusters* funcionais. Visto isso, hipotetizamos que a repressão de *Glrx* observada em amebas reduziria atividades da via de glicólise e, assim, diminuiria também a disponibilidade de carboidratos na célula hospedeira; esse resultado pode ser devido a mecanismos de defesa de *A. castellanii* contra a replicação fúngica ou uma consequência da modulação por *C. neoformans* a fim de impedir a proliferação celular da ameba durante uma possível estratégia de exocitose, por exemplo. Essas possibilidades podem ser reavaliadas em estudos futuros.

Os resultados de transcrição não detectáveis dos demais 5 genes de *A. castellanii* indicam provável repressão da expressão frente à interação a *C. neoformans*. Para os genes *E3 ubiquitina ligase (Uhrf1)* e *helicase linfoide-específica (Hells)*, esses dados foram conservados com o padrão de repressão da expressão observado em *Mus. musculus*. Uma vez que ambos foram agrupados ao *cluster* do metabolismo de proliferação celular, sobrevivência e reparo de danos do DNA, sugerimos a hipótese de que houve modulação desses genes de *A. castellanii* por fatores de virulência de *C. neoformans*, uma possível estratégia de sobrevivência intracelular no hospedeiro.

Já os genes *zinc finger CCCH 6 (Zc3h6)* e *F-box 36 (Fbxo36)*, mais expressos em macrófagos murinos nas condições descritas, apresentaram padrão de expressão diferente em *A. castellanii*. Além de não produzirem níveis de transcritos detectáveis, esses genes não foram associados a nenhum dos *clusters* metabólicos de resposta a *C. neoformans*. Resultados da literatura associam *Zc3h6* à regulação da ativação de macrófagos (LIANG et al., 2008) e *Fbxo36* à formação de complexos com função ubiquitina-ligase (FRASER; MARANCHUK; FOLEY, 2014; KALAM; FONTANA; KUMAR, 2017). Acreditamos que estudos futuros possam auxiliar com melhores dados para entendimento sobre o real papel imunológico dessas proteínas em

fagócitos.

Catepsina E (Ctse), gene com expressão aumentada em *M. musculus* quando exposto à *C. neoformans HK* após 24 h, não apresentou o mesmo resultado frente à *C. neoformans* vivo. Esse gene codifica uma endopeptidase aspártica possivelmente envolvida no processamento de antígenos e na maturação de enzimas secretoras (FRANK et al., 2015). Podemos sugerir que, em *A. castellanii*, *Ctse* teve sua expressão reprimida por *C. neoformans* vivo como uma estratégia contra o reconhecimento de peptídeos antigênicos e consequente inibição do recrutamento da maquinaria de defesa do hospedeiro; isso pode não ter acontecido durante a exposição de macrófagos a *C. neoformans n HK*. Porém, novos ensaios de exposição de *A. castellanii* a *C. neoformans HK* nas mesmas condições são necessários a fim de gerar resultados que possam melhor auxiliar com o entendimento da modulação de *Ctse*.

Por fim, dados da literatura que avaliam padrões de expressão gênica de *C. neoformans* após a fagocitose por macrófagos murinos e *A. castellanii* (DERENGOWSKI et al., 2013) apresentam a modulação de genes com funções similares às reguladas em fagócitos deste trabalho (Figura 9). A comparação entre estudos sinaliza o protagonismo de certos processos metabólicos durante interações biológicas tanto no patógeno como no hospedeiro: reações redox, estresse oxidativo, transcrição/tradução, metabolismo de carboidratos, replicação e reparo do DNA. Uma vez que a similaridade entre padrões de expressão gênicos entre fagócitos fortalece a hipótese de ancestralidade imunológica compartilhada (SIDDIQUI; KHAN, 2012), a mesma situação observada entre patógeno e hospedeiro pode reforçar um cenário de coevolução e relações endossimbiontes sugerido pela hipótese da interação de amebas com microrganismos no ambiente (GREUB; RAOULT, 2004).

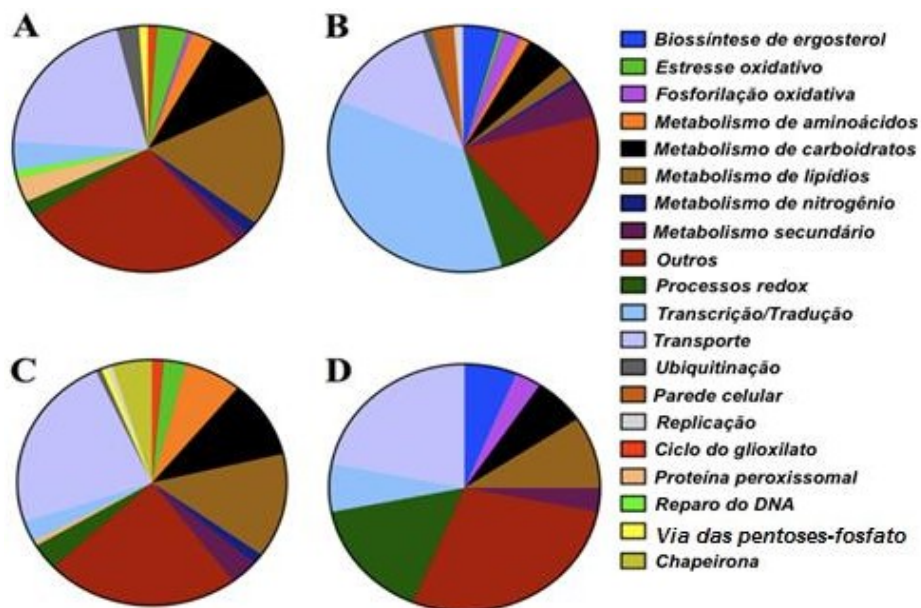


Figura 9 Classificação funcional de genes de *C. neoformans* modulados após serem internalizados por (A, B) *A. castellanii* ou (C, D) macrófagos murinos; (A) e (C) apresentam genes induzidos e (B) e (D) genes reprimidos após a interação. Adaptado de (DERENGOWSKI et al., 2013).

6 CONCLUSÃO

Os resultados da expressão de genes ortólogos de macrófagos murinos em *A. castellanii* obtidos neste trabalho permitem-nos sugerir proteínas possivelmente conservadas em processos de diferentes fagócitos de *C. neoformans*. *P4hb*, *Uhrf1* e *Hells* são genes que codificam proteínas envolvidas principalmente nos metabolismos de resposta ao estresse, reparo de danos do DNA e proliferação celular, respectivamente; esses genes apresentaram expressão diferencial equivalente à observada sob as mesmas condições em macrófagos murinos, forte indicação de conservação entre processos intercelulares.

Além disso, validamos o uso de amebas como modelo representativo para o estudo e contínuo esclarecimento de mecanismos envolvidos na resposta patógeno-hospedeiro, reforçando a hipótese evolutiva entre amebas e macrófagos.

REFERÊNCIAS

- 1) ADAMS, W. P. et al. The Use of Poly-4-Hydroxybutyrate (P4HB) Scaffold in the Ptotic Breast: A Multicenter Clinical Study. **Aesthetic Surgery Journal**, v. 38, n. 5, p. 502-518, 2018.
- 2) ALTENHOFF, A. M. et al. Inferring Hierarchical Orthologous Groups from Orthologous Gene Pairs. **PLoS ONE**, v. 8, n. 1, 2013.
- 3) ASRAT, S.; DAVIS, K. M.; ISBERG, R. R. Modulation of the host innate immune and inflammatory response by translocated bacterial proteins. **Cellular Microbiology**, v. 17, n. 6, p. 785–795, 2015.
- 4) AURRECOECHEA, C. et al. AmoebaDB and MicrosporidiaDB: Functional genomic resources for Amoebozoa and Microsporidia species. **Nucleic Acids Research**, v. 39, n. SUPPL. 1, p. 612–619, 2011.
- 5) BRINKWORTH, J. F.; PECHENKINA, E. A. (EKATERINA A. **Primates, pathogens, and evolution.**
- 6) CHRISMAN, C. J.; ALVAREZ, M.; CASADEVALL, A. Phagocytosis of *cryptococcus neoformans* by, and nonlytic exocytosis from, *Acanthamoeba castellanii*. **Applied and Environmental Microbiology**, 2010.
- 7) COELHO, C. et al. Macrophage Mitochondrial and Stress Response to Ingestion of *Cryptococcus neoformans*. **The Journal of Immunology**, 2015.
- 8) DERENGOWSKI, L. DA S. et al. The transcriptional response of *cryptococcus neoformans* to ingestion by *Acanthamoeba castellanii* and macrophages provides insights into the evolutionary adaptation to the mammalian host. **Eukaryotic Cell**, 2013.
- 9) FRANK, B. et al. Autophagic digestion of *Leishmania major* by host

- macrophages is associated with differential expression of BNIP3, CTSE, and the miRNAs miR-101c, miR-129, and miR-210. **Parasites and Vectors**, v. 8, n. 1, p. 1–31, 2015.
- 10)FRASER, B.; MARANCHUK, R. A.; FOLEY, E. A high-content RNAi screen identifies ubiquitin modifiers that regulate TNF-dependent nuclear accumulation of NF- κ B. **Frontiers in Immunology**, v. 5, n. JUL, p. 1–13, 2014.
- 11)GHIGO, E. et al. Ameobal pathogen mimivirus infects macrophages through phagocytosis. **PLoS Pathogens**, v. 4, n. 6, 2008.
- 12)GILBERT, A. S.; WHEELER, R. T.; MAY, R. C. Fungal pathogens: Survival and replication within macrophages. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 5, n. 7, p. 1–14, 2015.
- 13)GORRES, K. L.; RAINES, R. T. Prolyl 4-hydroxylase. 2010.
- 14)GREUB, G.; RAOULT, D. Microorganisms Resistant to Free-Living Amoebae. **CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS**, v. 17, n. 2, p. 413–433, 2004.
- 15)GRIFFITHS, D. A. J. Growth and Encystation of *Acanthamoeba castellanii*. **Journal of General Microbiology**, v. 85, p. 139–145, 1974.
- 16)GUIMARAES, A. J. et al. *Acanthamoeba* spp. as a universal host for pathogenic microorganisms: One bridge from environment to host virulence. **Microbiological Research**, 2016.
- 17)HUNTER, S. et al. InterProScan 5: genome-scale protein function classification. **Bioinformatics**, 2014.
- 18)KALAM, H.; FONTANA, M. F.; KUMAR, D. **Alternate splicing of transcripts shape macrophage response to Mycobacterium tuberculosis infection**. v. 13
- 19)LIANG, J. et al. Genome-wide survey and expression profiling of CCCH-zinc

- finger family reveals a functional module in macrophage activation. **PLoS ONE**, v. 3, n. 8, 2008.
- 20) LIN, X.; HEITMAN, J. The Biology of the *Cryptococcus neoformans* Species Complex. 2006.
- 21) LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402–408, 2001.
- 22) MOLMERET, M. et al. MINIREVIEW Amoebae as Training Grounds for Intracellular Bacterial Pathogens. **APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY**, v. 71, n. 1, p. 20–28, 2005.
- 23) MORGAN, K. L. et al. The glutaredoxin GLRX-21 functions to prevent selenium-induced oxidative stress in *Caenorhabditis elegans*. **Toxicological Sciences**, v. 118, n. 2, p. 530–543, 2010.
- 24) RIBEIRO, N. S. et al. Modulation of zinc homeostasis in *Acanthamoeba castellanii* as a possible antifungal strategy against *Cryptococcus gattii*. **Frontiers in Microbiology**, 2017.
- 25) SIDDIQUI, R.; KHAN, N. A. *Acanthamoeba* is an evolutionary ancestor of macrophages: A myth or reality? **Experimental Parasitology**, v. 130, n. 2, p. 95–97, 2012a.
- 26) SIDDIQUI, R.; KHAN, N. A. *Acanthamoeba* is an evolutionary ancestor of macrophages: A myth or reality? **Experimental Parasitology**, v. 130, n. 2, p. 95–97, fev. 2012b.
- 27) SMEDLEY, D. et al. The BioMart community portal: an innovative alternative to large, centralized data repositories. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. 43, 2015.

- 28) SPRENGER, M. et al. Metabolic adaptation of intracellular bacteria and fungi to macrophages. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 308, n. 1, p. 215–227, 2017.
- 29) STEENBERGEN, J. N.; SHUMAN, H. A.; CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* interactions with amoebae suggest an explanation for its virulence and intracellular pathogenic strategy in macrophages. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 2001.
- 30) STRASSMANN, J. E.; SHU, L. Ancient bacteria–amoeba relationships and pathogenic animal bacteria. **PLOS Biology**, v. 15, n. 5, p. e2002460, 2 maio 2017.
- 31) TOFT, C.; ANDERSSON, S. G. E. **Evolutionary microbial genomics: Insights into bacterial host adaptation** *Nature Reviews Genetics*, 2010.
- 32) VALLABHANENI, S. et al. **The Global Burden of Fungal Diseases** *Infectious Disease Clinics of North America*, 2016.
- 33) WOLF, Y. I.; KOONIN, E. V. A tight link between orthologs and bidirectional best hits in bacterial and archaeal genomes. **Genome Biology and Evolution**, v. 4, n. 12, p. 1286–1294, 2012.
- 34) ZHANG, M.; SUN, D.; SHI, M. Dancing cheek to cheek: *Cryptococcus neoformans* and phagocytes Background. **SpringerPlus**, v. 4, 2015.
- 35) BRAZILIENSE, Correio. **Doença do pombo deixa três pessoas hospitalizadas no Distrito Federal**, 2018. Disponível em: <https://www.correiobraziliense.com.br/app/noticia/cidades/2018/02/22/interna_cidadesdf,661479/doenca-do-pombo-deixa-tres-pessoas-hospitalizadas-no-distrito-federal.shtml>. Acesso em: 8 de jun. 2018.

36)DO NORDESTE, Diário. **Pombos representam ameaça para a saúde**, 2018.

Disponível em:

<<http://diariodonordeste.verdesmares.com.br/cadernos/cidade/pombos-representam-ameaca-para-a-saude-1.1953106>>. Acesso em: 12 de jun. 2018.

37)G1. **Porto Alegre terá testes gratuitos de HIV no Dia Mundial de Luta contra**

a Aids, 2018. Disponível em: <<https://g1.globo.com/rs/rio-grande-do-sul/noticia/porto-alegre-tera-testes-gratuitos-de-hiv-no-dia-mundial-de-luta-contra-a-aids.ghtml>>. Acesso em: 8 de jun. 2018.