

UTILIZAÇÃO DE AMINOÁCIDOS NO ESTUDO DO CRESCIMENTO DO *Paracoccidioides brasiliensis*. INFLUÊNCIA SOBRE O DIMORFISMO

Maria Isabel Nogueira CANO(1) & Mônica S.M. Vidal de AGUIAR(2)

RESUMO

Utilizamos 15 amostras de *Paracoccidioides brasiliensis* nas formas miceliana (M) e leveduriforme (L), cultivadas em meio mínimo (MM) e adaptadas ao mesmo meio suplementado com a solução de aminoácidos (MMS). Para a realização do estudo auxológico das amostras, foram preparadas soluções complementares das quais foram retirados um aminoácido de cada vez. Nove amostras foram prototróficas nas formas M e/ou L e as demais auxotróficas para os diferentes aminoácidos e bases nitrogenadas. A heterogeneidade dos resultados apresentados não permitiu a caracterização auxológica das 15 amostras de *P. brasiliensis* estudadas. Nenhum dos compostos nitrogenados demonstrou ser essencial para o crescimento ou para a manutenção da morfogênese do fungo. Alterações morfológicas (macro e microscópicas) também foram observadas, mas somente entre as amostras prototróficas, sugerindo a ativação de um mecanismo de adaptação desenvolvido pelo fungo mediante a ausência de substratos nitrogenados no meio de cultura (MM).

UNITERMOS; *Paracoccidioides brasiliensis*; Aminoácidos; Dimorfismo

INTRODUÇÃO

Paracoccidioides brasiliensis, agente etiológico da paracoccidioidomicose, é um fungo dimórfico apresentando-se sob as formas miceliana (M), à temperatura ambiente e leveduriforme (L), a 37°C⁽⁵⁾. Esta transformação morfogenética define as fases de transição vegetativa do fungo, resultantes de ativação gênica seletiva⁽¹⁶⁾.

Vários autores^{(4), (7), (10), (14)} demonstraram que, além da temperatura^{(12), (17)}, compostos orgânicos nitrogenados, como aminoácidos, são fundamentais para o desenvolvimento das formas em que o fungo se apresenta. A mudança destas fontes nitrogenadas altera profundamente a morfologia do fungo⁽⁹⁾.

O presente trabalho, teve por finalidade, estudar a influência dos aminoácidos sobre o crescimento e dimorfismo do *Paracoccidioides brasiliensis*, além da caracterização auxológica em relação aos aminoácidos, de amostras provenientes de diferentes

regiões endêmicas da América do Sul.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras de *P. brasiliensis*: Foram utilizadas 15 amostras do fungo mantidas em cultivo no Laboratório de Micologia Médica do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo:

Bt1, Bt2 e Bt3: Laboratório de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, São Paulo (UNESP); **Bt2:** Cerebriforme a 25°C.

SN, 113, 666 e 665: Micoteca do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, SP.

Pb arg e Pb Cob30: Laboratório de Micologia Médica da Faculdade de Medicina de Buenos Aires, Argentina.

891 e 1925: Faculdade de Medicina de Montevideo, Uruguai.

728: Instituto Venezuelano de Investigação Ci-

(1) Laboratório de Investigação Médica nº 53 Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. São Paulo, SP, Brasil.

(2) Laboratório de Micologia Médica do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. São Paulo, SP, Brasil. Chefe: Prof. Carlos da Silva Lacaz

Address for correspondence: Maria Isabel Nogueira Cano. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Laboratório de Micologia Médica. Av. Dr. Arnaldo, 455 - CEP 01246 - São Paulo, SP, Brasil.

entífica, Caracas, Venezuela. Mutante auxotrófica da amostra IVIC Pb 267.

262: Uberlândia, Minas Gerais. Isolada de ração para cães.

IHM 1962: Antártida. Isolada de fezes de pinguins da Antártida.

Amostras isoladas de pacientes com paracoccidioidomicose: **Bt1, Bt2, Bt3, SN, 113, 666, 665, Pparg, PbCob30** (reisolada em cobaio), **891 e 1925**.

Meios de Cultivo: Foram utilizados três meios de composição química semelhante: **MM:** meio mínimo, sintético, elaborado de acordo com o "Manual for methods in yeast genetics" (13), composto de 1% de "Bacto Yeast Nitrogen Base w/o Acid" (Difco), 1% de glicose anidra (Merck) e 1,8% de ágar. **MMS:** meio mínimo suplementando com solução de aminoácidos, em concentrações foram determinadas pelo Manual já mencionado. As soluções foram preparadas segundo a solubilidade de cada aminoácido, seguindo indicação do index Merck (6). Os aminoácidos foram utilizados nas seguintes concentrações (em mg/ml): asparagina (0,01), triptofano (10,0), metionina (10,0), histidina (10,0), arginina (10,0), tirosina (2,0), fenilalanina (10,0), cisteína (0,01), ácido glutâmico (10,0), lisina (10,0), cistina (0,01), e duas bases nitrogenadas: adenina (0,01) e guanina (0,01). **MMS (-):** é o MMS subtraído de um aminoácido, por exemplo: MMS - asparagina, quer dizer que a asparagina foi subtraída do meio.

Condições de Crescimento - As 15 amostras de *Paracoccidioides brasiliensis* foram cultivadas em MMS nas forma M e L. A forma M foi subcultivada em intervalos de 15 dias e a forma L em intervalos de 7 dias. O tempo de adaptação neste meio de cultura foi de dois meses. Em seguida foram realizados os testes para a avaliação de prototrofismo, cultivando-se as 15 amostras em MM com subcultivos repetidos de quatro em quatro dias, nas temperaturas adequadas para ambas as formas. Este teste teve a duração de um mês. As amostras que não apresentaram crescimento em MM foram subcultivadas em MMS (-) para a análise de suas necessidades nutricionais em relação aos aminoácidos e bases nitrogenadas utilizados.

Análise macro e microscópica - O aspecto macroscópico das colônias foi observado com auxílio de microscópio estereoscópico (Nikon), ao final de cada cultivo. Com auxílio de microscópio óptico de luz (Zeiss), as amostras foram analisadas (objetiva de médio aumento-400X), nas formas M e L, coletando-se pequena quantidade de material do

cultivo, montando entre lâmina e lamínula, com lactofenol azul-algodão. Foram realizadas microfotografias das amostras prototróficas, mantidas em MM, com auxílio de microscópio Ultraphoto II (Carl Zeiss) (Foto 2).

RESULTADOS

Os aspectos macroscópicos e microscópicos dos cultivos em MMS, às temperaturas de 25°C e 37°C, e a procedência das amostras encontram-se na Tabela 1. A Tabela 2 demonstra que, das 15 amostras de *P. brasiliensis* cultivadas em MM, quatro foram prototróficas na fase M a 25°C (113, 1925, 891 e 666); duas foram prototróficas na fase M a 37°C (262 e Bt3); a amostra Bt2 foi a única prototrófica somente na fase L a 37°C e as amostras SN e IHM 1962 foram prototróficas nas fases M a 25°C e L a 37°C.

Estão ilustradas na Tabela 3 as diferenças em relação às necessidades de aminoácidos, como fonte de nitrogênio orgânico. Pode-se observar, por exemplo, que as amostras 665, Pb. arg., Bt1 e Pb cob 30 não cresceram na fase L na ausência de asparagina; na fase M somente a amostra 728 não apresentou crescimento. A ausência de adenina inibiu o crescimento das amostras 665, Pb arg, Bt1, Pb cob 30 e 728, na fase M, sendo que na fase L não cresceu apenas a amostra 339. Verificou-se que, entre os aminoácidos e bases nitrogenadas utilizadas para este estudo, nenhum demonstrou ser, particularmente, importante para o crescimento e manutenção da morfogênese do fungo.

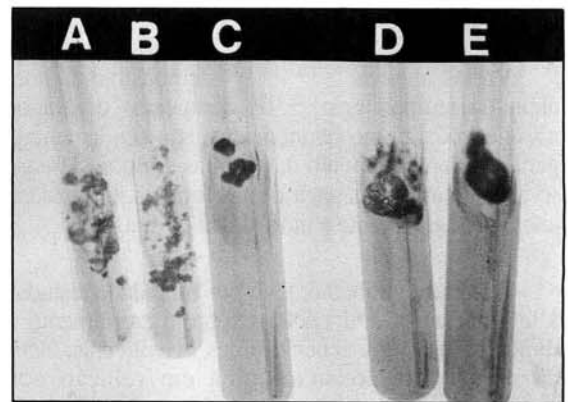


FOTO 1: Aspectos macroscópicos das amostras prototróficas cultivadas em MM (meio mínimo):

- A - Bt2 leveduriforme a 37°C.
- B - IHM 1962 leveduriforme a 37°C.
- C - 666 miceliano a 25°C.
- D - Bt3 miceliano a 37°C.
- E - 262 miceliano a 37°C.

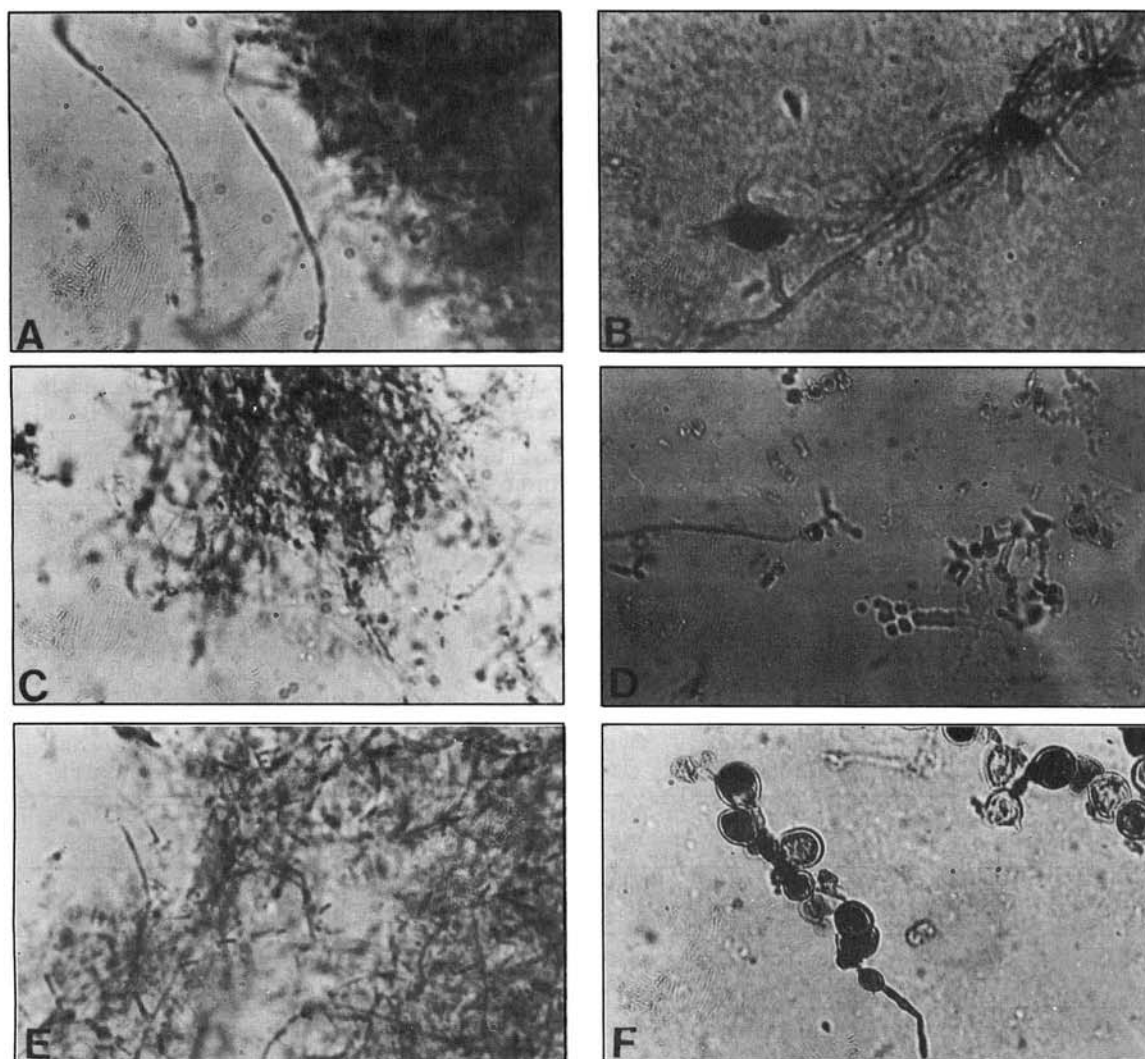


FOTO 2: Alterações micromorfológicas das amostras prototróficas de *P. brasiliensis* a 25°C, coradas por azul - algodão.

- A) À esquerda duas hifas finas, septadas, da amostra 666, em MMS (400X).
B) Hifas da amostra 666 em MM, com ramificações laterais, mais espessas que as observadas no ítem A (160X).
C) Feixe de hifas septadas e finas, da amostra Bt2, em MMS (250X).
D) Hifas e fragmentos de hifas com formas irregulares da amostra Bt2, cultivada em MM (160X).
E) Emaranhado de hifas finas e septadas da amostra IHM 1962 em MMS (250X).
F) Hifa com cadeia de células globosas de parede celular espessa, semelhantes a clamidoconídios, da amostra IHM 1962, cultivada em MM (160X).

Na observação macroscópica das colônias, a ausência de aminoácidos e bases nitrogenadas provocou alterações na coloração, textura, diminuição e lentidão de crescimento das amostras prototróficas em fase M. As amostras 666 e IHM 1962, quando cultivadas em MMS a 25°C, apresentaram colônias com aspectos cotonosos e micélio aéreo. Estas mesmas amostras quando cultivadas em MM, à mesma temperatura, adquiriram aspecto leveduriforme. Por sua vez, a amostra Bt2, tipicamente cerebriforme a

25°C, quando subcultivada nas mesmas condições em MM, apresentava colônias do tipo miceliano. (foto 1).

Observadas ao microscópio de luz, as amostras prototróficas, mantidas em MM a 25°C, demonstraram formas celulares bizarras e células semelhantes a clamidoconídios, apresentando todas maior tamanho do que quando cultivadas em MMS à mesma temperatura (foto 2). As amostras auxotróficas não apresentaram as modificações morfológicas acima

Tabela 1
Aspectos macro e microscópicos das 15 amostras de *P. brasiliensis* em MMS, às temperaturas de 25° e 37°C.

Amostras	a 25°C-M		a 37°C-L		Origem
	Macro	Micro	Macro	Micro	
* Pb arg.	cotonoso	artroconídios	membranoso e cerebriforme	células leveduriformes com multibrotamentos	Argentina
*Pbcob30	cotonoso	aleuroconídios	membranoso e cerebriforme	células leveduriformes com multibrotamentos	Argentina
IHM1962	cotonoso	artroconídios	membranoso e cerebriforme	células leveduriformes com multibrotamentos	Antártida
*262	cotonoso		membranoso e cerebriforme	células leveduriformes com multibrotamentos	Uberlândia MG-Brasil
*1925	cotonoso	aleuroconídios	membranoso e cerebriforme	células leveduriformes com multibrotamentos	Uruguai
*665	cotonoso	artroconídios	membranoso e cerebriforme	células leveduriformes com multibrotamentos	São Paulo Brasil
*666	cotonoso		membranoso e cerebriforme	células leveduriformes com multibrotamentos	São Paulo Brasil
*891	cotonoso		membranoso e cerebriforme	células leveduriformes com multibrotamentos	Uruguai
*SN	cotonoso	aleuconídios e artroconídios	membranoso e cerebriforme	células leveduriformes com multibrotamentos	São Paulo Brasil
*113	cotonoso		membranoso e cerebriforme	células leveduriformes com multibrotamentos	São Paulo Brasil
*Bt1	cotonoso		membranoso e cerebriforme	células leveduriformes com multibrotamentos	Botucatu Brasil
*Bt3	cotonoso	aleuroconídios	membranoso e cerebriforme	células leveduriformes com multibrotamentos	Botucatu Brasil
*Bt2	cerebriforme e membranoso	clamidoconídios hialinos	membranoso e cerebriforme	células leveduriformes com multibrotamentos	Botucatu Brasil
*339	cotonoso	aleuroconídios globosos	membranoso e cerebriforme	células leveduriformes com tubo germinativo	Colômbia
728	cerebriforme e membranoso	aleuroconídios	membranoso e cerebriforme	células leveduriformes com tubo germinativo	Venezuela

* Amostras que apresentaram microscopicamente: hifas finas, septadas, ramificadas e hialinas.

TABELA 2
Amostras de *P. brasiliensis* desenvolvidas em meio mínimo (MM): Prototróficas.

FORMAS	AMOSTRAS
M (25°C)	1925,113,891,666
M (37°C)	262,Bt3
L (37°C)	Bt2
M (25°C) e (37°C)	SN, IHM 1962

descritas, quando foram submetidas às mesmas condições de cultivo.

DISCUSSÃO

O objetivo deste trabalho foi o de estabelecer o perfil da utilização de aminoácidos e algumas bases nitrogenadas, como fonte de nitrogênio orgânico, por cultivos de *Paracoccidioides brasiliensis* de procedências diferentes, nas fases M e L. Para tal foram

TABELA 3

Amostras de *P. brasiliensis* auxotróficas que não cresceram em meio mínimo suplementado e subtraído (MMS (-)) dos aminoácidos e bases abaixo relacionados

MMS (-)	AMOSTRAS	
	Forma M (25°C)	Forma L (37°C)
Asparagina	728	665; Pb arg; Btl; Pb cob 30
Triptofano	Pb arg; Pb cob 30	PB arg; Btl; Pb cob 30
Metionina	Pb arg; Pb cob 30; 339	665; Btl; Pb cob 30 728
Histidina	Pb arg; Btl; Pb cob 30; 339	665; Btl; Pb cob 30 728
Arginina	Pb arg; Btl; Pb cob 30; 665; 728	665
Tirosina	Pb arg; Btl; Pb cob 30; 339; 665; 728	665; Btl; 339
Fenilalanina	Pb arg; Btl; 728	Btl; 339; 728
Cisteína	Pb arg; Btl; 665; 728	Pb arg; 665; 728
Ác. glutâmico	Pb arg; Btl; Pb cob 30	Pb cob 30; 728
Lisina	Btl; Pb cob 30; 339	Pb arg; Btl; Pb cob 30
Cistina	Btl; Pb cob 30; 665; 728	Pb arg
Adenina	Btl; Pb cob 30; 665; 728	339
Guanina	Btl; 728	Btl

escolhidas amostras de diversas regiões endêmicas de paracoccidioidomicose na América do Sul.

Observamos se existiam diferenças que possibilitassem uma caracterização auxológica do fungo, a nível epidemiológico, o que se tornou praticamente impossível devido à heterogeneidade dos resultados apresentados.

O "fator" responsável pelo crescimento e manutenção das formas morfogênicas apresentadas pelo fungo em cultura, ainda não foi definido. RESTREPO et al. (12) e VILLAR et al. (17) comprovaram que a temperatura não é o único elemento limitante, e que fatores nutricionais estariam implicados mais diretamente na morfogênese do *P. brasiliensis*.

A presença de aminoácidos e bases no meio de cultura podem ser responsáveis pela manutenção da

fase leveduriforme do fungo. As amostras Bt3 e 262 cresceram com aspecto miceliano em MM à temperatura de 37°C, não ocorrendo o mesmo com as outras amostras prototróficas. Isto talvez indique a existência de reais diferenças entre as amostras, no que diz respeito à regulação da morfogênese. GILLARD & LAFFER (4) também observaram amostras de *P. brasiliensis* que cultivadas em MM a 37°C, na presença do aminoácido tirosina, mantinham a forma miceliana, mesmo após alguns subcultivos. RAMIREZ-MARTINEZ & RODRIGUEZ (10) utilizando MM preconizado por GILLARD & LAFFER (4), observaram que as amostras de *P. brasiliensis* por eles estudadas, apresentavam deficiências nutricionais em relação a nitrogênio orgânico tanto na fase M quanto na fase L. PARIS et al. (8), utilizando MM que continha sais e traços de elementos, observou resultado diferente dos autores acima citados. As amostras de *P. brasiliensis* se mostraram prototróficas somente na fase L. Utilizando o mesmo MM mencionado no

trabalho de PARIS et al. ⁽⁶⁾, encontramos resultados distintos, os quais nos levam a indagar se a questão real é a composição do meio de cultura (MM), ou se cada amostra possui características que lhe são próprias e que as diferenciam das outras.

Em relação às alterações morfológicas observadas nas amostras prototróficas, o que se pode especular é que provavelmente o *P. brasiliensis* tenha desenvolvido um metabolismo de adaptação devido à ausência de substratos orgânicos nitrogenados no meio de cultura. Assim sugerimos que para uma resposta mais exata sobre deficiência nutricional e regulação da morfogênese do *P. brasiliensis*, sejam estes mecanismos estudados a nível da biologia molecular.

SUMMARY

The use of aminoacids in the study of *Paracoccidioides brasiliensis* growth and its role in fungus dimorphism.

Fifteen *Paracoccidioides brasiliensis* strains, in the mycelial (M) and yeast like (Y), were cultivated in minimal medium (MM) and subcultivated to be adapted to the same medium supplemented with a pool of aminoacid in solution (MMS). Each of the aminoacids were studied separately of the solution to provide the auxological study. The prototrophism was demonstrated by nine strains in both M and Y forms, and the auxotrofism by the remaining strains. The heterologous results has not allowed us to draw an auxological characterization of the *P. brasiliensis*.

As far as we could observe none of the aminoacid studied in this piece of research can be considered of absolute importance for to the growth and the morphogenesis maintainance of the fungus. Morphological alterations were only verified in the prototroph strains, which suggest that there could have been adaptative metabolism activity due to the absence of organic nitrogen compounds in the minimal medium (MM).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BIAGIONI, L.M.V.; ORSI, S.; CHAMMA, L. G.; SADATSUNE, T. & FRANCO, M. Imunoglobinas e C3 no granuloma paracoccidióico. Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo, 29: 97-103, 1987.
2. FERREIRA, M. S.; FREITAS, L.H.; LACAZ, C.S.; MELO, N.T.; SALEBIAN, A.; DEL NEGRO, G. M. B.; GARCIA, N. M. & HEINSVACCARI, E. M. - Isolation and characterization of a *Paracoccidioides brasiliensis* strain from a foodstuff for dogs, probably contaminated with soil un Uberlândia, Brazil. In: ENCUESTRO INTERNACIONAL SOBRE PARACOCCIDIOIDOMICOSIS, 4., Caracas, Venezuela, 1989. p. B1.
3. GEZUELE, E. - Aislamento de *Paracoccidioides sp* de heces de pinguino de la Antartida. In: ENCUESTRO INTERNACIONAL SOBRE PARACOCCIDIOIDOMICOSIS, 4., Caracas, Venezuela, 1989. p. B2.
4. GILLARD, G. L. & LAFFER, N. C. - Nutritional studies on the yeast phase of *Blastomyces dermatitidis* and *Blastomyces brasiliensis*. J. Bact., 83: 219-227, 1962.
5. LACAZ, C. S.; PORTO, E. & MARTINS, J. E. C. - Paracoccidioidomicose. São Paulo, Sarvier, 1984 p. 189-213.
6. MERCK INDEX . 9. Ed. Rahway, New York, Merck 1976.
7. MINAMI, P. S. - Ação da tiamina e do inositol sobre o crescimento do *Paracoccidioides brasiliensis* na fase filamentosa. An. Farm. Quím. S. Paulo, 25 : 25-33, 1985.
8. PARIS, S.; DURAN-GONZALES, S. & MARIATI, F. - Nutritional studies on *Paracoccidioides brasiliensis*: the role of organic sulfur in dimorfism. Sabouraudia, 23: 85-92, 1987.
9. RAMIREZ-MARTINEZ, J. R. - Growth curves and nucleic acid content of mycelial and yeast forms of *Paracoccidioides brasiliensis*. Mycopathologia (Den Haag), 41: 203-210, 1970.
10. RAMIREZ-MARTINEZ, J. R. & RODRIGUEZ, J. - Nutritional studies on a methionine-requiring strain of *Paracoccidioides brasiliensis*. Mycopathologia (Den Haag), 46: 341-350, 1972.
11. RESTREPO, A. & DROUHET, E. - Étude des anticorps precipitantes dans la blastomycose sud-américaine par l'analyse immunoelectrophoretique des antigènes de *Paracoccidioides brasiliensis*. Ann. Inst. Pasteur, 119: 337-346, 1970.
12. RESTREPO, A.; MONCADA, L. H. & QUINTERO, M. - Effect of the hidrogen ion concentration and of temperature on the growth of *Paracoccidioides brasiliensis* in soil extracts. Sabouraudia, 7: 207-215, 1969.
13. ROSE, M. D.; WINSTON, F. & HIETER, P. - Laboratory course manual for methods in yeast genetics. In: COLD SPRING HARBOR MANUAL. Boston, 1988, p. 147-149.
14. SAN BLAS, F. & COVA, L. J. - Growth curves of the yeast-like form of *Paracoccidioides brasiliensis*. Sabouraudia, 13: 22-29, 1975.
15. SAN BLAS, G. & SAN BLAS, F. - Molecular aspects of fungal dimorphism. Crit. Rev. Microbiol., 11: 101-127, 1983.
16. SHIEPHER, D. G. M. - Morphogenetic transformation of fungi. In: McGinnis, M. R. - Current topics in medical mycology, New York, Springer Verlag, 1988. p. 278-304.
17. VILLAR, L. A.; SALAZAR, M. E. & RESTREPO, A. - Morphological study of a variant of *Paracoccidioides brasiliensis* that exists in the yeast form at room temperature. J. med. vet. Mycol., 26: 269-276, 1988.

Recebido para publicação em 24/09/1990
Aceito para publicação em 13/06/1991