

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Centro de Biotecnologia do Estado do Rio Grande do Sul
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Purificação e Caracterização de uma Urease de
Cryptococcus gattii

Vanessa Feder

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre.

Orientação:
Célia Regina Ribeiro da Silva Carlini
Marilene Henning Vainstein

Porto Alegre, Julho de 2008.

COMPOSIÇÃO DA BANCA DE MESTRADO

Profa. Dra. Patrícia Azambuja
(Fiocruz - RJ)

Profa. Dra. Patrícia Valente
(Depto. Microbiologia – ICBS, UFRGS)

Prof. Dr. Alexandre Macedo
(Faculdade de Farmácia – UFRGS)

Revisor Dr. Charley Staats
(Centro de Biotecnologia - UFRGS)

Suplente: Prof. Dr. Carlos Termignoni
(PPGBCM - UFRGS)

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Proteínas Tóxicas do Departamento de Biofísica, Instituto de Biociências, e no laboratório de Biologia de Fungos de Importância Médica e Biotecnológica, do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, sob a orientação das Profas. Dras. Célia R. Carlini e Marilene H. Vainstein. Os auxílios recebidos foram do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

Agradecimentos

Primeiramente, agradeço a minha família pelo incansável e incondicional apoio. Meus pais Walter e Gessi por me ensinarem a importância do estudo e estarem sempre presentes na minha vida, das mais diversas e preciosas formas. Obrigado por me ensinarem a perseverar. A minha irmã Denise: quem me apresentou o fascinante universo da pesquisa, exemplo de profissional e ser humano de grande generosidade... jamais teria cumprido esta etapa sem teu amparo e confiança. Meu eterno respeito, amor e gratidão. Meu irmão André e minha querida Nara por desejarem meu sucesso e felicidade...sempre.

A minha querida orientadora Célia Carlini por ter me dado a oportunidade de aprender muito, e sobre tudo pelo apoio e solidariedade em obstáculos difíceis que surgiram nesta caminhada. Sempre descomplicando, mostrando atalhos, contornos, ajudando a empurrar as pedras...

A orientadora Marilene Vainstein pela confiança e por permitir iniciar este trabalho em conjunto com a equipe do seu laboratório. A Simone Soares pelo auxílio precioso nos inúmeros cultivos e na árdua missão de romper cápsula !!!

A Sílvia e Luciano pela paciência, humor e competência.

A Charley Staats pela disponibilidade de revisão desta dissertação em prazos bem estreitos!!

Aos colegas e amigos do Laprotox pelos ensinamentos, conselhos e pelos preciosos momentos de alegria durante o café ou chimarrão. Vander, Angelas, Marina, Mel, Deiber, Mônica, Augusto, Rodrigo, Karine, German, Diogo, Martha...

vocês não fazem idéia do quanto me alegraram em dias que nem tudo estava muito certo! Arlete e Evelyn pela valiosa ajuda na etapa final deste trabalho e pelas conversas! Em especial a quem me iniciou o meu aprendizado no laboratório e foram pacientes em me apresentar o “mundo das enzimas”: Anne e Juliana, não vou esquecer nunca o apoio de vocês!

Aos amigos que moram no meu coração, de forma tão sincera e fiel que nem preciso citar nomes... Comadres e compadres para toda a vida! Obrigada por estarem na minha vida, pelo abraço, pelo sorriso, pelas lágrimas, pela solidariedade, pela lembrança, por continuarem ao meu lado, por me mostrarem pontos de vista... Nada acontece por acaso.

A pessoa que torna minha vida mais colorida, me abençoa com seu sorriso e doçura todos os dias. Grande pequena pessoa com alma iluminada que em pouco tempo me transformou num ser humano melhor: minha pequena Sofia. Presente de Deus... amor incondicional. Te amo, minha princesa de cabelos cacheados. Estar na minha vida só me encheu de ânimo para superar qualquer dificuldade, qualquer desvio de caminho. Dedico a você este trabalho, guarde-o com carinho em suas lembranças.... “Avião sem asa, fogueira sem brasa, sou eu assim sem você... “

ÍNDICE

INTRODUÇÃO	12
1 Urease	13
1.1 <i>Canavalia ensiformis</i> ou feijão de porco	17
1.2 Canatoxina	18
1.3 Ação Biológica da Urease/ Canatoxina	19
2 <i>Cryptococcus neoformans</i> e criptococose	20
2.1 Ciclo de Infecção	24
2.2 Ciclo de Vida do Basidiomiceto	24
2.3 Fatores de Virulência de <i>Cryptococcus neoformans</i>	27
2.4 Urease e Criptococose	30
2.5 <i>Cryptococcus gattii</i> e a Epidemia de Vancouver	31
OBJETIVOS	33
Objetivo Específico	34
Justificativa	34
METODOLOGIA	36
1 Origem dos Isolados	37
2 Condições de Cultura	38
2.1 Condições de Lise celular para obtenção do Extrato Bruto	38
3 Determinação do Conteúdo de Proteína	40
4 Determinação da Atividade Enzimática	41
5 Urease de <i>C. ensiformis</i>	41
6 Cromatografias	41
6.1 Cromatografia de Troca Ânionica – Q-Sepharose	42
6.2 Cromatografia de Troca aniônica – Source 15Q	42
6.3 Cromatografia de Gel Filtração – Superose 6	43
7 Caracterização Enzimática	43
7.1 pH Ótimo	43
7.2 Estimativa de K_m e V_{max}	44
7.3 Sensibilidade a inibidores	44
7.4 Estimativa da Massa Molecular	44
8 Eletroforese	45
9 Ensaio Imunológicos	46
9.1 Western Blot	47
9.2 Dot Blot	47
9.3 ELISA	47
10 Ensaio Biológico- Agregação plaquetária	48
11 Análises de Seqüências	49

RESULTADOS	50
1 Seleção da linhagem	51
2 Cultivo e Lise Celular	51
3 Purificação CGU	52
4 Caracterização	56
4.1 Estimativa de Massa Molecular	56
4.2 pH Ótimo	57
4.3 Determinação Km/Vmax	58
4.4 Sensibilidade a inibidores	59
5 Ensaio Imunológico	61
5.1 Western Blot	62
5.2 Dot Blot	62
5.3 ELISA	64
6 Agregação Plaquetária	65
7 Análise de Seqüências Preditas Depositadas	65
DISCUSSÃO	71
CONCLUSÕES	77
Referências Bibliográficas	80
Anexo I- Curriculum Vitae	88
Anexo II- Publicação I	96
Anexo III- Publicação II	98

RESUMO

Ureases (EC 3.5.1.5) são metaloenzimas que hidrolisam uréia para produzir amônia e dióxido de carbono. Estas enzimas, que são amplamente encontradas em fungos, bactérias e plantas, compartilham de estruturas similares. A presença de urease em várias bactérias patogênicas (*Helicobacter pylori* e *Proteus mirabilis*, p.e) está fortemente correlacionada com a patogênese em doenças humanas. Muitos fungos de importância médica possuem atividade ureásica, entre eles citamos *Cryptococcus neoformans*, *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum*, *Sporothrix schenckii*, e espécies de *Trichosporon* e *Aspergillus*. *C. neoformans* é uma levedura que produz vários fatores de virulência conhecidos, como presença de cápsula polisacarídica, produção de melanina e capacidade de desenvolvimento a 37°C. A maioria de isolados clínicos produz grandes quantidades de urease e muitos autores sugerem que a urease de *Cryptococcus* exerça uma função importante na patogênese, porém com mecanismos ainda não esclarecidos. *Cryptococcus gattii* – sorotipo B, tipo molecular VGII, linhagem R265, com capacidade de infectar pacientes imunocompetentes, causou uma epidemia na Ilha de Vancouver (Canadá) entre 1999 e 2003. Neste trabalho desenvolvemos um procedimento de purificação e apresentamos a caracterização físico-química e cinética da urease de *C. gattii*, cepa R265, após ter sido purificada na razão de 539 vezes. A massa molecular estimada foi de 120 kDa, K_m 2,0 mM para uréia, pH ótimo 8,0. O ácido acetohidroxâmico demonstrou ser um bom inibidor em concentrações micromolares, enquanto ρ -hidroximercuribenzoato causou inibição em concentrações mais altas, comparado a outras ureases. Espera-se que estudos adicionais com essa urease purificada permitam investigar propriedades biológicas independentes da atividade ureolítica e estabelecer sua contribuição para a patogênese da criptococose.

ABSTRACT

Ureases (EC 3.5.1.5) are metalloenzymes that hydrolyze urea to produce ammonia and carbon dioxide. These enzymes, which are found in fungi, bacteria, and plants show very similar structures. The presence of urease in many pathogenic bacteria (*Helicobacter pylori* and *Proteus mirabilis*) is strongly correlative with pathogenesis in human diseases. Many medically important fungi have urease activity, among which are *Cryptococcus neoformans*, *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum*, *Sporothrix schenckii*, and species of *Trichosporon* and *Aspergillus*. *C. neoformans* is a heterothallic yeast with several known virulence factors, including a polysaccharide capsule, melanin production, and the ability to grow at 37°C. The majority of clinical isolates produce large amounts of urease and several authors suggest that Cryptococcal urease play an important role in pathogenesis but with unclear mechanisms but probably by different routes dependent and independent of ureolytic activity, although many questions are unclear. We wanted to further investigate the role of urease in biological properties by using *Cryptococcus gattii* as a pathogen model. *C. gattii* – serotype B, molecular type VGII, R265 strain, which has capacity to infect immunocompetent individuals, caused an outbreak on Vancouver Island in Canada from 1999 to 2003. This work presents the physicochemical characterization of a urease from *C. gattii* strain R265 after a 539 fold purification. The estimated native molecular mass was 120 kDa, K_m 2.0 mM urea, pH optimum 8.0. Aceto hydroxamic acid was a strong inhibitor at low concentration while *p*-hydroxy mercuribenzoate needed higher concentrations for inhibition compared to other ureases.

LISTA DE ABREVIATURAS

ρ -HMB	ρ -hidroximercuriobenzoato
°C	graus Celsius
A	Absorbância
AAH	Ácido Acetohidroxâmico
AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism
AIDS	Síndrome da Imuno Deficiência Adquirida
CGU	Urease de <i>Cryptococcus gattii</i>
CNTX	canatoxina
CNU	Urease de <i>Cryptococcus neoformans</i>
DL ₅₀	Dose letal para 50% dos indivíduos testados
DNA	ácido desoxirribonucléico
EB	Extrato Bruto
EDTA	ácido etileno diaminotetracético
FPLC	fast protein liquid chromatography
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HIV+	Vírus da Imunodeficiência Humana Positivo
HPU	<i>Helicobacter pylori</i> urease
IgG	Imunoglobulina G
IP	Intraperitoneal
IM	Intramuscular
IV	Intravenoso
JBU	Jack Bean Urease (Urease de <i>C. ensiformis</i>)
kDa	Quilo daltons (1.000 daltons)
K _m	Constante Michaelis-Menten
mM	milimolar
mU	miliunidade
NaCl	Cloreto de Sódio

NaPB	Tampão fosfato de sódio
N-terminal	Região amino-terminal de uma proteína
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCR	reação de polimerização em cadeia
PRP	plasma rico em plaquetas
PMSF	fluoreto de fenilmetilsulfonila
PVDF	difluoreto de polivinilideno
RPM	Rotações por minutos
SBU	Soybean Urease
SDS	sódio dodecilsulfato
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS
SNC	Sistema Nervoso Central
TBS	solução TRIS HCl salina: 10 mM TRIS + 137 mM NaCl pH 7,4
TCA	ácido tricloroacético
TFA	ácido trifluoroacético
TTBS	TBS acrescido de 0,05% Tween® 20 no caso do TTBS
U	unidade
var.	variedade
V_{max}	velocidade máxima

Introdução

1. Urease

A urease (uréia amidohidrolases; EC 3.5.1.5) da semente de feijão-de-porco *Canavalia ensiformis* foi a primeira enzima a ser cristalizada em 1926, comprovando a natureza proteica das enzimas (Sumner, 1926). Também foi a primeira metalo-enzima dependente de níquel a ser identificada. A urease catalisa a hidrólise da uréia para formar duas moléculas de amônia e uma de dióxido de carbono (Dixon *et al.*, 1975) (Figura 1).

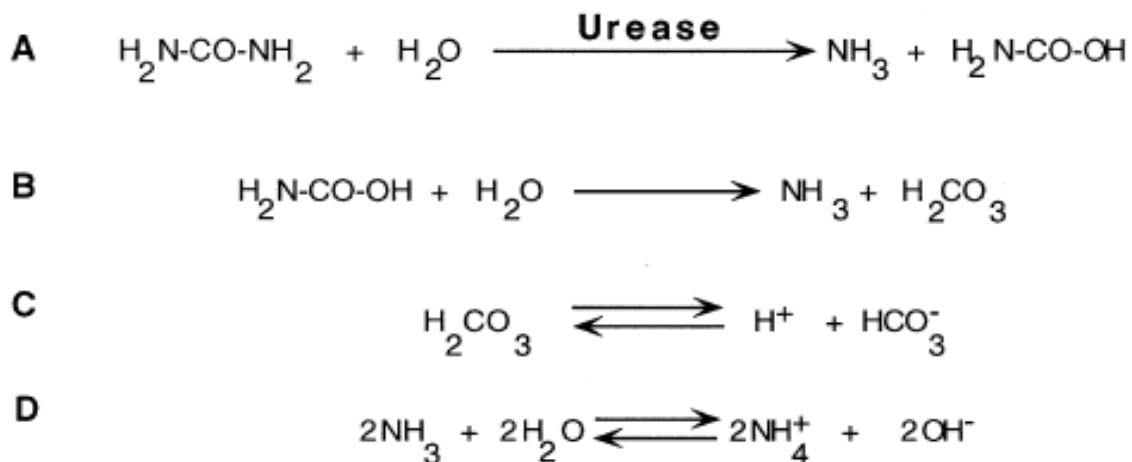


Figura 1: Reação da urease: Uréia é clivada pela urease, produzindo uma molécula de amônia e uma de Ácido Carbâmico (A). O Ác. Carbâmico decompõe-se espontaneamente em amônia e ácido carbônico (B). O ácido carbônico equilibra-se em água (na hidrólise) (C) produzindo duas moléculas de amônia, que se tornam protonadas, gerando íons amônio e hidróxido (D). A reação resulta em aumento do pH. Adaptado de (Burne & Chen 2000)

Porém, esta enzima também age sobre outros substratos, sendo que hidroxauréia e dihidroxauréia são os substratos para urease (Fishbein, 1969). Catalisa também a hidrólise de algumas uréias substituídas e ésteres de ácido carbâmico, como a tiouréia e p-

nitrofenilcarbamato. Diferentes compostos são inibidores de ureases, como ácido acetohidroxâmico (AAH) ou ρ -hidroximercuribenzoato (ρ -HMB) (Bennett & Wren, 1977).

As ureases são encontradas em inúmeros tecidos vegetais, sendo particularmente abundantes em sementes de leguminosas e curcubitáceas (Polacco & Holland, 1993), estando também amplamente distribuídas em bactérias, fungos e plantas. Apesar da abundância de urease em alguns tecidos vegetais, pouco se sabe sobre sua função no vegetal. Postula-se que a principal função das ureases de plantas esteja relacionada à reciclagem de nitrogênio (Sirko & Brodzik, 2000) ainda que a uréia, que é seu principal substrato, não seja um metabólito importante em plantas (Polacco & Holland, 1993). Postula-se ainda, que em combinação com arginase, a urease pode ter função na utilização das reservas proteicas da semente durante a fase de germinação (Follmer, 2008).

Em relação aos microrganismos, a atividade ureásica foi detectada em mais de 200 espécies de bactérias gram negativas e gram positivas. A urease sintetizada em bactérias de solo e em bactérias anaeróbicas, presentes na flora digestiva de ruminantes, favorece a reciclagem de compostos nitrogenados (Mobley & Hausinger, 1989). As ureases bacterianas estão envolvidas na patogênese de muitas condições clínicas, como a ulceração péptica e a formação de urólitos e biofilmes de incrustação em catéter urinário, contribuindo para a patogênese de pielonefrites por infecções do trato urinário por *Proteus mirabilis*, encefalopatia causada por amônia, coma hepático, câncer gástrico em processos infecciosos crônicos característicos de *H. pylori* (Carlini & Polacco, 2008; Island & Mobley, 1995). Salienta-se que devido à urease, a espiroqueta *Helicobacter pylori* tem capacidade de adaptação em ambientes com pH variando entre 3,5 e 8,6 (Mobley *et al.*, 1991). Em *P. mirabilis*, a condição básica para a formação dos urólitos é ser proveniente de infecções de cepas urease positivas, resultando em um crescimento

excepcionalmente rápido destas pedras em 4-6 semanas (Bichler *et al.*, 2002). Dois operons de urease (*ure1* e *ure2*) estão descritos em *Brucella suis*. O operon *ure1* é caracterizado como importante para a atividade ureolítica e sobrevivência em ambiente de pH baixo (Bandara *et al.*, 2007).

A urease é sintetizada por vários gêneros de fungos de importância médica, como *Coccidioides*, *Candida*, *Aspergillus*, *Rhodotorula*, *Trichosporon* e *Cryptococcus* (Mirbod *et al.*, 2002), além de *Histoplasma capsulatum*, *Sporothrix schenckii* (Cox *et al.*, 2000). Em 1997, o primeiro gene URE de fungo foi isolado codificando a urease em *Coccidioides immitis* (Yu *et al.*, 1997). Alguns anos mais tarde, a urease de *C. immitis* foi purificada e caracterizada a sua forma nativa com massa molecular 450 kDa, tendo sido sugerido um papel dessa urease na patogenicidade do fungo, atuando na colonização no tecido hospedeiro, resultando na formação de abscessos com um microambiente alcalino diferenciado (Mirbod *et al.*, 2002).

Ureases apresentam alta homologia e mecanismos catalíticos similares, apesar de diferirem na estrutura quaternária. Enquanto que ureases vegetais e fúngicas comportam-se como trímeros ou hexâmeros de uma subunidade de 90 kDa, as ureases bacterianas são multímeros de complexos formados por duas ou três subunidades (Mobley & Hausinger, 1989) esquematicamente representado na Figura 2.

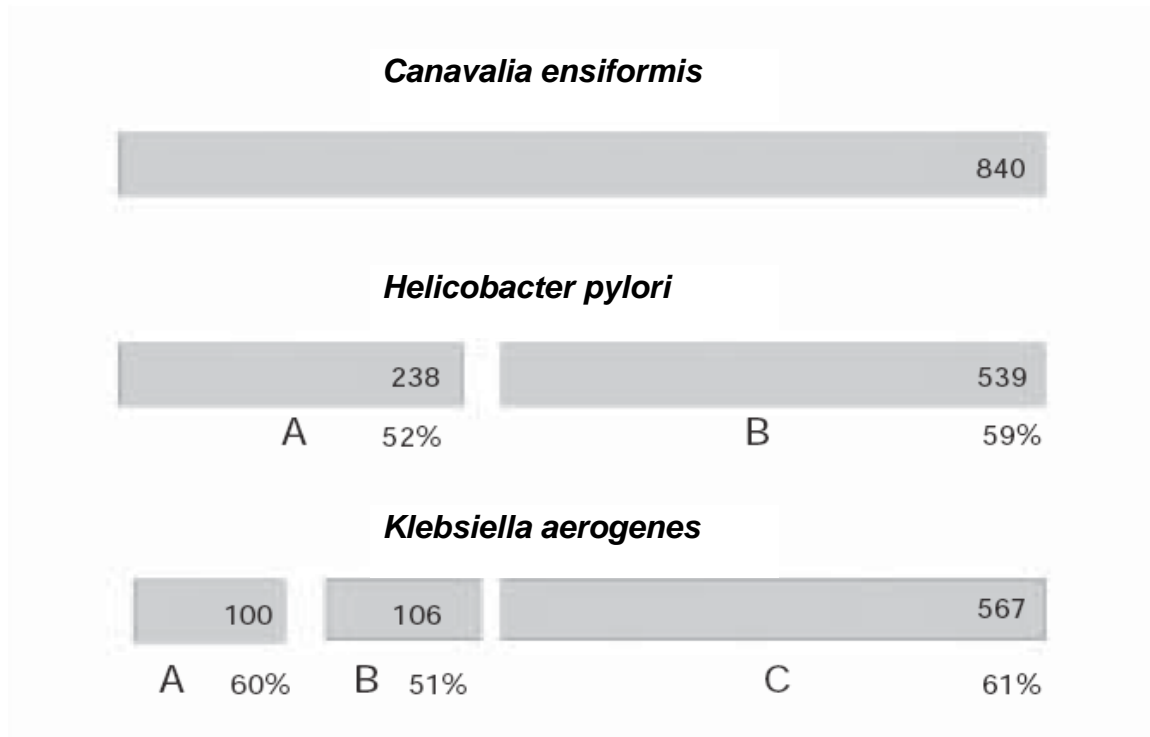


Figura 2: Comparação esquemática das subunidades estruturais das ureases de diferentes organismos. O número de aminoácidos de cada unidade está indicado dentro das caixas. Os valores percentuais, abaixo de cada bloco, indicam o grau de identidade com a urease de *C. ensiformis*. Retirado de (Olivera-Severo *et al.*, 2006b)

As ureases vegetais e microbianas pertencem a um grupo de proteínas multifuncionais, que apresentam atividade ureolítica e outras propriedades independentes da ação enzimática, como efeitos tóxicos em insetos e a habilidade de ativar agregação plaquetária, que será descrito a seguir. As novas descobertas sobre as ureases vegetais reforçam a hipótese de um papel protetor dessas proteínas em plantas, atuando em predadores e fitopatógenos por mecanismos diferentes não relacionados a geração de amônia (Follmer, 2004).

1.1 *Canavalia ensiformis* ou feijão-de-porco

As espécies do gênero *Canavalia* são nativas do Novo Mundo, com espécies de distribuição em regiões de clima tropical, mas sendo pouco utilizadas como alimento humano ou de animais domésticos devido a sua toxicidade (Udedibie & Carlini, 1998). No Extremo Oriente, as vagens novas são ingeridas em saladas verdes. A *C. ensiformis*, feijão-de-porco ou “jackbean” em inglês, possui cerca de 300 g de proteínas e 600 g de carboidratos por quilo de semente, e apresenta excelentes características agrônômicas, produzindo de 2,5 a 5,4 t de sementes por ha (Udedibie & Carlini, 1998). A alta resistência a ataque de insetos deve-se à presença, entre outros fatores, de metabólitos secundários, como a canavanina (Rosenthal & Dahlman, 1986). A semente de *Canavalia ensiformis* é ainda fonte de várias proteínas de interesse bioquímico e biotecnológico, como a já descrita urease (Sumner, 1926), além da lectina concanavalina A (Sumner & Howell 1936), inibidores de tripsina e a canatoxina (Carlini & Guimaraes, 1981).

A urease de *C. ensiformis* ou *Jackbean Urease* (JBU) constitui-se de uma cadeia polipeptídica com 840 aminoácidos e massa molecular de 90,77 kDa. A forma mínima da enzima ativa é trimérica, com 270 kDa, sendo encontrada em sua forma nativa como um hexâmero de 540 kDa (Zerner, 1991). Possui dois átomos de níquel no sítio ativo, cada um coordenado por dois resíduos de histidina (Follmer *et al.*, 2001).

1.2 Canatoxina

A canatoxina (CNTX) é uma proteína tóxica isolada de sementes de *C. ensiformis* (Carlini & Guimarães, 1981), que posteriormente foi caracterizada como uma isoforma da urease (Follmer *et al.*, 2001). Produz convulsão e morte de camundongos e ratos ($DL_{50} = 0.5-2.0$ mg/kg); e em doses sub-letais induz hipotermia, bradicardia (Carlini *et al.*, 1984), hipóxia, hipoglicemia e hiperinsulinemia (Ribeiro-da Silva *et al.*, 1986, Ribeiro-da Silva *et al.*, 1989). A proteína é ativa por várias vias de administração (IP, IV, IM, SC), mas mostra-se inócua quando administrada por via oral a esses animais, provavelmente devido a sua instabilidade em meio ácido (Carlini *et al.*, 1984; Carlini & Guimarães, 1991).

Estruturalmente, em condições redutoras em SDS-PAGE, a CNTX apresenta-se como uma cadeia polipeptídica de 95 kDa. A análise em gel filtração em pH 7,5 mostra uma proteína com massa molecular de 184 kDa, sugerindo que sua forma nativa seja um dímero não covalente. Anticorpos monoclonais anti-urease ou policlonais anti-CNTX não distinguem entre as proteínas, sugerindo elevado grau de homologia. Entretanto, a CNTX apresenta apenas 30 – 40% da sua atividade enzimática sobre uréia, comparada com a urease da mesma semente (Follmer *et al.*, 2001). A baixa atividade ureolítica da canatoxina pode estar relacionada com sua forma dimérica, ou então com a presença em cada monômero de um átomo de níquel e um de zinco (Follmer *et al.*, 2001), ao invés dos dois átomos de níquel presentes na urease (Zerner, 1991).

1.3 Ação Biológica da Urease / Canatoxina

A canatoxina e a JBU foram testadas oralmente em insetos pertencentes a diferentes ordens, revelando uma potente atividade entomocida em diversos tipos de insetos. O mecanismo de ação de toxicidade aponta uma relação de dependência com enzimas digestivas acídicas nos insetos susceptíveis, como *Callosobruchus maculatus* (caruncho do feijão-de-corda), *Rhodnius prolixus* (barbeiro), *Nezara viridula* (fede-fede) e *Dysdercus peruvianus* (percevejo manchador do algodão). Estudos do mecanismo da ação entomocida da canatoxina mostraram que a proteína é "ativada" proteoliticamente no trato digestivo dos insetos sensíveis, através de clivagem que gera um peptídeo entomotóxico de 10 kDa (Carlini *et al.*, 1997; Ferreira-DaSilva *et al.*, 2000). Um peptídeo recombinante, denominado jaburetox 2Ec, equivalente ao produzido por hidrólise enzimática da canatoxina por homogenados de *C. maculatus*, foi obtido por expressão heteróloga em *Escherichia coli* (Becker-Ritt *et al.*, 2004; Mulinari *et al.*, 2004, Mulinari *et al.*, 2007). Este peptídeo mostrou-se altamente tóxico contra *D. peruvianus* (Staniscuaski *et al.*, 2005), bem como contra a lagarta do cartucho do milho *Spodoptera frugiperda*, inseto insensível a canatoxina/urease nativa, devido às características de suas enzimas digestivas (Mulinari *et al.*, 2007). O peptídeo recombinante jaburetox-2Ec não apresentou toxicidade aguda, quando administrados por via oral ou intraperitoneal, em ratos neonatos e camundongos adultos (Mulinari *et al.*, 2007)

Oliveira e colaboradores (1999) descreveram preliminarmente a atividade fungicida da canatoxina sobre alguns fungos filamentosos. Recentemente, foi demonstrada a ação antifúngica de ureases de diferentes fontes em concentrações sub-micromolares. A inibição do crescimento e germinação de fungos fitopatogênicos foi observada, mesmo quando as ureases foram pré-tratadas com o inibidor irreversível ρ -

hidroximercuribenzoato, que resulta em perda total de atividade ureolítica. Estes dados acrescentam à hipótese de um papel das ureases vegetais na proteção da planta contra fungos fitopatogênicos (Becker-Ritt *et al.*, 2007; Oliveira *et al.*, 1999).

Comparativamente, verificou-se que a urease clássica (JBU) possui, além das propriedades inseticidas e fungitóxicas, outras atividades biológicas descritas para a canatoxina, como indução de exocitose resultando em ativação plaquetária e interação com gangliosídeos. Entretanto, a JBU não é letal por via intraperitoneal em camundongos. As atividades citadas também são independentes da atividade ureolítica, como verificado através da persistência dessas após inibição da atividade ureolítica com ρ -HMB (Follmer *et al.*, 2001). Esses dados indicam a existência, nestas proteínas, de pelo menos dois domínios protéicos distintos, responsáveis por atividades biológicas diferentes: um domínio com atividade hidrolítica sobre uréia, suscetível de inibição por agentes oxidantes; e pelo menos mais um segundo domínio, responsável (eis) pela toxicidade intraperitoneal da canatoxina e outras propriedades farmacológicas compartilhadas com a urease.

2. *Cryptococcus neoformans* e criptococose

Em 1894, *Cryptococcus neoformans* foi reconhecido como patógeno de humanos e animais, além de uma levedura normalmente encontrada no meio ambiente. Por muito tempo, este fungo não foi de interesse de outras pesquisas pela baixa casuística da criptococose (Idnurm *et al.*, 2005). Com o aumento dos tratamentos com altas doses de corticosteróides (pacientes transplantados ou com desordens linfoproliferativas), o número de pacientes imunossuprimidos aumentou consideravelmente, acrescentado ainda do

número de pacientes HIV-positivos. Desde então, a criptococose tem sido uma das três doenças oportunistas mais comuns em pacientes com AIDS. Nos demais grupos citados acima, que são terapêuticamente imunossuprimidos, estima-se 6% de risco de desenvolverem criptococose clínica (Perfect, 2006). Lin & Heitman (2006) reportam dados da OMS que mostram que aproximadamente 3 milhões de pacientes infectados pelo HIV morrem por ano no mundo com complicações associadas a criptococose. O crescimento dos casos de criptococose diretamente proporcional ao aumento do número de pacientes com AIDS, fez ressurgir o interesse por estudos nessa área.

C. neoformans é uma levedura basidiomicética tradicionalmente dividida em 5 sorotipos (A, B, C, D e AD), como observado na Figura 3. *C. neoformans var. grubii* e *Cryptococcus gattii* foram isolados de fezes de pássaros de espécies e locais distintos como em psitacídeos de zoológico no sul do Brasil (Abegg *et al.*, 2006), pet shops e domicílios (Raso *et al.*, 2004). Apesar da identificação do fungo em diversos cortes histológicos de órgãos destes animais, estes se apresentavam assintomáticos. Foram relatadas também evidências de isolados de aves e fezes de psitacídeos de *C. neoformans var grubii* na Colômbia (Caicedo *et al.*, 1999) e no Brasil (Raso *et al.*, 2004). Este e outros achados são sugestivos de um padrão de transmissão zoonótica para pacientes imunocompetentes, tendo estes animais como importantes reservatórios do patógeno (Lagrou *et al.*, 2005).

Este fungo foi inicialmente identificado pela sua capacidade de produzir o pigmento melanina e uma cápsula de polissacarídeos, e posteriormente foi classificado pelo teste com antígenos capsulares e *fingerprinting* molecular (Figura 3). Os sorotipos A (*C. neoformans var grubii*) e D (*C. neoformans var neoformans*) geralmente causam a doença em pacientes imunocomprometidos. Já os sorotipos B e C (*C. gattii* descrito como

uma espécie independente por (Kwon-Chung *et al.*, 2002) causam a doença em pacientes imunocompetentes (Idnurm *et al.*, 2005).

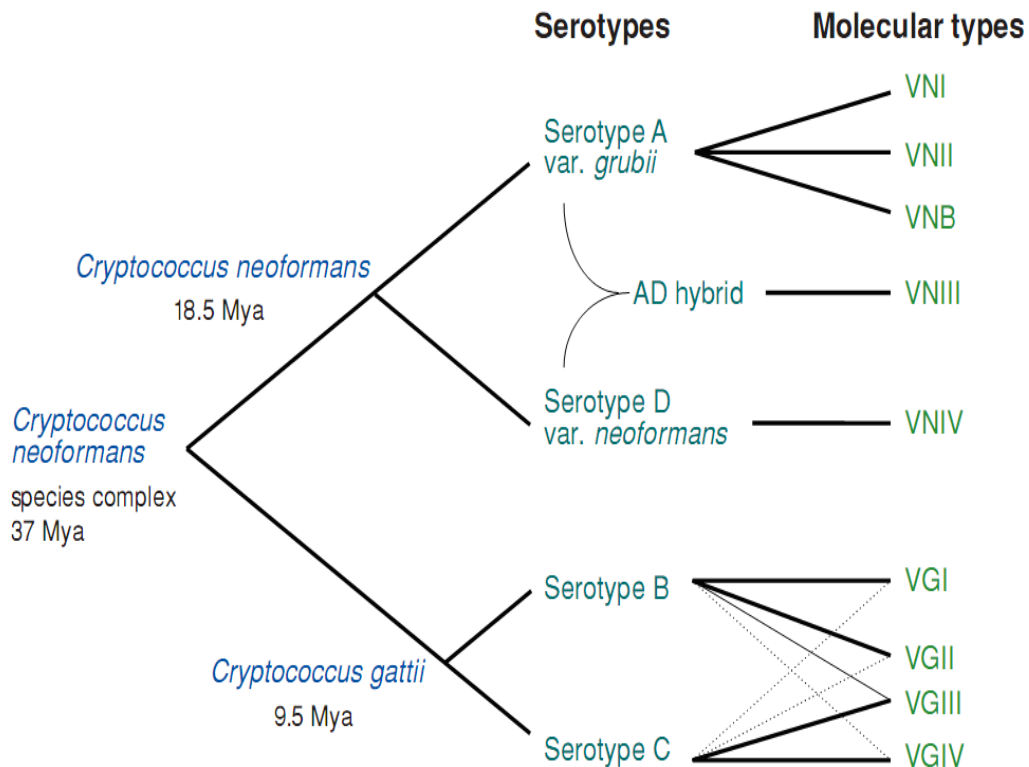


Figura 3: Classificação taxonômica de *C. neoformans* e *C. gattii* – Adaptado de Lin & Heitman (2006).

Recentemente realizou-se, no Rio Grande do Sul, uma análise epidemiológica de pacientes com meningite criptocócica, revelando que a maioria dos pacientes são homens (77%), caucasianos (83%) e infectados pelo vírus HIV (95%). A maioria dos pacientes tem entre 30 e 39 anos (46%), sendo as amostras identificadas como *C. neoformans* (95%) e *C. gattii* (4,5%) (Leal *et al.*, 2008).

O quadro inicial da doença apresenta variações de manifestação de acordo com o status do sistema imune do hospedeiro, ou padrão virulento da linhagem. Compara-se a fase latente da criptococose no complexo linfático (onde pode permanecer por anos

alojada no hilo do linfonodo) à fisiopatologia de tuberculose, que pode reativar e produzir a doença após um período inicial de infecção dormente. Indivíduos assintomáticos infectados com *Cryptococcus* são imunoreativos em teste cutâneo e em exames sorológicos específicos para o fungo. Nesta etapa, a imunidade celular é crucial na contenção da infecção, produzindo inflamação granulomatosa (Chayakulkeeree & Perfect, 2006).

Ao entrar nos alvéolos, o fungo é processado por macrófagos alveolares, recrutando outras células inflamatórias através de citocinas e quimiocinas, como interleucinas, proteínas para quimiotaxia de monócitos, etc. A doença manifesta-se como doença respiratória grave com pneumonia, formando criptococomas, mas também pode haver tropismo para o Sistema Nervoso Central, formando quadros de encefalite, meningite e meningoencefalite (Olszewski *et al.*, 2004). As terapias disponíveis para criptococose não são eficientes e a meningite criptococócica, no estágio final da doença, pode ser fatal (Rodrigues *et al.*, 1999).

No sistema respiratório, a criptococose pode apresentar nódulos múltiplos, efusão pleural, obstrução brônquica, podendo chegar a colapso pulmonar, mimetizando quadros de metástase pulmonar. Os quadros neurológicos incluem alterações de consciência, neuropatia cranial, perda de memória, letargia, dores de cabeça, irritação meningeana, chegando ao coma. Existe também formas menos comuns de criptococose, como a cutânea, a prostática e a ocular (Chayakulkeeree & Perfect, 2006). A doença no SNC torna-se fatal sem tratamento e a terapia com anfotericina B tem limitações devido ao potencial tóxico para o paciente, sendo que 10-25% dos pacientes ainda vêm a óbito por falhas no tratamento nos primeiros 3 meses após o diagnóstico (Steen *et al.*, 2003).

2.1 Ciclo de Infecção

Devido à presença de isolados clínicos com mesmo padrão molecular de isolados ambientais, foi estabelecido que *Cryptococcus neoformans* infectam humanos através da exposição ambiental (Chayakulkeeree & Perfect, 2006). O fungo está no ambiente, sendo encontrado no solo, árvores e fezes de aves, sobrevivendo em animais silvestres. A porta de entrada principal para o início da criptococose se dá pela inalação do patógeno na forma de levedura dessecada, ou como esporo. A partir daí a forma inalada se deposita nos alvéolos, podendo atravessar o endotélio de microcapilares até ultrapassar a barreira hemato-encefálica, e estabelecer infecção do SNC (Idnurm *et al.*, 2005). Ocasionalmente também pode ocorrer contaminação por via digestiva, inoculação direta por traumatismo ou por implante de tecidos e órgãos contaminados (Delgado *et al.*, 2005). Após entrada no hospedeiro suscetível, o fungo pode produzir um quadro latente ou agudo (Chayakulkeeree & Perfect, 2006)

2.2 Ciclo de Vida e Biologia do Basidiomiceto

O filo Basidiomycota compreende diversos organismos, desde o unicelular *C. neoformans* até o maior organismo do mundo (*Armillaria spp*). Os basidiomicetos mais conhecidos são os cogumelos; alguns produzem importantes metabólitos como toxinas e pigmentos. Os basidiomicetos contribuem para a reciclagem de nutrientes no ambiente formando sistemas simbióticos com plantas e suas raízes. Outros organismos são considerados patógenos de plantas, assim como *C. neoformans* é classificado como patógeno animal. Apesar de sua importância no meio ambiente, a biologia dos

basidiomicetos ainda é pouco conhecida (Idnurm *et al.*, 2005). A diversidade de nichos ecológicos de *C. neoformans* o torna uma boa ferramenta para compreensão de fungos patogênicos. A disponibilidade da seqüência completa do genoma de *C. neoformans* sorotipo A, em conjunto com seqüência parcial do *C. gattii* sorotipo B, torna este fungo uma peça chave para a comparação genômica dos filos do Reino Fungi (Heitman *et al.*, 1999, Loftus *et al.*, 2005)

C. neoformans isolados de pacientes e do ambiente encontram-se na forma leveduriforme. No entanto, pode haver uma transição dimórfica com formação de hifas (forma filamentosa) por duas rotas distintas: *mating* (ciclo sexuado) e frutificação monocariótica (ciclo assexuado) (Fraser *et al.*, 2005; Idnurm *et al.*, 2005) (Figura 4). O ciclo sexual de *C. neoformans* envolve a fusão de células haplóides *mating type a* e α para produzir filamentos dicarióticos. As variedades de *Cryptococcus* mostram diferenças na combinação entre os tipos *a* e α . Cepas de *C. gattii* de diferentes fontes são predominantemente estéreis, e mesmo quando são encontrados os dois tipos no mesmo nicho, não há evidências de recombinação. A única exceção conhecida ocorreu na epidemia de Vancouver, que será descrita a seguir no item “*C. gattii* e a Epidemia de Vancouver”.

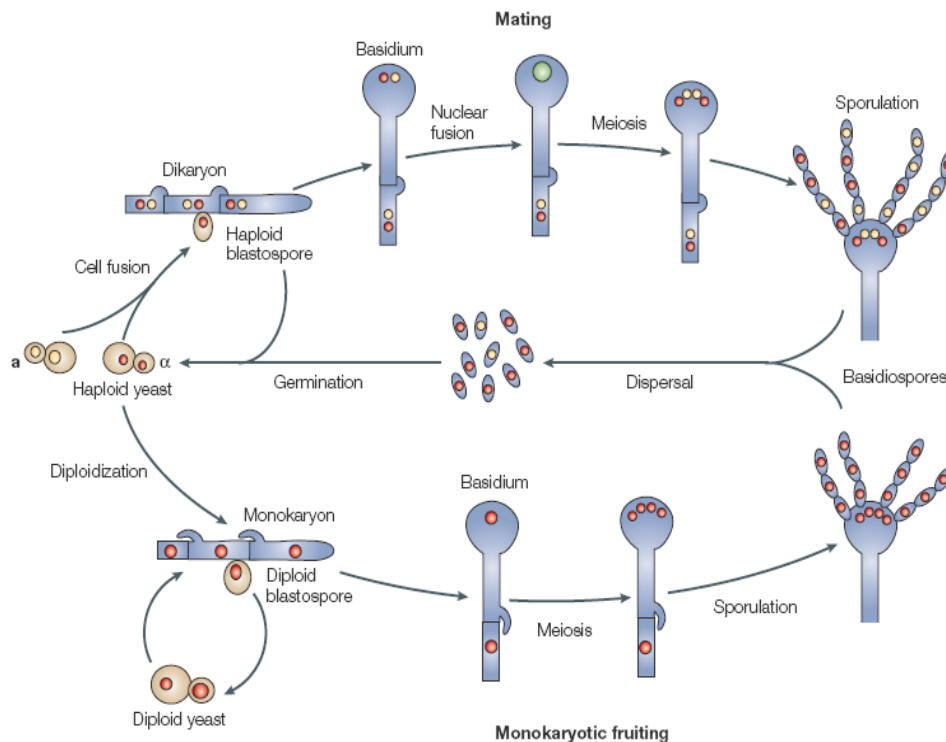


Figura 4: Modelo de Ciclo de vida de *C. neoformans*: Em resposta a limitação de nutrientes, as células do tipo **a** e **α** (*mating type*) secretam hormônios peptídicos que promovem a fusão celular. A fusão dicariótica desencadeia o crescimento filamentos. Os núcleos migram pelos filamentos, gerando células dicarióticas. Durante a frutificação monocariótica, células de um mesmo *mating type* tornam-se diplóides (α/α p.e.). A hifa diplóide passa por etapa de meiose gerando basidiósporos haplóides. Adaptado de (Idnurm *et al.*, 2005)

O *mating type* é considerado um fator de virulência de *C. neoformans*. Estudos já determinam um perfil em que o tipo α tem mais prevalência no ambiente e é mais virulento que o tipo **a**. A maioria dos isolados clínicos pertencem ao tipo α (Wickes, 2002) e linhagens do sorotipo D tipo α mostraram maior virulência quando inoculadas em cobaias (Heitmann, 1999). Linhagens tipo α foram encontradas em maior casuística de invasão do SNC (Kwon-Chung *et al.*, 2002).

2.3 Fatores de Virulência de *Cryptococcus neoformans*

C. neoformans produz fatores de virulência que o distingue de *Saccharomyces cerevisiae* e outros fungos: a cápsula de polissacarídeos, produção de melanina (Figura 5) e a habilidade de desenvolvimento a 37°C (Perfect 2006).

A melanina protege *C. neoformans* da radiação ultravioleta. Durante o desenvolvimento da doença, a melanina pode se formar pela oxidação de catecolaminas no cérebro do hospedeiro, protegendo o patógeno de radicais livres tóxicos produzidos pelo sistema imune do hospedeiro (Casadevall *et al.*, 2000). Lacases são importantes para a produção do pigmento melanina, que é um *scavenger* de radicais livres e tem função na proteção ao estresse oxidativo. A lacase também faz o seqüestro de ferro durante a infecção, levando a um rompimento oxidativo de fagócitos (Brown *et al.*, 2007). Quando em ação conjunta com fosfolipase B, a lacase promove a saída do patógeno do pulmão facilitando a penetração no SNC (Idnurm *et al.*, 2005). A prevalência de substratos para lacase no SNC foi proposta como uma possível justificativa para o neurotropismo do fungo (Steen *et al.*, 2003).

A cápsula polissacarídica está diretamente relacionada com a sobrevivência celular em condições de desidratação. Uma família de genes controlam a biossíntese de uma cápsula variável e complexa, capaz de interferir no processo de fagocitose por macrófagos (McFadden *et al.*, 2006). A cápsula bloqueia o recrutamento de células inflamatórias, além de agir na depleção do sistema complemento e supressão de sinalização de hipersensibilidade que influenciaria diretamente a produção de anticorpo durante o processo infeccioso (Steen *et al.*, 2003).

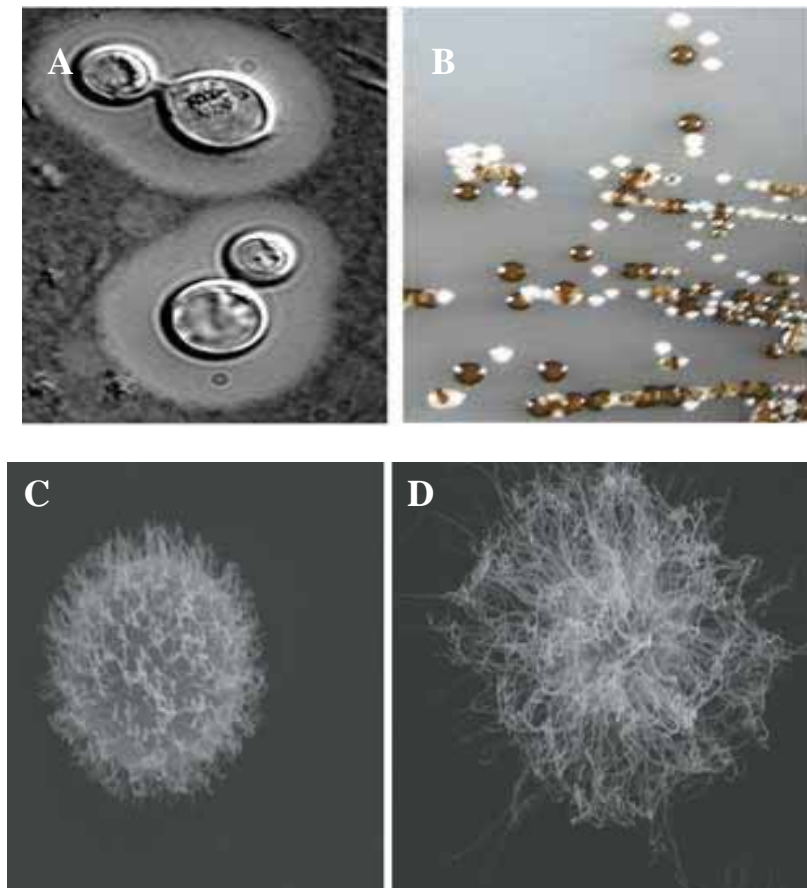


Figura 5: Fatores de virulência de *C. neoformans*. A; presença de cápsula de polissacarídeos (CPS) produzida em presença de açúcares. B; Produção de melanina observada pela coloração marrom a negra em contraste com a levedura patogênica *Candida albicans*, que forma colônias brancas em meio Agar niger. (Adaptado de Idnurm *et al*, 2005) C; Imagem 3D em microscopia de varredura de cápsula menor e D; formação aumentada da CPS (adaptado de Mc Fadden *et al*, 2006).

A capacidade do *C. neoformans* de crescimento na temperatura corporal de mamíferos (termotolerância) é uma característica fundamental para invasão do hospedeiro (Perfect , 2006). O desenvolvimento a 37°C está associado a transição para forma de levedura, sendo também importante na virulência de *Histoplasma capsulatum*, *Paracoccidioides brasiliensis* e *Blastomyces dermatidis* (Kraus *et al.*, 2004). No gênero *Cryptococcus*, somente as espécies *C. neoformans* e *C. gattii* são capazes de crescer em

temperatura superior a 30°C. Este comportamento está relacionado a genes como *RAS1* (codifica proteínas de ligação GTP) e ao gene *CNA1* (codifica a calcineurina), uma proteína necessária para resposta ao estresse e integridade celular em levedura. Visando identificar importantes fatores que permitem a sobrevivência do fungo no SNC, coelhos têm sido usados como modelos para investigação da meningite criptocócica, por terem uma temperatura corporal mais alta (39,5°C), que somado ao uso de corticosteróides, mimetiza o ambiente do hospedeiro com quadro infeccioso: com febre e imunodeprimido (Steen *et al.*, 2003).

Como já citado no item do ciclo de vida do basidiomiceto, o *mating type* (particularmente MAT α) é considerado fator de virulência, estando presente na grande maioria de isolado clínicos (Wickes , 2002). O *Mating* no mundo microbiano justifica a diversidade genética e produz linhagens que podem colonizar novos nichos ambientais. No parasito *Toxoplasma gondii*, a meiose pode produzir isolados mais patogênicos através da recombinação de duas cepas menos virulentas. No patógeno de plantas *Ustilago maydis*, o *mating* é essencial para a infecção (Fraser *et al.* 2005) . A produção de manitol pela levedura, verificada em cultivos e em coelhos infectados, sugere que seu papel esteja relacionado a quadros de edema cerebral e proteção ao ataque de neutrófilos durante a infecção, já que mutantes com baixa produção de manitol são mais suscetíveis ao estresse térmico e osmótico, com menor patogenicidade (Rodrigues *et al.*, 1999; Steen *et al.*, 2003). Além dos fatores já mencionados, ainda há enzimas associadas à proteção contra danos oxidativos (peroxidases p.e) (McClelland *et al.*, 2005).

2.4 Urease e Criptococose

A importância da atividade ureásica na patogenicidade do fungo ainda está em debate. Cox *et al.* (2000) demonstraram que camundongos infectados com mutantes urease-negativos de *C. neoformans* apresentaram uma maior porcentagem de sobrevivência do que os infectados com cepas controles urease positivas. Até o momento, dos gêneros de fungos com urease estudados, apenas a urease de *Coccidioides immitis* e *Cryptococcus neoformans* têm sugestão de importância no papel de patogenicidade (Mirbod *et al.*, 2002).

Olszewski *et al.* (2004) realizaram estudos com linhagens urease negativas/positivas, com inoculação por vias distintas em camundongos, especulando a importância desta proteína na disseminação global da infecção em diversos órgãos, e constataram o papel da urease como facilitadora de infestação no sistema nervoso central, via seqüestro nos microcapilares cerebrais. Recentemente, a identificação de um gene URE 2, que possivelmente codifica uma proteína acessória envolvida na biossíntese no metalocentro da enzima, isolado de uma cepa urease negativa de um paciente com meningite criptocócica, levantou mais perguntas em relação à urease como fator de virulência (Varma *et al.*, 2006).

Ainda não se conhece o mecanismo pelo qual a urease facilita o seqüestro do *C. neoformans* em microcapilares. Postula-se que a hidrólise da uréia próxima ao endotélio poderia promover adesão do fungo ao endotélio, ou que a liberação de amônia resultaria em toxicidade celular, afetando astrócitos e fragilizando as junções celulares da barreira hemato-encefálica. Uma função da urease como fator de virulência num mecanismo mais complexo, não dependente da atividade ureolítica, é sugerido por Olszewski *et al.* (2004) e Varma *et al.* (2006).

Recentemente, foi realizado um estudo comparando linhagens de *C. gattii* e *C. neoformans* quanto a atividade ureásica verificada em cultivo em meio Christensen. Os resultados obtidos mostram que *C. neoformans* produz mais urease que *C. gattii*. Os autores justificam que a ocorrência das cepas altamente patogênicas de *C. gattii* possuem baixa atividade ureásica comparada com *C. neoformans* pode estar relacionada com a atividade de outras enzimas (lacase, fosfolipase p.e) e que estas formam um conjunto que colabora para a virulência destas linhagens (Torres-Rodrigues *et al.*, 2008).

Ainda em 2008, Rodrigues e colaboradores identificaram 76 proteínas em vesículas extracelulares secretadas por *Cryptococcus neoformans*. Análises por proteômica permitiram verificar que muitas destas proteínas são classificadas como fatores de virulência e com função de proteção contra *stress* oxidativo. Testes bioquímicos indicaram ainda a presença de atividade ureolítica e de lacase nestas vesículas.

2.5 *Cryptococcus gattii* e a Epidemia de Vancouver

Antes de 1999 não havia evidências de infecções por *C. gattii* na Ilha de Vancouver – Canadá. Este patógeno era normalmente encontrado em nichos de árvores (Chayakulkeeree & Perfect , 2006) e restringia-se a regiões de clima tropical e subtropical (Austrália, Sudeste da Ásia, África Central e regiões tropicais e subtropicais das Américas). Estudos revelaram que 44% dos pacientes com criptococose na Austrália causada por *C. gattii* eram aparentemente imunocompetentes (Chen *et al.*, 2000). A súbita emergência de vários isolados em Vancouver mostrou que a ecologia e distribuição de *C. gatti* estava mudando. Estudos do ambiente da ilha apontaram uma surpreendente

alteração no nicho ambiental desta espécie, com habitat em uma variedade de árvores de clima temperado (Kidd *et al.*, 2004).

A epidemia de Vancouver de 1999 a 2003 foi documentada como a maior do mundo, com casuística 10 a 40 vezes mais alta do que a da Austrália, onde *C. gattii* é considerada endêmica (Kidd *et al.*, 2004). Como já descrito, o *mating type* é um fator de virulência reconhecido (Fraser *et al.*, 2003).

Na epidemia de Vancouver verificou-se que todos os isolados foram classificados como *mating type* α e, através de PCR *fingerprinting* e AFLP, foi constatada a presença de dois genótipos. A grande maioria dos isolados clínicos e ambientais pertenciam ao tipo hipervirulento VGII/AFLP6. Posteriormente, a análise genotípica mostrou que as cepas da epidemia eram clones e descendiam de dois ancestrais do mesmo *mating type* (α) – denominada *same-sex mating*. Estes isolados também foram muito mais virulentos quando testadas em modelos animais. Uma minoria de isolados significativamente menos virulentos compartilhavam um genótipo idêntico de isolado férteis, de uma população recombinante da Austrália. Este mesmo estudo também constatou a elevada virulência da principal linhagem isolada de Vancouver (R265) em ensaios com infecção intranasal em cobaias, produzindo maior mortalidade comparada a outras linhagens, principalmente em relação ao isolado australiano avirulento (cepa R272) (Fraser *et al.*, 2005).

Em relação ao quadro clínico, a localização preferencial de *C. gattii* é no parênquima cerebral e não na meninge, resultando numa maior prevalência de criptococomas cerebrais, ou hidrocefalia, após instalação do quadro respiratório inicial. Os pacientes com envolvimento do parênquima cerebral acabam por desenvolver aumento da pressão intracraniana, neuropatia craniana e baixa resposta à terapia antifúngica (Kozel 1995, Mitchell 2006).

Objetivos

Este trabalho teve o objetivo de purificar e caracterizar a urease de *Cryptococcus gattii* linhagem hipervirulenta R265.

Objetivos específicos

- ✓ Avaliar condições diferentes de meio de cultura, temperatura e tempo de crescimento para lise celular.
- ✓ Desenvolver um protocolo de purificação para a Urease de *Cryptococcus gattii*, a partir de agora denominada CGU;
- ✓ Caracterizar a enzima purificada quanto a aspectos físico-químicos e cinéticos;

Justificativa

Tendo em vista dados da OMS e Programas de controle HIV/AIDS das Nações Unidas que registram três milhões de óbitos por ano de pacientes infectados pelo HIV com complicações associadas a criptococose, e hoje enquadra-se entre as três doenças oportunistas mais comuns em pacientes HIV positivos (Lin & Heitman, 2006). Somando-se a estes dados, os perigos com a meningoencefalite criptocócica se agravam pela característica de *C. gattii* acometer pacientes imunocompetentes.

A presença de urease em *C. gattii* levanta hipóteses sobre a sua importância na patogenia da criptococose, principalmente no estabelecimento do estágio neurológico da doença. No entanto, estes estudos ainda não são conclusivos sobre a função e rota de patogenicidade da urease de *C. neoformans* ou *C. gattii*. Até então não há publicações a respeito desta enzima purificada.

Pretende-se, a partir da purificação, identificar propriedades físico-químicas e cinéticas da urease de uma linhagem altamente virulenta, responsável por elevada casuística de criptococose em pacientes imunocompetentes. Futuramente, a CGU poderá ser uma valiosa ferramenta investigativa na virulência das diversas formas de criptococose.

Metodologia

1- Origem dos Isolados

As linhagens de *C. neoformans* e *C. gattii* utilizadas neste trabalho pertencem a coleção do laboratório de Biologia de Fungos de Importância Médica e Biotecnológica, do Centro de Biotecnologia da UFRGS.

Inicialmente, no período de pré-ensaios, foram testadas linhagens de origens e sorotipos distintos a fim de detectar a presença da urease nestes isolados. Foram testadas as seguintes linhagens:

- HC6: *C. neoformans* var. *grubii*, sorotipo A, mating type α , tipo molecular VNI, amostra clínica isolada de liquor de paciente HIV+ do Hospital de Clínicas - Porto Alegre (RS)
- AL33: *C. gattii*; sorotipo B; mating type α ; tipo molecular VGIII; amostra clínica isolada de paciente HIV- no Hospital Santa Casa de Misericórdia – Porto Alegre (RS)
- R265 (cepa hipervirulenta) e R272: *C. gattii*; sorotipo B; mating type α ; tipo molecular VGII. Isolados clínicos da epidemia de Vancouver (Canadá); gentilmente cedida pelo Dr. Wieland Meyer (Universidade de Sidnei-Austrália).

2- Condições de Cultura

Na etapa de padronização de meio de cultivo ideal para posterior rompimento da cápsula celular foram testados:

- Meio Sabouraud: Glicose 2 g; Peptona 1 g; Extrato de levedura 0,3 g; água destilada qsp 100 mL.

Para rompimento celular de células sem cápsula:

- Meio Mínimo: 15 mM Glicose; 10 mM potássio fosfato dibásico; 10 mM fosfato de magnésio; 13 mM Glicina; 3 mM Tiamina (Martinez & Casadevall , 2006).

2.1-Condições de Lise Celular para Obtenção do Extrato Bruto.

Com objetivo de otimizar condições de lise celular e rompimento de cápsula ou simplesmente na lise celular, a linhagem selecionada foi submetida a diferentes meios de cultivo e métodos de lise descritas na Tabela 1.

Tampão para lavagem e lise celular:

- Tampão A: 20 mM fosfato de sódio, 1 mM EDTA, 5 mM 2-mercaptoetanol, pH 7.5

Tabela 1: Diferentes condições testadas para otimizar rendimento enzimático na obtenção do extrato bruto (EB).

<i>Meio</i>	<i>Tempo de cultivo*</i>	<i>Etapa intermediária**</i>	<i>Lise</i>
Sabouraud	20h	Liofilização	maceração celular em nitrogênio líquido
Sabouraud	48h	Liofilização	maceração celular em nitrogênio líquido
Sabouraud	20h		pérolas de vidro 450-600 µm
Meio Mínimo	20h		pérolas de vidro 450-600 µm
Meio Mínimo + Uréia 100mM, 1µM Ni	24h		pérolas de vidro 450-600 µm
Meio Mínimo + Uréia 100mM, 1µM Ni	48h		pérolas de vidro 450-600 µm
Meio Sabouraud	20h	Novozym 234® ^A e PMSF ^B a 37°C por 2h	pérolas de vidro 450-600 µm
Meio Sabouraud	20h	Novozym 234® a 37°C por 2h	pérolas de vidro 450-600 µm
Meio Sabouraud + 2,9% NaCl	20h		pérolas de vidro 450-600 µm
Meio Mínimo + 2,9% NaCl	20h		pérolas de vidro 450-600 µm

* Condições de cultivo fixadas em 30°C e 150 RPM.

**Todas as condições passaram por centrifugação, lavagem e ressuspensão das células precipitadas no tampão A.

^ANovozym 234 ® (Novo Biolabs - Dinamarca) concentração 1 mg/mL, descrito por (Barreto *et al.*, 1997)

^BPMSF: concentração final 1 mM

Foi adotada a condição de cultivo em meio mínimo coma adição de 2,9% de NaCl Após o crescimento de 4 litros de cultura, as células foram lavadas e centrifugadas em 3 ciclos (23.000 x g, por 20 min a 4°C, rotor GSA, centrífuga Sorvall RC5B) com tampão A, pH 7,5.

A lise celular foi realizada com ressuspensão das células no mesmo tampão em proporção 30% (w/v), e adição de pérolas de vidro 450-600 μm (Sigma-Aldrich), em razão de 50% do volume. Foram realizados 20 ciclos em vórtex por 1 minuto, alternados em gelo. Após centrifugação 23.000 x g por 30 min. a 4°C, o sobrenadante foi recolhido, filtrado em filtro não estéril 0,45 μm e dialisado contra o tampão A em membrana com 14.000 Da de cutt-off. Esta fração passou a ser denominada Extrato Bruto (EB).

3- Determinação do Conteúdo de Proteínas

A determinação do conteúdo de proteínas das amostras e durante as etapas de purificação foi feita através da medida da absorbância de luz ultravioleta em comprimento de onda de 280nm (A_{280}), em cubetas de quartzo com 1 cm de passo óptico, em espectrofotômetro (UV/Vis Spectrophotometer Hitachi, California-Estados Unidos).

Alternativamente, foi utilizado o método de Bradford: em placa de 96 poços foi incubado volume de 5 μL de amostra em 250 μL de Reagente de Bradford. Após 1 hora de reação em temperatura ambiente, foi feita a leitura de absorbância a 595 nm. Uma curva padrão com albumina sérica bovina (BSA) na faixa de 0,1 a 2 μg foi utilizada como referência (Bradford, 1976). As placas foram analisadas em espectrofotômetro Spectra Max $\text{\textcircled{R}}$ (Molecular Device).

4- Determinação da Atividade Enzimática

A atividade ureásica foi medida por método colorimétrico com reagente de fenilnitroprussiato–hipoclorito (Weatherburn, 1967), que se baseia na quantificação de amônia liberada a partir da hidrólise da uréia. Uma unidade de atividade ureásica foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μmol de amônia por minuto, em 20 mM NaPB pH 7,5 à 37°C.

O ensaio, realizado em placa de 96 poços, analisou alíquotas de frações das etapas de purificação tamponadas em 20mM NaPB pH 7,5 e incubadas com 10 mM de uréia (concentração final) em um volume reacional de 100 μL , a 37°C. Uma curva padrão com sulfato de amônio na faixa de 1 a 3,5 μg foi realizada para quantificação enzimática das amostras. As placas foram analisadas em espectrofotômetro SpectraMax®.

5- Urease da *Canavalia ensiformis*

A urease utilizada no trabalho para finalidade de comparação com CGU foi preparada a partir de sementes maduras de *Canavalia ensiformis*, conforme descrito por (Follmer *et al.*, 2004b).

6- Cromatografias

Em todas as cromatografias, as amostras foram previamente dialisadas contra o tampão de equilíbrio da resina, como descrito nas etapas a seguir. Os tampões para as cromatografias utilizando o sistema FPLC (Pharmacia LKB Biotechnology ®) foram

previamente filtrados com filtro 0,45 μm PVDF (Millipore®) e deaerados. As cromatografias foram sempre realizadas a 4° C.

6.1 Cromatografia Troca Aniônica em Q-Sepharose ®

Tampão de Equilíbrio: Tampão A -20 mM fosfato de sódio (NaPB), 1mM EDTA, 5mM β -mercaptoetanol; pH 7,5

Tampões de Eluição: Tampão A com adição de 100, 200, 300, 400, 500, e 1000 mM NaCl; pH 7,5

O EB dialisado foi colocado em contato com a resina Q-Sepharose (Amersham-Biotech Pharmacia) numa proporção de 5 A_{280} de proteína por mL de resina por 2 horas. Recolhida a fração proteica não retida, a resina foi lavada com o tampão A, e então foram realizadas as eluições, com gradiente descontínuo de 100 mM a 1M de NaCl no tampão. As frações com atividade de interesse foram reunidas e preparadas para a etapa subsequente.

6.2 Cromatografia Troca Aniônica Source 15-Q ®

As frações do *Pool* de eluição da etapa anterior foram dialisadas e concentradas em cartucho Centriprep ® com cut-off de 30 kDa (Millipore) e filtradas em filtro 0,45 μm , Millipore.

A coluna Source 15-Q (GE-Lifesciences), montada em sistema FPLC (Pharmacia) e monitorada por A_{280} , foi equilibrada em tampão A, pH 8,0, e posteriormente eluída com um gradiente contínuo de NaCl no tampão A, realizado em duas etapas: 0-275 mM em 20 mL e 275 a 500mM de NaCl em 20mL. As frações com atividade de interesse foram reunidas e preparadas para a etapa subsequente.

6.3- Cromatografia de Gel filtração em Superose 6

A coluna Superose-6 HR 10/30 (GE-Lifesciences), montada em sistema FPLC (Pharmacia) e monitorada por A_{280} , foi equilibrada em tampão A, pH 8,0 e calibrada com padrões na faixa de 14 kDa a 669 kDa. O *pool* rico em atividade ureolítica da etapa anterior foi concentrado em Cartucho Centricon® (Millipore) com cut-off 10kDa, e aplicado na coluna em alíquotas de 0,2 mL por corrida, com fluxo máximo de 0,2 mL/min, com coleta de frações de 300 μ L.

7- Caracterização Enzimática

7.1 pH Ótimo

A determinação do pH ótimo para CGU foi realizada no intervalo 4 a 10. Para a faixa de pH 4,0 – 5,5 foi utilizado tampão acetato de sódio 50 mM. A faixa de pH 6,0 a 10,0 foi tamponada com NaPB 50 mM. A capacidade de tamponamento da amostra de proteína foi confirmada com medida em fita de pH com margem de pH 0-14 (Merck®). Os ensaios foram conduzidos incubando-se 0,3 μ g da proteína com o tampão, em temperatura ambiente por 10 minutos. Após foi adicionado o substrato (10 mM Uréia),

incubando por 15 minutos a 37°C. O ensaio realizado, no mínimo duas vezes e em triplicata, gerou um gráfico com desvio padrão a ser analisado em Resultados.

7.2 Estimativa de K_m e V_{max}

A determinação dos valores de K_m e V_{max} foi realizada com o substrato uréia variando em concentrações finais de 0,1 a 10 mM. A CGU (0,3 μ g) foi incubada com o substrato a 37°C por 20 minutos. Os resultados foram calculados através do software GraphPad Prism Version 3.02.

7.3 Sensibilidade a Inibidores

A atividade ureolítica da fração purificada de CGU foi analisada na presença do inibidores AAH (ácido acetohidroxâmico) e ρ HMB (ρ -hidroxi-mercuriobenzoato).

Foram testadas concentrações de AAH variando de 2,5 a 100 μ M, incubadas com 75 ng de CGU diretamente nos poços da placa por 18 a 24 h, a 4°C. A atividade ureolítica residual foi medida na presença do inibidor, com 10 mM de uréia a 37°C.

Para inibição com ρ HMB foi necessário remover o β -mercaptoetanol do tampão, por diálise contra 20 mM NaPB, 1 mM EDTA, pH 8.0. Concentrações de 2,5 a 200 μ M de ρ HMB foram incubadas com 38,5 ng de CGU por 18-24h a 4°C. A atividade ureolítica residual foi medida na presença do inibidor, com 10 mM de uréia a 37°C.

7.4 Estimativa de Massa Molecular

A massa molecular da proteína nativa foi determinada na gel filtração em Superose 6, em três corridas distintas. O volume de eluição do pico de atividade ureolítica foi interpolado em uma curva de calibração na faixa de 14 a 669 kDa, que gerou uma equação com R^2 0,9703.

Paralelamente, foi realizada análise da proteína desnaturada em condições redutoras em SDS-PAGE, utilizando-se com padrões de massa molecular BenchMark[®] Protein Ladder (Invitrogen). As bandas de proteína nos géis foram digitalizadas em sistema de fotodocumentação (Biorad [®]) e analisadas com software 1-D analysis Quantity One 4.6.3 (Bio-Rad Lab Inc.).

8 Eletroforese

Análises por eletroforese em SDS-PAGE foram realizadas para avaliação das etapas de purificação e análise de massa molecular de CGU.

As eletroforeses foram realizadas de acordo com Laemmli *et al.* (1970), utilizando-se géis com 10% poliacrilamida (1,0 ou 1,5 mm de espessura) em condições desnaturantes e redutoras. As quantidades de material aplicadas no gel, bem como os padrões de massa molecular utilizados, estão descritos no respectivo experimento.

Eventualmente, as alíquotas a serem aplicadas no gel foram previamente precipitadas com ácido tricloroacético (TCA) a 20%, por 12h a 4°C, seguida de centrifugação e lavagem com acetona 100%. A proteína precipitada foi solubilizada no tampão de amostra, no volume a ser aplicado no gel. Os géis foram corados com Coomassie Blue coloidal ou revelados por nitrato de prata, conforme Wray *et al.* (1981).

9 Ensaios Imunológicos

Com a finalidade de identificar a CGU nas diferentes etapas de purificação em condições nativas ou desnaturadas, foram realizados imun-ensaios tipo Dot Blot, Western Blot e ELISA contra anticorpos policlonais anti-CNTX ou anti-jaburetox- 2Ec (peptídeo entomotóxico de JBU), conforme Towbin *et al.* (1979).

9.1 Western Blot

Após separação por SDS-PAGE, as proteínas foram transferidas por gravidade para uma membrana PVDF com poro de 0,45 μm (Hybond-P Amersham Bioscience) previamente ativada em metanol, imersa em tampão Tris-SDS-glicina pH 8,3 com 20% metanol, por 16 a 18 horas para a transferência. Todas as etapas foram realizadas sob leve agitação e em temperatura ambiente, e precedidas de três lavagens com TBS. A membrana foi bloqueada com 5% de leite desnatado em TTBS por 2 horas, e depois incubada com anticorpo primário anti-CNTX (IgG de coelho, produzida conforme Follmer *et al.* (2001), em solução TTBS com 1,5% de leite desnatado, na diluição v/v de 1:2.500, por 2 horas (ou *overnight* a 4° C). Seguiu-se incubação com anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado com fosfatase alcalina (Sigma Chem. Co) por 2 horas, em diluição 1:20.000.

A revelação da fosfatase alcalina fixada foi feita com uma solução de 0,03% de nitroblue tetrazolium (NBT) e 0,015% de 5-bromo-4-cloro-indoil-fosfato (BCIP), em tampão 10 mM Tris-HCl pH 9,6, contendo 100 mM NaCl e 5 mM de MgCl_2 , à temperatura ambiente, até o desenvolvimento da cor desejada.

Como controle positivo dos imuno-ensaios, utilizou-se a JBU em concentrações equivalentes ou inferiores às amostras a serem testadas.

9.2 Dot Blot

Para os ensaios de Dot Blot, alíquotas de até 20 μL , pipetadas em séries de 2 μL em cada ponto até atingir a concentração desejada da proteína na forma nativa, foram aplicadas em membrana de nitrocelulose Hybond-ECL (GE-Lifesciences).

Semelhante a técnica de Western-Blot , cada etapa foi precedida de lavagens com TBS. Após a secagem da membrana, esta foi bloqueada com 5% leite desnatado em TTBS por 2 horas, seguindo-se a incubação com anticorpo primário anti-CNTX (1:5000) por 2 horas. A incubação com anticorpo secundário e revelação foram realizadas conforme descrito no item 9.1.

9.3 ELISA

Placas para ensaio imuno-enzimático (Maxisorb® Nunc, Rochester) foram sensibilizadas com 50 μL de amostra das proteínas nativas por poço, diluídas em tampão TBS, por 1 hora em temperatura ambiente seguido de 16 horas a 4°C. Entre as etapas seguintes, foram feitas três lavagens dos poços com 100 μL de TBS.

Os poços foram bloqueados com 5% de caseína em TBS por 1 hora, e a seguir incubados com os anticorpos primário e secundário, nas mesmas condições descritas para o Dot-Blot.

A revelação foi feita com 50 μ L/poço de solução contendo 1mM de p -nitrofenilfosfato em 10 mM Borato de sódio, 0,25 mM $MgCl_2$, pH 9,0, por 30 minutos a 37°C, e a cor desenvolvida foi determinada a 405 nm em leitor de placas Spectarmax®.

Para imunoreatividade com anticorpos anti-CNTX, foram testadas aliquotas de 7 ng a 2,5 μ g de CGU e JBU. Nos ensaios de imunoreatividade para IgG anti-Jaburetox 2EC, foram testadas concentrações de 30 ng a 2,5 μ g de CGU, JBU e SBU (soybean urease purificada conforme Follmer *et al.*, 2004a).

10 Ensaio Biológico: Agregação plaquetária

A medida de agregação plaquetária foi feita por turbidimetria conforme Born & Cross (1963). Plasma rico em plaquetas (PRP) foi preparado a partir de sangue de coelho coletado da artéria auricular na presença de citrato de sódio na concentração de 0,31% (v/v). As amostras foram centrifugadas a 200 x g por 15 minutos em temperatura ambiente. A agregação plaquetária, precedida de *shape change*, foi analisada em um Lummi-agregômetro (Chrono-log Co.) por um período mínimo de 3 até 10 minutos, como descrito por Olivera-Severo *et al.* (2006a).

Alternativamente, o ensaio de agregação plaquetária foi realizado em placa de 96 poços, fundo plano, conforme Olivera-Severo *et al.*, (2006a). Para tal, 50 μ l da amostra diluída em solução salina foram pipetadas nos poços, e a reação de agregação foi iniciada com a adição de 100 μ l da suspensão de plaquetas. A placa foi incubada por 2 minutos a 37°C sob agitação antes do início das leituras, e as leituras foram realizadas a

cada 10 segundos por 30 minutos, em comprimento de onda de 650 nm em Spectramax®. Foi utilizado como controle positivo, 1µg de colágeno de tendão bovino (Sigma-Aldrich®).

11 Análise das Seqüências

As seqüências de aminoácidos de JBU (M65260); a isoforma JBURE-II (AAN08919); e o peptídeo tóxico recombinante de JBU – Jaburetox 2EC (Mulinari *et al.*, 2007) foram comparadas com a seqüência parcial deduzida do cDNA de *Cryptococcus gattii* (AAZ07872), a seqüência de 833 aminoácidos a partir do cDNA de *C. neoformans* (Q5KCQ6); a urease de *Helicobacter pylori* (subunidade A: CAA02043; Subunidade B: AAD05651) e a urease de *Schizosaccharomyces pombe* (CAB52575). Foram utilizadas ferramentas auxiliares para estudos comparativos com auxílio de alinhamentos realizados no BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) and Clustal W (Larkin *et al.*, 2007) em www.ebi.ac.uk/clustalw.

Dados teóricos a respeito do perfil e características físico-químicas foram determinadas com simulação utilizando a seqüência de aminoácidos predita a partir do cDNA de *C. neoformans* com auxílio do site ExPASy Prot Param Tool que está no site <http://ca.expasy.org/cgi-bin/protparam>.

Resultados

1. Seleção da Linhagem

Numa etapa de triagem e escolha da cepa deste estudo, foram feitas análises de quantificação enzimática dos isolados HC6, VG4, R265 e R272, cultivadas em 100mL meio Sabouraud por 20h a 30°C, com lise celular por liofilização, seguido de maceração em nitrogênio líquido. Todas apresentaram perfis semelhantes de rendimento enzimático e atividade específica. Portanto, a cepa R265 foi selecionada devido ao seu elevado potencial de virulência.

2. Crescimento e Lise Celular

Com a finalidade de obter um extrato bruto da cepa R265 com maior estabilidade e rendimento de urease, foram testadas condições diferentes de meio de cultivo e técnicas de lise celular, considerando também a otimização de tempo, e segurança na manipulação das células.

A condição que apresentou melhores resultados em relação a rendimento enzimático foi crescimento em meio mínimo com adição de 2,9% NaCl (Cavalcante *et al.*, 2007). Sendo este protocolo fixado como padrão para os critérios estabelecidos todas purificações realizadas.

A cada 5 ciclos de vortex, uma aliquota do material era recolhida, corada com nigrosina, e analisada em microscopia óptica (1.000 vezes de aumento). Os 20 ciclos de agitação com pérolas de vidro geraram o padrão de ruptura celular demonstrado na Figura 6.

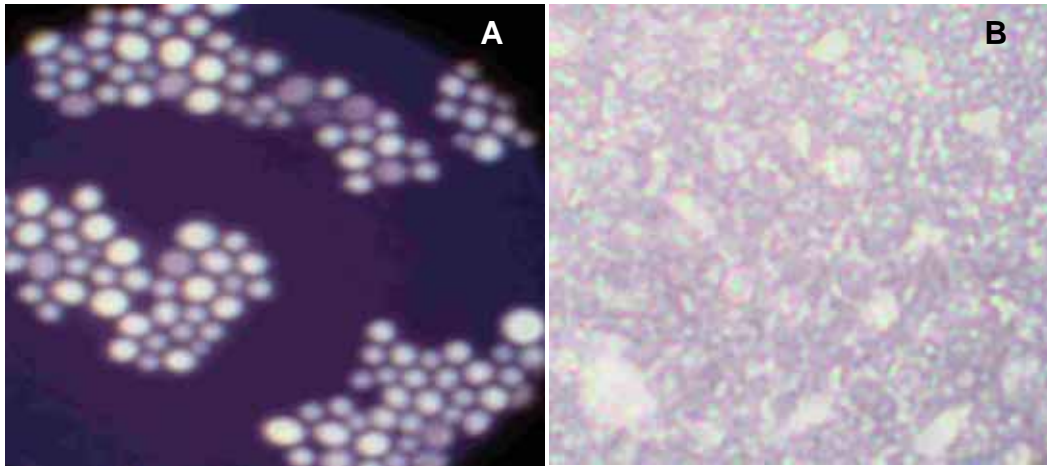


Figura 6: Imagem comparativa de células de *C. gattii* R265 antes e após lise com pérolas de vidro. A; células íntegras. B; células lisadas após 20 ciclos em vórtex com pérolas de vidro. Imagem realizada em microscopia óptica (Zeiss) com 1.000 vezes de aumento, lâminas coradas com nigrosina. Imagem produzida por Claudia Egres do Laboratório de Fungos de Importância Médica e Biotecnológica, Centro de Biotecnologia.

3. Purificação da CGU

A metodologia empregada para obtenção da Urease de *Cryptococcus gattii* cepa R265 compreendeu duas etapas de cromatografia de troca iônica (Q-Sepharose e Source 15Q, respectivamente) e uma etapa de gel filtração em Superose 6.

O extrato bruto (EB) de aparência levemente leitosa, após diálise e diluição adequada (20X), apresentou uma quantificação proteica semelhante em A_{280} , quando comparada à medida feita pelo método de Bradford. O EB aplicado na resina Q-Sepharose resultou em média em 48% de proteínas não retidas. A Figura 7 demonstra o perfil de eluição das proteínas retidas, obtido com o gradiente descontínuo de NaCl.

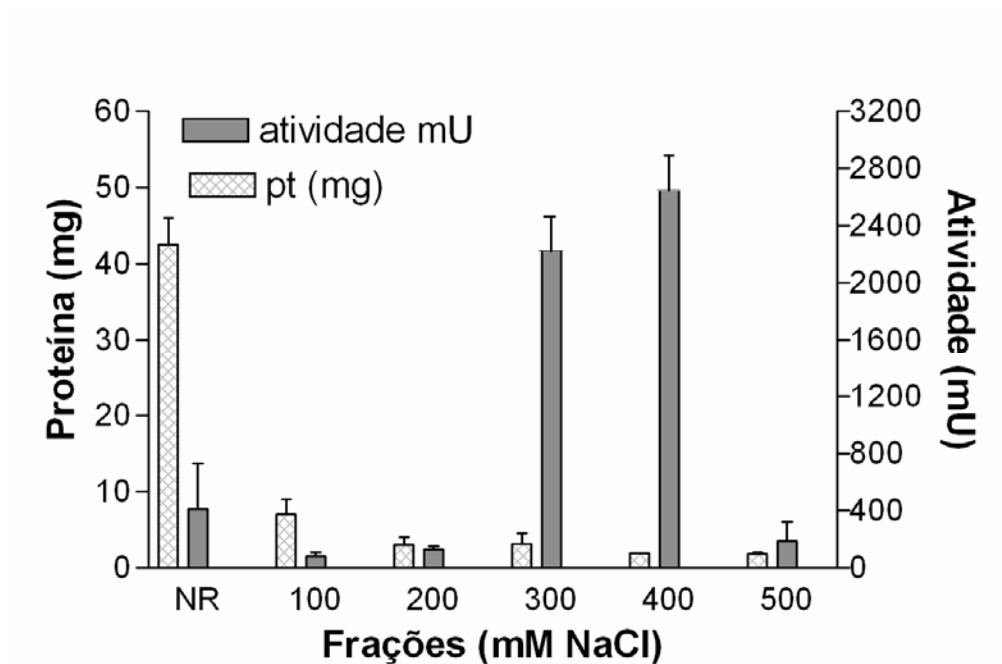


Figura 7: Perfil de Eluição na troca iônica em Q-Sepharose da CGU presente no EB.

As barras mostram a quantificação de proteína total em A_{280} e a atividade ureolítica total (mU) das frações obtidas na cromatografia. NR; Fração não retida na resina. Médias e desvio padrão de, no mínimo, quatro purificações.

As frações eluídas com 300 e 400 mM NaCl, ricas em urease, foram reunidas em um *pool* denominado Q, concentrado três vezes em cartucho Centriprep (YM 30 kDa) e dialisado contra o tampão A, pH 8,0. Antes de aplicar o *Pool-Q* na próxima etapa de cromatografia, a amostra foi filtrada em filtro não estéril 0,45 μm .

A segunda etapa compreendeu uma cromatografia de troca iônica em coluna Source 15Q. A eluição foi realizada duas fases de gradiente contínuo, de 0 a 500mM de NaCl no tampão de equilíbrio (Tampão A).

- 0-55% tampão A em 20 mL
- 55-100% tampão A em 20 mL

A eluição de CGU ocorreu entre 65 e 75% do gradiente de eluição, correspondendo a 325 a 375 mM de NaCl. A Figura 8 ilustra o perfil obtido para pico de atividade ureolítica nessa etapa.

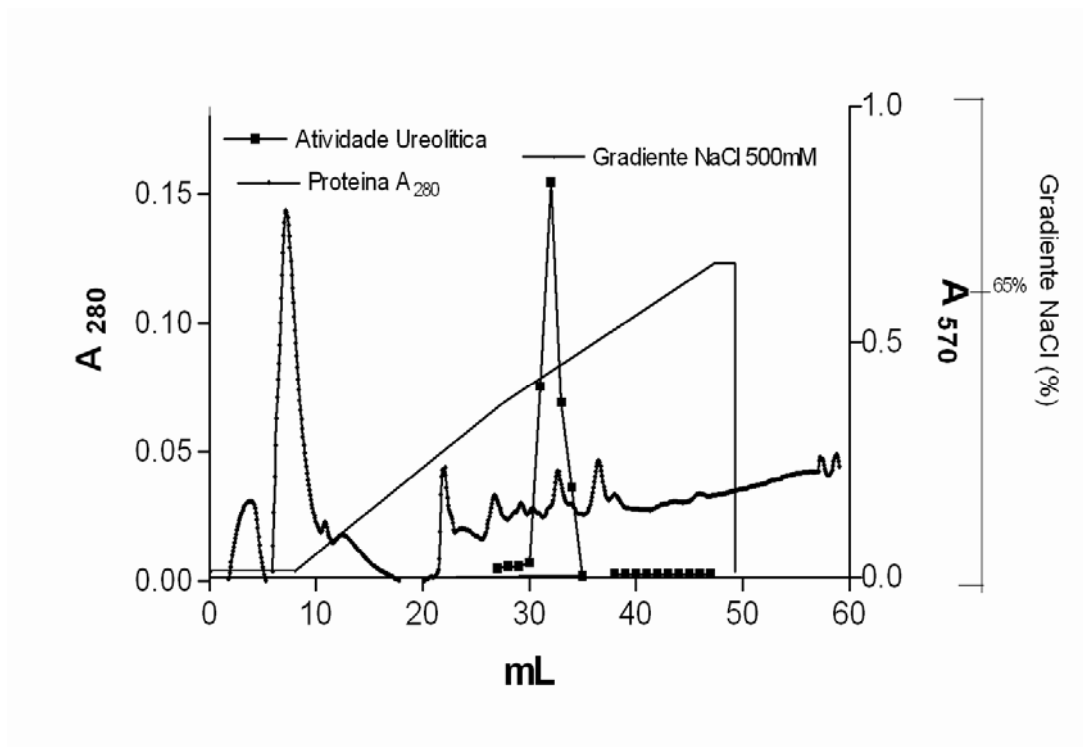


Figura 8: Perfil de eluição da cromatografia de troca iônica Source 15 Q.

Troca iônica realizada em sistema FPLC, pH 8.0, com gradiente de eluição com 0-275 mM NaCl em 20mL, 275-500 mM de NaCl em 20mL. Fluxo 0,5 mL/min., coleta das frações por picos em A_{280} . O pico de atividade eluído entre 325 e 375 mM NaCl foram reunidos no *Pool* denominado SQ.

O *Pool* SQ foi concentrado em Centricon (YM 10) até obtenção de leituras 0,5 a 0,8 A_{280} /mL, e aplicado na coluna Superose 6, com um máximo de 200 μ L de amostra por corrida. A CGU foi eluída entre 15,2 e 15,4mL, conforme ilustra a Figura 9.

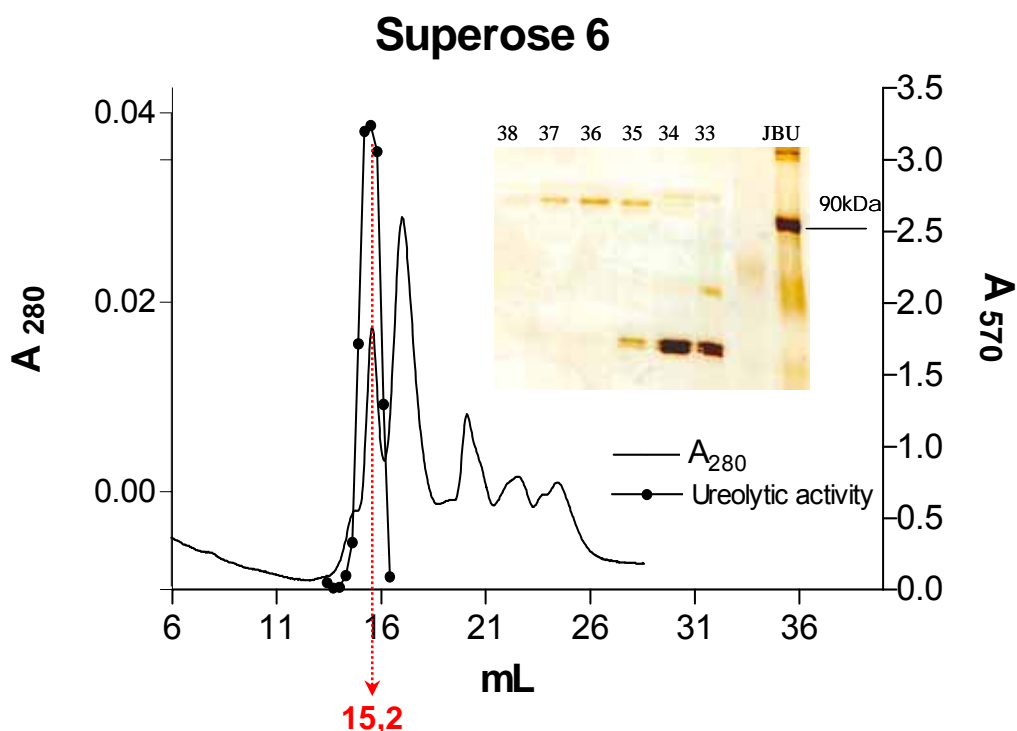


Figura 9: Perfil de eluição em gel filtração Superose 6. Seta (→) indica o volume de eluição correspondente ao pico de atividade. Frações de 300 µL foram analisadas em SDS-PAGE 10% poliácridamida (Figura interna) com 1 µg de proteína em todas as canaletas, corado com nitrato de prata. As frações 36 e 37 não apresentaram contaminantes visíveis, formaram o *Pool 1* (S6¹); já as frações 35 e 38, com uma banda acima de 90 kDa e atividade ureolítica elevada, apresentaram alguns contaminantes, e foram reunidas no *Pool 2* (S6²); a JBU foi utilizada como padrão de massa molecular.

O protocolo de purificação desenvolvido permitiu obter a CGU em bom grau de pureza em três etapas, com um rendimento de 20%. A tabela 2 apresenta dados resumidos de todas as etapas efetuadas.

Tabela 2: Purificação da urease de *Cryptococcus gattii*

Etapa	Vol (mL)	Proteína Total (mg/mL)	Enzima Total (mU)	Atividade Específica (mU/mg)	Rendimento Enzimático %	Índice de Purificação (x)
EB	100	2,100	6930	33	100	1
Q	50	0,150	5105	667	73	20
SQ	0,6	0,500	1752	5482	23	117
S6 ¹	1,2	0,065	1157	17807	20	539
S6 ²	0,8	0,081	707	10424	10	315

EB: extrato bruto; **Q:** *Pool* de atividade em 300 e 400 mM NaCl troca iônica pH 7,5 Q-Sepharose; **SQ:** *Pool* de atividade em 325-375mM NaCl troca iônica pH 8,0 Source15Q; **S6¹:** *Pool* 1 de atividade em gel filtração Superose 6 correspondente a fração 36 e 37; **S6²:** *Pool* 2 de atividade em gel filtração Superose 6 correspondente a fração 35 e 38.

4. Caracterização

4.1 Estimativa de Massa molecular

A determinação da massa molecular na forma nativa da CGU foi realizada através de seu comportamento na coluna Superose 6 equilibrada em pH 8,0. O volume médio de eluição da CGU (Figura 9) em todas as corridas não apresentou variações superiores a 200 μ L (15,2 e 15,4 mL), correspondendo a uma massa molecular aparente de 120 kDa.

Na determinação da CGU em condições desnaturantes e redutoras, as análises em SDS-PAGE 10% poliacrilamida mostraram uma única banda presente nas frações do pico

de atividade ureolítica, provenientes de gel filtração. A análise feita pelo software Quantity One ® estimou em 103 kDa a massa banda correspondente a CGU nos géis (Figura 10).

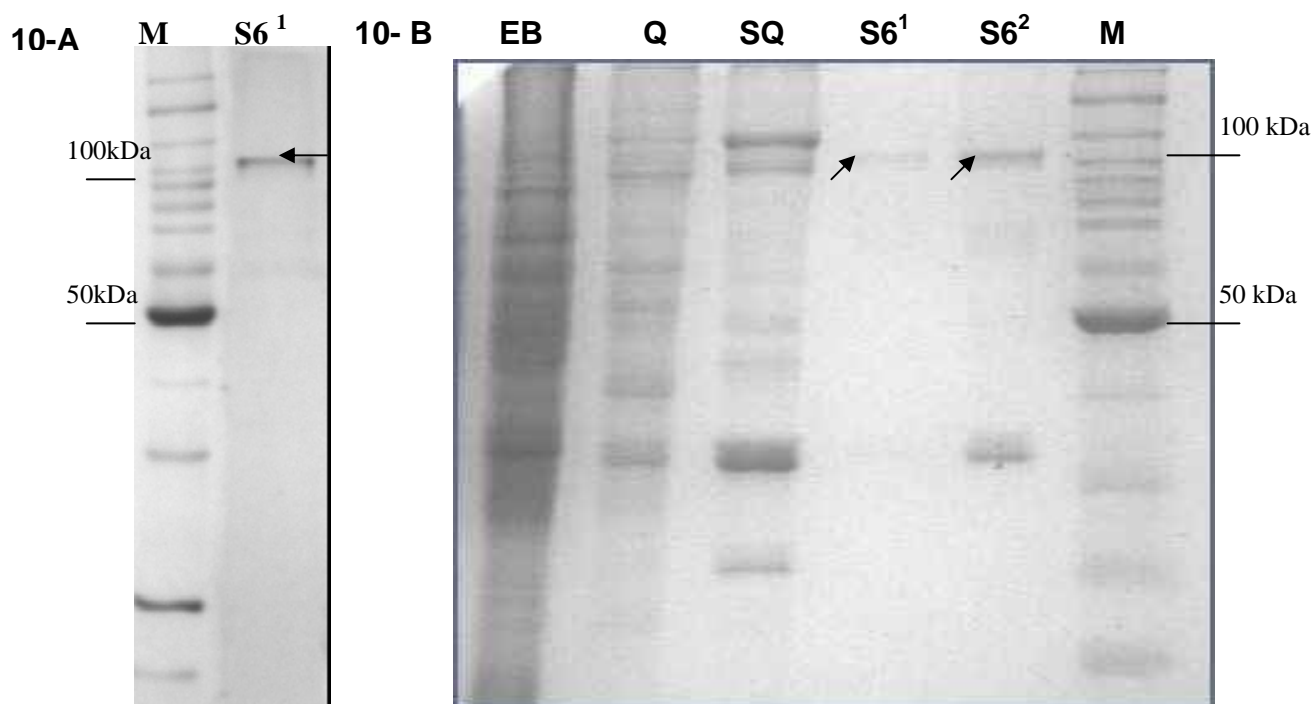


Figura 10: Análise das frações por eletroforese. SDS-PAGE 10%. 10-A gel corado com nitrato de prata; **M:** Marcadores de massa molecular; **S6¹** : *Pool* 1 da Superose 6, 1µg. **10-B** gel corado com Coomassie Blue; **EB:** extrato bruto, 80µg ; **Q** *Pool* da Q-Sepharose, 60µg; **SQ:** *Pool* da Source 15Q, 30µg **S6¹**: *Pool* 1 Superose 6, 15µg ; **S6²**: *Pool* 2 da Superose 6, 20 µg. Setas indicam a banda correspondente a CGU, com 103 kDa.

4.2 pH ótimo

O pH ótimo para a atividade ureolítica da CGU foi avaliado no intervalo de pH 4 a 10, como mostrado na Figura 11. O máximo de atividade ocorreu em pH 8,0, sendo que 75 e 85% da atividade máxima se mantêm entre os pH 7,5 e 8,5. O ensaio foi realizado

comparativamente com JBU, que como a maioria das ureases já descritas, tem o pH ótimo em 7,5.

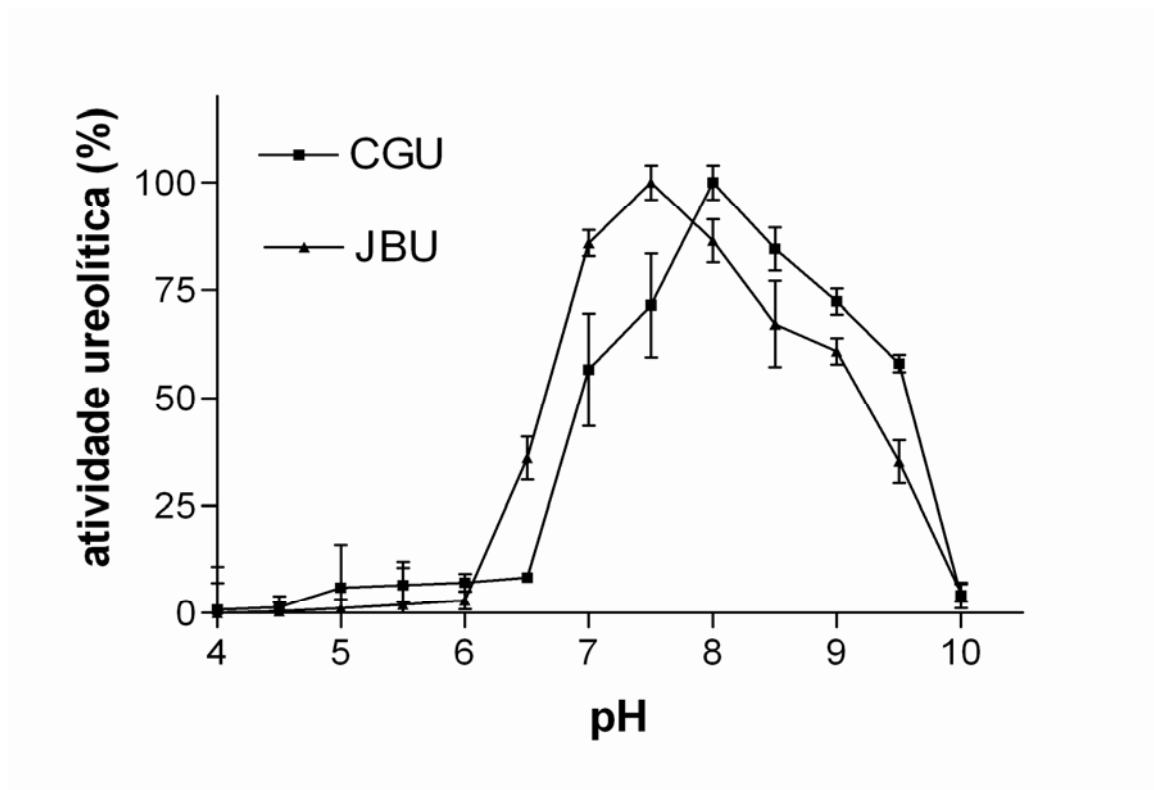


Figura 11: pH ótimo para CGU comparativamente a JBU. Valores típicos em dois experimentos, média de triplicatas e atividade CGU/JBU realizados simultaneamente nas mesmas condições (10mM Uréia, 37°C, 10 minutos).

4.3 Determinação de K_m e V_{max}

Parâmetros cinéticos de K_m e V_{max} para a CGU purificada foram determinados em ensaios em triplicata, com variação na concentração de uréia de 0,1 a 10 mM. Os valores obtidos foram avaliados no software Graphpad Prism®, que gerou uma curva de

Michaelis-Menten, com um R^2 de 0,9952. Os valores estimados foram K_m de 2,009 mM uréia e V_{max} de 10,46 mU (34,86 mU/mg), como ilustra a Figura 12.

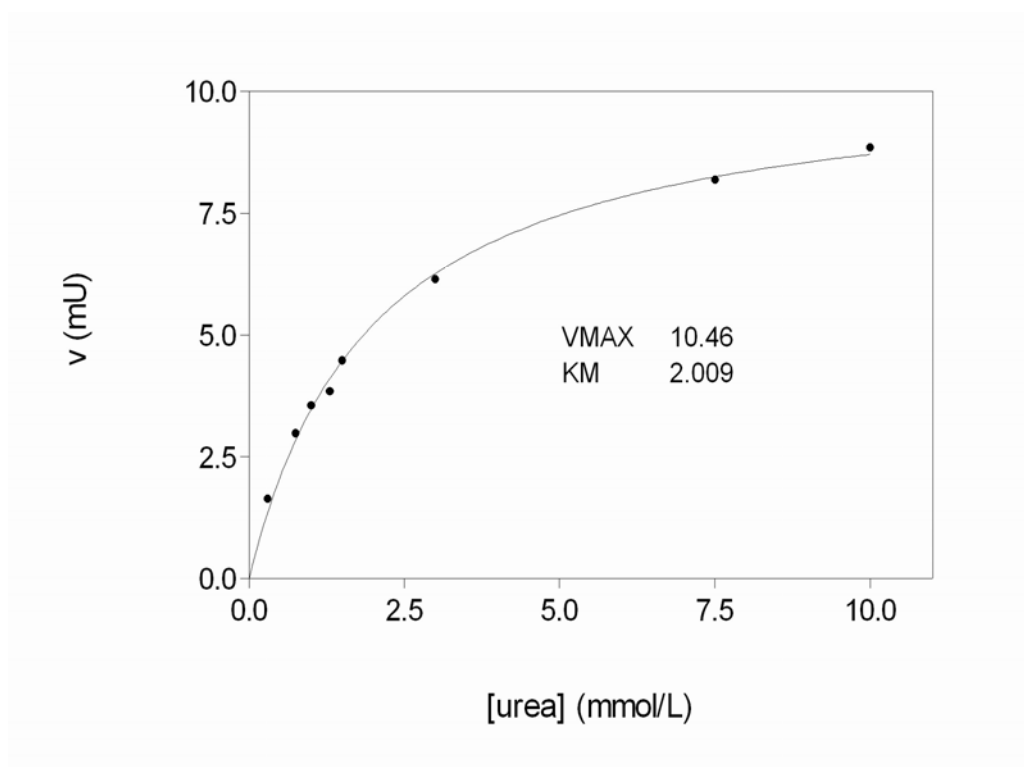


Figura 12: Determinação da constante de Michaelis-Menten (K_m) e Velocidade máxima (V_{max}). Enzima purificada (*Pool S6*, 0,3 μ g) incubada com substrato uréia em concentração de 0,1 mM a 10 mM por 20 minutos a 37°C, pH 8,0. Valores típicos em três experimentos em triplicata.

4.4 Sensibilidade a Inibidores

A atividade enzimática foi avaliada na presença de inibidores ácido acetohidroxâmico (AAH) e p -hidroximercuribenzoato (p -HMB). A Figura 13 ilustra que o AAH, um agente quelante dos íons níquel, foi mais eficiente na redução da atividade ureolítica do que o p -HMB. A tabela 3 apresenta os dados de cinética da CGU, incluindo

IC₅₀ para os inibidores, comparativamente a outras ureases vegetais estudadas pelo nosso grupo.

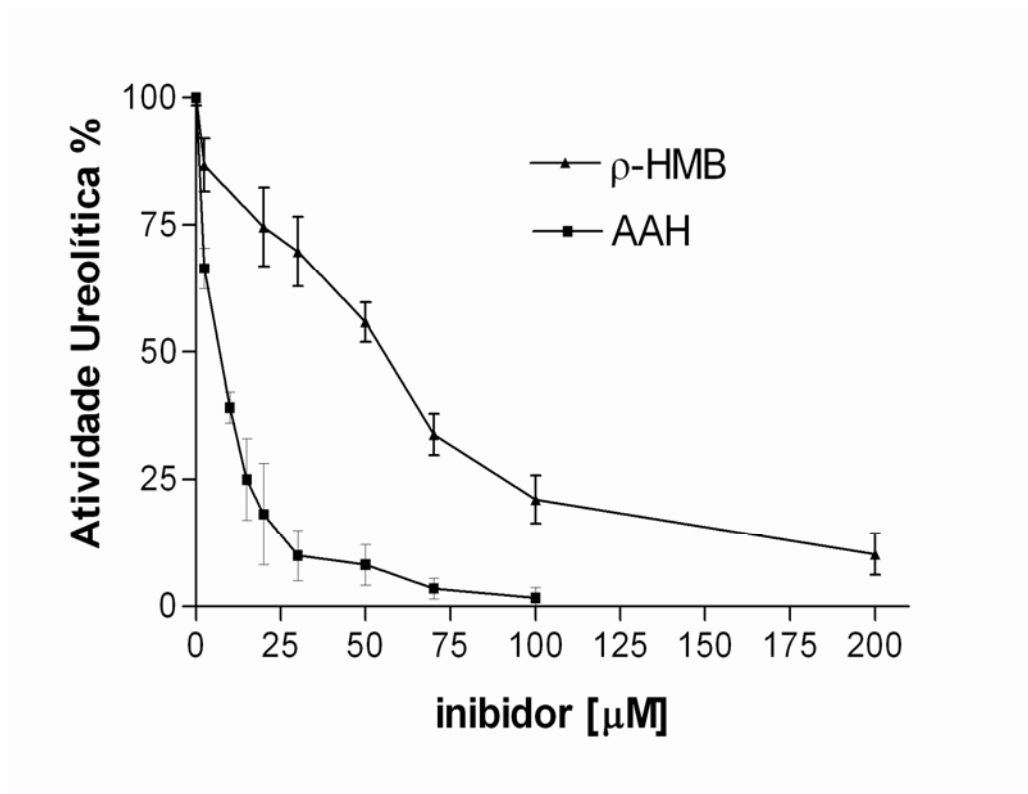


Figura 13: Perfil de Inibição de CGU na presença do inibidor ácido acetohidroxâmico e ρ -hidroximercuriobenzoato. Considera-se 100% da atividade, o controle da mesma quantidade de CGU sem a presença de inibidor. Média e desvio padrão de três repetições em triplicatas.

Tabela 3: Comparação de parâmetros cinéticos da urease purificada de *Canavalia ensiformis* (JBU), *Glycine max* (SBU, embrião específica), *Gossypium hirsutum* (GHU) e *Cryptococcus gattii* (CGU).

	GHU ^a	SBU ^b	JBU ^c	CGU ^d
Propriedades Físico-Químicas				
Massa Molecular (kDa), SDS-PAGE Forma Nativa	98,3 Hexâmero	93,6 Hexâmero	90,7 Hexâmero	~120 Monômero
Atividade Ureásica				
K _m (uréia, mM)	0,12-0,15	0,2-0,6	2-3,6	1,67-2,32
V _{max} (U/mg)	29	1.600	13.700	17,8
pH Ótimo	7,5	7,5	7,5	8,0
IC₅₀^e				
p-hidroxi-mercuribenzoato	59	38	70	131
ácido acetohidroxâmico	152	216	42	36

^a (Menegassi *et al.*, 2008). ^b (Follmer *et al.*, 2004a). ^c (Follmer *et al.*, 2001). ^d Este trabalho. ^e 50% da concentração inibitória expressa em moles de inibidor por mole de urease.

5. Ensaio Imunológicos

Estes ensaios foram realizados para comparar a imunoreatividade da urease purificada de *Cryptococcus gattii* com ureases de outras fontes. O anticorpo utilizado foi uma preparação de IgG policlonal anti-CNTX de *Canavalia ensiformis*, desenvolvido contra a proteína nativa, sendo o sinal obtido no ensaio para JBU considerado como

100% (controle positivo). Foram realizados experimentos com a enzima na forma nativa e desnaturada, testada contra diferentes concentrações com anticorpo policlonal anti-CNTX.

5.1 Western Blot

Alíquotas de CGU purificada e semi-purificada de até 80 µg foram transferidas para membrana PVDF e testadas com baixas diluições de anticorpo primário anti-CNTX (1:2.500), em contato com a membrana por até 16 horas. O controle positivo JBU apresentou elevada imunoreatividade nas mesmas condições, enquanto as amostras de CGU não apresentaram qualquer reação, nas condições desnaturantes realizadas neste ensaio (dados não demonstrados).

5.2 Dot Blot

Amostras provenientes de etapas distintas de purificação indicaram uma baixa imunorreatividade da CGU purificada, em comparação com JBU (Figura 14). Frações com menor grau de pureza por vezes apresentaram imunorreatividade maior do que a enzima purificada, sugerindo um processo de desnaturação parcial da CGU durante o processo de purificação.

Amostra	JBU	CGU -EB	CGU-Q	CGU-S6 ¹
Proteína				
0,25µg		nt	-	nt
0,5µg		nt	-	nt
0,75µg		nt	-	nt
1µg		nt	-	-
2,5 µg		nt	-	-
3 µg	nt	-	nt	
5µg	nt	-	nt	
10µg	nt		nt	nt
15µg	nt		nt	nt
30µg	nt		nt	nt

Figura 14: Dot-Blot contra anticorpos anti-CNTX de frações da purificação da urease de *C. gattii* . JBU: Urease de *Canavalia ensiformis*; CGU-EB: Extrato bruto de *Cryptococcus gattii*; CGU-Q: Pool da Q-Sepharose; CGU-S6¹: Pool 1 da Superose 6. nt : não testado; - : ausência de reação

5.3 ELISA

Comprovando os dados de Dot-blot, a Figura 15 ilustra a baixa imunoreatividade (aproximadamente 10%) obtida para 2 μg de CGU purificada, na forma nativa, frente a anticorpos anti-CNTX, comparada à resposta da mesma massa de JBU ensaiada nas mesmas condições.

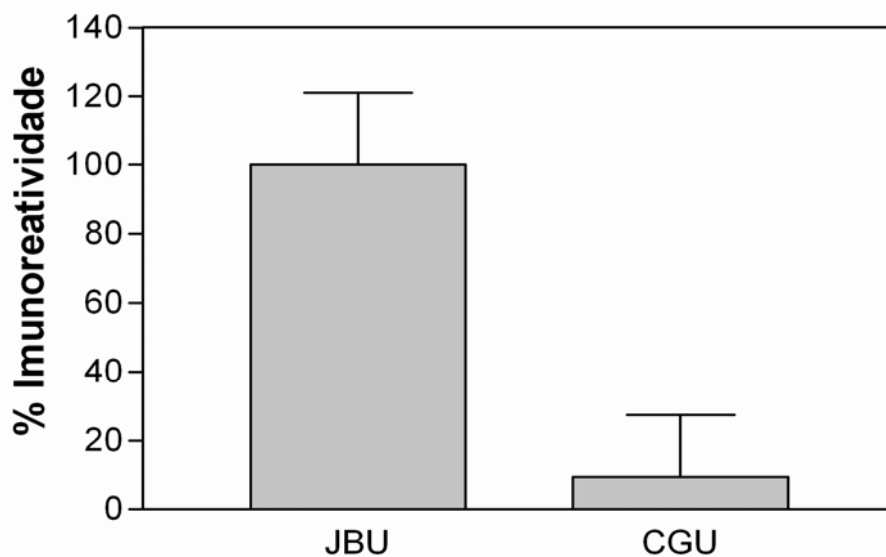


Figura 15. Ensaio de Elisa para comparar a imunoreatividade cruzada da urease de *C. gattii*. Para o ensaio foi utilizado 2 μg de cada uma das amostras. **JBU:** urease de *Canavalia ensiformis*, **CGU:** urease de *C. gattii*. Média e desvio padrão de quadruplicatas.

Nas análises por ELISA com o anticorpo contra peptídeo entomotóxico Jaburetox 2EC, não foi detectada imunoreatividade para CGU até 2,5 μg . No entanto, o mesmo anticorpo detecta amostras de JBU e SBU a partir de 30 ng (dados não demonstrados).

6. Agregação plaquetária

Foram realizados ensaios de agregação com plaquetas de coelho em agregômetro e em placa em Spectramax, com concentrações finais de CGU de 433 nM e 833 nM, considerando a forma nativa monomérica da enzima. No entanto, mesmo monitorado por até 10 min, não houve qualquer evidência de resposta das plaquetas (dados não mostrados). Em comparação, nas mesmas condições, a CNTX induz agregação plaquetária a partir de concentrações de 20 nM, considerando a forma nativa dimérica da proteína (Carlini *et al.*, 1985).

7. Análise das Seqüências preditas depositadas.

A partir da seqüência predita do cDNA de urease *C. neoformans* e com a ferramenta de simulação online do ExPASy, estimou-se a massa molecular desta proteína em 90,45 kDa e seu ponto isoelétrico teórico em 5,51.

A seqüência predita da urease de *C. neoformans*, com 833 aminoácidos, apresenta identidade de 93% em comparação com a seqüência parcial de *C. gattii*, com 146 aminoácidos, alinhando-se no primeiro terço da extremidade N-terminal. Tendo em vista a elevada identidade, a seqüência da urease de *C. neoformans* (denominada CNU) foi alinhada com as demais ureases. As Figuras 16 e 17 ilustram alguns alinhamentos realizados no Clustal W. A Figura 16 alinha seqüência de urease clássica JBU; a isoforma JBURE II; Urease de *C. neoformans* – CNU e, Urease de *C. gattii* – CGU, com

identificação das histidinas responsáveis pela coordenação dos dois íons níquel, e a identificação de cinco cisteínas adicionais.

Com a ferramenta de alinhamento BLASTp, verificou-se que CGU e JBU possuem 51% de identidade. A seqüência completa de CNU comparada com JBU, apresenta 54% de identidade. As seqüências de CNU e HPU têm 51% de identidade, semelhante ao resultado comparando-se HPU e JBU (54%). Comparando a seqüência CNU com a seqüência de 91 aminoácidos do peptídeo Jaburetox 2EC resultou em 49% de identidade. O alinhamento de seqüências de duas ureases fúngicas: *C. neoformans* e *Schizosaccharomyces pombe* (834 aminoácidos), resultou em 56% de identidade.

```

JBureII -----
JBU MKLSPREVEKLGHLNAGYLAQKRLARGVRLNYTEAVALIASQIMEYARDGEKTVAQLMCL 60
CGU -----
CNU MHLLEPRFTDKLIVTTLGTLAQRRLAGLILNRAETIALISSQLQEFIRDGRHVAELMDL 60

JBureII -MNHFNRRQVLPVAPHLLNIIQVEATLPNGTKLVTVHDPIANENGDL EEALYGSFLPVPS 59
JBU GQHLLGRRQVLPVAPHLLNAVQVEATFPDGTKLVTVHDPI SRENGELQEALFGSLLPVPS 120
gattii -----
neoformans GKKMLGRRHVRKGVPE SIHTIQVEGTFPDGVFLVTVDDPISSDDGLNNAFYGSFLPIPS 120

JBureII LDKFAESKE-EHKIPGEIICADGRLTLNPGRKAVFLKVVNHGDRPIQVGSYHFIEVNPY 118
JBU LDKFAETKE-DNRIPGEILCEDECLTLNIGRKAVILKVTSGDRPIQVGSYHFIEVNPY 179
CGU -----
CNU ADVFPAAPFPADTLGALICRKEPIKINASRRRFKLEVKNAGDRPIQVGSYHFLETNPA 180

JBureII LTFDRRKAYGMRLNIAAGDSVRFEPGDHKT VNLVSI GGNKIIRGGNAIADGPVNEANCKA 178
JBU LTFDRRKAYGMRLNIAAGTAVRFEPGDCKSVTLVSI EGNKVIRGGNAIADGPVNETNLEA 239
CGU -----ENLRET 6
CNU LIFDRLLSYGYHLDIPAGTAVRFEPGEKKTVTMVEFGGKKIFHGSGLASGSFDENLRET 240
* ::

JBureII AMEIVCRRE-FGHKEEEASEGVTGDPDCPFTKAIPREEYANKYGPTIGDKIRLGD TDL 237
JBU AMHAVRSKG-FGHEEKDASEGFTKEDPNC PFNTFIHRKEYANKYGPTTGDKIRLGD TNL 298
CGU TIKAMVEKGGFSHKQEKEVEEGPVT-----EMNRE VYASMF GPTTGDKIKLADMDL 57
CNU KVKE MVKGGFGHKDQEKVEEGPTT-----EMNRE VYASMF GPTTGDKIKLADMDL 291
.: : : * . * : : : . . . * * . . : * : * * . : * * * * * : * * : *

JBureII IAEIEKDFALYGDES VFGGK VIRDGMGQSSGHPPAMSLD TVITSAVIIDYTGIIKADIG 297
JBU LAEIEKDYALYGDEC VFGGK VIRDGMGQSSGHPPAISLD TVITNAVIIDYTGIIKADIG 358
CGU WIEIEKDYTVYGE ECKFGGK VLRDGGGQASGRYDHEVLDLVITNALIVD WNGIYKADIG 117
CNU WIEVEKDYTVYGE ECKFGGK VLRDGGGQASGRHEHEVLDLVITNALIVD WNGIYKADIG 351
* : * * * : : * * * : * * * * *

JBureII IKDGLIASIGKAGNPDIMNGVFPNMIIGV NTEVICGELIVTAGGIDCHVHYICPQSLDE 357
JBU IKDGLIASIGKAGNPDIMNGVFSNMIIGANTEVIAGEGLIVTAGAIDCHVHYICPQLVYE 418
CGU VKNGIIVGIGKAGNPDMMDGVTDGMIVGS----- 146
CNU VKNGIIVGIGKAGNPDMMDGVTDGMIVGSSTEVIAGEKLIITAGALDVH VHYICPQLMTE 411

JBureII AISSGITTVVGGGTGPTDGS RATTCTPAPTQMKLMLQSTDDIPLNFGFTGKGSGSHPDEL 417
JBU AISSGITTVVGGGTGPAAGTRATTCTPSP TQMRMLMLQSTDY LPLNFGFTGKGSSSKPDEL 478
CGU -----
CNU ALASGITTVVGGGTGPADGSNATTCTSSSFYMQNMIKATD TVPLNFGFTGKGNDSGTINAL 471

JBureII HEI IKAGAMGLKLHEDWGCTPAAIDNCLAVAEQHDIQVNIHTD TVNESGFVEHTIAAFNG 477
JBU HEI IKAGAMGLKLHEDWGSTPAAIDNCLTIAEHHDIQINIHTD TLNEAGFVEHSIAAFKG 538
CGU -----
CNU RDVIEAGACGLK VVHEDWGATPEVIDRALSI ADEYDVQVNLHSDTLNESGYVESTLAAIKG 531

JBureII RTIHTYHSEGAGGGHAPDI IKVCSMKNVLPSSNTNTRPLTSNTVDEHLDMLMVCHKLNRE 537
JBU RTIHTYHSEGAGGGHAPDI IKVCGIKNVLPSSNTNTRPLTSNTIDEHLDMLMVCHHLDRE 598
CGU -----
CNU RTIHSYHTSEGAGGGHAPDI IVVCEYENVLPSSNTNTRPYAVNTLDEHLDMLMVCHHLDKS 591

JBureII IPEDLAFASSRVREQTIAAEDILHHIGGISIISSDAQAVGRIGEVISCTWQTADMKKAER 597
JBU IPEDLAFASRRIRKKTIAAEDVLNDIGALSIISSDSQAMGRVGEVISR TWQTADPMKAQT 658
CGU -----
CNU IPEDIAFADSRIRSETVA AEDVLQDTGALSMISSDCQAMGRIGEVITRTWR TAAKMKQFR 651

```

JBureII	GPLQPDGSDNDNFRIKRYIAKYTINPAIVNGISQYVGSVEVGKLADLVIWKPSFFGAKPD	657
JBU	GPLKCDSSDNDNFRIIRRYIAKYTINPAIANGFSQYVGSVEVGKLADLVMWKPSFFGTKPE	718
CGU	-----	
CNU	GPLEGDEPTRDNNRVKRYVAKYITINPATHTGMSHLIGQVAVGCLADLVFWTAESFGARPE	711
JBureII	IVIKGGSIAWADMGDPNGSIPTPEVLMRPMYGTLGKAGSALSIAFVSKAALDLGVKVLV	717
JBU	MVIKGGMVAWADIGDPNASIPTPEPVKMRPMYGTLGKAGGALSIAFVSKAALDQRVNVLY	778
CGU	-----	
CNU	MILKGGVIAWAAMDANASIPTVQPVIGRPMWGSQPEAAALNSIVVVSQASLDKDLVKRF	771
JBureII	GLNKGWNP-----	725
JBU	GLNKRVEAVSNVRKLTKLDMKLNDALPEITVDPESTYTKADGKLLCVSEATTVPLSRNYF	838
CGU	-----	
CNU	NIKKRAEAVKNCRAIGKKDMKWNDSPKMTVDPETYDVHADGVLCDVPPADKLPLTKRYF	831
JBureII	--	
JBU	LF 840	
CGU	--	
CNU	VY 833	

Figura 16: Comparação das seqüências. Urease de *C. ensiformis* (JBU); seqüência predita da Urease de *C. neoformans* (CNU); e a seqüência parcial da urease de *C. gattii* (CGU). Os 6 resíduos de cisteínas adicionais que não se encontram em JBU ou JBUREII estão grifados na seqüência de CNU em amarelo. As histidinas, ácido aspártico e lisina carbamilada responsáveis pela coodenação dos átomos de níquel no sítio ativo estão grifadas em cinza, e encontram-se conservadas em CNU/JBU. Aminoácidos que compartilham identidade (*), similaridade na cadeia lateral (:), menos conservados(.)

A Figura 17, painel A, ilustra o alinhamento das seqüências de CNU e CGU com o peptídeo entomotóxico Jaburetox 2Ec, derivado da isoforma JBURE-IIb da *C. ensiformis* (Mulinari *et al.*, 2007). Constata-se a presença de 5 aminoácidos não conservados nas ureases fúngicas, em relação aos 14 que compõem a alça tipo grampo beta (painel B), que se acredita estar envolvidos na atividade inseticida do peptídeo jaburetox-2Ec .

A

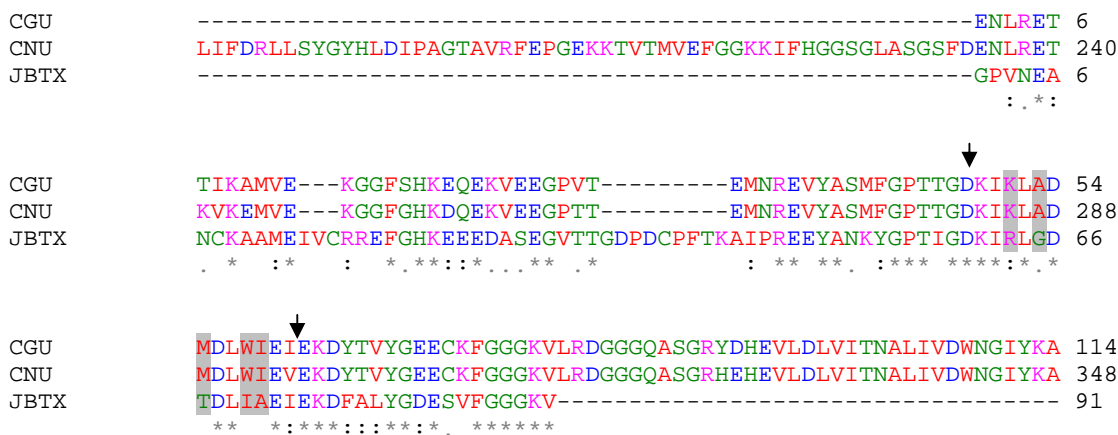
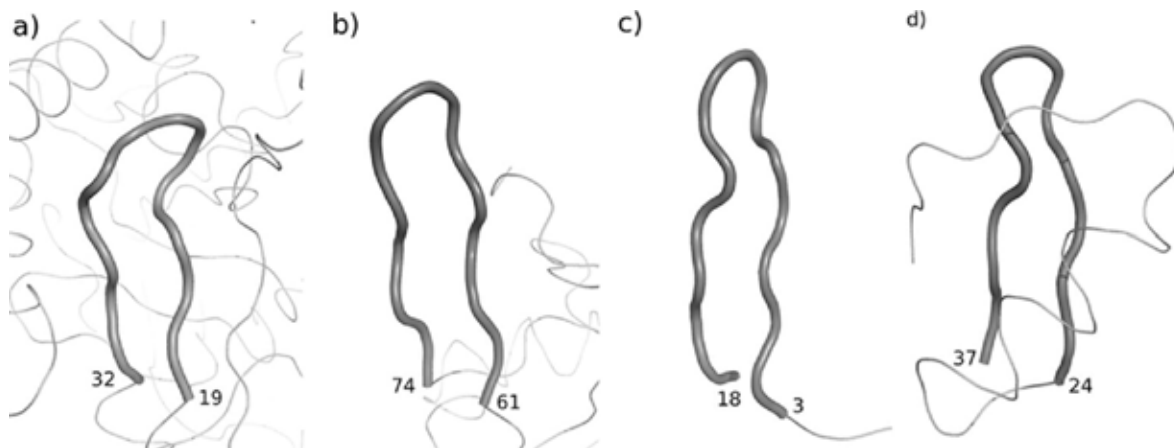


Figura 17 (painel A): comparação de seqüências de Urease de *C. neoformans* e *C. gattii* (CNU e CGU, respectivamente) alinhadas com o peptídeo Jaburetox 2EC (JBTX). Setas indicam o início e final da região da alça (painel B) no peptídeo (JBTX). Trocas não conservativas de aminoácidos estão grifados em cinza. Aminoácidos que compartilham identidade (*), similaridade na cadeia lateral (:), menos conservados(.)

B



Painel B: Representação da alça em forma de grampo beta prevista para o peptídeo jaburetox-2Ec, presente em outras ureases e proteínas inseticidas. a) Urease de *H. pylori*; b) Jaburetox- 2Ec, c) protegrin43 (PDB code 1pg1) e d) charybdotoxin44 (PDB code 2crd). (Mulinari *et al.*, 2007)

Discussão

O crescimento *in vitro* de *C. gattii*, linhagem R 265, resultou em um extrato bruto com atividade ureolítica. As diferentes técnicas aplicadas para rompimento da cápsula foram propostas por Rezwan *et al.*, (2007), que comparou métodos de lise celular para obtenção de extratos protéicos de *Mycobacterium smegmatis*, observando rendimentos mais elevados em extratos obtidos com lisozima em associação com pérolas de vidro. No entanto, a metodologia adaptada com uso de Novozyme® e pérolas de vidro, aplicada em células de *C. gattii* resultou em perdas significativas da atividade enzimática de urease.

A adição de NaCl na concentração de 2,9% é citada por (Cavalcante *et al.*, 2007) como uma técnica que inibe a produção da cápsula polissacarídica em *C. neoformans*. Este método, associado ao cultivo em meio mínimo utilizado por Martinez & Casadevall (2006), levou a uma lise celular mais eficiente ao final de 20 ciclos de lise com pérolas de vidro, elevando o rendimento enzimático do extrato bruto em até 70%, e permitindo uma manipulação segura e obtenção mais rápida do extrato bruto.

A partir do extrato bruto, foi possível a obtenção de frações purificadas de CGU em três etapas, sendo duas de trocas iônicas e uma de gel filtração. Esta sequência de cromatografias permitiu separação da atividade ureolítica já na 2ª etapa, contribuindo para a boa resolução verificada na fase de gel filtração.

A enzima purificada mostrou atividade específica (17400 mU mg^{-1}) mais alta entre as ureases fúngicas já purificadas, como a urease de *Aspergillus nidulans* (6700 mU mg^{-1}) (Creaser & Porter, 1985) e *Schizosaccharomyces pombe* ($7000\text{-}8000 \text{ mU mg}^{-1}$) (Lubbers *et al.*, 1996), ou um pouco mais próximo, a urease de *Aspergillus niger* (13410 mU mg^{-1}) (Smith *et al.*, 1993). Os valores encontrados para as ureases fúngicas são bastante inferiores aos reportados para ureases bacterianas, que variam entre 1000 e 5500 U mg^{-1} (Mobley *et al.*, 1995), ou para a JBU (13700 U mg^{-1}) (Follmer *et al.*, 2001), como observado na tabela 3.

A massa molecular da urease nativa é tipicamente verificada em cromatografia de exclusão molecular, ou gel filtração. Em geral, as ureases microbianas apresentam massa nativa entre 200 e 250 kDa, correspondendo a trómeros da unidade funcional, compostas de 3 cadeias polipeptídicas (ver figura 1). Valores anormalmente baixos (125 kDa) foram descritos para ureases de bactérias da flora ruminal, enquanto que ureases com elevada massa molecular (800 kDa ou maiores) foram constatadas em linhagens de *Morganella morgani*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, p.e (Mobley & Hausinger 1989). A massa molecular da urease de *C. gattii* estimada em gel filtração foi de 120 kDa, e a análise em SDS-PAGE identificou uma única subunidade de aproximadamente 103 kDa. Até o momento não existe relato de uma urease ativa em forma monomérica, o que torna muito interessante o estudo da enzima de *C. gattii*.

Ureases de eucariotos têm sido relatadas como estruturas multiméricas compostas por subunidades idênticas (Island & Mobley, 1995), inclusive as ureases fúngicas, como a de *Aspergillus nidulans* (40 kDa) (Creaser & Porter, 1985), *A. niger* (83 kDa) (Smith *et al.*, 1993); e a de *Ustilago violacea* (80 kDa) (Baird & Garber, 1981). A urease de *S. pombe* apresenta uma forma nativa de 212 kDa, sendo um dímero de uma única subunidade de 102 kDa (Lubbers *et al.*, 1996). Apesar de *A. nidulans* apresentar forma hexamérica semelhante a JBU, as subunidades da urease deste fungo tem menos da metade do tamanho das ureases vegetais.

A análise do ponto isoelétrico “hipotético” da urease de *C. gattii* em pH 5,5 está de acordo com outras ureases microbianas, e também vegetais, que apresentam variações de pI entre 4,1 e 5,9 (Mobley & Hausinger, 1989).

O K_m obtido para CGU inclui-se na faixa (1,0 - 4,1 mM) verificada para outras ureases fúngicas como *Aspergillus niger* (Smith *et al.*, 1993), *C. immitis* (Mirbod *et al.*, 2002), *A. nidulans* (Creaser & Porter, 1985), e *S. pombe* (Lubbers *et al.*, 1996). Mobley *et*

al. (1995) relatam que o K_m de ureases bacterianas apresenta maior variação, na faixa de 0,1 – 100 mM. A urease de *C. gattii* compartilha com outras ureases de fungos o pH ótimo em 8,0. Ureases bacterianas possuem variação de pH ótimo entre 7,0 e 7,8 (Jones & Mobley, 1989) e JBU tem pH ótimo em 7,5. De acordo com (Mirbod *et al.*, 2002), um pH ótimo da enzima entre 7,5 e 8,5 pode sugerir uma ação de alcalinização de microambiente, importante para sobrevivência do fungo durante a etapa de colonização tecidual, pós-infecção do hospedeiro. Este processo de alcalinização pode comprometer também mecanismos de defesa do hospedeiro, ou pode contribuir na travessia da barreira hemato-encefálica para colonização do SNC (Chayakulkeeree & Perfect, 2006)

O efeito de inibidores na atividade ureolítica de CGU descrita neste trabalho é similar ao relatado para outras ureases. No entanto, a concentração de pHMB necessária para inibir CGU foi significativamente mais alta do que para outras ureases. A presença de 11 resíduos de cisteína na CGU, quando comparada às 6 cisteínas encontradas em JBU e JBURE II, pode explicar o aumento da concentração inibitória de pHMB. A tabela 3 mostra que o IC_{50} da CGU para o agente oxidante p-HMB é 1,8 vezes maior do que a IC_{50} encontrada para a JBU.

Normalmente, o níquel não é considerado um metal importante na atividade biológica. No entanto, em 1975, o grupo de Dixon e colaboradores mostrou que este ion é um componente essencial para JBU (Zerner, 1984). (Blakeley *et al.*, 1969) mostraram que o ácido acetohidroxâmico, um quelante de metais, é um potente inibidor de ureases e seu mecanismo de ação envolve a ligação ao sítio de níquel da enzima. Estudos com espectroscopia em JBU evidenciaram este mecanismo (Andrews *et al.*, 1984). O perfil inibitório do AAH sobre a CGU confirma a dependência de ligação de níquel para sua atividade enzimática. A tabela 3 mostra IC_{50} similares para AAH inibindo a CGU ou a JBU,

sugerindo que as histidinas e a lisina carbamilada responsáveis pela incorporação do Ni na JBU (Figura 16) e conservadas na CNU, e também estariam preservadas na CGU.

A ausência de imunoreatividade de CGU contra anticorpo policlonal anti-CNTX (produzido contra a proteína nativa), no ensaio Western Blot, sugere ausência na CGU de epitopos estruturais típicos da JBU e canatoxina. Estes anticorpos não distinguem JBU e canatoxina e possuem alta imunoreatividade contra ureases de soja. No entanto, o reconhecimento da urease de algodão por estes anticorpos é bem mais fraco (Menegassi *et al.*, 2008). Esses anticorpos reconhecem também, ainda que fracamente, as cadeias maiores das ureases de *H. pylori* e de *B. pausterii* (dados não mostrados). No entanto, este é o primeiro relato de ausência de imunoreatividade desses anticorpos em Western blot, contra uma urease de outra espécie.

O fato de não termos observado agregação plaquetária induzida por CGU na concentração máxima de 433 nM (50µg/µL), ainda não descarta uma eventual atividade dessa proteína sobre plaquetas. Ainda que a canatoxina apresente este efeito a partir da concentração de 20 nM, atingindo atividade máxima com 400 nM em plasma rico em plaquetas de coelhos (Carlini *et al.*, 1985), para a urease de *H. pylori* esse efeito começa partir de 300 nM e para a urease de *B. pausterii*, a concentração mínima para essa atividade foi de 1,48 µM (Follmer *et al.*, 2004a; Olivera-Severo *et al.*, 2006a). Assim, novos testes com doses a partir de 400 nM de CGU deverão ser realizados para confirmar, ou não, seu eventual efeito na agregação plaquetária.

A comparação das seqüências de aminoácidos do peptídeo entomotóxico de JBU (Jaburetox 2EC); CGU e CNU revelaram modificações não conservadas em 5 dos 14 aminoácidos que formam a alça do peptídeo. Estes dados sugerem alterações estruturais e/ou de atividade biológica para a sequência equivalente derivada das ureases de *Cryptococcus*, quando comparado com o jaburetox-2Ec (Mulinari *et al.*, 2007). Estes

dados podem ser relevantes para os estudos estruturais das ureases, particularmente para as ureases fúngicas. A baixa imunorreatividade e a forma monomérica nativa sugerem uma organização estrutural diferenciada das proteínas fúngicas, nunca relatada antes para ureases.

Conclusões a respeito de uma maior produção de urease em linhagens de *C. neoformans* em relação a *C. gattii* por Torres-Rodriguez em 2008, ainda não são totalmente conclusivas, pois requerem ensaios de maior especificidade correlacionando a quantificação enzimática proporcional a alcalinização do meio Christensen provocada pela levedura.

Ao nosso conhecimento, este é o primeiro estudo sobre purificação da urease de *Cryptococcus*, considerada por vários autores como um importante fator de virulência (Chayakulkeeree & Perfect 2006), mas por mecanismos ainda não totalmente esclarecidos (Varma *et al.*, 2006). Os resultados apresentados neste trabalho e seus desdobramentos no futuro, como o estudo das atividades biológicas *in vitro* e *in vivo* da CGU, podem vir a auxiliar na compreensão dos mecanismos na patogenia do fungo *C. gattii* e o papel da urease como fator de virulência na criptococose.

Conclusões

- A inibição da produção da cápsula, com o cultivo da levedura em meio mínimo com adição de 2,9% de NaCl, facilitou a lise das células de *C. gattii* através de ciclos com agitação com pérolas de vidro.
- A urease de *C. gattii* (CGU) foi purificada em três etapas de cromatografia: duas etapas de troca iônica (Q-Sepharose e Source-15Q) e uma etapa de gel filtração (Superose 6).
- A purificação resultou na enzima purificada 539 vezes, com atividade específica de 17.807 mU.mg⁻¹.
- A CGU possui pH ótimo em 8,0, semelhante a outras ureases fúngicas, porém mais alcalino que ureases vegetais.
- O K_m estimado foi 2,0 mM de uréia e V_{max} 34,86 mU/mg.
- A inibição por AAH foi verificada em concentrações micromolares. A inibição com *p*-HMB necessitou de concentrações quase 2 vezes maiores em relação às ureases vegetais, em especial a JBU.
- As concentrações maiores de *p*-HMB necessárias para inibir a CGU são justificadas pela presença de 6 resíduos de cisteína adicionais, em comparação com as seqüências de JBU e JBUREII.
- A seqüência parcial predita da urease de *C. gattii* (CGU) e seqüência total da urease de *C. neoformans* (CNU) apresentaram 93% de identidade, permitindo a utilização da seqüência de CNU para estudos de alinhamentos em regiões importantes na atividade enzimática.
- Sugere-se que CGU pode apresentar alterações nos epitopos estruturais comuns às ureases vegetais, visto que a proteína desnaturada não apresentou imunoreatividade com anticorpo policlonal anti-CNTX, e teve baixa imunoreatividade com a proteína na forma nativa.

- Também não existe imunoreatividade com o anticorpo anti-Jaburetox 2EC. A análise de seqüências mostra 6 aminoácidos não conservados na região da CNU equivalente ao peptídeo entomotóxico, sugerindo alterações estruturais e/ou do efeito inseticida.
- A massa molecular da CGU nativa e desnaturada foi estimada em ~100-120 kDa, sugerindo sua apresentação monomérica. Este é o primeiro relato de uma urease fúngica com esta forma nativa.

Referências Bibliográficas

- Abegg, M.A., Cella, F.L., Faganello, J., Valente, P., Schrank, A., Vainstein, M.H. 2006. *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* isolated from the excreta of psittaciformes in a Southern Brazilian zoological garden. *Mycopathologia* 161, 83- 91.
- Andrews, R.K., Blakeley, R.L., Zerner, B. 1984. Urea and urease. *Adv.Inorg.Biochem.* 6, 245- 283.
- Baird, M.L. & Garber, E.D. 1981. The Genetics and Biochemistry of Urease in *Ustilago violacea*. *Biochemical Genetics* 19, 1101- 1114.
- Bandara, A.B., Contreras, A., Contreras-Rodriguez, A., Martins, A.M., Dobrean, V., Poff-Reichow, S., Rajasekaran, P., Sriranganathan, N., Schurig, G.G., Boyle, S.M. 2007. *Brucella suis* urease encoded by ure1 but not ure2 is necessary for intestinal infection of BALB/c mice. *Bmc Microbiology* 7,
- Barreto, C.C., Alves, L.C., Aragao, F.J.L., Rech, E., Schrank, A., Vainstein, M.H. 1997. High frequency gene transfer by microprojectile bombardment of intact conidia from the entomopathogenic fungus *Paecilomyces fumosoroseus*. *FEMS Microbiology Letters* 156, 95- 99.
- Becker-Ritt, A.B., Martinelli, A.H.S., Mitidieri, S., Feder, V., Wassermann, G.E., Santi, L., Vainstein, M.H., Oliveira, J.T.A., Fiuza, L.M., Pasquali, G., Carlini, C.R. 2007. Antifungal activity of plant and bacterial ureases. *Toxicon* 50, 971- 983.
- Becker-Ritt, A.B., Mulinari, F., Vasconcelos, I.M., Carlini, C.R. 2004. Antinutritional and/or toxic factors in soybean (*Glycine max* (L) Merrill) seeds: comparison of different cultivars adapted to the southern region of Brazil. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 84, 263- 270.
- Bennett, J. & Wren, E.A. 1977. The interaction of p-nitrophenyl carbamate with urease. *Biochimica et Biophysica Acta* 482, 421- 426.
- Bichler, K.H., Eipper, E., Naber, K., Braun, V., Zimmermann, R., Lahme, S. 2002. Urinary infection stones. *Int.J.Antimicrob.Agents* 19, 488- 498.
- Blakeley, R.L., Hinds, J.A., Kunze, H.E., Webb, E.C., Zerner, B. 1969. Jack bean urease (EC 3.5.1.5). Demonstration of a carbamoyl- transfer reaction and inhibition by hydroxamic acids. *Biochemistry* 8, 1991- 2000.
- Born, G.V.R. & Cross, M.J. 1963. The aggregation of blood platelets. *J.Physiol.* 168, 178- 195.

- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248- 254.
- Brown, S.M., Campbell, L.T., Lodge, J.K. 2007. *Cryptococcus neoformans*, a fungus under stress. *Current Opinion in Microbiology* 10, 320- 325.
- Burne, R.A. & Chen, Y.Y. 2000. Bacterial ureases in infectious diseases. *Microbes.Infect.* 2, 533- 542.
- Caicedo, L.D., Alvarez, M.I., Delgado, M., Cardenas, A. 1999. *Cryptococcus neoformans* in bird excreta in the City Zoo of Cali, Colombia. *Mycopathologia* 147, 121- 124.
- Carlini, C.R., Gomes, C., Guimaraes, J.A., Markus, R.P., Sato, H., Trolin, G. 1984. Central nervous effects of the convulsant protein canatoxin. *Acta Pharmacol.Toxicol.(Copenh)* 54, 161- 166.
- Carlini, C.R. & Guimaraes, J.A. 1981. Isolation and characterization of a toxic protein from *Canavalia ensiformis* (jack bean) seeds, distinct from concanavalin A. *Toxicon* 19, 667- 675.
- Carlini, C.R. & Guimaraes, J.A. 1991. Plant and microbial toxic proteins as hemilectins: emphasis on canatoxin. *Toxicon* 29, 791- 806.
- Carlini, C.R., Guimaraes, J.A., Ribeiro, J.M. 1985. Platelet release reaction and aggregation induced by canatoxin, a convulsant protein: evidence for the involvement of the platelet lipoxygenase pathway. *Br.J.Pharmacol.* 84, 551- 560.
- Carlini, C.R., Oliveira, A.E., Azambuja, P., Xavier-Filho, J., Wells, M.A. 1997. Biological effects of canatoxin in different insect models: evidence for a proteolytic activation of the toxin by insect cathepsinlike enzymes. *Journal of Economical Entomology* 90, 340- 348.
- Carlini, C.R. & Polacco, J.C. 2008. Toxic Properties of Urease. *Crop Science. In Press.*
- Casadevall, A., Rosas, A.L., Nosanchuk, J.D. 2000. Melanin and virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Current Opinion in Microbiology* 3, 354- 358.
- Cavalcante, S.C., Freitas, R.S., Vidal, M.S.M., Dantas, K.C., Levi, J.E., Martins, J.E.C. 2007. Evaluation of phenotypic and genotypic alterations induced by long periods of subculturing of *Cryptococcus neoformans* strains. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz* 102, 41- 47.
- Chayakulkeeree, M. & Perfect, J.R. 2006. Cryptococcosis. *Infectious Disease Clinics of North America* 20, 507- 544.

- Chen, Y.C., Chang, S.C., Shih, C.C., Hung, C.C., Luh, K.T., Pan, Y.S., Hsieh, W.C. 2000. Clinical features and in vitro susceptibilities of two varieties of *Cryptococcus neoformans* in Taiwan. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 36, 175- 183.
- Cox, G.M., Mukherjee, J., Cole, G.T., Casadevall, A., Perfect, J.R. 2000. Urease as a virulence factor in experimental cryptococcosis. *Infection and Immunity* 68, 443- 448.
- Creaser, E.H. & Porter, R.L. 1985. The Purification of Urease from *Aspergillus nidulans*. *International Journal of Biochemistry* 17, 1339- 1341.
- Delgado, A.C.N., Taguchi, H., Mikami, Y., Myiajy, M., Villares, M.C.B., Moretti, M.L. 2005. Human cryptococcosis: relationship of environmental and clinical strains of *Cryptococcus neoformans var. neoformans* from urban and rural areas. *Mycopathologia* 159, 7- 11.
- Dixon, N.E., Gazzola, C., Blakeley, R.L., Zerner, B. 1975. Jack bean urease (EC 3.5.1.5). A metalloenzyme. A simple biological role for nickel ? *J.Am.Chem.Soc.* 97, 4131- 4133.
- Ferreira-DaSilva, C.T., Gombarovits, M.E.C., Masuda, H., Oliveira, C.M., Carlini, C.R. 2000. Proteolytic activation of canatoxin, a plant toxic protein, by insect cathepsin-like enzymes. *Archives Insect Biochemistry and Biophysics* 44, 162- 171.
- Fishbein, W.N. 1969. Urease catalysis. 3. Stoichiometry, kinetics, and inhibitory properties of a third substrate: dihydroxyurea. *The Journal of Biological Chemistry* 244, 1188- 1193.
- Follmer, C. 2008. Insights into the role and structure of plant ureases. *Phytochemistry* 69, 18- 28.
- Follmer, C., Barcellos, G.B.S., Zingali, R.B., Machado, O.L.T., Alves, E.W., Barja-Fidalgo, C., Guimaraes, J.A., Carlini, C.R. 2001. Canatoxin, a toxic protein from jack beans (*Canavalia ensiformis*), is a variant form of urease (EC 3.5.1.5): biological effects of urease independent of its ureolytic activity. *Biochemical Journal* 360, 217- 224.
- Follmer, C., Real-Guerra, R., Wasserman, G.E., Olivera-Severo, D., Carlini, C.R. 2004a. Jackbean, soybean and *Bacillus pasteurii* ureases - Biological effects unrelated to ureolytic activity. *European Journal of Biochemistry* 271, 1357- 1363.
- Follmer, C., Wassermann, G.E., Carlini, C.R. 2004b. Separation of jack bean (*Canavalia ensiformis*) urease isoforms by immobilized metal affinity chromatography and characterization of insecticidal properties unrelated to ureolytic activity. *Plant Science* 167, 241- 246.
- Fraser, J.A., Giles, S.S., Wenink, E.C., Geunes-Boyer, S.G., Wright, J.R., Diezmann, S., Allen, A., Stajich, J.E., Dietrich, F.S., Perfect, J.R., Heitman, J. 2005. Same-sex mating and the origin of the Vancouver Island *Cryptococcus gattii* outbreak. *Nature* 437, 1360- 1364.

- Fraser, J.A., Subaran, R.L., Nichols, C.B., Heitman, J. 2003. Recapitulation of the sexual cycle of the primary fungal pathogen *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*: Implications for an outbreak on Vancouver Island, Canada. *Eukaryotic Cell* 2, 1036- 1045.
- Heitman, J., Casadevall, A., Lodge, J.K., Perfect, J.R. 1999. The *Cryptococcus neoformans* genome sequencing project. *Mycopathologia* 148, 1- 7.
- Idnurm, A., Bahn, Y.S., Nielsen, K., Lin, X.R., Fraser, J.A., Heitman, J. 2005. Deciphering the model pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Nature Reviews Microbiology* 3, 753- 764.
- Island, M.D. & Mobley, H.L.T. 1995. *Proteus mirabilis* urease - operon fusion and linker insertion analysis of ure gene organization, regulation, and function. *Journal of Bacteriology* 177, 5653- 5660.
- Jones, B.D. & Mobley, H.L. 1989. *Proteus mirabilis* urease: nucleotide sequence determination and comparison with jack bean urease. *J.Bacteriol.* 171, 6414- 6422.
- Kidd, S.E., Hagen, F., Tscharke, R.L., Huynh, M., Bartlett, K.H., Fyfe, M., MacDougall, L., Boekhout, T., Kwon-Chung, K.J., Meyer, W. 2004. A rare genotype of *Cryptococcus gattii* caused the cryptococcosis outbreak on Vancouver Island (British Columbia, Canada). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 17258- 17263.
- Kozel, T.R. 1995. Virulence Factors of *Cryptococcus neoformans*. *Trends in Microbiology* 3, 295- 299.
- Kraus, P.R., Boily, M.J., Giles, S.S., Stajich, J.E., Allen, A., Cox, G.M., Dietrich, F.S., Perfect, J.R., Heitman, J. 2004. Identification of *Cryptococcus neoformans* temperature-regulated genes with a genomic-DNA microarray. *Eukaryotic Cell* 3, 1249- 1260.
- Kwon-Chung, J.K., Boekhout, T., Fell, J.W., Diaz, M. 2002. Proposal to conserve the name *Cryptococcus gattii* against *C. hondurianus* and *C. bacillisporus* (Basidiomycota, Hymenomycetes, Tremellomycetidae). *Taxon* 51, 804- 806.
- Laemmli, U.K., Molbert, E., Showe, M., Kellenbe, E. 1970. Form-Determining Function of Genes Required for Assembly of Head of Bacteriophage-T4. *Journal of Molecular Biology* 49, 99-104.
- Lagrou, K., Van Eldere, J., Keuleers, S., Hagen, F., Merckx, R., Verhaegen, J., Peetermans, W.E., Boekhout, T. 2005. Zoonotic transmission of *Cryptococcus neoformans* from a magpie to an immunocompetent patient. *Journal of Internal Medicine* 257, 385- 388.

- Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J.D., Gibson, T.J., Higgins, D.G. 2007. Clustal W and clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23, 2947- 2948.
- Leal, A.L., Faganello, J., Fuentefria, A.M., Boldo, J.T., Bassanesi, M.C., Vainstein, M.H. 2008. Epidemiological Profile of Cryptococcal Meningitis Patients in Rio Grande do Sul, Brazil. *Mycopathologia* 166, 71- 75.
- Lin, X.R. & Heitman, J. 2006. The biology of the *Cryptococcus neoformans* species complex. *Annual Review of Microbiology* 60, 69- 105.
- Loftus, B.J., Fung, E., Roncaglia, P., Rowley, D., Amedeo, P., Bruno, D., Vamathevan, J., Miranda, M., Anderson, I.J., Fraser, J.A., Allen, J.E., Bosdet, I.E., Brent, M.R., Chiu, R., Doering, T.L., Dontin, M.J., D'Souza, C.A., Fox, D.S., Grinberg, V., Fu, J.M., Fukushima, M., Haas, B.J., Huang, J.C., Janbon, G., Jones, S.J.M., Koo, H.L., Krzywinski, M.I., Kwon-Chung, J.K., Lengeler, K.B., Maiti, R., Marra, M.A., Marra, R.E., Mathewson, C.A., Mitchell, T.G., Pertea, M., Riggs, F.R., Salzberg, S.L., Schein, J.E., Shvartsbeyn, A., Shin, H., Shumway, M., Specht, C.A., Suh, B.B., Tenney, A., Utterback, T.R., Wickes, B.L., Wortman, J.R., Wye, N.H., Kronstad, J.W., Lodge, J.K., Heitman, J., Davis, R.W., Fraser, C.M., Hyman, R.W. 2005. The genome of the basidiomycetous yeast and human pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Science* 307, 1321- 1324.
- Lubbers, M.W., Rodriguez, S.B., Honey, N.K., Thornton, R.J. 1996. Purification and characterization of urease from *Schizosaccharomyces pombe*. *Canadian Journal Of Microbiology* 42, 132- 140.
- Martinez, L.R. & Casadevall, A. 2006. *Cryptococcus neoformans* cells in biofilms are less susceptible than planktonic cells to antimicrobial molecules produced by the innate immune system. *Infection and Immunity* 74, 6118- 6123.
- McClelland, E.E., Perrine, W.T., Potts, W.K., Casadevall, A. 2005. Relationship of virulence factor expression to evolved virulence in mouse-passaged *Cryptococcus neoformans* lines. *Infection and Immunity* 73, 7047- 7050.
- McFadden, D., Zaragoza, O., Casadevall, A. 2006. The capsular dynamics of *Cryptococcus neoformans*. *Trends in Microbiology* 14, 497- 505.
- Menegassi, A., Wassermann, G.E., Olivera-Severo, D., Becker-Ritt, A.B., Martinelli, A.H., Feder, V., Carlini, C.R. 2008. Urease from Cotton (*Gossypium hirsutum*) Seeds: Isolation, Physicochemical Characterization, and Antifungal Properties of the Protein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56, 4399- 4405.
- Mirbod, F., Schaller, R.A., Cole, G.T. 2002. Purification and characterization of urease isolated from the pathogenic fungus *Coccidioides immitis*. *Medical Mycology* 40, 35- 44.

- Mitchell, A.P. 2006. Cryptococcal virulence: beyond the usual suspects. *Journal of Clinical Investigation* 116, 1481- 1483.
- Mobley, H.L. & Hausinger, R.P. 1989. Microbial ureases: significance, regulation and molecular characterization. *Microbiology Reviews* 53, 85- 108.
- Mobley, H.L., Hu, L.T., Foxal, P.A. 1991. *Helicobacter pylori* urease: properties and role in pathogenesis. *Scand.J.Gastroenterol.Suppl.* 187, 39- 46.
- Mobley, H.L., Island, M.D., Hausinger, R.P. 1995. Molecular biology of microbial ureases. *Microbiol.Rev.* 59, 451- 480.
- Mulinari, F., Pires-Alves, M., Moraes, M.G., Kurtenbach, E., Carlini, C.R., Grossi-de-Sa, M.F. 2004. Toxina praguicida, construção gênica e método de controle de pragas. Privilégio de Invenção - INIP-RS 0001120
- Mulinari, F., Staniscuaski, F., Bertholdo-Vargas, L.R., Postal, M., Oliveira-Neto, O.B., Riden, D.J., Grossi-de-Sa, M.F., Carlini, C.R. 2007. Jaburetox-2Ec: An insecticidal peptide derived from an isoform of urease from the plant *Canavalia ensiformis*. *Peptides* 28, 2042- 2050.
- Oliveira, A.E., Gomes, V.M., Sales, M.P., Fernandes, K.V., Carlini, C.R., Xavier-Filho, J. 1999. The toxicity of jack bean [*Canavalia ensiformis* (L.) DC.] canatoxin to plant pathogenic fungi. *Revista Brasileira de Biologia* 59, 59- 62.
- Olivera-Severo, D., Wassermann, G.E., Carlini, C.R. 2006a. *Bacillus pasteurii* urease shares with plant ureases the ability to induce aggregation of blood platelets. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 452, 149- 155.
- Olivera-Severo, D., Wassermann, G.E., Carlini, C.R. 2006b. Ureases display biological effects independent of enzymatic activity. Is there a connection to diseases caused by urease-producing bacteria? *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 39, 851- 861.
- Olszewski, M.A., Noverr, M.C., Chen, G.H., Toews, G.B., Cox, G.M., Perfect, J.R., Huffnagle, G.B. 2004. Urease expression by *Cryptococcus neoformans* promotes microvascular sequestration, thereby enhancing central nervous system invasion. *American Journal of Pathology* 164, 1761- 1771.
- Perfect, J.R. 2006. *Cryptococcus neoformans*: the yeast that likes it hot. *Fems Yeast Research* 6, 463- 468.
- Polacco, J.C. & Holland, M.A. 1993. Roles of Urease in Plant Cells. *International Rev.Cytology* 145, 65- 103.
- Raso, T.F., Werther, K., Miranda, E., Mendes-Giannini, M.J.S. 2004. Cryptococcosis outbreak in psittacine birds in Brazil. *Medical Mycology* 42, 355- 362.

- Rezwan, M., Laneelle, M.A., Sander, P., Daffe, M. 2007. Breaking down the wall: Fractionation of mycobacteria. *Journal of Microbiological Methods* 68, 32- 39.
- Ribeiro-daSilva, G., Carlini, C.R., Pires-barbosa, R., Guimaraes, J.A. 1986. Blood glucose alterations induced in rats by canatoxin, a protein isolated from jack bean (*Canavalia ensiformis*) seeds. *Toxicon* 24, 775- 782.
- Ribeiro-daSilva, G., Collares, C.B., Grassi, D.M., Prado, J.F., Zappellini, A., Carlini, C.R. 1989. Alterations in rat carbohydrate metabolism induced by canatoxin as a probable consequence of primary hypoxia. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 22, 1405- 1413.
- Rodrigues, M.L., Nakayasu, E.S., Oliveira, D.L., Nimrichter L., Nosanchuk J.D., Almeida, I.C., Casadevall, A. 2008. Extracellular vesicles produced by *Cryptococcus neoformans* contain protein components associated with virulence. *Eukaryotic Cell*. 9 (6), 58-67.
- Rodriguez, M.L., Alviano, C.S., Travassos, L.R. 1999. Pathogenicity of *Cryptococcus neoformans*: virulence factors and immunological mechanisms. *Microbes and Infection* 1, 293- 301.
- Rosenthal, G.A. & Dahlman, D.L. 1986. L-canavanine and protein synthesis in the tobacco hornworm *Manduca sexta*. *Proc.Nat.Acad.Sci.USA* 83, 14- 18.
- Sirko, A. & Brodzik, R. 2000. Plant ureases: Roles and regulation. *Acta Biochimica Polonica* 47, 1189- 1195.
- Smith, P.T., King, A.D., Goodman, N. 1993. Isolation and Characterization of Urease from *Aspergillus niger*. *Journal of General Microbiology* 139, 957- 962.
- Staniscuaski, F., Ferreira-DaSilva, C.T., Mulinari, F., Pires-Alves, M., Carlini, C.R. 2005. Insecticidal effects of canatoxin on the cotton stainer bug *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera : Pyrrhocoridae). *Toxicon* 45, 753- 760.
- Steen, B.R., Zuyderduyn, S., Toffaletti, D.L., Marra, M., Jones, S.J.M., Perfect, J.R., Kronstad, J. 2003. *Cryptococcus neoformans* gene expression during experimental cryptococcal meningitis. *Eukaryotic Cell* 2, 1336- 1349.
- Sumner, J.B. 1926. The isolation and crystallization of the enzyme urease. *The Journal of Biological Chemistry* 69, 435- 441.
- Sumner, J.B. & Howell, S.F. 1936. The identification of the hemagglutinin of the jack bean with concaivalin A. *J.Bacteriol.* 32, 227- 237.
- Torres-Rodrigues, JM, Alavarado-Ramirez, E., Gutierrez-Gallego, R. 2008 Urease activity in *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*. *Rev. Iberoam Micol.*, 25(1), 27-31.

- Towbin, B., Staebelin, T., Gordon, J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Natl.Acad.Science,USA* 4350- 4354.
- Udedibie, A.B.I. & Carlini, C.R. 1998. Questions and answers to edibility problem of the *Canavalia ensiformis* seeds - A review. *Animal Feed Science and Technology* 74, 95-106.
- Varma, A., Wu, S.X., Guo, N.R., Liao, W.Q., Lu, G.X., Li, A.S., Hu, Y.L., Bulmer, G., Kwon-Chung, K.J. 2006. Identification of a novel gene, URE2, that functionally complements a urease-negative clinical strain of *Cryptococcus neoformans*. *Microbiology-Sgm* 152, 3723- 3731.
- Weatherburn, M.W. 1967. Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. *Analytical Chemistry* 39, 971- 974.
- Wickes, B.L. 2002. The role of mating type and morphology in *Cryptococcus neoformans* pathogenesis. *International Journal of Medical Microbiology* 292, 313- 329.
- Wray, W., Boulikas, T., Wray, V.P., Hancock, R. 1981. Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. *Analytical Biochemistry* 118, 197- 203.
- Yu, J.J., Smithson, S.L., Thomas, P.W., Kirkland, T.N., Cole, G.T. 1997. Isolation and characterization of the urease gene (URE) from the pathogenic fungus *Coccidioides immitis*. *Gene* 198, 387- 391.
- Zerner, B. 1991. Recent advances in the chemistry of an old enzyme, Urease. *Bioorganic Chemistry* 19, 116- 131.

ANEXO I

Curriculum Vitae

Vanessa Feder
Curriculum Vitae

Julho/2008

Vanessa Feder

Curriculum Vitae

Dados Pessoais

Nome Vanessa Feder

Endereço residencial Rua Noemi Valle Rocha, 497
Guarujá - Porto Alegre
91770330, RS - Brasil
Telefone: 51 32076369

Endereço profissional Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Avenida Bento Gonçalves 9500
Agronomia - Porto Alegre
91501-970, RS - Brasil
Telefone: 51 33087606

Endereço eletrônico

e-mail para contato : vfeder@ufrgs.br
e-mail alternativo : vfeder@terra.com.br

Formação Acadêmica/Titulação

- 2007** Mestrado em Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular - UFRGS.
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil
Título: Isolamento e Caracterização de Urease de *Cryptococcus neoformans*
Orientador: Célia R. Carlini
- 2001 - 2002** Especialização em Clínica e Cirurgia de Cães e Gatos Lato Sensu.
Universidade Luterana do Brasil, ULBRA, Canoas, Brasil
Título: Leishmaniose Tegumentar e Visceral: uma contribuição à clínica veterinária e saúde pública no Brasil
Orientador: Dr Celso Bittencourt dos Anjos
- 1993 - 1998** Graduação em Medicina Veterinária.
Universidade Luterana do Brasil, ULBRA, Canoas, Brasil
Título: Relatório de Conclusão de Curso em Clínica e Cirurgia de Caninos, Felinos e Animais Silvestres
Orientador: Dra Carla Hennemann

Formação complementar

- 1994 - 1994** Extensão universitária em Campanha de Vacinação Antirábica de Novo Hamburgo.
Universidade Luterana do Brasil, ULBRA, Canoas, Brasil
- 1995 - 1995** Curso de curta duração em Manutenção e Reprodução de Répteis Em Cativeiro.
Sociedade dos Zoológicos do Brasil, SZB, Brasil

1995 - 1995	Extensão universitária em Serviço de Saúde de Defesa Sanitária e Zootecnia. Universidade Luterana do Brasil, ULBRA, Canoas, Brasil
1996 - 1996	Curso de curta duração em Medicina Veterinária Em Animais Silvestres. Universidade Luterana do Brasil, ULBRA, Canoas, Brasil
1996 - 1996	Curso de curta duração em Atualização Em Clínica Cirúrgica e Atualização Em. Universidade Federal de Santa Maria, UFSM, Santa Maria, Brasil
1996 - 1996	Curso de curta duração em Curso de Atualização Em Clínica Cirúrgica. Universidade Federal de Santa Maria, UFSM, Santa Maria, Brasil
1996 - 1996	Extensão universitária em Atendimento Clínico Veterinário na XIX Expointer. Universidade Luterana do Brasil, ULBRA, Canoas, Brasil
1997 - 1997	Extensão universitária em Doença de Chagas, Leishmaniose e Esquistossomose. Fundação Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio De Janeiro, Brasil

Atuação profissional

1. Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS

Vínculo institucional

2005 - Atual	Vínculo: bolsista , Enquadramento funcional: bolsa de apoio técnico nível 1 , Carga horária: 40, Regime: Dedicção Exclusiva
2005 - 2005	Vínculo: estágio , Enquadramento funcional: estagiário , Carga horária: 30, Regime: Dedicção Exclusiva

Atividades

02/2005 - 12/2005	Estágio, Centro de Biotecnologia <i>Estágio: acompanhamento de atividades dos pesquisadores do laboratório de proteínas tóxicas</i>
01/2006 - 2007	Pesquisa e Desenvolvimento, Departamento de Biofísica <i>Linhas de Pesquisa: Ação fungicida de urease de soja em fungos fitopatogênicos</i>

2. Dog Doc Veterinários Associados - DOG DOC

Vínculo institucional

1997 - 1997	Vínculo: Estágio Voluntário , Enquadramento funcional: Estagiária Plantonista , Carga horária: 36, Regime: Parcial
1998 - 1998	Vínculo: Estagiário Curricular Vinculad , Enquadramento funcional: Estagiária não remunerada , Carga horária: 48, Regime: Integral
1999 - 1999	Vínculo: Prestação de Serviço Autônomo , Enquadramento

2000 - 2001 funcional: Plantonista , Carga horária: 36, Regime: Parcial
Vínculo: Prestação de Serviço Autônomo , Enquadramento funcional: Clínica e Cirurgiã da equipe , Carga horária: 44, Regime: Integral

Atividades

06/1997 - 11/1997 Estágio

*Estágio:
plantonista voluntária*

06/1998 - 10/1998 Estágio, Universidade Luterana do Brasil, Medicina Veterinária

*Estágio:
Estágio Currícular Obrigatório*

01/1999 - 01/1999 Serviço Técnico Especializado

*Especificação:
Clínica e Cirurgiã de caninos, felinos e silvestres*

05/2000 - 05/2001 Serviço Técnico especializado

*Especificação:
Clínica e Cirurgiã, Treinamento de Estagiários Plantonistas*

05/2000 - 05/2001 Serviço Técnico Especializado

*Especificação:
Clínica e Cirurgiã*

05/2000 - 05/2001 Direção e Administração

*Cargos Ocupados:
Clínica e cirurgia, Coordenadora Clínica*

3. Semefertil comércio de produtos veterinários - SEMEFERTIL

Vínculo institucional

2003 - 2003 Vínculo: profissional liberal , Enquadramento funcional: representante comercial , Carga horária: 40, Regime: Dedicção Exclusiva

Atividades

07/2003 - 01/2004 Treinamento

*Especificação:
Instrução sobre fármacos e princípios de nutrição em caninos.*

07/2003 - 12/2003 Serviço Técnico Especializado

*Especificação:
representação comercial , suporte técnico na área de nutrição e farmacologia, palestras de orientação a profissionais e leigos.*

4. Pet Store Serviços Veterinários Ltda - PET STORE

Vínculo institucional

1999 - 2000 Vínculo: Prestação de Serviço Autônomo , Enquadramento funcional: Responsável Técnica, Clínica e Cirurgiã , Carga horária: 36, Regime: Parcial

Atividades

08/1999 - 04/2000 Serviço Técnico Especializado
Especificação:
Responsabilidade Técnica, Clínica e Cirurgiã

5. Comércio de Serviços e Produtos Veterinários Ltda - MIAUAU

Vínculo institucional

2001 - 2003 Vínculo: prestação de Serviço autônomo , Enquadramento funcional: Clínica e cirurgiã de caninos, felinos e anim , Carga horária: 25, Regime: Parcial

Atividades

12/2001 - 07/2003 Serviço Técnico Especializado
Especificação:
clínica e cirurgiã de caninos, felinos e animais silvestres

Linhas de pesquisa

1. Ação fungicida de urease de soja em fungos fitopatogênicos
2. Purificação e caracterização da urease de *C. gattii*.

Áreas de atuação

1. Proteínas Tóxicas
2. Epidemiologia
4. Toxicologia
5. Biologia Molecular
6. Doenças Infeciosas

Idiomas

Inglês Compreende Bem , Fala Bem, Escreve Bem, Lê Bem

Espanhol Compreende Razoavelmente , Fala Razoavelmente, Escreve Pouco, Lê Bem

Títulos

- 2002** Especialista em Clínica e Cirurgia de Cães e Gatos, Ulbra
- 1998** Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Luterana do Brasil

Produção em C, T & A

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1. MENEGASSI, A., WASSERMANN, G. E., OLIVERA-SEVERO, D., BECKER-RITT, A. B, MARTINELLI, A. H.S., FEDER, V., CARLINI, C. R.
Urease from Cotton (*Gossypium hirsutum*) Seeds: Isolation, Physicochemical Characterization, and Antifungal Properties of the Protein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. , v.56, p.4399 - 4405, 2008.
2. BECKER-RITT, A. B, MARTINELLI, A. H.S., MITIDIERI, S., FEDER, V., WASSERMANN, G. E., SANTI, L., VAINSTEIN, M. H., OLIVEIRA, J., FIUZA, L. M., PASQUALI, G., CARLINI, C. R.
Antifungal Activity of Plant and Bacterial Ureases. *Toxicon*. , v.008, p.1 - 14, 2007.

Comunicações e Resumos Publicados em Anais de Congressos ou Periódicos (resumo)

1. FEDER, V.; VAINSTEIN, M.H.; CARLINI, C.R. Purificação e caracterização da urease de *C. gattii*. IX Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2007, Porto Alegre.
2. Becker-Ritt, A. B, MARTINELLI, A. H.S., MITIDIERI, S., FEDER, Vanessa, WASSERMANN, G. E., PASQUALI, G., CARLINI, C. R.
Antifungal activity of ureases from *Glycine max* and *Canavalia ensiformis* seeds and a recombinant *Helicobacter pylori* urease In: *Plant Biology and Botany 2007 Joint Congress*, 2007, Chicago.
3. FEDER, Vanessa, CHULA, Sílvia, MARQUES, Ana Cândida, RAMOS, Carla, MARQUES, Maria da Graça
Mamona: Ralato de caso de intoxicação em cão Poodle In: XXI Congresso Brasileiro e Conferência Sul-americana de Medicina Veterinária, 2000, Rio de Janeiro.
Anais do XXI Congresso Brasileiro e Conferência Sul-americana de Medicina Veterinária. Rio de Janeiro: , 2000. p.54 - 54
4. FEDER, Vanessa, CHULA, Sílvia, RAMOS, Carla, MARQUES, Maria da Graça, MARQUES, Ana Cândida
Metoclopramida: intoxicação em cão - relato de caso In: XXI Congresso Brasileiro e Conferência Sul-americana de Medicina Veterinária, 2000, Rio de Janeiro.
Anais do XXI Congresso Brasileiro e Conferência Sul-americana de Medicina Veterinária. Rio de Janeiro: , 2000. p.55 - 55
5. FEDER, Vanessa, CHULA, Sílvia, RAMOS, Carla, MARQUES, Maria da Graça, MARQUES, Ana Cândida
A importância dos Centros de Informação Toxicológica na Clínica Veterinária - Relato de Casos. In:

Brasiltox 99 - XI Congresso Brasileiro de Toxicologia Internacional. International Congress of Clinical Toxicology, 1999, Guarujá.

Brasiltox 99 - XI Congresso Anais - Brasileiro de Toxicologia Internacional. International Congress of Clinical Toxicology. , 1999. p.70 - 70

6. FEDER, Vanessa, CHULA, Silvia, RAMOS, Carla, MARQUES, Maria da Graça
Araneísmo: acidentes com animais do gênero Phoneutria spp. em pequenos animais - relato de caso In: II Congresso de Medicina Veterinária do Conesul. XIII Congresso Estadual de Medicina Veterinária. XXV Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, 1997, Gramado.

Anais do I Congresso de Medicina Veterinária do Conesul. XIII Congresso Estadual de Medicina Veterinária. XXV Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária. , 1997. p.63 - 63

7. FEDER, Vanessa, CHULA, Silvia, RAMOS, Carla, MARQUES, Maria da Graça
Ofidismo: acidentes com animais do gênero Bothrops spp. em pequenos animais- relato de caso. In: II Congresso de Medicina Veterinária do Conesul. XIII Congresso Estadual de Medicina Veterinária. XXV Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, 1997, Gramado.

II Congresso de Medicina Veterinária do Conesul. XIII Congresso Estadual de Medicina Veterinária. XXV Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária. Gramado: , 1997.

Produção Técnica

Trabalhos Técnicos

1. FEDER, Vanessa

Trabalho de Conclusão de Curso: relatório de estágio em clínica e Cirurgia de cães, gatos e animais silvestres, 1998

Demais produções técnicas

1. FEDER, Vanessa

Leishmaniose Tegumentar e Visceral: uma contribuição à clínica veterinária e saúde pública no Brasil, 2001. Monografia para conclusão do curso de especialização em clínica e cirurgia de cães e gatos, 2002.

Orientações e Supervisões

Orientações e Supervisões concluídas

Trabalhos de conclusão de curso de graduação

1. Bianca Plentz. **Relatório de Estágio Supervisionado em Clínica e Cirurgia de Cães e Gatos.** 2001. Curso (Medicina Veterinária) - Universidade Luterana do Brasil

Eventos

Participação em eventos

1. **XXI Congresso Brasileiro e Congerência Sul-americana de Medicina Veterinária,** 2000. (Congresso)

Mamona: Relato de caso de intoxicação em Poodle.

2. **XXI Congresso Brasileiro de Clínicos Veterinários de Pequenos Animais e Conferência Sul-americana de Medicina Veterinária**, 2000. (Congresso)
Metoclopramida: intoxicação em cão - relato de caso.
3. **XXI Congresso Brasileiro de Clínicos Veterinários de Pequenos Animais e Conferência sul-americana de Medicina Veterinária**, 2000. (Congresso)
XXI Congresso Brasileiro de Clínicos Veterinários de Pequenos Animais e Conferência sul-americana de Medicina Veterinária.
4. **Brasiltox 99 - XI Congresso Brasileiro de Toxicologia, International Congress of Clinical Toxicology**, 1999. (Congresso)
A importância dos Centros de Informação Toxicológica na Clínica Veterinária - relato de caso..
5. **XX Congresso Brasileiro de Clínicos Veterinários de Pequenos Animais**, 1999. (Congresso)
XX Congresso Brasileiro de Clínicos Veterinários de Pequenos Animais.
6. **II Congresso de Medicina Veterinária do Conesul, XIII Congresso Estadual de Medicina Veterinária, XXV Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária.**, 1997. (Congresso)
Araneísmo: acidentes com animais do gênero Phoneutria spp. em pequenos animais - relato de caso..
7. **I Congresso e VI Encontro da Associação Brasileira de Veterinários de animais Selvagens**, 1997. (Congresso)
I Congresso e VI Encontro da Associação Brasileira de Veterinários de animais Selvagens.
8. **II Congresso de Medicina Veterinária do Conesul, XIII Congresso Estadual de Medicina Veterinária, XXV Congresso Brasileiro de Medicina Vetrinária.**, 1997. (Congresso)
Ofidismo: acidentes com animais do gênero Bothrops spp. em pequenos animais - relato de caso..
9. **XIX Congresso Brasileiro e II Encontro Internacional da Sociedade de Zoológicos do Brasil**, 1995. (Congresso)
XIX Congresso Brasileiro e II Encontro Internacional da Sociedade de Zoológicos do Brasil.

Totais de produção

Produção bibliográfica

Artigos completos publicado em periódico.....	2
Comunicações em anais de congressos e periódicos (proceedings e suplementos).....	7

Produção Técnica

Trabalhos técnicos (relatório técnico).....	1
Outra produção técnica.....	1

Orientações

Orientação concluída (trabalho de conclusão de curso de graduação).....	1
---	---

Eventos

Participações em eventos (congresso).....	9
---	---

ANEXOII

Publicação I

Antifungal activity of plant and bacterial ureases[☆]

A.B. Becker-Ritt^a, A.H.S. Martinelli^a, S. Mitidieri^b, V. Feder^a,
G.E. Wassermann^a, L. Santi^a, M.H. Vainstein^{a,c}, J.T.A. Oliveira^d,
L.M. Fiuza^e, G. Pasquali^{a,f}, C.R. Carlini^{a,g,*}

^aGraduate Program in Molecular and Cellular Biology, Center of Biotechnology,
Universidade Federal do Rio Grande do Sul—UFRGS, Brazil

^bBioPlus Biotechnological Development LTDA, Porto Alegre, Brazil

^cDepartment of Microbiology, UFRGS, Brazil

^dDepartment of Biochemistry and Molecular Biology, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, Brazil

^eUniversidade do Vale dos Sinos, São Leopoldo, RS, Brazil

^fDepartment of Molecular Biology and Biotechnology, UFRGS, Brazil

^gDepartment of Biophysics, UFRGS, Av. Bento Gonçalves, 9500. Prédio 43.422, Porto Alegre, RS, CEP 91501-970, Brazil

Received 25 April 2007; received in revised form 10 July 2007; accepted 11 July 2007

Available online 31 July 2007

Abstract

Ureases (EC 3.5.1.5) are nickel-dependent metalloenzymes that catalyze the hydrolysis of urea to ammonia and carbon dioxide. Produced by plants, fungi and bacteria, but not by animals, ureases share significant homology and similar mechanisms of catalysis, although differing in quaternary structures. While fungal and plant ureases are homo-oligomeric proteins of 90 kDa subunits, bacterial ureases are multimers of two (e.g. *Helicobacter pylori*) or three subunit complexes. It has been proposed that in plants these enzymes are involved in nitrogen bioavailability and in protection against pathogens. Previous studies by our group have shown that plant ureases, but not a bacterial (*Bacillus pasteurii*) urease, display insecticidal activity. Herein we demonstrate that (*Glycine max*) embryo-specific soybean urease, jackbean (*Canavalia ensiformis*) major urease and a recombinant *H. pylori* urease impair growth of selected phytopathogenic fungi at sub-micromolar concentrations. This antifungal property of ureases is not affected by treatment of the proteins with an irreversible inhibitor of the ureolytic activity. Scanning electron microscopy of urease-treated fungi suggests plasmolysis and cell wall injuries. Altogether, our data indicate that ureases probably contribute to the plant arsenal of defense compounds against predators and phytopathogens and that the urease defense mechanism is independent of ammonia release from urea.

© 2007 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Antifungal protein; Plant pathogen; Urease; Soybean; Jackbean; *Helicobacter pylori*

[☆] *Ethical statement:* The experimental protocols and procedures used to obtain the results were approved by the Research and Ethics Committee of the Institute of Biosciences, Federal University of Rio Grande do Sul.

*Corresponding author. Department of Biophysics, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 9500. Prédio 43.422, 91501-970 Porto Alegre, RS, Brazil. Tel.: +55 51 3308 7606; fax: +55 51 3308 7003.

E-mail addresses: ccarlini@ufrgs.br, celia.carlini@pq.cnpq.br (C.R. Carlini).

ANEXOIII

Publicação II

Urease from Cotton (*Gossypium hirsutum*) Seeds: Isolation, Physicochemical Characterization, and Antifungal Properties of the Protein

ANGELA MENEGASSI,[†] GERMAN E. WASSERMANN,[†] DEIBER OLIVERA-SEVERO,[†]
 ARLETE B. BECKER-RITT,[†] ANNE HELENE S. MARTINELLI,[†] VANESSA FEDER,[†]
 AND CELIA R. CARLINI^{*†‡§}

Graduate Program in Molecular and Cellular Biology—Center of Biotechnology and Department of Biophysics, Universidade Federal do Rio Grande do Sul—UFRGS, Porto Alegre, RS CEP 91501-970, Brazil

Ureases (EC 3.5.1.5) are metalloenzymes that hydrolyze urea to produce ammonia and carbon dioxide. These enzymes, which are found in fungi, bacteria, and plants, show very similar structures. Despite an abundance of urease in vegetal tissues, the physiological role of this enzyme in plants is still poorly understood. It has been previously described that ureases from the legumes jackbean (*Canavalia ensiformis*) and soybean (*Glycine max*) have insecticidal activity and antifungal properties. This work presents the physicochemical purification and characterization of a urease from cotton (*Gossypium hirsutum*) seeds, the first description of this enzyme in Malvaceae. The urease content varied among different cotton cultivars. Cotton seed urease (98.3 kDa) displayed low ureolytic activity but exhibited potent antifungal properties at sub-micromolar concentrations against different phytopathogenic fungi. As described for other ureases, the antifungal effect of cotton urease persisted after treatment with an irreversible inhibitor of its enzyme activity. The data suggest an important role of these proteins in plant defense.

KEYWORDS: Cotton seed; *Gossypium hirsutum*; purification; urease; antifungal protein

INTRODUCTION

Ureases (EC 3.5.1.5, urea amidohydrolase) are nickel-dependent metalloenzymes that catalyze the hydrolysis of urea to ammonia and carbon dioxide (1), enhancing the rate of the uncatalyzed reaction by a factor of 8×10^{17} (2). Ureases are widespread in plants, fungi, and bacteria (3–5). Whereas fungal and plant (e.g. jackbean and soybean) ureases are homo-hexameric proteins of 90 kDa subunits, bacterial ureases are multimers of two or three subunit complexes. The high sequence similarity of all ureases indicates that they are variants of the same ancestral protein and are likely to possess highly conserved tertiary structures and similar catalytic mechanisms (3–5). Some bacterial ureases such as those from *Proteus mirabilis* and *Helicobacter pylori* (6, 7) play an important role in the pathogenesis of human and animal diseases. Urease production is also probably related in humans to the pathogenesis of diseases caused by fungal infection with *Coccid-*

loides posadasii (8), *Coccidioides immitis* (9), *Paracoccidioides brasiliensis* (10), and *Cryptococcus neoformans* (11, 12).

Despite the abundance in some plant tissues, mainly in seeds of some members of the families Fabaceae, Leguminosae, and Curcubitaceae, little has been revealed about their biological roles (5, 13). Urease has been proposed to function coordinately with arginase in the utilization of seed protein reserves during germination (14). A second role is the assimilation of urea derived from ureide metabolism (15) or imported from the environment because urea is an effective foliar fertilizer (16).

Our group has shown that plant and microbial ureases display several biological properties that are independent of their ureolytic activity, such as the activation of blood platelets, interaction with glycoconjugates, insecticidal (6, 17), and antifungal properties (18). Besides these activities, jackbean canatoxin, an isoform of urease, is also lethal to rats and mice by an intraperitoneal route (17, 19). The entomotoxic effect and the antifungal property of jackbean and soybean ureases persisted after treatment of the enzymes with an irreversible inhibitor of ureolytic activity, demonstrating that protein domain(s) other than the active site might be involved (6, 18, 20). Actually an internal entomotoxic peptide released upon digestion by insect cathepsins accounts for the insecticidal activity of jackbean ureases (21–23). These findings reinforce the hypothesis that ureases might be involved in plant defense mechanisms (24).

* Address correspondence to this author at the Department of Biophysics Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av Bento Gonçalves, 9500 Prédio 43.422, 91501-970 Porto Alegre, RS, Brazil (telephone + 55 51 3308 7606; fax + 55 51 3308 7003; e-mail carlini@ufrgs.br or celia.carlini@pq.cnpq.br).

[†] Graduate Program in Molecular and Cellular Biology—Center of Biotechnology.

[‡] Department of Biophysics, Universidade Federal do Rio Grande do Sul—UFRGS.