

Universidade Federal do Rio de Janeiro
Centro de Ciências da Saúde
Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

Juliana Grechi

**Papel da glucuronoxilomanana de *Cryptococcus neoformans* na
regulação da enzima Fosfofrutocinase**

Rio de Janeiro, 2010

Juliana Grechi

**Papel da glucuronoxilomanana de *Cryptococcus neoformans* na
regulação da enzima Fosfofrutocinase**

**Dissertação de mestrado apresentada ao
Programa de Pós Graduação em Ciências
Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da
Universidade Federal do Rio de Janeiro, como
parte dos requisitos necessários à obtenção
do Título de Mestre em Ciências
Farmacêuticas**

Orientadores: Mauro Sola-Penna

(Departamento de Fármacos – Faculdade de Farmácia, UFRJ)

Co-orientador: Leonardo Nimrichter

(Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes, UFRJ)

**Universidade Federal do Rio de Janeiro
Centro de Ciências da Saúde
Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas**

Rio de Janeiro, 2010

Grechi, Juliana

Papel da glucuronoxilomanana de *Cryptococcus neoformans* na
regulação da enzima Fosfofrutocinase. 2010.

121 f.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade
Federal do Rio de Janeiro, Faculdade de Farmácia, Rio de Janeiro,
2010.

Orientadores: Mauro Sola-Penna (Faculdade de Farmácia) e
Leonardo Nimrichter (Instituto de Microbiologia Professor
Paulo de Góes).

1. *Cryptococcus neoformans*. 2. GXM. 3. Fosfofrutocinase
4. Metabolismo. 5. Glicólise.

I Universidade Federal do Rio de Janeiro

II. Título

Juliana Grechi

Papel da glucuronoxilomanana de *Cryptococcus neoformans* na
regulação da enzima Fosfofrutocinase

Dissertação de Mestrado submetida à Universidade Federal do Rio de Janeiro
visando a obtenção do Grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Rio de Janeiro, 30 de Março de 2010.

Banca Examinadora:

Dr. Mauro Sola-Penna (Doutor – UFRJ) Faculdade de Farmácia - Orientador

Dr. Leonardo Nimrichter (Doutor – UFRJ) Instituto de Microbiologia
Professor Paulo de Góes - Co- Orientador

Dr. Marcio Lourenço Rodrigues (Doutor – UFRJ) Instituto de Microbiologia
Professor Paulo de Góes

Dra. Patricia Zancan (Doutora – UFRJ) Faculdade de Farmácia

Dr. Wagner Barbosa Dias (Doutor – UFRJ) Instituto de Biofísica Carlos
Chagas Filho

Esse trabalho foi realizado nos Laboratórios: Laboratório de Enzimologia e Controle do Metabolismo – LabECom – do Departamento de Fármacos, Faculdade de Farmácia e Laboratório de Estudos Integrados em Bioquímica Microbiana – LEIBM – do Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes, na Universidade Federal do Rio de Janeiro, sob a orientação do Professor Mauro Sola Penna e co-orientação do Professor Leonardo Nimrichter, com auxílios financeiros concedidos pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Dedico essa dissertação aos meus Pais, meus grandes incentivadores. Obrigada por todo o amor, carinho, compreensão e por acreditarem em mim. Aos meus irmãos pelas palavras de incentivos nos momentos difíceis. Vocês foram de grande ajuda!!! A minha avó, que também foi uma mãe para mim. Obrigada por todos os momentos felizes que tivemos juntas. Saudades eternas.

Agradecimentos

Um agradecimento carinhoso e especial aos meus pais e aos meus irmãos e a minha avó que sempre me apoiaram nas minhas decisões.

Ressalto a importância da colaboração e dos momentos de intensa troca em especial com meus pais Colmar e Iná meus maiores professores, com quem aprendi desde sempre, através de seus exemplos e sensibilidades a diferenciar o certo do errado, os ensinamentos que me serviram por toda a minha vida e estão presentes neste estudo.

Aos meus irmãos, Janaina, Jaqueline e Colmar obrigada pelo incentivo, amor e confiança dando toda a força para que eu completasse mais essa etapa.

A minha avó, segunda mãe, com quem aprendi muitas coisas. Obrigada pelos mimos, carinho e amor. Eternas Saudades...

Agradeço aos meus orientadores: Mauro Sola-Penna e Leonardo Nimrichter pela confiança depositada em mim, pelo apoio, compreensão, amizade e pelas brincadeiras nos momentos de descontração. Viu eu não sou tão mala assim!!! Mauro acho que ainda vou ganhar muito “chá de sumiço” nessa nova caminhada, para não ficar te amolando. Léo você só não pode aderir a essa idéia.

Aos professores que me acompanharam durante o trabalho ajudando e sempre à disposição: Marcio Lourenço Rodrigues e Patrícia Zancan. Obrigado por passarem tranquilidade e por estarem na minha banca.

Agradeço imensamente a Mônica pela sua enorme paciência comigo nesses últimos meses. Você foi muito amiga. Aprendi muito com você. Obrigada por tudo!!!

Aos colegas do LEIBM, Débora, Gabriele, Luna, Deborah, Carol, Priscila, Fernanda, Mariana, Nati, Jéssica, Ana Cláudia, em especial, a amiga Paty, pela amizade que vocês têm por mim. Obrigada pelo apoio, compreensão e carinho. Ah não poderia deixar de agradecer a Geralda pelo preparo dos materiais, mas tenho uma dúvida: porque toda baixinha é brava?

Aos colegas do LabECoM, Mônica, Daniel (obrigada pela acessória nos gráficos), Wagner, Tiago, Raquel, Deborah, Isadora, Priscilas, Edigar, Lilian obrigada pela amizade, compreensão e pela companhia.

Ao André e seus alunos Bianca, Lys, Érika, Ana Luiza, Roberta, Carina, Anderson, Polii e Diego pela amizade e compreensão.

A Naiara por ser minha família aqui no Rio. Obrigada pela amizade, compreensão e pelos momentos de brincadeira “os ataques de palhaçada em casa” e a Ana Paula e Aline recém chegadas aqui em casa, mas que já fazem parte dessa nossa família.

Aos meus Amigos de infância, Etyenne, Carlos José (Casé), Angélica, Gêssica (Magrela) e Lélia apesar da distância estão sempre presentes.

Aos meus colegas do Rio, em especial a Magdalena e a Raquel pelas conversas, momentos de descontração e carinho.

As meninas do laboratório da Prof. Clarisa: Dirlei, Lucieri, Gulnara e Flávia.

A todos que contribuíram para realização deste trabalho.

Ao CNPq e Capes pelo apoio financeiro.

"Há homens que lutam um dia e são bons.
Há outros que lutam um ano e são melhores.
Há os que lutam muitos anos e são muito bons.
Porém, há os que lutam toda a vida.
Esses são os imprescindíveis."

Bertolt Brecht.

Resumo

O *Cryptococcus neoformans* é o agente etiológico da criptococose, um patógeno fúngico encapsulado oportunista que vem assumindo um papel de destaque por acometer, principalmente, pacientes imunocomprometidos. A infecção por esse fungo ocorre após a inalação de basidiosporos ou leveduras dessecadas e pouco encapsulada encontradas principalmente nas excretas de pombos e em árvores, podem ultrapassar as barreiras de defesa no tecido pulmonar, atingir a circulação, atravessar as barreiras endoteliais e chegar ao cérebro, causando um quadro letal de meningite criptocócica. A cápsula polissacarídica, principal fator de virulência desse fungo, tem como componente majoritário a glucuronoxilomanana (GXM) onde uma vez fagocitado pelos macrófagos, induz apoptose. Devido à estreita relação entre a apoptose e produção de energia, o presente trabalho teve por objetivo avaliar os efeitos GXM sobre a principal enzima da via glicolítica, fosfofrutocinase (PFK). Essa enzima utiliza a frutose-6-fosfato como substrato gerando frutose-1,6-bifosfato. Em nossos experimentos, a GXM inibe a atividade da PFK em macrófagos murinos de maneira dose e tempo dependente o que ocorre em paralelo com a diminuição da viabilidade celular. A inibição também é observada na PFK purificada, seguido de uma diminuição da afinidade da enzima pelo seu substrato. Esses dados sugerem que a GXM, quando internalizada pelas células, interage diretamente com a PFK. O mecanismo de inibição ocorre através da dissociação da PFK da forma de tetrâmeros, bastante ativos, em dímeros inativos, como revelado por espectro de fluorescência intrínseca da enzima. Além disso, moduladores alostéricos da enzima, os quais são capazes de estabilizar sua conformação tetramérica, são atenuados pela inibição promovida pela GXM. Em conjunto, nossos resultados sugerem que o mecanismo de morte celular induzida pela GXM envolve a inibição do fluxo glicolítico.

Palavras-chave: *Cryptococcus neoformans*. Glucuronoxilomanana. Fosfofrutocinase.

Abstract

The encapsulated fungi *Cryptococcus neoformans* is the causative agent of cryptococcosis, an opportunistic life-threatening infection that gained a prominent role for affect mainly immunocompromised patients. Infection by this fungus occurs after inhalation of basidiospores or desiccated yeast and some encapsulated mainly found in the pigeon droppings and trees. The fungus can overcome the defense barriers of lung tissue, reaching the circulation, crossing the endothelial barrier and arriving at the brain causing a lethal meningoencephalitis. The polysaccharide capsule, which is the main virulence factor of this fungus, is majorly formed by glucuronoxylomannan (GXM) that, once uptaken by macrophages, induces apoptosis. Due to the close relationship between apoptosis and energy production, the present work aimed at evaluating the effects GXM on the key glycolytic enzyme, phosphofructokinase (PFK), a key enzyme in the glycolytic pathway. This enzyme uses fructose-6-phosphate as substrate generating fructose-1,6-bisphosphate. GXM inhibits PFK activity in cultured murine macrophages in a dose- and time-dependent manner, which occurs in parallel to the decrease of the cell viability. The inhibition is also observed on purified PFK, followed by the decrease on the enzyme affinity for its substrates. These data suggest that GXM, which is uptaken by cells, directly interacts with PFK. The mechanism of inhibition is through the dissociation of PFK active tetramers into quite inactive dimers, as revealed by fluorescence spectroscopy. Moreover, allosteric modulators of the enzyme able to stabilize its tetrameric conformation attenuate the inhibition promoted by GXM. Altogether, our results suggest that the mechanism of GXM induced cell death involves the inhibition of the glycolytic flux.

Keywords: *Cryptococcus neoformans*. Glucuronoxylomannan. Phosphofructokinase.

Sumário

1	Introdução	17
1.1	Infecções fúngicas e <i>Cryptococcus neoformans</i>	17
1.1.1	A cápsula polissacarídica do <i>Cryptococcus neoformans</i>	19
1.1.2	Infecção por <i>C. neoformans</i> : células hospedeiras e resposta a GXM	26
1.1.2.1	Interação de <i>C. neoformans</i> com as Células Epiteliais Alveolares	26
1.1.2.2	Interação de <i>C. neoformans</i> com os Macrófagos	27
1.1.2.3	Interação de <i>C. neoformans</i> com os Neutrófilos	32
1.1.3	<i>C. neoformans</i> , GXM e Fosfofrutocinase (PFK)	31
1.2	Via Glicolítica	33
1.2.1	Regulação do Fluxo Glicolítico	36
1.2.2	Fosfofrutocinase	38
1.2.3	Interação da PFK com o Citoesqueleto	41
1.2.4	Oligomerização da PFK	42
2.1	Objetivo Geral	45
2.2	Objetivos Específicos	45
3	Material e Métodos	46
3.1	Cultivo de células fúngicas e animais	46
3.1.1	Células fúngicas	46
3.1.2	Células animais	46
3.2	Purificação da GXM de <i>C. neoformans</i>	46
3.3	Purificação da PFK	46
3.3.1	Extração	46
3.3.2	Precipitação com Isopropanol	47
3.3.3	Tratamento Quente	47
3.3.4	Fracionamento por Sulfato de Amônio	47
3.3.5	Cristalização	48
3.4	Dosagem de proteína	48
3.5	Medida da Atividade da PFK	48
3.6	Método do sistema acoplado de enzima	48
3.7	Influência da GXM na atividade da PFK	49

3.8	Síntese de ATP radioativo	49
3.9	Espectro de fluorescência	49
3.9.1	Espectroscopia de emissão de fluorescência da enzima	49
3.10	Microscopia de Fluorescência	50
3.11	Ensaio de viabilidade dos macrófagos (lactato-desidrogenase)	50
3.12	Determinação da viabilidade dos macrófagos(MTT)	51
3.13	Dosagem do consumo de glicose	51
3.14	Análise estatística dos resultados	51
4	Resultados	54
4.1	Determinação do número de células, ensaio de MTT, consumo de glicose e produção de lactato após 24 horas de tratamento com a GXM	54
4.2	Sobreposição das imagens demonstrando co-localização da GXM e PFK	56
4.3	Determinação da Atividade Enzimática da Fosfofrutocinase em Macrófagos após Diferentes Tempos de Tratamento com a GXM	57
4.4	GXM inibe a atividade PFK alterando a afinidade pelos seus substratos F-6-P e ATP	59
4.5	Efeito da GXM nos Parâmetros Cinéticos para ATP e F-6-P na PFK de músculo esquelético de coelho	62
4.6	Efeito da GXM sobre a Estrutura Quaternária da PFK	64
4.7	Comportamento dos efetores alostéricos positivos e negativos da enzima PFK na presença e na ausência de GXM	66
5	Discussão	68
6	Conclusão	74
7	Bibliografia	75
8	Anexo	86

Lista de Figuras

Figura 1	<i>Cryptococcus neoformans</i>	17
Figura 2	Estrutura dos polissacarídeos de <i>C. neoformans</i>	19
Figura 3	Esquema mostrando auto-associação das moléculas de GXM e o crescimento distal da cápsula polissacarídica	22
Figura 4	Modelo proposto para a montagem da cápsula do <i>Cryptococcus neoformans</i>	24
Figura 5	Visão geral da via glicolítica	35
Figura 6	Visão geral da regulação do fluxo glicolítico	37
Figura 7	Reação da enzima fosfofrutocinase	38
Figura 8	Associação da fosfofrutocinase com filamentos de actina	41
Figura 9	Modelo proposto para a associação da PFK com f-actina	44
Figura 10	Avaliação do número de células viáveis (A), ensaio de oxidação mitocondrial (MTT) (B), consumo de glicose (C) e produção de lactato (D) após o tratamento por 24 horas com diferentes concentrações da GXM (1, 10 e 100 µg/ml) em macrófagos murinos RAW 264.7	55
Figura 11	Distribuição da PFK-1 e GXM em macrófagos	56
Figura 12	Efeito da GXM na atividade da PFK em macrófagos RAW 246.7	58
Figura 13	Efeito da GXM na atividade da PFK purificada de músculo esquelético de coelho.	59
Figura 14	Efeito da GXM na atividade da PFK purificada de músculo esquelético de coelho utilizando diferentes concentrações do substrato da enzima, F-6-P	60
Figura 15	Efeito da GXM na atividade da PFK purificada de músculo esquelético de coelho utilizando diferentes concentrações do substrato da enzima, ATP	61
Figura 16	Efeito da GXM em diferentes concentrações (0,1; 1; 10 e 100 µg/ml) sobre a PFK no centro de massa do espectro de fluorescência intrínseca	65

Figura 17 Efeito da GXM na atividade da PFK purificada de 67
músculo esquelético de coelho com o ATP (A) 1 mM e
em (B) 5 mM, na presença de efetores alostéricos
positivos da enzima (F-2,6-BP; ADP; PKA, Ca^{2+} CaM⁺) e
negativos (citrato e lactato).

Tabela 1 Efeitos da GXM nos parâmetros cinéticos para ATP e 63
F-6-P na PFK de músculo esquelético de coelho

Esquema 1 Equação de conversão de glicose a piruvato,ATP e NADH 34

Esquema 2 Equilíbrio entre os diferentes oligômeros da PFK 43

Abreviaturas

- [³²P] Pi – fosfato inorgânico marcado com fosfato radioativo
- [γ -³²P] ATP - adenosina 5'-trifosfato marcado radioativamente no fosfato γ
- Acetil-CoA - acetil coenzima A
- ADP - adenosina 5'difosfato
- Ags - antígenos
- AIDS - síndrome da imunodeficiência adquirida
- AMP - adenosina 5'monofosfato
- APC - célula apresentadora de antígeno
- ATP - adenosina 5'trifosfato
- BSA - albumina de soro bovino ("Bovine serum albumin")
- Ca²⁺ - íon cálcio
- CaM - Calmodulina
- DIC - contraste interferencial-diferencial
- DMEM - dulbeccos's modified eagle medium
- F1,6BFase -frutose-1,6-bisfosfatase
- F1,6BP - frutose 1,6-bifosfato
- F2,6BP - frutose 2,6-bifosfato
- F6P - frutose- 6-fosfato
- FADH₂- flavina adenina dinucleotídeo reduzida
- Fas L - ligante de Fas
- Fc \odot RII - receptor para a porção Fc de imunoglobulina \odot
- G3P - gliceraldeído-3-fosfato
- G6P - glicose-6-fosfato
- GalXM - galactoxilomana
- GlcA - ácido glucurônico
- GXM - glucuronoxilomanana
- HK - hexoquinase
- I - intensidade de fluorescência
- I_{0,5}- constante de afinidade para inibição
- IFN- \odot - interferon gama
- Ig - Imunoglobulina
- IL-10 - interleucina 10
- IL-8 - interleucina 8
- K_{0,5}- Constante de afinidade para substrato
- LDH - lactato desidrogenase

LPS - lipopolissacarídeos
M₁ - monômeros da PFK
M₁₆ - hexadecâmeros
M₂ - dímeros
M₄ - tetrâmeros
Man - Manose
MCT - monocarboxylate transporters
MHC de classe II – molécula de histocompatibilidade principal de classe II
MTT - Thiazolyl blue tetrazolium bromide
NAD⁺ - nicotinamida adenosina dinucleotídeo oxidada
NADH - nicotinamida adenosina dinucleotídeo reduzida
NaF- fluoreto de sódio
NH₄⁺ - sulfato de amônia
n_i - índice de cooperatividade do componente de inibição
n_s - índice de cooperatividade do componente de estímulo
PBS – salina tamponada em fosfato
PDH - piruvato desidrogenase
PEP - fosfoenolpiruvato
PFK - fosfofrutocinase
PFKL - fosfofrutocinase isoforma L
PFKM - fosfofrutocinase isoforma M
PFKP - fosfofrutocinase isoforma P
Pi - fosfato inorgânico
RAW 246.7 – macrófagos tumorais murinos de linhagem RAW 246.7
TLR2 - receptor Toll like 2
TLR4 - receptor Toll like 4
TNF - fator de necrose tumoral
Tris - tris(hidroximetil)aminometano
V_{max app} – velocidade máxima aparente
V_{max} - velocidade máxima
V_{sat} - atividade da PFK quando o primeiro componente está saturado
Xyl - xilose

1- Introdução:

1.1- Infecções fúngicas e *Cryptococcus neoformans*:

Estudos epidemiológicos revelam um aumento de infecções fúngicas nas duas últimas décadas. Esse aumento vem sendo associado ao crescimento no número de pacientes imunocomprometidos. Fato que está relacionado às doenças ou tratamentos que diminuem as defesas do organismo, como por exemplo, a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), transplante de órgãos e terapias imunossupressoras. Essas infecções fúngicas vêm despertando atenção na comunidade científica por diferentes motivos: (i) pela ineficiência no tratamento das micoses sistêmicas, a forma mais grave das infecções fúngicas, (ii) pelo aumento de cepas resistentes aos antifúngicos correntes e (iii) pela emergência de novos gêneros e espécies capazes de infectar o homem (Juang, 2007). Isso vem aumentando a busca de novos alvos e de novos agentes antifúngicos. Alternativamente, o conhecimento dos mecanismos regulatórios promovidos pelo fungo invasor ou moléculas derivadas pode gerar novas alternativas para o combate dessas infecções.

Dentre os fungos emergentes, o *Cryptococcus neoformans* é considerado um dos mais letais acometendo, principalmente, indivíduos imunocomprometidos. O *C. neoformans*, um patógeno fúngico intracelular facultativo, encapsulado e de morfologia esférica, é o agente etiológico da criptococose podendo ser facilmente visualizado pela contra-coloração com tinta nanquim (Figura 1).

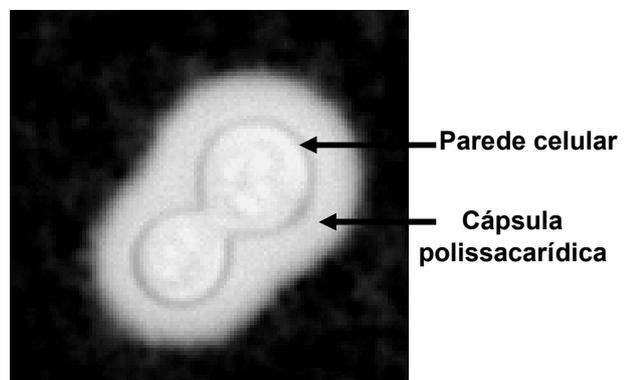


Figura 1 – *Cryptococcus neoformans* (microscopia óptica com tinta nanquim demonstrando a cápsula polissacarídica).

A taxa de incidência para a criptococose nesses últimos anos é de 0,4 a 1,3 casos a cada cem mil pessoas na população em geral. Em pacientes com AIDS a incidência anual é de 2 a 7 pessoas a cada mil casos (http://www.cdc.gov/nczved/dfbmd/disease_listing/cryptococcus_ti.html).

O *C. neoformans* tem distribuição mundial e caráter oportunista. A infecção se dá após a inalação de basidiosporos ou leveduras dessecadas e pouco encapsuladas encontradas no meio ambiente, principalmente nas excretas de pombos e em árvores. Os basidiósporos são facilmente aerolizados e muito resistentes a dessecação. Apresentam-se com um diâmetro em torno de 1,8 a 2 μm , sendo pequenos o bastante para atingir os alvéolos pulmonares. A infecção, na maioria dos casos, pode ser assintomática. Porém, o fungo pode ultrapassar as barreiras de defesa no tecido pulmonar, atingindo a circulação, e atravessar as barreiras endoteliais e chegar ao cérebro, causando um quadro letal de meningite criptocócica (Rodrigues *et al.*, 1999; Lin e Heitman 2006). Após tratamento com agentes antifúngicos a infecção pode ser controlada, embora mesmo em indivíduos que não apresentam qualquer comprometimento imunológico esse tratamento nem sempre é eficiente. Muitas vezes, em infecções assintomáticas, os fungos permanecem dormentes e se por algum motivo a imunidade do hospedeiro é comprometida, a forma dormente pode ser ativada e levar a uma disseminação sistêmica. Isso também pode ocorrer quando a infecção existente é controlada e o fungo permanece no hospedeiro (Lin & Heitman 2006). Segundo estudos de Garcia-Hermoso e colaboradores (1999) os indivíduos podem abrigar leveduras na forma latente por um período longo de até 13 anos antes da infecção ser ativada.

1.1.1- A cápsula polissacarídica do *Cryptococcus neoformans*

A cápsula polissacarídica (Figura 1), principal fator de virulência desse fungo, é composta por uma rede contendo glucuronoxilomanana (GXM) e galactoxilomana (GalXM). A GXM é o componente majoritário da cápsula do *C. neoformans* (~90% de toda cápsula) (Nimrichter, *et al*, 2007; Bose, 2003). Ela apresenta massa entre 1700 a 7000 KDa e é composta por uma cadeia linear de manose com ligações α (1,3) com substituições de xilose β (1,2) e β (1,4) e resíduos de ácido glucurônico (GlcA) β (1,2) (Figura 2 A) (McFadden, Zaragoza & Casadevall, 2006; McFadden, De Jesus & Casadevall, 2006; Rodrigues *et al.*, 2009). A GalXM tem uma massa de aproximadamente 100 KDa sendo formada por um core central de galactose contendo ligações α (1,6) e ramificações de galactose β (1,3), manose α (1,4) e α (1,3) e de xilose β (1,3) e β (1,2) (McFadden, Zaragoza & Casadevall, 2006; Zaragoza *et al.*, 2009) (Figura 2 B).

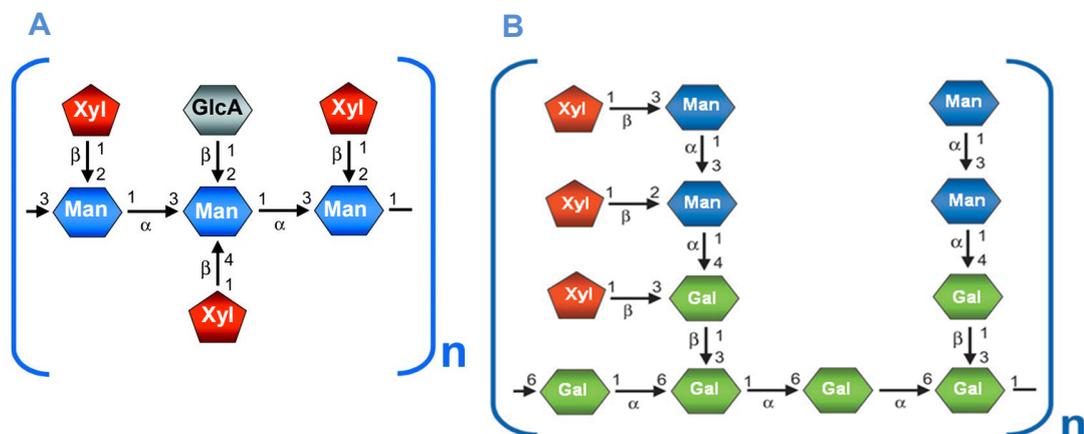


Figura 2 – Estrutura dos polissacarídeos de *C. neoformans*. A GXM (A) é formada por um “core” central de manose (Man - Azul) contendo ramificações de xilose (Xyl - Vermelho) e ácido glucurônico (GlcA - Cinza) (sorotipo B). A GalXM (B) formada por um “core” central de galactose contendo ramificações de Xyl, Man e Gal (Adaptado de Bose, *et al.*, 2003).

Tanto a composição quanto a estrutura da cápsula do *C. neoformans* pode variar de acordo com a cepa. Com base na reatividade com anticorpos o *C. neoformans* é dividido em cinco sorotipos: A, B, C, D e AD. Os sorotipos A e D são os mais comumente associados com doenças humanas (McFadden, Zaragoza & Casadevall, 2006).

Uma vez que a cápsula é a primeira estrutura do *C. neoformans* a interagir com células do hospedeiro ela vem sendo alvo de estudos de diferentes grupos na literatura. A capacidade de múltiplas combinações de tamanho e estrutura da cápsula torna a rede capsular muito versátil além de contribuir para a virulência do fungo, conforme será discutido adiante (Feldmesser *et al.*, 2000a; Tucker & Casadevall, 2002; Zaragoza *et al.*, 2006). Além de compor a cápsula, os polissacarídeos são constitutivamente secretados para o meio extracelular tanto *in vitro* quanto *in vivo* (McFadden, Zaragoza & Casadevall, 2006). Dessa forma, eles não apenas participam das etapas iniciais de interação do fungo com células hospedeiras, mas também sua forma não associada estaria em contato constante com as células do indivíduo infectado. Nesse contexto, níveis aumentados de GXM no soro de pacientes são correlacionados com um prognóstico negativo, indicando a evolução da doença (McFadden, Zaragoza & Casadevall, 2006).

A cápsula polissacarídica não é apenas crucial para a patogênese. Existem relatos na literatura demonstrando que essa cápsula também tem um importante papel na sobrevivência do *C. neoformans*, promovendo a proteção do fungo no meio ambiente. A expressão da cápsula aumenta a resistência desse fungo contra a dessecação e o efeito de radiações solares (Zaragoza *et al.*, 2009; Martinez, & Casadevall, 2005).

A importância da cápsula como principal fator de virulência e a complexidade dessa estrutura na superfície do *C. neoformans* vem despertando o interesse no minucioso processo de síntese, expressão e montagem dessa estrutura na superfície do fungo. Em geral, os sinais que induzem o crescimento da cápsula são muito heterogêneos, tais como pH, concentrações de ferro livre, disponibilidade de CO₂, osmolaridade do meio, concentração de nutrientes, temperatura e soro (Zaragoza *et al.*, 2009). As condições alcalinas facilitam o crescimento da cápsula, embora o pH básico não seja suficiente para mediar este efeito. Baixa concentração de ferro também

estimula o crescimento da cápsula. Alta osmolaridade do meio pode bloquear o crescimento da cápsula, uma vez que altas concentrações de glicose inibem o seu crescimento. Embora este efeito não se aplique a qualquer soluto, cloreto de sódio produz o mesmo efeito. Finalmente, a temperatura parece ter um efeito sobre o tamanho da célula, mas somente quando associada a outros fatores que induzem o crescimento. (Zaragoza & Casadevall, 2004; McFadden, Zaragoza & Casadevall, 2006; Lin, 2009).

Algumas diferenças são observadas *in vitro* e *in vivo* com relação ao tempo necessário para crescimento da cápsula e seu tamanho. Segundo estudos de Rivera e colaboradores (1998) a expressão da cápsula *in vitro*, sob condições padrões, é pequena, chegando a 1 ou 2 microns. O aumento do tamanho da cápsula pode ser detectado *in vitro* depois de quatro a seis horas após a indução. (McFadden, Zaragoza & Casadevall, 2006). Por outro lado, *in vivo* o crescimento da cápsula parece ser mais rápido e as diferenças no seu tamanho são perceptíveis e aparentes após cinco minutos de infecção. A cápsula pode chegar até 30 microns, ultrapassando em mais de dez vezes o tamanho do corpo celular (McFadden, Zaragoza & Casadevall, 2006).

A elevada quantidade produzida e secretada do material capsular e a sua correlação com mecanismos de sobrevivência levantaram a hipótese de que as moléculas envolvidas na formação da cápsula sejam de alguma forma reguladas de acordo com o meio onde a levedura se encontra. De fato, o tamanho da cápsula do *C. neoformans* pode variar dependendo das condições de crescimento e da cepa utilizada (Rodrigues *et al.*, 1999). Essa característica tem sido associada com a virulência, uma vez que a cápsula protege o fungo contra os mecanismos de defesa do hospedeiro, tal como, a fagocitose, inibição da migração de leucócitos e modulação de diferentes citocinas (Zaragoza *et al.*, 2006).

Diferente de todos os demais polissacarídeos microbianos, os polissacarídeos capsulares desse fungo são sintetizados no citoplasma e transferidos em vesículas para o espaço extracelular (Yoneda & Doering, 2006, Rodrigues *et al.*, 2007, Rodrigues *et al.*, 2008, Oliveira *et al.*, 2009). Presumivelmente, as vesículas se rompem liberando os componentes capsulares que, em seguida, são associados à parede celular e utilizados para o aumento da cápsula.

Conforme visualizado anteriormente na Figura 1, a cápsula forma um grande complexo na superfície do *C. neoformans*. Essa rede capsular é formada pela auto-associação das moléculas e o emaranhado das fibras está representada de forma esquemática na Figura 3 (McFadden, Zaragoza & Casadevall, 2006). A montagem da cápsula na superfície do *C. neoformans* é um processo complexo e ainda sob investigação. Segundo estudos de Zaragoza e colaboradores (2006), a análise do crescimento da cápsula utilizando complemento como marcador revelou que o material capsular antigo continua próximo a parede celular durante o aumento da capsula enquanto as fibras mais novas se associam a parte mais externa (Figura 3). Os primeiros estudos sugerem que a rede capsular está associada à parede celular através de uma estreita interação com α 1,3 mananas (Doering, 2009). Mais recentemente, Rodrigues e colaboradores (2008) demonstraram que oligômeros de quitina também participam desse processo e que o crescimento distal ocorre através da auto-agregação da GXM na superfície (Nimrichter *et al.*, 2007).

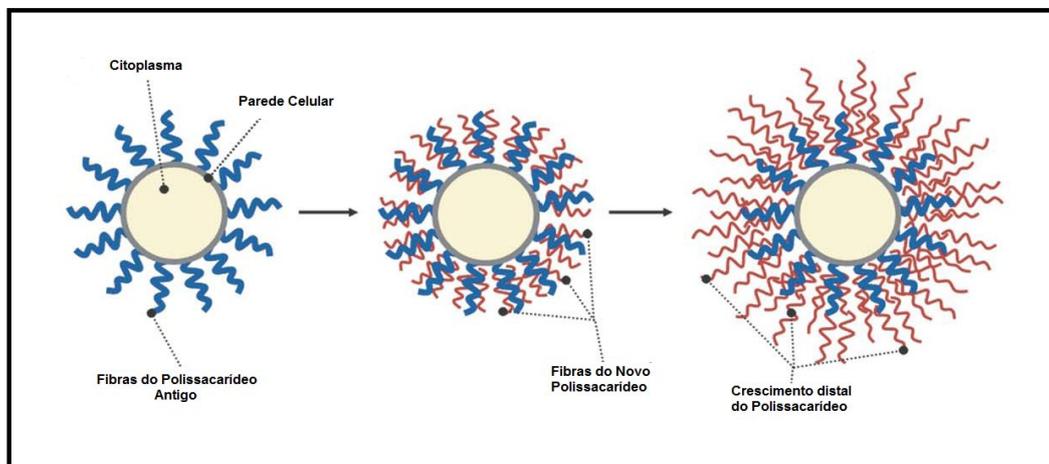


Figura 3 – Esquema mostrando auto-associação das moléculas de GXM e o crescimento distal da cápsula polissacarídica. O novo polissacarídeo (vermelho) é associado ao polissacarídeo existente (azul) (Adaptado de McFadden, Zaragoza & Casadevall, 2006).

Nimrichter e colaboradores (2007) demonstram que a formação das pontes por cátions divalentes apresentam uma correlação estequiométrica entre os íons e a única carga negativa do GlcA. Neste sentido, as condições ideais para a agregação GXM exigem dois GlcA para cada átomo do metal divalente. Essa associação gera ligações cruzadas entre as cadeias do polissacarídeo levando ao aumento do tamanho da cápsula polissacarídica (Figura 4). Os mecanismos que contribuem para a auto-agregação da GXM podem interferir sobre a viscosidade dos polissacarídeos capsulares. Na presença de um aumento da concentração dos íons divalentes, a viscosidade diminui em função da saturação unilateral dos resíduos do GlcA com cátions divalentes, reduzindo a agregação das moléculas de GXM. A adição de quantidades excessivas de cátions divalentes a leveduras de *C. neoformans* tem como resposta um desequilíbrio e uma consequente redução no tamanho da cápsula (Nimrichter *et al.*, 2007).

Portanto, as pontes de cátions divalentes são as responsáveis pela alta densidade do filme contendo GXM, mas em concentrações compatíveis com os resíduos de GlcA. Essa propriedade nos levou a um método de purificação eficiente e rápido, onde a GXM é obtida sem as alterações estruturais observadas em protocolos utilizados previamente na literatura (Nimrichter *et al.*, 2007). As informações obtidas na literatura com relação a organização estrutural da cápsula polissacarídica está representada na Figura 4.

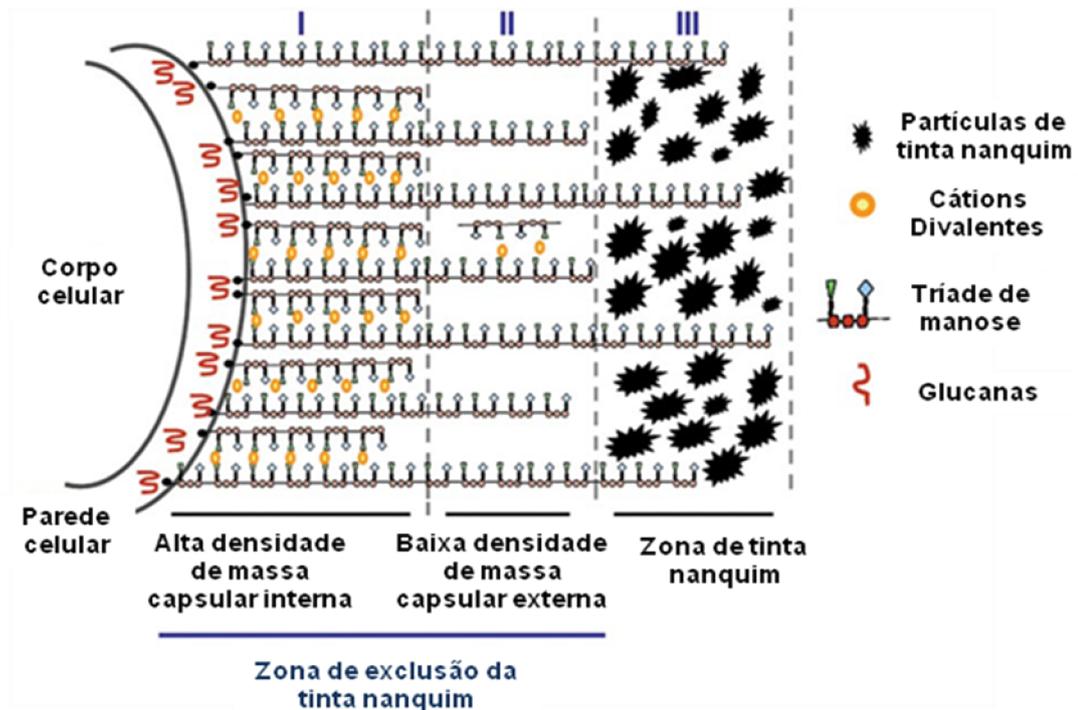


Figura 4 – Modelo proposto para a montagem da cápsula do *Cryptococcus neoformans*. As fibras de GXM estão unidas a parede celular pelas glucanas por meio de interações não covalentes. Para mostrar que a capsula polissacarídica diminui a densidade em função do crescimento distal, foi utilizado tinta nanquim como um marcador do comprimento da cápsula, onde também demonstra que as fibras não se ligam uniformemente. A interação das fibras de GXM são mediadas através da formação de pontes de cátions divalentes. Uma pequena população de fibras, de maior comprimento servem para aumentar o diâmetro efetivo da cápsula passado pela zona de exclusão de tinta nanquim. Embora o diagrama mostra as interações GXM-GXM limitado apenas à camada interna, supõe-se que esta interação pode ocorrer em todo o diâmetro da cápsula com a ressalva de que elas são mais frequentes nas camadas internas da cápsula, onde representam a maior densidade dessas regiões (Adaptado de Frases *et al.*, 2008).

Após o crescimento, existem diferenças de densidade no interior da cápsula. As regiões mais densas se encontram adjacentes à parede celular e tem sua densidade diminuída gradualmente para o exterior. Apesar do aumento capsular ser uma resposta comum de *C. neoformans* aos estímulos do ambiente, uma cápsula grande poderia ser problemática para uma das mais importantes funções vitais das células, a replicação (McFadden, Zaragoza & Casadevall, 2006). Todavia, a separação da célula-filha não é interferida pela densa rede de fibras da cápsula. No brotamento, o rearranjo capsular inicialmente se manifesta como uma ondulação na borda da cápsula que é direcionada para o broto. Os dados na literatura sugerem que a cápsula sofre rearranjo local durante o brotamento, possivelmente produzindo um túnel para o broto surgir (Bose *et al.*, 2003; McFadden, Zaragoza & Casadevall, 2006). Esse processo sugere um mecanismo elaborado que tem como base o controle durante a formação e a ruptura da rede capsular (McFadden, Zaragoza & Casadevall, 2006). Alternativamente, a separação pode ser um processo puramente físico, com a força que está sendo gerada pelas fibras da cápsula da célula mãe, movendo-se para a fenda de separação, ou pela célula filha quando a cápsula aumenta. Isso também permitiria uma separação rápida dessas leveduras (McFadden, Zaragoza & Casadevall, 2006).

Conforme discutido, a GXM que não se associa a superfície fúngica fica livre para interagir com as células do hospedeiro, onde é reconhecidamente uma molécula imunossupressora (Monari, Bistoni & Vecchiarelli, 2006). Por esses motivos o papel da GXM na infecção pelo *C. neoformans* vem sendo estudado em detalhes por diferentes grupos na literatura. Uma modulação negativa da resposta imune do hospedeiro, bem como o envolvimento desse polissacarídeo na adesão do *C. neoformans* a diferentes tipos celulares vem sendo demonstrado e algumas das informações contidas na literatura serão discutidas adiante (Rodrigues *et al.*, 2007).

1.1.2 - Infecção por *C. neoformans*: células hospedeiras e resposta a GXM

O estabelecimento da criptococose depende da sobrevivência do fungo nos alvéolos pulmonares, fato que precede sua disseminação para outros tecidos. Nessa região o fungo interage com dois tipos celulares principais, os macrófagos alveolares e as células epiteliais alveolares. Embora as partículas fúngicas que chegam aos alvéolos tenham sua expressão capsular reduzida pelas condições encontradas no solo, em poucas horas esse fungo já expressa uma cápsula compacta e capaz de influenciar de forma decisiva nos mecanismos de defesa do hospedeiro. Além de proteger contra fagocitose, o material presente na cápsula é secretado constantemente e interage com as células do hospedeiro modulando suas atividades. Muitos estudos vêm analisando a interação do *C. neoformans* e da GXM com diferentes células hospedeiras.

1.1.2.1- Interação de *C. neoformans* com as Células Epiteliais Alveolares

Uma interação efetiva do fungo com células epiteliais alveolares é provavelmente essencial para o estabelecimento da infecção pulmonar (Barbosa *et al.*, 2005) sendo a primeira barreira encontrada pelo fungo durante a instalação da infecção. Uma vez que, o *C. neoformans* se estabelece no pulmão, ele se prolifera no local e provoca uma lesão primária, que geralmente é assintomática e contida pela formação de granulomas (Barbosa *et al.*, 2007). Os componentes do *C. neoformans*, que são importantes para a adesão a células epiteliais alveolares tipo II humano são adesinas, fosfolipase B e a GXM (Barbosa *et al.*, 2007; Bicanic & Harrison, 2005, Rodrigues *et al.*, 2009, Feldmesser, Tucker & Casadevall, 2001).

- I - Adesinas: facilitam a adesão e penetração através do tecido infectado;
- II - Fosfolipase B: hidrolisa componentes lipídicos da membrana do fagossoma dando acesso ao fungo para o ambiente citoplasmático de macrófagos.
- III - Glucuronoxilomanana: fornece uma barreira física, que interfere com a fagocitose promove evasão imune e a sobrevivência no hospedeiro.

Em estudos realizados em nosso laboratório observou-se que as células epiteliais expressam receptores para a GXM. Barbosa e colaboradores (2007) demonstraram que o receptor usado pelas células epiteliais alveolares para ligação da GXM é a molécula CD14 (Barbosa *et al.*, 2007). A internalização da GXM tem como consequência a ativação da produção de interleucina (IL)-8, uma molécula envolvida na resposta inflamatória (Rodrigues *et al.*, 2009) e que também é induzida por lipopolissacarídeos (LPS) bacterianos nesse mesmo tipo celular (Reddi *et al.*, 2003). Embora a GXM isolada não tenha nenhum efeito citotóxico sobre essas células, o fungo é capaz de provocar a sua morte. Nesse processo, o fungo adere ao epitélio alveolar por intermédio da sua cápsula, ocorre a internalização e ele pode ficar por até 18 meses nos granulomas intersticiais (Bicanic, 2003) e isso culminaria com a morte das células hospedeiras e a passagem do fungo para o interstício pulmonar (Barbosa *et al.*, 2007) podendo cair na corrente sangüínea ou linfática e atingir diferentes órgãos e tecidos. Assim como a GXM, a endotoxina LPS também tem como receptor, nas células epiteliais alveolares, a molécula CD14. Em ensaios de inibição foi observado que a incubação prévia com LPS reduz significativamente a associação do *C. neoformans* com células epiteliais alveolares (Barbosa *et al.*, 2006).

1.1.2.2- Interação de *C. neoformans* com os Macrófagos

Estudos recentes demonstram que o *C. neoformans* é um patógeno tanto intracelular como extracelular e é capaz de sobreviver e se reproduzir dentro dos macrófagos (Bicanic & Harrison, 2005; Del Poeta, 2004).

No espaço alveolar, as células fúngicas inaladas são confrontadas pelos macrófagos onde são internalizadas por um mecanismo de fagocitose, ainda não totalmente conhecido (Chang *et al.*, 2006). Os *C. neoformans* são totalmente englobados por essas células de defesa evitando a exposição e, conseqüentemente o ataque completo do sistema imunológico (Ma *et al.*, 2006). Porém, essa associação do principal componente da cápsula, a GXM com os macrófagos parecem envolver diferentes ligantes, como, por exemplo, TLR4, TLR2, CD18, CD14 e Fc γ RII (Chang *et al.*, 2006).

Porém para sobreviver e proliferar intracelularmente, os microrganismos precisam desenvolver mecanismos para evitar sua destruição por vias degradativas, que podem incluir o escape do fagossoma no citosol do hospedeiro, a prevenção da fusão do fagolisossoma ou mesmo a capacidade de sobreviver dentro de fagolisossoma (Del Poeta, 2004). No caso de *C. neoformans*, o que parece ocorrer é a fusão do fagolisossomo e esse processo ocorre dentro de duas horas de infecção (Feldmesser, Tucker & Casadevall, 2001), com transferência do polissacarídeo capsular para dentro dos lisossomas (Ma *et al.*, 2006). Além desses mecanismos criados pelo fungo ele apresenta alguns fatores de virulência, tais como: Fosfolipase B, Melanina e a GXM os quais ajudaram na sua sobrevivência.

Dentro do fagolisossomo ocorre a proliferação do fungo (Ma *et al.*, 2006) e em algumas horas a GXM se acumula. O tráfico lisossomal desordenado, resultante da presença do polissacarídeo, leva ao acúmulo de vacúolos citoplasmáticos, com subsequente rompimento da célula hospedeira e liberação de organismos extracelulares (Del Poeta, 2004) que poderão infectar novas células (Feldmesser, Tucker & Casadevall, 2001). Como consequência observa-se uma resposta celular que envolve o complexo CD14/TLR4 e que leva ao aumento na expressão de moléculas chave na resposta imune, tais como FasL, CD40, CD86, CD14, TLR4, CD18 e Fc γ RII. Além disso, a exposição de macrófagos ao polissacarídeo resulta na produção de IL-10 e diminuição da expressão de moléculas de MHC de classe II. No entanto, embora tenha receptores similares ao LPS, a GXM é capaz de reverter a produção de citocinas em macrófagos estimulados por LPS (Monari *et al.*, 2005a e Monari *et al.*, 2005b).

Uma vez que, os macrófagos podem liberar grandes quantidades de metabólitos tóxicos o qual podem promover danos no tecido durante as respostas de defesa antimicrobianas, eles também podem iniciar um processo de resposta imune de auto-destruição, ou seja, eles podem induzir a apoptose das células. Portanto, os macrófagos são células extremamente importantes na defesa, mas também estão envolvidos em processos que causam dano ao tecido do hospedeiro (Monari *et al.*, 2005b).

Os macrófagos são responsáveis por apresentar antígenos (Ags) em sua superfície para os linfócitos T, ativando célula apresentadora de antígeno (APC) a qual

desempenha um importante papel, como exemplo, iniciam a resposta da célula T. Os linfócitos T são ativados se a APC expressa molécula co-estimulatória, tal como CD80 e CD86 e apresenta anergia se a APC não expressa moléculas co-estimulatória, ou apoptose se a APC expressa Fas ligante (Fas L). Fas é um receptor transmembranar do tipo I e a sua expressão pode ser estimulada pelas citocinas, tal como IFN- γ , TNF e também pela ativação de linfócitos. Apoptose mediada por Fas ocorre pelo seu ligante natural, Fas L que é uma proteína de membrana do tipo II. Ao contrário de Fas, que é expresso na superfície de diferentes populações de células, a expressão de FasL na superfície parece ser mais restrita e, muitas vezes requer ativação celular (Monari *et al.*, 2005b; Villena *et al.*, 2008).

O *C. neoformans* também pode levar a um processo de apoptose, pois a GXM é um potente imunomodulador e através de estudos de Monari e seus colaboradores constatou-se que ocorre uma super expressão de Fas L quando o macrófago tem o contato com o polissacarídeo capsular e que essa expressão ocorre através da interação GXM -TLR4 (Monari *et al.*, 2005b).

Outra alternativa que o *C. neoformans* tem e que ocorre em alguns macrófagos é o processo de extrusão após a replicação dos fungos no fagolisossomo. Como consequência, os fungos presentes no fagolisossomo são liberados para o meio extracelular sem nenhum tipo de dano para as células hospedeiras, que, em seguida, se dividem normalmente. Esse mecanismo de extrusão parece ser dependente, principalmente, da presença de cápsula e independente do funcionamento do citoesqueleto (Alvarez & Casadevall, 2006; Ma *et al.*, 2006). Esses dados sugerem que o fungo é o responsável direto por esse evento.

Recentemente, um novo mecanismo de disseminação do fungo foi descrito. Este mecanismo permite ao microrganismo escapar de componentes antimicrobianos do espaço extracelular como anticorpos, complemento e drogas que tenham penetração limitada nas células. Essa nova estratégia descoberta seria de uma passagem lateral do fungo de uma célula para outra, evitando, portanto o espaço extracelular e escapando do reconhecimento e ação da resposta imune. Esse novo mecanismo de disseminação direta de uma célula infectada para uma não infectada requer contato entre as células e depende da motilidade das mesmas, ou seja, seu citoesqueleto deve

estar funcionando normalmente. Portanto, o estudo desse mecanismo de disseminação pelo *C. neoformans* é importante porque a passagem do patógeno de um fagócito frágil para um saudável permite a persistência intracelular do patógeno mesmo se a célula hospedeira começar a morrer. Além disso, os macrófagos infectados podem viajar através do sistema circulatório e linfático do hospedeiro onde podem interagir entre si e com outros tipos celulares. Especula-se também que *C. neoformans* internalizado pode usar esse contato para atravessar a barreira hematoencefálica por passagem direta célula a célula (Alvarez & Casadevall, 2007; Ma *et al.*, 2007).

O fato de *C. neoformans* sobreviver dentro de fagócitos e de nem sempre levá-los à lise, pode ter uma grande influência na patologia causada por este fungo. O macrófago poderia servir como uma espécie de “veículo” para o fungo, já que através desta célula do hospedeiro o patógeno pode se disseminar para outros órgãos e tecidos escapando da resposta imune do hospedeiro (Alvarez & Casadevall, 2006).

1.1.2.3- Interação de *C. neoformans* com os Neutrófilos

Em neutrófilos, outra célula envolvida no combate a criptococose, a GXM é internalizada após um período de 1 hora, podendo ser posteriormente eliminada. Nessas células a GXM promove uma diminuição da atividade anti-criptocócica (Monari *et al.*, 2003) e bloqueia a interação dos neutrófilos com o endotélio. Tal processo resulta na inibição da migração de leucócitos para os sítios de combate ao patógeno. O bloqueio da interação entre neutrófilos e endotélio mediado por GXM poderia ser explicado pela interação do polissacarídeo com moléculas indispensáveis ao processo, como selectinas e seus receptores de superfície no neutrófilo (Ellerbroek *et al.*, 2004).

1.1.3- *C. neoformans*, GXM e Fosfofrutocinase (PFK):

Se por um lado a resposta imunológica derivada da interação entre o *C. neoformans* e a GXM com células do sistema imunológico vem sendo detalhadamente estudada, seus efeitos na modulação de enzimas metabólicas nessas mesmas células ainda são totalmente desconhecidos.

Considerando que todas as alterações mediadas pela GXM nos diferentes tipos celulares descritos acima dependem de um gasto de energia, nosso interesse tem como foco a enzima fosfofrutocinase (PFK), a principal enzima reguladora da via glicolítica.

Vale ressaltar que a glicólise é a principal via para o catabolismo de carboidratos em todos os tipos celulares, requerendo um alto grau de regulação para o bom funcionamento celular. Além disso, a glicólise produz intermediários biossintéticos para outras vias, alimentando as vias de biossíntese de ácidos graxos, aminoácidos e colesterol, entre outras (El-Bacha & Sola-Penna, 2002). Nesse contexto, entender o efeito da GXM na regulação de PFK pode ser útil no entendimento da potente modulação mediada pelo polissacarídeo.

Embora não exista nenhum estudo na literatura que envolva GXM e regulação da PFK, alguns estudos contrastantes vêm mostrando o envolvimento indireto do LPS na regulação dessa enzima. De acordo com Markov e colaboradores (1981) o LPS promove a inibição de PFK em modelo canino por desencadear uma acidose metabólica. Como consequência observa-se uma redução na formação do produto dessa enzima, a frutose-1,6-bisfosfato (F1,6BP) (Markov *et al.*, 1981). A reposição da F1,6BP, por sua vez, é capaz de reverter o efeito do LPS. Isso se deve, aparentemente, a restauração da via glicolítica. No entanto, a dificuldade do transporte transmembranar de açúcares fosforilados questiona a teoria proposta por esses autores. Além disso, o tratamento com F1,6BP se mostrou capaz de prevenir isquemia em diferentes órgãos e tecidos (Hardin e Roberts, 1994, Didlake *et al.*, 1989, Lazzarino *et al.*, 1991, Sano *et al.*, 1995, Sola *et al.*, 1996) em um mecanismo que pode envolver a inibição da produção de oxidantes, o seqüestro de cálcio extracelular (Galzigna *et al.*, 1989) a estabilização

da membrana plasmática (Galzigna *et al.*, 1989) e a inibição da NO sintase (Markov *et al.*, 1981, Edde *et al.*, 1998).

Por outro lado, em 1992, Ceppi e colaboradores demonstraram que células de fígado de ratos tratadas com LPS apresentaram um aumento da atividade de PFK e uma redução na atividade da frutose-1,6-bisfosfatase (F1,6BFase). A modulação dessa atividade foi mediada pela estimulação da produção de F2,6BP, um ativador da PFK, e na redução do fosfoenolpiruvato (PEP), um regulador negativo da enzima produtora de F2,6BP (Fosfofrutocinase-2 - PFK-2).

Esses resultados contraditórios sugerem que estudos adicionais devem ser realizados com a finalidade de se entender a influência de microrganismos e moléculas deles derivadas em enzimas relacionadas ao metabolismo energético. Novas estratégias para o combate de infecções podem surgir através da compreensão da relação entre tais estruturas e o controle metabólico.

1.2 - Via Glicolítica

A via central do catabolismo da glicose nos seres vivos é conhecida como Via de Embden-Meyerhof ou glicólise. A glicólise converte a molécula de glicose em duas moléculas de piruvato através das ações sequenciais de 10 enzimas citosólicas. Neste processo há geração líquida de 2 moléculas de ATP e NADH.

Inicialmente a glicose é fosforilada no seu carbono 6 pela enzima HK. Nesta reação ocorre a transferência do fosfato gama do ATP para a molécula de glicose, que é convertida em G6P. Esta reação é irreversível nas condições fisiológicas, sendo um dos pontos de controle da via. Com exceção do fígado, das células β pancreáticas e dos rins que, possuem a enzima glicose 6-fosfatase capaz de converter a G6P em glicose livre, a G6P gerada pela HK não é capaz de sair da célula, sendo necessariamente metabolizada pela mesma. Isso ocorre porque a membrana plasmática é impermeável a G6P. Na etapa seguinte da via glicolítica ocorre uma isomerização da G6P em frutose-6-fosfato (F6P), através da enzima glicose fosfato isomerase. A F6P posteriormente pode ser fosforilada no carbono 1, sendo assim convertida em frutose-1,6-bifosfato (F1,6BP). Esta reação consome ATP sendo catalisada pela enzima fosfofrutocinase (PFK). Esta é a segunda reação irreversível desta via, sendo descrita como o principal ponto de controle de todo o fluxo glicolítico. A conversão da F6P em F1,6BP compromete esta última a ser metabolizada na via glicolítica. A próxima reação, catalisada pela aldolase, converte este composto de 6 carbonos em dois outros compostos, cada um com 3 carbonos: gliceraldeído-3-fosfato (G3P) e diidroxiacetona-3-fosfato. A enzima triose fosfato isomerase interconverte este dois compostos, sendo que apenas o G3P segue o fluxo glicolítico. Até esta etapa foram consumidos 2 moles de ATP por mol de glicose. Entretanto, as duas moléculas de G3P geradas até o momento serão metabolizadas, através de 5 reações sequenciais, em 2 moléculas de piruvato. As enzimas que catalisam estas reações em sequência são: gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, fosfoglicerato cinase, fosfogliceratomutase, enolase, e piruvato cinase.

A piruvato cinase é a terceira e última reação irreversível em condições fisiológicas da via glicolítica. Neste processo 4 moles de ADP serão convertidos em 4 moles de

ATP, e concomitantemente, ocorrerá a redução de 2 moles de NAD^+ em 2 moles de NADH. Assim, o rendimento líquido da metabolização de 1 mol de glicose em 2 moles de piruvato passa a ser: 2 moles de ATP e 2 moles de NADH. A oxidação parcial da glicose pela via glicolítica pode ser sumarizada pela seguinte equação (Esquema 1).



Esquema 1: Equação de conversão de glicose a piruvato, ATP e NADH.

Como vimos, a via glicolítica pode gerar para cada mol de glicose metabolizada dois moles de piruvato. O piruvato formado pode seguir diferentes vias metabólicas dependendo da célula em questão e do perfil metabólico em que ela se encontra. Por exemplo, o piruvato pode ser translocado para a matriz mitocondrial através do transportador de monocarboxilato (MCT - monocarboxylate transporters) (Gladden, 2004). No interior da mitocôndria o piruvato sofre a ação do complexo multienzimático piruvato desidrogenase (PDH). Este complexo catalisa uma reação irreversível, possuindo como substratos o piruvato, NAD^+ e coenzima A livre, liberando, como produtos da reação o acetil-CoA, CO_2 e NADH. O acetil-CoA gerado nesta etapa é condensado com uma molécula de oxalacetato formando citrato, que pode ser oxidado no ciclo de Krebs. Em cada "ciclo" completo de reações do ciclo de Krebs são gerados quatro co-substratos reduzidos: três NADH e uma flavina adenina dinucleotídeo reduzida (FADH_2). Além disso, há a síntese de uma molécula de guanosina 5`trifosfato ou ATP.

O NADH e o FADH_2 liberam os seus elétrons na cadeia de transporte de elétrons onde, em última análise, ocorrerá a síntese de ATP e a redução do oxigênio (O_2) em água pela fosforilação oxidativa.

Por outro lado, células com grande demanda energética como as fibras musculares esqueléticas durante exercícios intensos, células cancerígenas com elevadas taxas de síntese de proteínas entre outras, devem adaptar seu metabolismo para uma rápida produção de energia. Nessas condições uma boa parcela do piruvato

sintetizado não será totalmente oxidado a CO_2 e H_2O , sendo reduzido pela enzima lactato desidrogenase (LDH) gerando lactato (fermentação láctica). A visão geral da via glicolítica está demonstrada na Figura 5.

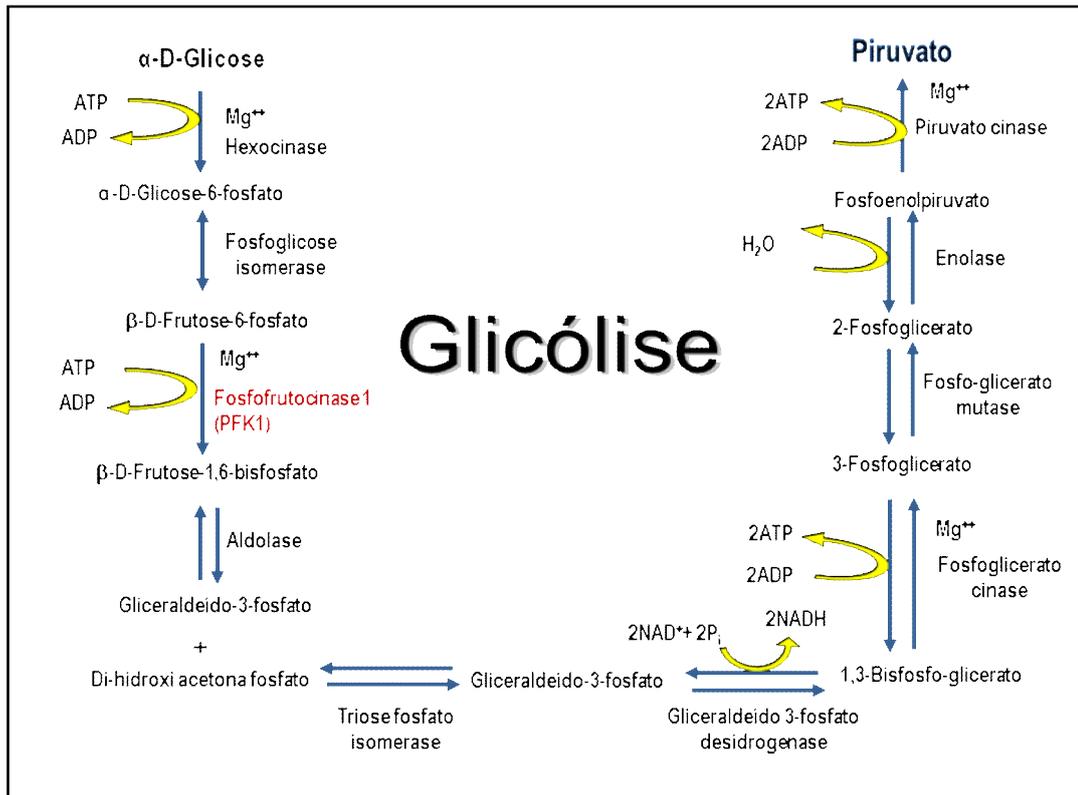


Figura 5 - Visão geral da via glicolítica. As enzimas hexocinase, PFK e piruvato cinase são os principais pontos de controle do fluxo glicolítico.

1.2.1 - Regulação do Fluxo Glicolítico

Para manter a sua homeostasia, a célula tem que se adaptar a possíveis perturbações agudas ou crônicas que possam ocorrer no seu meio interno e/ou externo. Tais adaptações passam necessariamente por modificações das suas vias metabólicas, ou seja, na atividade das enzimas envolvidas. A via glicolítica não é diferente, devendo se adaptar à necessidade celular a cada momento. Dentre os grandes sinalizadores que modulam a atividade da glicólise podemos destacar os hormônios, como por exemplo, a insulina, a adrenalina e o glucagon. Estes hormônios ligam-se inicialmente aos seus receptores de membrana plasmática e ativam uma série de cascatas intracelulares que irão, em última análise, induzir a resposta celular frente ao hormônio em questão. Vale ressaltar que nem todos os hormônios conseguem agir em todos os tipos celulares. Por exemplo, não é descrito que exista um receptor de glucagon no músculo esquelético.

Podemos considerar que a via glicolítica possui duas grandes funções: degradar a glicose para geração de ATP e fornecer elementos para a biossíntese de macromoléculas celulares. Nesse sentido, a velocidade da glicólise é regulada para atender a essas duas necessidades. Isso se dá através de regulações alostéricas, ou ainda por modificações covalentes. Em processos envolvendo tantas etapas, certas reações catalisadas por enzimas estão, essencialmente, em equilíbrio: as taxas dessas reações dependerão das concentrações de seus substratos. Outras reações estão fora de equilíbrio entre substrato e produto, sendo então limitadas pelas enzimas envolvidas. Essas reações são altamente exergônicas e irreversíveis, sendo pontos onde o fluxo através da via é regulado. Na via glicolítica, essas etapas são representadas pelas reações catalisadas pelas enzimas HK, PFK e piruvato cinase (Philips *et al.*, 1981).

Com exceção da sua isoforma IV, que é modulada por outros fatores, a HK é inibida diretamente pelo seu produto G6P. Outro modo de controlar a sua atividade é modulando a sua localização intracelular.

Há muito já foi demonstrado que ao estar associada à mitocôndria a HK tem sua atividade aumentada (Southard & Hultin, 1972). A piruvato cinase é inibida por ATP e alanina e ativada por F1,6BP (Devlin, 2002). Dentre as 3 enzimas regulatórias do fluxo

glicolítico, a PFK é a que apresenta a maior complexidade de mecanismos regulatórios, sendo por este motivo, considerada o ponto chave da regulação do metabolismo glicolítico (Passonneau & Lowry 1962; Uyeda 1979; Kemp & Foe, 1983). Um resumo da regulação do fluxo glicolítico pode ser visto na Figura 6.

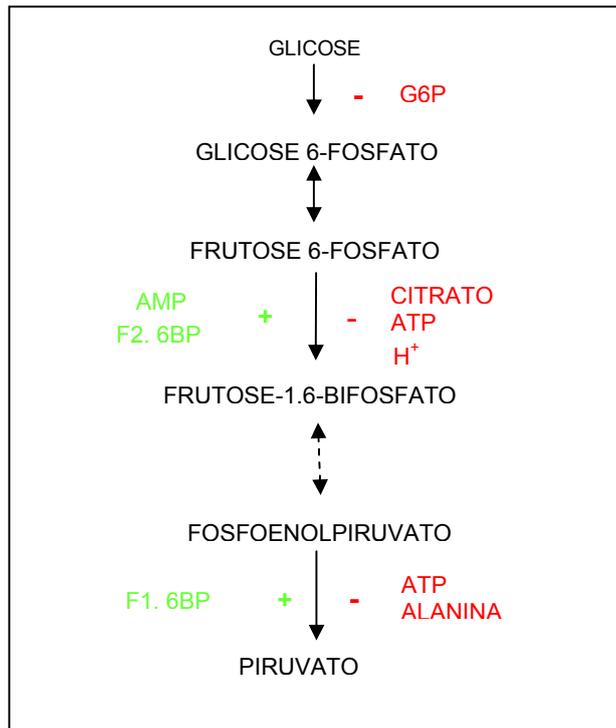


Figura 6 - Visão geral da regulação do fluxo glicolítico. Em verdes moduladores positivos, e em vermelho moduladores negativos da via glicolítica.

1.2.2 - Fosfofrutocinase

A fosfofrutocinase (ATP: D-frutose-6-fosfato-1-fosfo-transferase, PFK, EC 2.7.1.11) catalisa a terceira reação da via glicolítica e funciona como a principal enzima reguladora desta via metabólica (Kemp & Foe, 1983). A transferência do grupo fosfato gama terminal do MgATP^{2-} para F6P, formando F1,6BP e ADP, é muito favorecida em condições metabólicas normais (Figura 7).

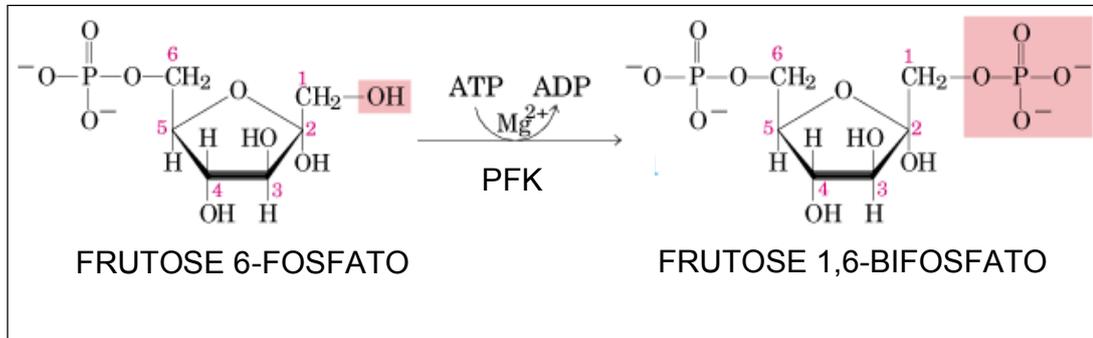


Figura 7 - Reação da enzima fosfofrutocinase. A fosforilação da frutose-6-fosfato gerando frutose-1,6-bifosfato através da catálise enzimática pela fosfofrutocinase. (Adaptado de Lehninger, Nelson & Cox, 2000).

Em mamíferos, são descritos três isoformas da PFK, com um peso molecular para os monômeros em torno de 85.000 Da que são capazes de formar heteroligômeros. Vora e Francke (1981) estabeleceram a existência de 3 loci estruturais para PFK: PFKM, PFKL e PFKP, codificando distintas isoformas de PFK no músculo, no fígado e em plaquetas, respectivamente. Dependendo do tecido, pode haver a expressão de um, dois, ou dos três genes. Os produtos destes genes podem associar-se randomicamente, formando heteroligômeros ou homoligômeros. No caso particular do músculo esquelético maduro a isoforma da enzima encontrada é exclusivamente PFKM. Em procariotos a PFK possui um peso molecular menor e a sua regulação é menos complexa.

De fato, evidências demonstram que a PFK de eucariotos surgiram após uma duplicação e fusão de um gene ancestral de algum procarioto. Desta forma a PFK de eucariotos possui outros sítios regulatórios inexistentes em procariotos (Poorman *et al.*, 1984; Martinez-Costa *et al.*, 2004).

A PFK é regulada por uma variedade de ligantes, incluindo substratos, produtos de reações, e vários metabólitos celulares, entretanto, diferentes isoformas da PFK podem responder de maneiras distintas aos efetores alostéricos (Uyeda, 1979; Goldhammer & Paradies, 1979; Kemp & Foe, 1983). Além de substrato, o ATP também

é um efetor alostérico negativo da enzima, diminuindo a afinidade da PFK por F6P. Altas concentrações de ATP (acima de 1 mM), são capazes de inibir fortemente a enzima (Passonneau & Lowry, 1962). Esta inibição pode ser potencializada pela presença de altas concentrações de H^+ , citrato ou isocitrato, mas não por outros intermediários do ciclo de Krebs (Parmeggiani & Bowman, 1963). O grau de inibição provocado pelo ATP, entretanto, varia entre os diferentes tecidos e organismos. Em mamíferos, a isoforma de fígado é mais fortemente inibida que a de músculo, e esta, por sua vez são mais sensíveis à inibição que a isoforma de cérebro (Vora & Francke 1981; Knobler *et al.*, 1997). Da mesma maneira que a inibição por ATP, a sensibilidade à inibição por citrato também varia entre os tecidos (Passonneau & Lowry, 1962). Outros compostos fosforilados podem inibir a PFK, como a fosfocreatina, 3-fosfoglicerato, 2-fosfoglicerato, 2,3-bifosfoglicerato e fosfoenolpiruvato. A inibição da PFK promovida por estas moléculas é mais pronunciada em baixo pH e em altas concentrações de ATP (Uyeda, 1979).

Uma das moléculas capazes de regular a atividade da PFK mais significativamente foi descoberta em 1980 por Van Schaftingen e Hers: a frutose 2,6-bifosfato (F2,6BP). A F2,6BP é um potente efetor alostérico positivo da PFK. Esta molécula é um produto da fosforilação da F6P pela enzima bifuncional fosfofrutocinase-2/frutose 2,6 bifosfatase. Para tal, a atividade cinásica desta enzima precisa estar ativa e a fosfatásica, que converte a F2,6BP em F6P e fosfato inorgânico, inibida. No músculo esquelético e cardíaco a atividade cinásica desta enzima bifuncional é ativada pela fosforilação da enzima. Esta fosforilação ocorre após estímulos hormonais como os promovidos pela adrenalina. Porém, no tecido hepático existe outra isoforma desta enzima, onde, a fosforilação da enzima fosfofrutocinase-2/frutose 2,6 bifosfatase ativa a porção fosfatásica e inibe a cinásica, diminuindo (1) a síntese de F2, 6BP e (2) o fluxo glicolítico. O resultado metabólico da fosforilação da enzima bifuncional no fígado é a interrupção da estimulação alostérica da PFK e a desinibição alostérica da frutose-1,6-bifosfatase, que converte a F1,6BP em F6P. Desta forma, o fluxo da frutose através destas enzimas é gliconeogênico, produzindo F6P e eventualmente, glicose.

A F2,6BP atua de maneira sinérgica com o ADP e AMP, ambos efetores alostéricos positivos da PFK, sendo capaz de contrapor a inibição da PFK causada por

altas concentrações de ATP, aumentando sua afinidade pelo substrato, F6P, porém sem efeitos sobre a atividade máxima da enzima (Pilkis *et al.*,1981; Van Schaftingen *et al.*,1981; Uyeda, Furuya & Sherry, 1981).

Outros moduladores positivos da PFK também já foram descritos: P_i , K^+ , NH_4^+ , F6P, glicose 1,6-bifosfato e F1,6BP. Esses moduladores são capazes de reverter a inibição promovida por ATP e citrato (Passonneau & Lowry, 1962; Uyeda, 1979; Liling & Beitner, 1990; Chen-Zion, Livnat & Beitner 1992; Magen *et al.*,1995; Ashkenazy-Shazar & Beitner, 1997). A própria PFK pode ser modificada covalentemente em resíduos de serina e treonina pela proteína cinase A (PKA) (Alves & Sola-Penna, 2003), pela proteína cinase C, (Nettelblad *et al.*,1986), e pela proteína cinase dependente de Ca^{2+} -calmodulina (Mahrenhoz Lan & Mansour, 1991). Além disso, foi demonstrado que a PFK assim como outras enzimas glicolíticas, é substrato para a atividade tirosina cinásica do receptor de insulina (Sale, White & Kahn, 1987), o que altera a atividade e a distribuição intracelular da enzima (Zancan e Sola-Penna, 2005a).

Interação da PFK com proteínas do citoesqueleto, como os filamentos de F-actina também são capazes de incrementar a sua atividade. Por outro lado, associações com microtúbulos, mais especificamente as tubulinas, podem inibir a sua atividade enzimática. Outra forma importante capaz de modular a atividade da PFK é alterando o seu estado oligomérico.

Entretanto, a cristalografia da PFK de mamíferos ainda não foi resolvida, desse modo, uma melhor compreensão de como os diferentes moduladores interagem com a enzima ainda estão por serem elucidados.

1.2.3 - Interação da PFK com o Citoesqueleto

A PFK pode associar-se, formando complexos protéicos, com algumas enzimas citosólicas, como a aldolase e a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (Rais *et al.*, 2000; Campanella, Chu & Low, 2005), com elementos do citoesqueleto, como a actina filamentosa e microtúbulos (Liou & Anderson, 1980; Andrés, Carreras & Cusso, 1996; Alves & Sola-Penna 2003; El-Bacha, Freitas & Sola-Penna, 2003) (Figura 8), e também com proteínas de membrana plasmática, como o canal aniônico banda 3 presente na membrana plasmática de eritrócitos (Kaul & Kohler, 1983; Campanella, Chu & Low, 2005; Zancan & Sola-Penna, 2005b) e membranas de miócitos durante o infarto (Hazen *et al.*, 1994).

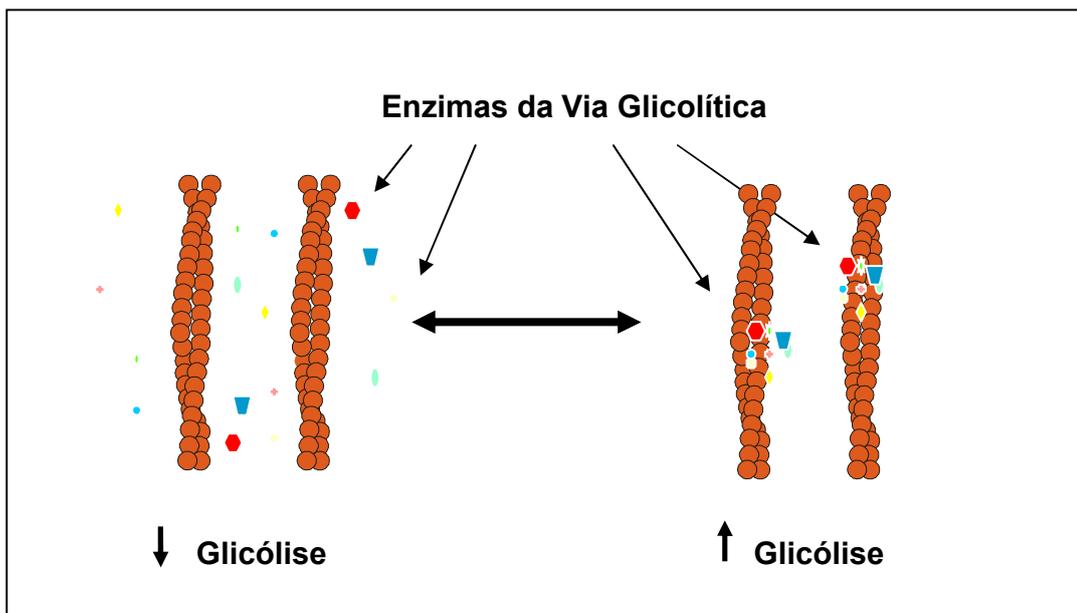


Figura 8 – Associação da fosfofrutocinase com filamentos de actina alterando a atividade catalítica da enzima. Os filamentos de actina estão representados em laranja, enquanto que as enzimas glicolíticas estão representadas como símbolos coloridos.

A associação da PFK com estas proteínas ocorre de forma muito dinâmica e é capaz de alterar a atividade catalítica da enzima (Liou & Anderson, 1980; Andrés, Carreras & Cusso, 1996). Recentemente, nosso laboratório demonstrou que esta

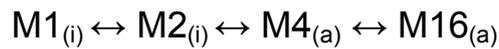
associação está envolvida na regulação do fluxo glicolítico modulada por hormônios, como a adrenalina (Alves & Sola-Penna, 2003) e a insulina (Silva *et al.*, 2004; Zancan & Sola-Penna, 2005a e 2005b).

Em outro trabalho, El-Bacha, Freitas & Sola-Penna (2003) demonstram um aumento do fluxo glicolítico em células altamente proliferativas e indiferenciadas, como no caso de células tumorais, onde ocorre aumento da associação da enzima com o citoesqueleto. Em tumores, é possível correlacionar a dissociação da enzima do citoesqueleto (o que promove uma diminuição na atividade catalítica da PFK) com o aumento da morte destas células. Este estudo nos permitiu propor novas drogas no combate da doença (Meira *et al.*, 2005). Alterações na associação da PFK com proteínas também foram vistas em quadros de diabetes mellitus, e podem ser um possível alvo na redução dos efeitos danosos, em longo prazo, causados por esta disfunção metabólica (Corry *et al.*, 2002; Zancan & Sola-Penna, 2005a). Assim, o estudo da associação da PFK com elementos celulares tem aberto novas perspectivas no entendimento da regulação do metabolismo glicolítico, e prevê novas aplicações para o estudo da enzima.

1.2.4 - Oligomerização da PFK

Estudos sugerem um modelo de associação que pode ser mais bem descrito pelo esquema 2, mostrado abaixo (Uyeda, 1979; Hesterberg & Lee, 1982). O equilíbrio entre formas diméricas (inativas) e tetraméricas (ativos) é consideravelmente afetado pela concentração da enzima, pH, e temperatura (Bock e Frieden, 1974). Em valores baixos de pH (< 6,5), a inativação da enzima pode ser correlacionada com a mudança de uma forma ativa para uma forma inativa de menor peso molecular, acompanhada pela variação na concentração de íons H^+ . Estudos conduzidos por Bock & Frieden (1974) mostraram que esta inativação envolve a protonação de alguns resíduos no tetrâmero, provavelmente histidinas, seguida de uma mudança conformacional, levando a uma forma inativa e, então, a dissociação em dímeros. Este efeito pode ser revertido com o aumento do pH e/ou pela adição de ligantes, como F2,6BP e ATP, fazendo, novamente, uma correlação entre o aumento da atividade e a formação de uma enzima

ativa. Esta inativação é mais pronunciada em temperatura e concentração de PFK mais baixas (Bock & Frieden, 1974).



Esquema 2 - Equilíbrio entre os diferentes oligômeros da PFK. $M1_{(i)}$ e $M2_{(i)}$ representam respectivamente as formas monoméricas e diméricas da PFK consideradas como inativas (i). $M4_{(a)}$ $M16_{(a)}$ são as formas tetraméricas e hexaméricas, respectivamente as quais são consideradas ativas (a).

O esquema 2 representa o equilíbrio entre os diferentes oligômeros da PFK. Monômeros da PFK (M_1) são capazes de associar-se reversivelmente formando dímeros (M_2). Os dímeros da PFK também podem ser dissociados em monômeros (Uyeda, 1979). Estes dímeros podem associar-se, formando tetrâmeros (M_4). Por sua vez, os tetrâmeros são capazes de associar-se, formando hexadecâmeros (M_{16}). Neste esquema as letras *a* e *i* indicam a atividade catalítica em cada forma oligomérica, sendo (*a*) ativo e (*i*) inativo.

Nas últimas décadas, diversos estudos têm relatado a capacidade da PFK de se associar reversivelmente a elementos estruturais da célula. A associação da PFK com filamentos de actina é capaz de aumentar significativamente sua atividade enzimática e diminuir seu $K_{0,5}$ para F6P (Liou & Anderson, 1980; Andrés *et al.*, 1996), além de estabilizar formas oligoméricas mais ativas (Roberts & Somero, 1987).

A associação e a dissociação da PFK tem sido objeto de diversas investigações (Aaronson & Frieden, 1972; Luther, Hesterberg & Lee, (1985); Cai *et al.*, 1990; Berland *et al.*, 1996; Drozdov-Tikhomirov, Skurida & Alexandrov, 1999; Rais *et al.*, 2000; Berchanski & Eisenstein, 2003; Faber-Barata & Sola-Penna, 2005). A importância fisiológica desse equilíbrio decorre da influência direta que a estrutura quaternária da PFK exerce sobre a sua atividade enzimática (Parmeggiani *et al.*, 1966; Paetkau & Lardy, 1967). A ligação das formas diméricas e monoméricas da PFK com a tubulina e

microtúbulos deslocam o equilíbrio entre oligômeros, resultando em uma diminuição significativa da atividade enzimática (Lehotzky *et al.*, 1993; Vértessy *et al.*, 1997). De forma recíproca, a associação com a actina filamentosa estabiliza os tetrameros, ativando a enzima (Clarke *et al.*, 1983; Alves & Sola-Penna, 2003; Silva *et al.*, 2004) (Figuras 8 e 9). Curiosamente, a forma dimérica da PFK, originalmente inativa, quando associada com a aldolase apresenta atividade similar à forma tetramérica, e é capaz de reverter à inibição promovida pela associação com microtúbulos (Orósz, Christova & Ovádi, 1987; Vértessy *et al.*, 1997) (Figura 9).

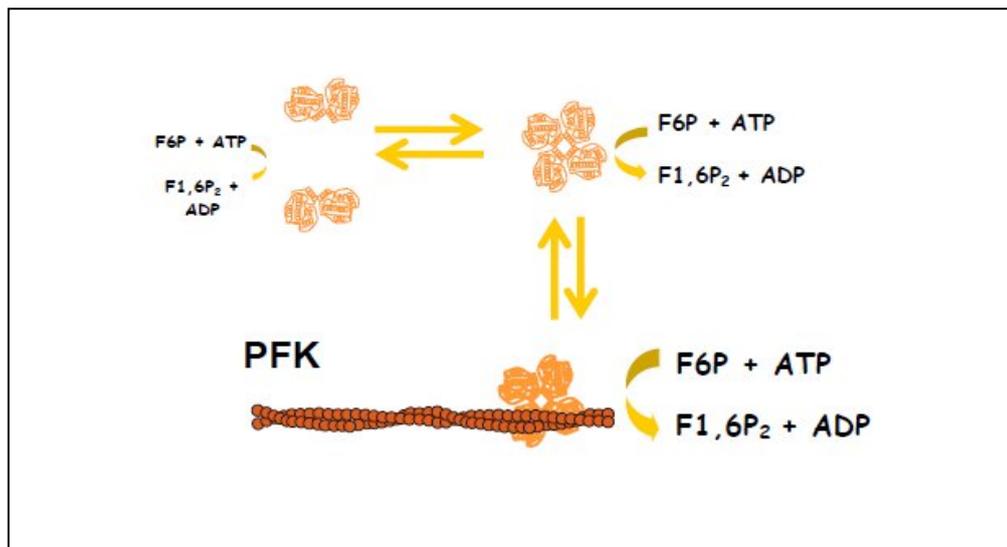


Figura 9 – Modelo proposto para a associação da PFK com f-actina.

2- Objetivos

2.1- Objetivo Geral

Tendo como base as informações disponíveis na literatura podemos afirmar que o volume de dados que avaliam o papel de moléculas derivadas de microorganismos na regulação direta ou indireta de PFK é reduzido e conflitante. A maioria dos estudos que envolvem a GXM, um potente imunomodulador produzido pelo *C. neoformans*, é focada na caracterização da resposta imunológica do hospedeiro, sem levar em conta o funcionamento de enzimas envolvidas com o metabolismo energético. Muitos dos mecanismos de regulação da própria resposta imunológica contra esse agente e seu principal fator de virulência ainda precisam ser elucidados e o controle metabólico celular pode ser relevante nesse sentido. Diante disso temos como objetivos principais avaliar a influência da GXM na regulação da enzima PFK em linhagem tumoral de macrófago murino e definir a importância da enzima durante a modulação da resposta microbicida do macrófago.

2.2- Objetivos Específicos

- 1) Avaliar o efeito da GXM na atividade da PFK;
- 2) Avaliar o mecanismo de ação da GXM sobre a inibição da PFK.

3- Material e Métodos

3.1- Cultivo de células fúngicas e animais:

3.1.1- Células fúngicas: Para obtenção da GXM as células fúngicas foram cultivadas em meio mínimo, conforme descrito previamente (Rodrigues *et al.*, 2000), por 72h em temperatura ambiente, sob agitação. As células foram removidas por centrifugação e a purificação da GXM foi realizada conforme descrito adiante (Nimrichter *et al.*, 2007). A cepa de *C. neoformans* utilizada foi H99 de alta expressão de cápsula.

3.1.2- Células animais: A linhagem murina de macrófagos RAW 246.7 foram cultivados em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1% de penicilina e estreptomicina e glutamina 2mM a 37°C e 5% de CO₂.

3.2- Purificação da GXM de *C. neoformans*: O sobrenadante de cultivo da cepa H 99 foi obtido após 3 dias de cultivo a 30°C. As leveduras foram separadas por centrifugações sucessivas a 4000 e 15000g por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi então concentrado utilizando-se um sistema Amicon de ultrafiltração sob pressão positiva de N₂. Para tal foi utilizada uma membrana com cutoff de 100 KDa. O filme translúcido contendo GXM purificada foi removido da fração não filtrada e dosada através de técnica de ELISA utilizando o anticorpo 18B7, monoclonal específico para GXM de *C. neoformans*.

3.3- Purificação da PFK: A PFK de músculo esquelético de coelho foi purificada segundo o protocolo proposto por Kemp (1975), adaptado do original descrito por Parmeggiani *et al.* (1966).

3.3.1- Extração: O coelho foi sacrificado por deslocamento cervical, seguido de sangramento por corte dos vasos do pescoço, sendo os músculo da região dorsal e das patas traseiras removidos, limpos e mantidos em gelo. A massa muscular foi então processada em um moedor de carne até formar uma pasta que é depois pesada e

triturada em liquidificador com 3 volumes do tampão 1 (30 mM NaF, 4 mM EDTA e 15 mM β -mercaptoetanol, pH 7,5) por 30 segundos para homogeneização. A mistura foi então centrifugada a 14.000 g por 10 minutos a 4°C (Hitachi-Himac). O sobrenadante foi filtrado através de gaze para a remoção dos resíduos lipídicos e o pH é ajustado para 6,8 com adição de 1,5 M Tris (pH 8,8).

3.3.2- Precipitação com Isopropanol: A mistura foi mantida em constante agitação em gelo com sal grosso mantendo a temperatura entre -5°C e 0°C. Adicionou-se álcool isopropílico gelado (1/5 do volume total do extrato) gota a gota em constante agitação que foi mantida por mais 20 minutos. O precipitado foi coletado por centrifugação a 14.000 g por 30 minutos em centrífuga refrigerada a 4°C e dissolvido em 1/15 da fração inicial 19 em tampão 2 (0,1 M Tris-fosfato, 0,2 mM EDTA, 0,2 mM frutose 1,6-bifosfato, 1 mM β -mercaptoetanol, 5mM de pirofosfato de sódio, pH 8,0). Esta suspensão foi dialisada por 20 horas contra o mesmo tampão para a remoção do isopropanol remanescente.

3.3.3- Tratamento Quente: A suspensão dialisada foi transferida para um becker e colocada em banho maria a 70°C. Sob agitação, a temperatura foi mantida entre 57 e 59°C por 3 minutos quando, então, foi retirada e condicionada em banho de gelo, também sob agitação, até atingir a temperatura de 5°C. Depois disto, a suspensão foi centrifugada por 10 minutos (23.500 g) a 4°C. O sobrenadante foi reservado e o pellet foi resuspenso em tampão 2 e centrifugado novamente. O segundo sobrenadante obtido foi adicionado ao primeiro.

3.3.4- Fracionamento por Sulfato de Amônio: Ao sobrenadante mantido em banho de gelo sob agitação foi adicionado sulfato de amônio sólido até atingir 38% de saturação (21,3 g / 100 ml da solução inicial). Após 30 minutos, o precipitado foi removido por centrifugação a 14.000 g por 15 minutos a 4°C, e ao sobrenadante foi adicionado sulfato de amônio até atingir 55% de saturação (30,8 g / 100 ml da solução inicial). O sedimento foi coletado por centrifugação a 14.000 g por 20 minutos e dissolvido em

tampão 3 (50 mM Tris-fosfato, 0,2 mM EDTA, 1 mM β -mercaptoetanol, 5mM de pirofosfato de sódio, pH8,0).

3.3.5- Cristalização: A solução foi dialisada em banho de gelo contra o tampão 3 adicionado sulfato de amônio até 38% de saturação (21,3 g / 100 ml). Após 24 horas o tampão de diálise foi trocado pelo mesmo volume de tampão 3 e, então, sulfato de amônio foi adicionado até atingir 40% de saturação (22,6 g / 100 ml). A cristalização se inicia após aproximadamente uma semana. Depois da diálise, a suspensão foi centrifugada a 1.500 g por 10 minutos em centrífuga clínica a 4°C. O precipitado foi dissolvido em tampão 3 e mantido em isopor com gelo dentro da geladeira.

3.4- Dosagem de proteína: A dosagem de proteína foi feita pelo método de Lowry *et al.* (1951). O padrão utilizado em todas as dosagens foi a albumina de soro bovino.

3.5- Medida da Atividade da PFK: A atividade da fosfofrutocinase foi medida através do método direto radiométrico desenvolvido por Sola-Penna e colaboradores (2002), com as modificações introduzidas por Zancan e Sola-Penna (2005a e 2005b). Resumidamente, o método consiste na incubação de frutose-6-fosfato e $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP na presença de fosfofrutocinase e demais reagentes. Durante a reação catalisada pela enzima, os produtos liberados são ADP e $[1\text{-}^{32}\text{P}]$ frutose-1,6-bisfosfato, que é separada do $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP não reagido através da adsorção deste último em carvão ativado em HCl 0,1N (25 g/100 ml) e manitol 0,5 M. Após centrifugação, a radioatividade remanescente no sobrenadante contada por cintilação líquida e atribuída a $[1\text{-}^{32}\text{P}]$ frutose-1,6-bisfosfato.

3.6- Método do sistema acoplado de enzima: A atividade da PFK purificada de músculo esquelético de coelho foi avaliada em um leitor de microplaca (Victor 3 Perkin Elmer) através da oxidação de NADH (340 nm) por um sistema acoplado de enzimas, como previamente descrito (Sola-Penna *et al.*, 2002; Meira *et al.*, 2005). O sistema consistiu de diferentes concentrações de GXM (1, 10 e 100 $\mu\text{g/ml}$) em um meio de reação contendo 50 mM de Tris-HCl, pH 7,4, 1 mM NADH, 10 mM MgCl_2 , 1 mM ATP e

1 mM de frutose-6-fosfato mais as enzimas aldolase (2 mU/ml), triose fosfato isomerase (2 mU/ml) e α -glicerofosfato desidrogenase (2 mU/ml). A reação foi iniciada pela adição de 5 μ g/ml de PFK purificada.

3.7- Influência da GXM na atividade da PFK: Os macrófagos foram cultivados na presença de diferentes concentrações de GXM (1; 10 e 100 μ g/ml). A incubação foi realizada em diferentes tempos (1, 3, 6, 24 e 48 horas) e a atividade enzimática foi determinada conforme descrito no item anterior. Os controles foram realizados na ausência dos produtos microbianos.

3.8- Síntese de ATP radioativo: O [γ - 32 P] ATP foi preparado de acordo com Maia e colaboradores (1983). A síntese do [γ - 32 P] ATP acontece em um meio contendo 0.115 mM Tris-HCl pH 9,0, 0,0276 mM MgCl₂, 0,0138 mM DTT, 0,276 μ M L- α -glicerofosfato, 1,15 μ M β -NAD, 0,115 μ M ADP e 2,3 μ M Piruvato pela adição de 1 ml [32 P]Pi e 40 μ l de um coquetel enzimático de marcação. Esse coquetel de enzimas contém glicerol-3-fosfato desidrogenase, triose-fosfato isomerase, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, 3- fosfoglicerato quinase e lactato desidrogenase. Durante 90 minutos esse meio de reação foi incubado em temperatura ambiente. Após este período, o [32 P] Pi livre foi retirado da mistura através de uma coluna DOWEX 1 x 10 Mesh ativada em 1 M de HCl. Em seguida o [γ - 32 P] ATP formado foi alíquotado e avaliado através de contagem em cintilação líquida e depois mantido a -20°C.

3.9- Espectro de fluorescência: As medidas de fluorescência foram feitas em cubeta com caminho óptico de 1,0 X 1,0 cm usando-se a enzima e titulando diferentes ligantes. As medidas foram feitas em fluorímetro Spectra Manager.

3.9.1. Espectroscopia de emissão de fluorescência da enzima: Para podermos quantificar a interação da PFK com a GXM, esse ensaio foi realizado em diferentes condições: As amostras foram colocadas em cubetas de quartzo com caminho óptico de 1,0 x 1,0 cm e excitadas em 280 nm em meio de reação contendo 100 mM Tris- HCl pH 7,4; PFK 1 μ g/ml e diferentes concentrações de GXM (0,1; 1; 10; 100 μ g/ml). A

emissão de fluorescência foi medida entre 300 e 400 nm. O centro de massa espectral (c.m.) foi calculado pela equação:

Equação 1:

$$c.m. = \frac{\sum \lambda \cdot I_{\lambda}}{\sum I_{\lambda}}$$

Onde : Σ = somatório

I_{λ} = intensidade de fluorescência em um dado comprimento de onda (λ)

λ = comprimento de onda

3.10- Microscopia de Fluorescência: Os macrófagos RAW 246.7 foram cultivados em placas de 24 poços sobre lamínulas por 24 horas a 5% de CO₂. Após esse tempo foi adicionada GXM na concentração de 10 µg/ml e as células incubadas por 6 ou 24 horas. Após os períodos de incubação as células foram fixadas com paraformaldeído 4% por 30 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, as células foram lavadas com PBS e bloqueadas com PBS 5% BSA por 60 minutos a temperatura ambiente. As células foram incubadas com anticorpos anti-GXM (18 B7) e anti-PFK. Após essa incubação, as células foram lavadas novamente e incubadas com anticorpos anti-Imunoglobulina (Ig) de camundongo conjugada a Alexa Fluor 568 para a GXM e anti-Ig de rato para PFK conjugado Alexa Fluor 488 (Invitrogen). A presença e a localização da GXM e da PFK foram visualizadas em microscópio de fluorescência Axioplan II (Zeiss, Alemanha).

3.11- Ensaio de viabilidade dos macrófagos (lactato-desidrogenase): (Collins, Yang & Schnaar, 2000): Para determinação da citotoxicidade das drogas moduladoras da PFK, os sobrenadantes de cultura dos macrófagos incubados com a GXM foram transferidos para uma outra placa de 96 poços. Deste sobrenadante foram retirados 80 µL, o qual foi misturado a 120 µL de solução contendo piruvato (0,5 µg/mL de PBS) e NADH (0,5 µg/mL de PBS). O consumo de NADH foi medido, no comprimento de onda de 340 nm, através da diminuição da absorbância observada no leitor de microplaca. As

leituras foram realizadas a cada dez segundos. Uma curva padrão foi obtida através do uso de diferentes concentrações celulares lisadas sob as mesmas condições.

3.12- Determinação da Viabilidade dos macrófagos (MTT): os macrófagos foram cultivados na presença de diferentes concentrações de GXM (1; 10 e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) por 24h a 37^oC sob atmosfera de 5% CO₂. O sobrenadante foi removido, em seguida adicionou-se 20 μl /poço de solução de MTT na concentração final de 5 mg/ml em PBS. As amostras foram incubadas por 3 hora na ausência de luz. Após esse período, o sobrenadante foi descartado e 200 μl de DMSO foram adicionados. Os sistemas foram incubados por 5 min sob agitação (150 rpm). A leitura foi realizada no comprimento de onda de 560 nm com *background* de 670 nm em leitor de microplaca. A densidade óptica foi diretamente correlacionada com a quantidade de célula.

3.13- Dosagem do consumo de glicose: Os sobrenadantes obtidos no experimento anterior foram utilizados para dosagem do consumo de glicose durante o cultivo na presença de GXM. As amostras foram diluídas em água (1:9, v/v) e alíquotas de 10 μl incubadas com o 190 μl do reagente de glucox 500. As amostras foram incubadas por 15 min e a leitura realizada no comprimento de onda de 492 nm em leitor de microplaca.

3.14- Análise estatística dos resultados: Todos os resultados foram tratados a partir de testes específicos para cada caso, escolhendo testes de Student e/ou de múltiplas variâncias (ANOVA). Todos os testes serão realizados através do aplicativo SigmaStat 3.1 (Systat Co. CA, USA) de acordo com o descrito por Zancan e Sola-Penna (2005 a e b).

Parametros cinéticos para o efeito do ATP na PFK onde foram calculados considerando os dois componentes da modulação PFK por este metabólito. O primeiro componente é o elemento estimulador para a curva de saturação do substrato, na qual a PFK exibe um padrão alostérico que é descrito pela equação:

Equação 2:

$$V = \frac{V_{\max_{\text{app}}} \times [\text{ATP}]^{n_s}}{K_{0,5}^{n_s} + [\text{ATP}]^{n_s}}$$

Onde V é a atividade da PFK em uma dada concentração de ATP ([ATP]), $V_{\max_{\text{app}}}$ é a velocidade máxima aparente calculado, $K_{0,5}$ é a constante de afinidade para este componente e n_s é o índice de cooperatividade para este componente. O segundo componente é o componente inibitório que podem ser ajustados pela equação:

Equação 3:

$$V = \frac{V_{\text{sat}}}{1 + \left(\frac{[\text{ATP}]}{I_{0,5}} \right)^{n_i}}$$

Onde V é a atividade de PFK em uma dada concentração de ATP ([ATP]), $I_{0,5}$ é a constante de afinidade para este componente, n_i é o índice de cooperatividade para este componente e V_{sat} é a atividade da PFK quando o primeiro componente está saturado. Assumindo que esta declaração, V_{sat} é uma função do primeiro componente da curva e pode ser substituída pela equação 2 a resultar na seguinte equação:

Equação 4:

$$V = \frac{\frac{V_{\max_{\text{app}}} \times [\text{ATP}]^{n_s}}{K_{0,5}^{n_s} + [\text{ATP}]^{n_s}} \times I_{0,5}^{n_i}}{I_{0,5}^{n_i} + [\text{ATP}]^{n_i}}$$

Os dados experimentais foram ajustados através de regressão não-linear para o efeito do ATP na atividade PFK. Parâmetros cinéticos para os efeitos da F6P na PFK foram calculados através de regressão não-linear utilizando os dados experimentais para ajustar os parâmetros da equação:

Equação 5:



Onde V é a atividade de PFK calculado para uma dada concentração de F6P ($[F6P]$), V_{max} é a velocidade máxima calculada para saturar as concentrações de F6P, $K_{0.5}$ é o constante de afinidade para F6P, que é igual à concentração de F6P responsável pela meia-ativação da PFK pela F6P, e n é o índice de cooperatividade para este fenômeno.

4- Resultados

4.1- Determinação do Número de Células Viáveis, Ensaio de MTT, Consumo de Glicose e Produção de Lactato após 24 horas de Tratamento com a GXM

Macrófagos murinos (RAW 246.7) foram incubados por 24 horas em diferentes concentrações de GXM (1, 10 e 100 µg/ml). As células foram tratadas com azul de tripan (1:2) por 2 minutos. A contagem de células vivas e mortas foi realizada em câmara de Neubauer com auxílio de microscopia óptica. Houve a normalização pelo número de células viáveis. Foi observada uma diminuição no número de células em função do aumento da concentração da GXM (Figura 10 A). Para avaliação da viabilidade celular foi utilizado o método de MTT onde foi observada uma diminuição da viabilidade em função do aumento da concentração da GXM (Figura 10 B). Com base nesses resultados, experimentos adicionais foram realizados utilizando dois marcadores do fluxo glicolítico, glicose e lactato. Os sobrenadantes das culturas, do ensaio acima, foram recolhidos e utilizados para a dosagem do consumo de glicose pelos macrófagos RAW 246.7. Esse resultado mostra uma diminuição no consumo de glicose conforme aumentamos a concentração de GXM (Figura 10 C).

Outro marcador do fluxo glicolítico utilizado foi o lactato-desidrogenase (LDH) a fim de verificar a citotoxicidade da GXM para com os macrófagos. A LDH é uma enzima citoplasmática liberada no meio de cultura após ruptura na membrana plasmática. Para dosagem da atividade da enzima utilizou-se os sobrenadantes dos cultivos dos macrófagos tratados com as diferentes concentrações de GXM por 24 horas. Os dados mostram uma diminuição na produção de lactato em função do aumento das concentrações de GXM (Figura 10 D).

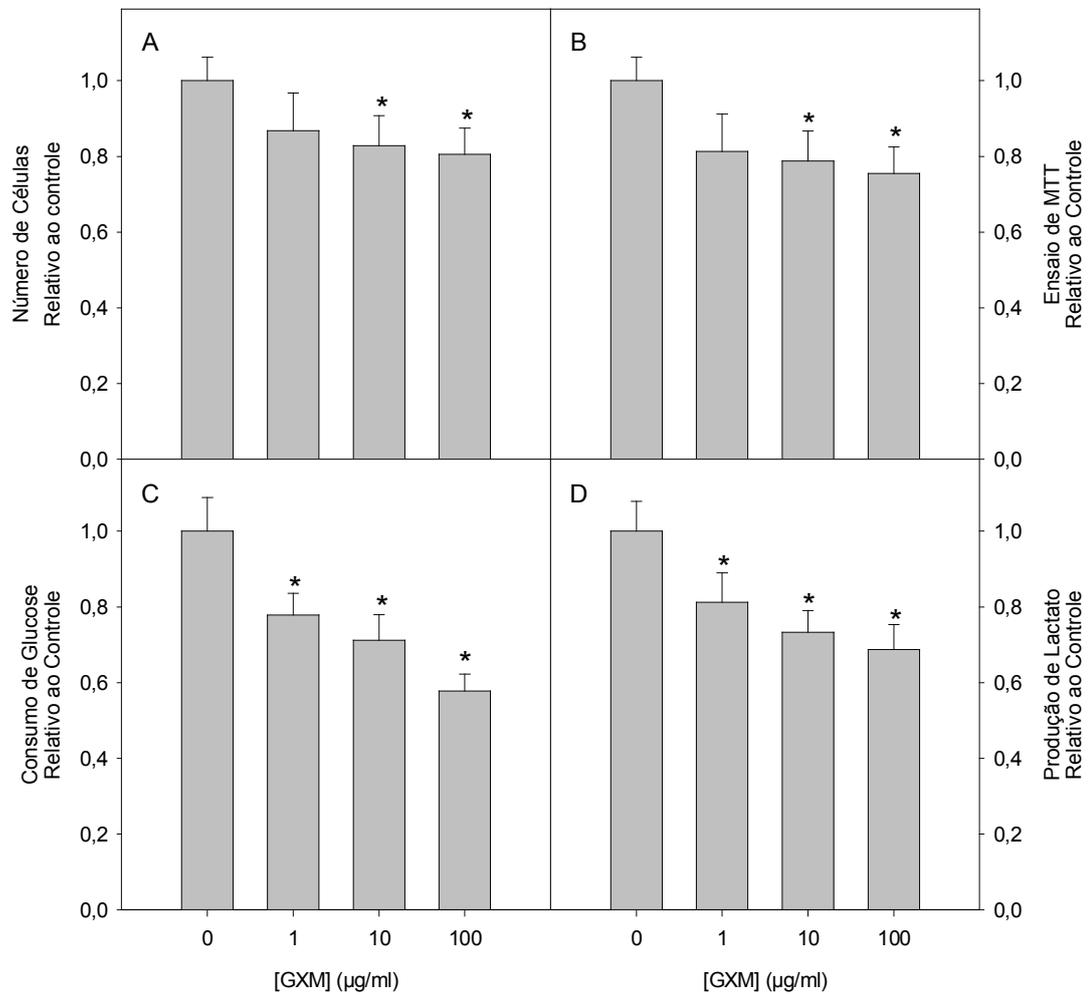


Figura 10 – Avaliação do número de células viáveis (A), ensaio de oxidação mitocondrial (MTT) (B), consumo de glicose (C) e produção de lactato (D) após o tratamento por 24 horas com diferentes concentrações da GXM (1, 10 e 100 µg/ml) em macrófagos murinos RAW 264.7 (* P < 0,05 quando comparado ao controle).

4.2- Sobreposição das imagens demonstrando co-localização da GXM e PFK

Os resultados anteriores indicam que a GXM interfere na via glicolítica. Por esse motivo, foi avaliado se a GXM poderia estar interagindo com a PFK. Os macrófagos foram tratados com a GXM (10 µg/ml) por 6 e 24 horas. Após esse período, eles foram incubados com anticorpos que reconhecem especificamente GXM e PFK e as lâminas observadas em microscópio de fluorescência. Em conjunto, podem-se observar na Figura 11 as células em contraste interferencial-diferencial (DIC), seguido pela reatividade com anticorpo anti-PFK em verde e em vermelho para a reatividade com anticorpo anti-GXM. Por último, observa-se a sobreposição das imagens sugerindo uma co-localização dessas estruturas. Esses resultados indicam que a GXM internalizada pode interagir com a PFK em macrófagos podendo, portanto, interferir com seu funcionamento.

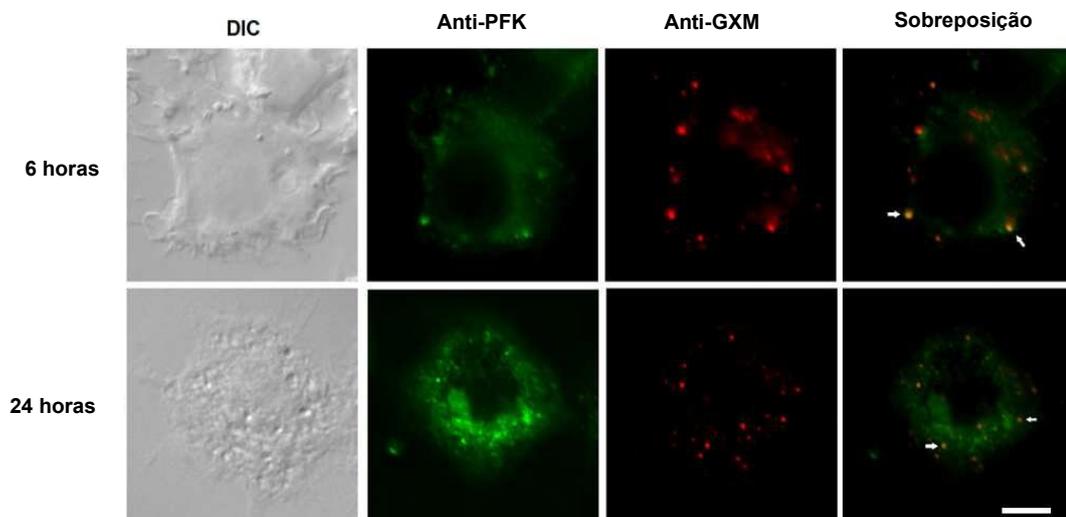


Figura 11 – Distribuição da PFK e GXM em macrófagos. As células foram incubadas com GXM (10 µg/ml) por 6 e 24 horas e em seguida lavadas com PBS e fixadas com PF 4%. As reações inespecíficas foram bloqueadas com PBS-BSA (5%). Em seguida, os sistemas foram incubados com os anticorpos anti-PFK-1 e anti-GXM. DIC: Contraste Interferencial - Diferencial; Reatividade com anticorpos anti-PFK; Reatividade com anticorpos anti-GXM; Sobreposição das imagens demonstrando co-localização da GXM e PFK.

4.3- Determinação da Atividade Enzimática da Fosfofrutocinase em Macrófagos após Diferentes Tempos de Tratamento com a GXM

Com o objetivo de avaliar se a GXM promove alguma alteração na atividade da enzima PFK, os macrófagos RAW 246.7 foram incubados por 24 horas em diferentes concentrações de GXM, conforme descrito em Material e Métodos. De acordo com os resultados a GXM parece inibir a atividade da PFK em macrófagos de linhagem murina. O aumento da concentração de GXM resulta em uma maior inibição da enzima (Figura 12 A). Considerando que a GXM é constitutivamente secretada pelo *C. neoformans* durante a infecção e, portanto, pode interagir com as células hospedeiras por períodos prolongados. Por esse motivo foi avaliado a atividade da PFK em períodos de incubação curtos e longos. As células foram incubadas nas mesmas condições anteriores e os resultados analisados após 1, 3, 6, 24 e 48 horas. Os resultados indicam uma maior inibição do polissacarídeo após 48 horas de incubação com a GXM, portanto corrobora com o experimento ao lado onde observa-se uma menor atividade da enzima na concentração de 100 µg/ ml (Figura 12 B).

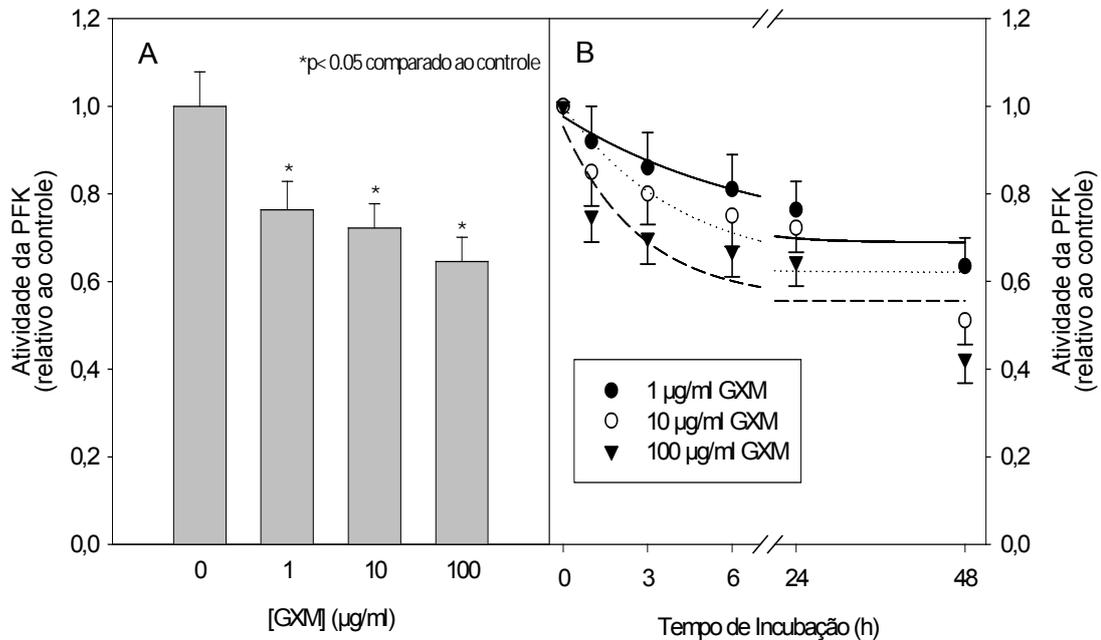


Figura 12 – Efeito da GXM na atividade da PFK em macrófagos RAW 246.7. As células foram tratadas por 24 horas com a GXM (A). Em (B) houve a incubação em diferentes tempos (1, 3, 6, 24 e 48 horas) com a GXM conforme descrito em material e métodos e após, realizado a medida da atividade da PFK utilizando um sistema enzimático acoplado como descrito por Sola-Penna *et al.*, 2002. Os dados da atividade da PFK foram normalizados pelo número de células viáveis (* P< 0,05 quando comparado ao controle). Os valores representam a média ± erro padrão (n=4).

4.4- GXM inibe a Atividade PFK Alterando a Afinidade pelos seus Substratos F6P e ATP

O próximo passo foi avaliar se a GXM poderia exercer um efeito direto sobre a PFK purificada de músculo esquelético de coelho. O ensaio foi realizado pelo método do sistema acoplado de enzima. Primeiramente, foi avaliada a atividade da PFK onde foi utilizada diferentes concentrações de GXM.

Conforme demonstrado na figura 13, observa-se que a GXM promove uma inibição na atividade da PFK purificada de músculo esquelético de coelho de forma dose dependente.

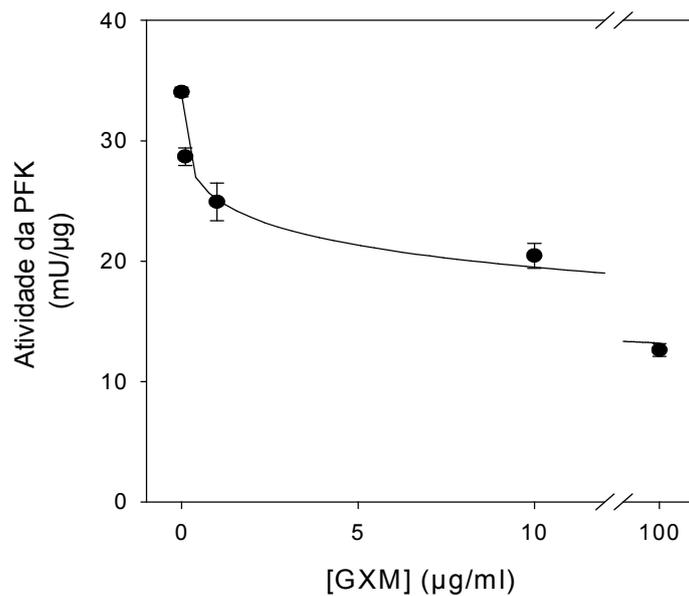


Figura 13 – Efeito da GXM na atividade da PFK purificada de músculo esquelético de coelho. Utilizou-se diferentes concentrações de GXM (0,1, 1, 10 e 100 μg/ml) e foi realizado conforme descrito em Material e Métodos e após, realizado a medida da atividade da PFK. Os valores representam a média \pm erro padrão (n=4).

Com o intuito de verificar o mecanismo pelo qual o polissacarídeo inibe a enzima, avaliamos o efeito do GXM sobre a afinidade da PFK pelo seu substrato F6P. Os resultados estão demonstrados na Figura 14 onde pode ser visto que os efeitos inibitórios do GXM sobre a PFK ocorrem em todas as concentrações de F6P testadas. Na presença de GXM, a ativação da PFK por F6P encontra-se tendendo a saturação a partir de 2 mM F6P, sendo que essa saturação ocorre induzindo, aproximadamente, metade da velocidade alcançada na ausência de GXM. Além disso, a curva de saturação encontra-se bem deslocada para a direita, na presença de GXM, o que é um forte indicativo de diminuição da afinidade da enzima por este substrato. De fato, ocorre uma diminuição da velocidade máxima e do $K_{0,5}$ da enzima para F6P, como será descrito com maiores detalhes na seção 4.5.

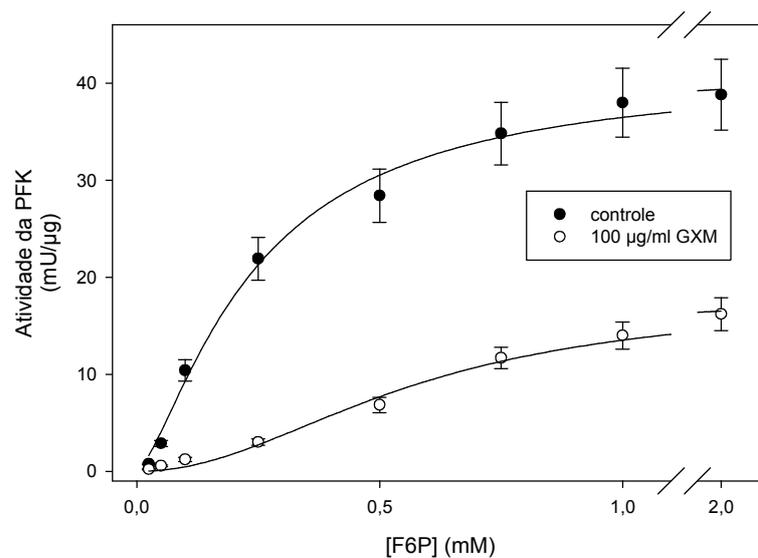


Figura 14 – Efeito da GXM na atividade da PFK purificada de músculo esquelético de coelho utilizando diferentes concentrações do substrato da enzima, F-6-P (0,025; 0,05; 0,1; 0,25; 0,5; 0,75; 1 e 2 mM), onde círculos pretos representam o controle e círculos brancos representam a presença de GXM na concentração de 100 μg/ml. Os valores representam a média ± erro padrão (n=4).

Como a PFK apresenta dois substratos, verificamos também se a presença de GXM poderia afetar a afinidade da enzima pelo seu outro substrato, ATP. Entretanto, a PFK apresenta dois sítios para ATP: o sítio catalítico com alta afinidade para ATP e o sítio alostérico de baixa afinidade, com efeitos inibitórios sobre a atividade da enzima. Dessa forma, ATP afeta a atividade da PFK de forma bimodal, ativando a enzima em concentrações até 1 mM e inibindo-a em concentrações mais altas. Esse perfil pode ser observado claramente na Figura 15, onde também observa-se que a presença de GXM diminui a atividade da enzima em qualquer concentração de ATP testada. Esse resultado confirma a diminuição da Velocidade máxima da enzima induzida por GXM. Ademais, há um deslocamento do componente estimulatório da enzima para a direita e do componente inibitório para a esquerda, sugerindo a diminuição da afinidade da PFK para ATP no sítio estimulatório e o aumento da afinidade no sítio inibitório. Estes efeitos sobre os parâmetros cinéticos da PFK serão descritos com mais detalhes a seguir.

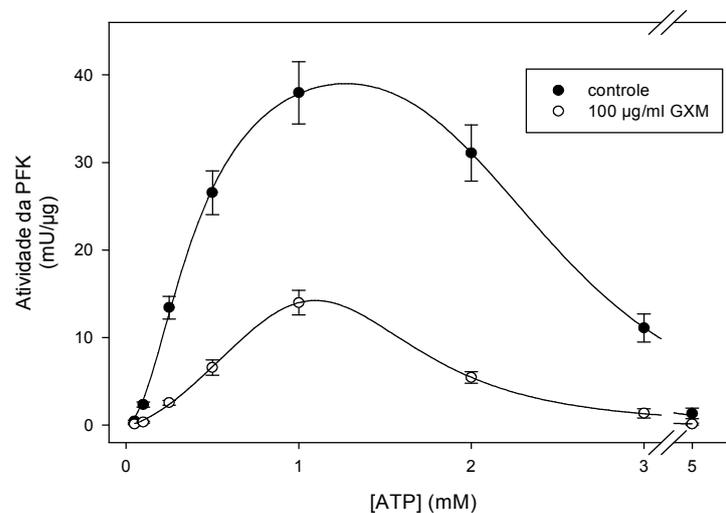


Figura 15 – Efeito da GXM na atividade da PFK purificada de músculo esquelético de coelho utilizando diferentes concentrações do substrato da enzima, ATP (0,05; 0,1; 0,25; 0,5; 1; 2; 3 e 5 mM) onde círculos pretos representam o controle e círculos brancos representam a presença de GXM na concentração de 100 µg/ml. Os valores representam a média ± erro padrão (n=4).

4.5- Efeito da GXM nos Parâmetros Cinéticos para ATP e F-6-P na PFK de músculo esquelético de coelho

Em conjunto, os resultados descritos acima mostram que a GXM diminui a afinidade da PFK pelo seu substrato, F6P, no sítio catalítico da enzima. Conforme pode ser observado na tabela abaixo (Tabela 1) o aumento da constante de afinidade para a F6P ($K_{0,5}$), calculado através da equação 5 apresentada no material e métodos, de $0,29 \pm 0,03$ mM no experimento controle para $0,51 \pm 0,05$ mM na presença de GXM. Houve uma redução na velocidade máxima (V_{max}) para $15,2 \pm 2,1$ mU/ μ g e o índice de cooperatividade (n) para este fenômeno aumentou.

Resultados semelhantes foram observados para o efeito da GXM na afinidade da PFK com o substrato ATP, onde houve também o aumento do $K_{0,5}$, calculado através da equação (4), de $0,31 \pm 0,03$ mM no experimento controle para $0,62 \pm 0,07$ mM na presença de GXM e uma redução da velocidade máxima aparente (V_{max} app) para $13,6 \pm 1,3$ mU/ μ g quando comparado ao controle. A constante de afinidade para o ATP ($I_{0,5}$) na presença da GXM também houve uma diminuição ($1,6 \pm 0,2$ mM). O índice de cooperatividade para este componente de estímulo (n_s) e o índice de cooperatividade para este componente de inibição (n_i) aumentaram respectivamente, para $2,5 \pm 0,3$ e $1,9 \pm 0,2$ quando comparado ao controle.

Essas alterações nos parâmetros cinéticos para a interação dos substratos com a PFK são semelhantes a alguns estudos descritos onde mostram a dissociação dos oligômeros da PFK de tetrâmeros ativos em dímeros fracamente ativos (Zancan *et al.*, 2007 a; Zancan *et al.*, 2008).

		control	100 µg/ml GXM
ATP	$K_{0.5}$ (mM)	0.31 ± 0.03	$0.62 \pm 0.07^*$
	n_s	1.3 ± 0.2	$2.5 \pm 0.3^*$
	$V_{max_{app}}$ (mU/µg)	39.7 ± 3.7	$13.6 \pm 1.3^*$
	$I_{0.5}$ (mM)	2.7 ± 0.3	$1.6 \pm 0.2^*$
	n_i	1.6 ± 0.2	1.9 ± 0.2
F6P	V_{max} (mU/µg)	38.9 ± 3.4	$15.2 \pm 2.1^*$
	$K_{0.5}$ (mM)	0.29 ± 0.03	$0.51 \pm 0.05^*$
	n	1.2 ± 0.1	$2.7 \pm 0.2^*$

Tabela 1 – Efeitos da GXM nos parâmetros cinéticos para ATP e F-6-P na PFK de músculo esquelético de coelho. Os parâmetros da F-6-P foram calculados na equação (5) e os dados experimentais apresentados na Figura 14 e para o ATP foram calculados na equação (2,3 e 4) e os dados experimentais apresentados na Figura 15. (* $P < 0,05$ quando comparado ao controle (Student's t-test)).

4.6- Efeito da GXM sobre a Estrutura Quaternária da PFK

As alterações nos parâmetros cinéticos descritas acima são comumente observadas quando há a dissociação dos tetrâmeros da enzima com a formação de dímeros (Zancan *et al.*, 2007a; 2008). Para avaliar um possível efeito da GXM na estrutura oligomérica da PFK foi realizado o ensaio do centro de massa do espectro de fluorescência intrínseca da enzima. Estudos publicados recentemente pelo nosso laboratório têm validado que tetrâmeros apresentam o centro de massa do espectro de fluorescência intrínseca mais deslocado para a região azul do espectro, de alta energia e baixo comprimento de onda, quando comparados com dímeros, devido a menor exposição dos triptofanos presentes na interface de interação entre os dímeros para a formação dos tetrâmeros (Marinho-Carvalho *et al.*, 2006; Leite *et al.*, 2007; Zancan *et al.*, 2007a; 2007b; 2008). Entretanto, quando os dímeros são formados, observa-se uma mudança no centro de massa para a região vermelha do espectro (baixa energia, alto comprimento de onda).

Com os dados obtidos a partir da leitura das amostras, foi possível calcular o centro de massa do espectro de fluorescência intrínseca da enzima, como descrito em material e métodos. As concentrações de GXM, citadas anteriormente, promovem um aumento no centro de massa de forma dose dependente (Figura 16). Portanto, sugere-se que o polissacarídeo capsular desloca o equilíbrio da enzima para sua forma dimérica. No inset, pode ser observado que ocorre um deslocamento da curva para o lado direito, ou seja, o lado de maior comprimento de onda e de menor energia sem promover alterações significativas nos espectros de emissão indicando, portanto que ocorre a dissociação da PFK de tetrâmeros para dímeros.

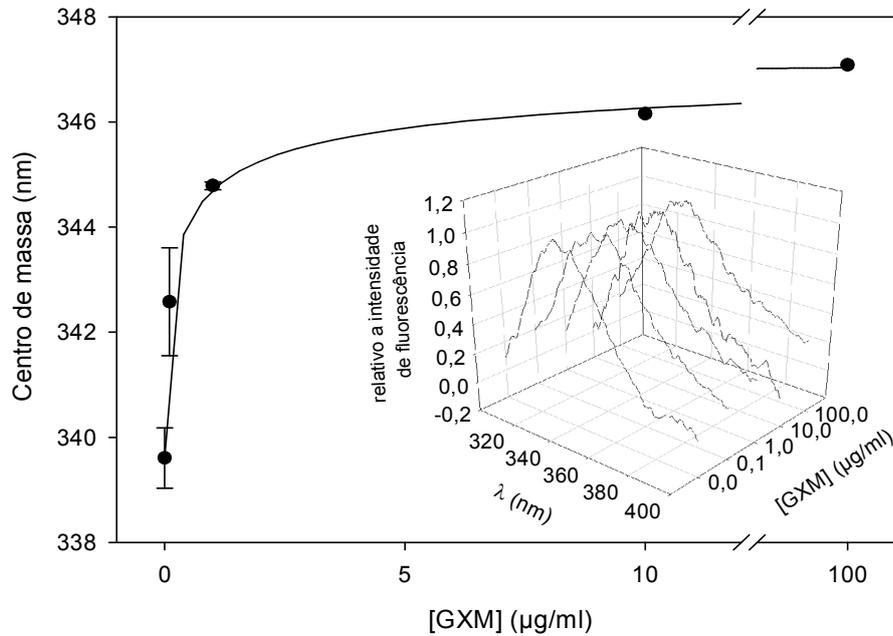


Figura 16 – Efeito da GXM em diferentes concentrações (0,1; 1; 10 e 100 µg/ml) sobre a PFK no centro de massa do espectro de fluorescência intrínseca. Os valores representam a média ± erro padrão (n=4). O centro de massa foi calculado a partir do espectro de fluorescência intrínseca analisado em um espectrofluorímetro Jasco FP6300 usando a equação 1. O comprimento de onda de excitação foi 280 nm e a absorção de luz foi varrida entre 300 e 400nm. O inset representa o espectro de emissão de fluorescência da PFK purificada na presença de diferentes concentrações de GXM.

4.7- Comportamento dos efetores alostéricos positivos e negativos da enzima PFK na presença e na ausência de GXM

Alterações no equilíbrio oligomérico da PFK entre tetrâmeros e dímeros é um mecanismo comum de regulação da enzima, o qual é afetada por muitos ligantes fisiológicos, tal como o ATP que liga-se no sítio alostérico inibitório e o ligante que é capaz de reverter o efeito promovido pelo ATP, frutose-2,6-bisfosfato (F2, 6BP) (Zancan *et al.*, 2007 b; Zancan *et al.*, 2008), calmodulina (Marinho-Carvalho *et al.*, 2009, Marinho-Carvalho, Zancan & Sola-Penna, 2006) e lactato (Leite *et al.*, 2007), entre outros.

Com o objetivo de investigar se a PFK estaria sofrendo inibição com outros efetores alostéricos positivos e negativos na presença da GXM, avaliou-se a atividade da PFK na presença de conhecidos efetores alostéricos tanto positivos, como exemplo Frutose-2,6- Bifosfato, ADP, PKA, e Cálcio Calmodulina (Ca^{2+} CaM^+) quanto negativos, como citrato e lactato onde promovem os seus efeitos através do deslocamento do equilíbrio da PFK entre tetrâmeros e dímeros.

No entanto, o ensaio foi realizado com duas concentrações de ATP, a de 1 mM que funciona como ativador para a enzima e 5 mM que é a concentração inibitória para a PFK. De acordo com os resultados obtidos, na concentração de 1 mM de ATP (Figura 17 A), observa-se que a GXM promove uma inibição parcial na atividade da enzima na presença da F-2,6-BP; ADP; PKA, Ca^{2+} CaM^+ onde esse efeito não é observado no experimento controle, pois o ATP nessa concentração funciona como substrato para a enzima. No entanto, na presença do citrato e lactato houve uma inibição da atividade da enzima e esse efeito fica mais potencializado na presença do polissacarídeo capsular. Na Figura 17 B, observa-se claramente o efeito que esses efetores alostéricos exercem sobre a enzima, onde os ativadores alostéricos revertem o efeito inibitório promovido por altas concentrações de ATP e GXM e esse efeito inibitório é potencializado quando na presença dos inibidores alostéricos. Portanto, a GXM sozinha inibiu a enzima em ambas as condições, corroborando com os resultados da Figura 15.

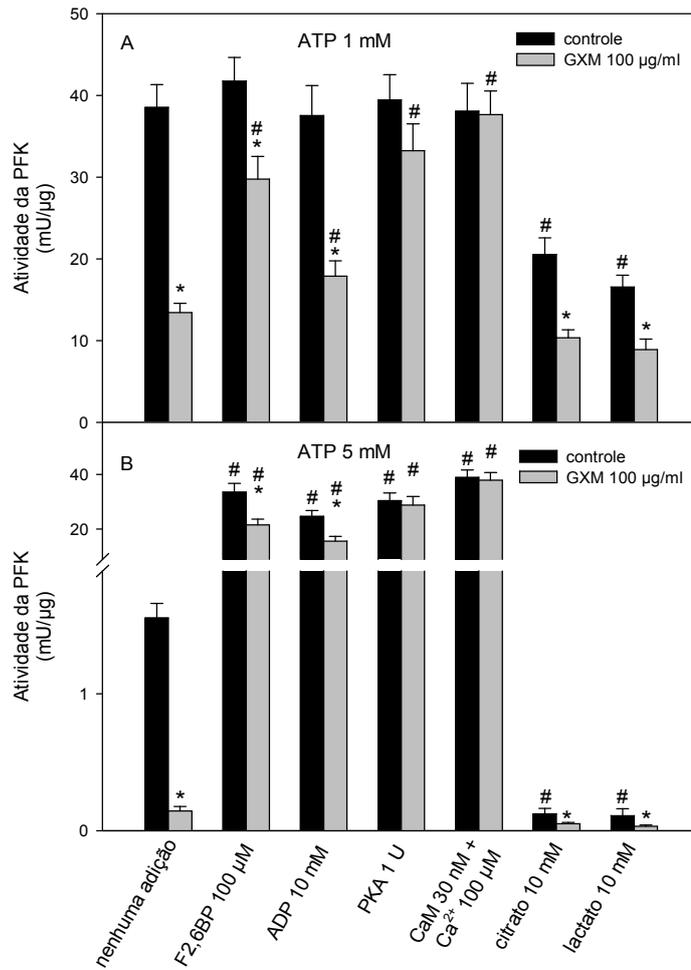


Figura 17 – Efeito da GXM na atividade da PFK purificada de músculo esquelético de coelho com o ATP (A) 1 mM e em (B) 5 mM, na presença de efetores alostéricos positivos da enzima (F-2,6-BP; ADP; PKA, Ca²⁺CaM⁺) e negativos (citrato e lactato). Barra preta representa o controle e barra cinza representa a presença de GXM na concentração de 100 μg/ml. Os valores representam a média ± erro padrão (n=4). (* P < 0,05 quando comparado ao controle do mesmo grupo e na ausência de GXM. # P < 0,05 em comparação com a respectiva barra, na ausência do modulador alostérico).

5- Discussão

C. neoformans, ao contrário de outros fungos patogênicos humanos, possui uma cápsula polissacarídica que é essencial para a sua sobrevivência. Essa cápsula tem propriedades anti-fagocíticas, pobremente imunogênica e essencial para a virulência do fungo (McFadden, Zaragoza & Casadevall, 2006). Nesse contexto, os macrófagos são um dos vários tipos de células que podem ser liberadas durante a infecção (Yauch, Mansour & Levitz, 2005).

Embora existam muitos trabalhos na literatura envolvendo *C. neoformans*, cápsula polissacarídica e a resposta imunológica, porém não existe nenhum trabalho envolvendo a glucuronoxilomanana de *C. neoformans* e o funcionamento de enzimas envolvidas com o metabolismo energético. Diante disso, o objetivo geral desse estudo foi avaliar o papel da glucuronoxilomanana na regulação da enzima fosfofrutocinase. Este poderia ser um novo mecanismo de patogenicidade, através do qual o *C. neoformans* pode interferir com a fisiologia das células hospedeiras. O LPS, foi demonstrado regular a atividade da PFK (Ceppi *et al*, 1992), mas, a nosso conhecimento, este é o primeiro relato de que um polissacarídeo microbiano inibe a atividade PFK em células hospedeira.

De acordo com a literatura, o *C. neoformans* interage com os macrófagos ligando aos receptores dessas células (Bicanic & Harrison, 2005; Del Poeta, 2004) onde o polissacarídeo capsular é internalizado dentro de poucas horas levando alterações nessas células (Chang *et al*, 2006). Com base nesses estudos, avaliou-se as alterações causadas pela GXM nos macrófagos. De acordo com os resultados houve uma diminuição no número de células de acordo com o aumento das concentrações de GXM. Entretanto, para confirmar se as células estavam morrendo devido ao efeito da GXM sobre os macrófagos foi realizado o ensaio de oxidação mitocondrial (MTT). Os resultados obtidos confirmam uma diminuição da atividade mitocondrial conforme ocorre o aumento da concentração de GXM, corroborando com o resultado anterior. Esses resultados sugerem que a GXM pode estar promovendo alguma depleção de energia nesses macrófagos, visto que eles dependem de glicose para sua sobrevivência.

Para avaliar se estava ocorrendo alguma inibição do fluxo glicolítico, foram utilizados dois marcadores dessa via, glicose e lactato. De fato, houve uma diminuição no consumo de glicose conforme aumentamos a concentração do polissacarídeo capsular demonstrando que a GXM esta levando a morte dessas células. No entanto, essa diminuição do fluxo glicolítico nos levou a hipótese de que esta diminuição de forma dose dependente pode estar associada a alguns eventos apoptóticos (Meira *et al.*, 2005) conforme demonstrado através de estudos de Monari (2005b) e de Villena e colaboradores (2008) onde mostram que a GXM de *C. neoformans* induz a apoptose dos macrófagos mediada a expressão de Fas ligante (Monari *et al.*, 2005b; Villena *et al.*, 2008).

A produção de lactato é regulada no interior das células e, assim, a sua acumulação altera a concentração de outros intermediários da via glicolítica, como a F-6-P, F-1,6-BP e fosfoenolpiruvato (PEP). As concentrações fisiológicas de lactato, o produto final da glicólise anaeróbia, inibem reversivelmente a atividade da PFK através da dissociação de tetrâmeros em dímeros, um efeito contrabalanceado pelos estabilizadores da forma tetramérica, como F2,6BP (Marinho-Carvalho *et al.*, 2009; Leite *et al.*, 2007). Portanto, o lactato funciona como uma molécula sinalizadora e como coordenador do metabolismo celular em vários tecidos e órgãos. Com base nessas informações foi realizado o ensaio da produção de lactato onde há uma diminuição da produção de lactato conforme aumentamos as concentrações de GXM indicando, portanto que esta ocorrendo alguma inibição no fluxo glicolítico.

Como visto anteriormente, o polissacarídeo capsular é internalizado dentro de poucas horas (Chang *et al.*, 2006) sendo capaz de sobreviver e se reproduzir dentro dos macrófagos modulando suas atividades (Bicanic & Harrison, 2005; Del Poeta, 2004) e com isso liberando a GXM ao longo do tempo (McFadden, Zaragoza & Casadevall, 2006). Nos ensaios realizados verificou-se que a GXM estaria se ligando a PFK e modulando o seu funcionamento.

Nas condições utilizadas nos experimentos, um mínimo de 4-5 horas foi necessário para visualizar GXM intracelular. Observou-se uma distribuição uniforme da GXM após seis horas de incubação com os macrófagos, semelhante ao descrito por Chang e colaboradores (Chang *et al.*, 2006). Através da sobreposição das imagens

realizada pela microscopia de fluorescência, em ambos os tempos de exposição dos macrófagos com o polissacarídeo capsular sugere-se uma co-localização da GXM com a PFK dentro dos macrófagos indicando, portanto uma possível interação da enzima com o polissacarídeo capsular.

Esta observação acima e o fato de que GXM diminui o consumo de glicose nos levou a investigar se o polissacarídeo capsular interfere com a atividade de PFK. Os macrófagos murinos foram incubados com a GXM conforme descrito em material e métodos. Esse resultado está acompanhado de uma diminuição da atividade da PFK em função do aumento da concentração de GXM, portanto, o polissacarídeo capsular esta modulando a atividade dessa enzima.

GXM é constitutivamente secretada pelo fungo durante a infecção e, portanto, pode interagir com as células hospedeiras por períodos prolongados, mas não se sabe se nessa interação em diferentes tempos pode haver alguma alteração na atividade da PFK. Nos experimentos realizados utilizando tempos curto e longos de tratamento com a GXM observou-se uma maior inibição do polissacarídeo após 48 horas, indicando uma modulação tempo-dependente. Portanto, a GXM promove uma inibição na atividade enzimática da PFK de forma dose e tempo dependente, porém ainda não se sabe qual o mecanismo de ação da GXM sobre a inibição da PFK.

Estudos adicionais foram realizados para verificar se a GXM poderia estar causando algum efeito direto na atividade da enzima PFK. A partir desses experimentos utilizou-se a PFK purificada do músculo esquelético de coelho, com o intuito de descartar qualquer artefato proveniente da cultura dos macrófagos. De acordo com os resultados obtidos ocorre uma inibição da atividade da PFK conforme ocorre o aumento da concentração de GXM corroborando, portanto com o resultado da atividade enzimática realizada nos macrófagos.

A PFK é a enzima chave que regula a glicólise, portanto, ela é uma enzima complexa onde é regulada por uma variedade de ligantes, incluindo seus substratos (Zancan *et al.*, 2007 a; Zancan *et al.*, 2008), hormônios (Alves & Sola-Penna, 2003; Coelho, Costa & Sola-Penna, 2007; Zancan & Sola-Penna, 2005 a e b), produtos da reação e vários outros metabólitos celulares como AMP, frutose-2,6-bisfosfato, glicose-

1,6-bisfosfato, citrato, lactato e outros (Uyeda, 1979; Marinho-Carvalho, Zancan & Sola-Penna, 2006).

Como substratos da enzima foi utilizado a F6P e o ATP nos ensaios com o intuito de investigar se a GXM poderia influenciar na afinidade da enzima pelo seu substrato. Os resultados apresentam uma diminuição da afinidade da enzima pelo seu substrato, F6P quando na presença de GXM. Um quadro similar é observado para o ATP, onde ele age primeiramente como efetor alostérico positivo e depois como negativo. Porém, essa inibição fica mais potencializada na presença da GXM onde ocorre uma menor afinidade da enzima pelo seu substrato. Portanto, a diminuição da afinidade da enzima com os substratos, F6P e ATP é, provavelmente, devido ao mecanismo de inibição da GXM com a PFK, o que implica na dissociação dos tetrâmeros totalmente ativos da enzima em dímeros fracamente ativos.

Para certificar que a GXM estava alterando a afinidade da enzima pelo seu substrato foi realizado o ensaio para avaliar os parâmetros cinéticos para a F6P e ATP na PFK de músculo esquelético de coelho, onde observamos mudanças quando na presença da GXM. Como de fato, observou-se que o polissacarídeo capsular induziu um aumento de aproximadamente 76% no $K_{0.5}$ da F-6-P, indicando uma diminuição significativa da afinidade da enzima pelo seu substrato, além de promover uma redução de 39% na velocidade máxima da enzima (V_{max}), indicando que a GXM interfere na velocidade da reação e, portanto, na afinidade dessa enzima.

Outro substrato da enzima analisado foi o ATP, observa-se um aumento de 100% no $K_{0.5}$ demonstrando uma diminuição muito mais significativa quando comparado a F-6-P e na V_{max} , uma redução de 34,25% sugerindo que o ATP, quando na presença da GXM, promove uma redução na velocidade máxima da catálise enzimática. Esses dados reforçam os resultados discutidos anteriormente, relativo modulação alostérica da enzima promovida pela GXM.

A estabilização das distintas conformações oligomérica da PFK, transição entre tetrâmeros totalmente ativos e dímeros fracamente ativos, é um dos mecanismos moleculares os quais regulam a atividade da enzima e que parece ser um evento celular chave dessa regulação (Hesterberg & Lee, 1980, Hesterberg, Lee & Erickson, 1981).

A GXM mostra-se como outro modulador deste equilíbrio deslocando a enzima para a sua conformação dimérica e, portanto, inibindo a sua atividade catalítica. Para confirmar se realmente esta ocorrendo essa mudança na conformação realizou-se o ensaio do centro de massa do espectro de fluorescência intrínseca da enzima. Constatou-se um aumento gradual no centro de massa em função do aumento da concentração do polissacarídeo capsular, sugerindo que a GXM promove uma dissociação na estrutura da PFK alterando a sua forma tetramérica para dimérica, onde os triptofanos presentes ficam expostos acarretando em uma maior emissão de luz e menor energia. Os dados apresentados no inset corroboram com a mudança da conformação oligomérica da enzima.

Levando em consideração que grande quantidade deste polissacarídeo é internalizado pelos macrófagos e outras células do hospedeiro acredita-se que este efeito pode ser observado também em outros tipos celulares. Isso poderia ser considerado um novo e importante mecanismo patogênico, considerando que a via glicolítica é altamente dinâmica e que os principais reguladores da PFK são conhecidos por interferir uns com os outros para manter a homeostase. Na verdade, é claro que os efeitos inibitórios da GXM podem ser atenuados, cancelados ou potencializados, e dependendo do sinal é prejudicial a atividade da enzima.

Por exemplo, se a concentração de F2,6BP sobe, devido a sinalização da insulina (Silva *et al*, 2004), os efeitos inibitórios da GXM seriam supostamente menos pronunciado, pois a F2,6BP favorecesse a formação de tetrâmeros neutralizando a formação de dímeros favorecido pela GXM. Por outro lado, se aumenta o nível intracelular de lactato ocorre uma diminuição da atividade da PFK e do metabolismo celular (Leite *et al*, 2007, Sola-Penna, 2008), potencializando a ação inibitória da GXM sobre PFK possivelmente deixando as células mais suscetíveis aos efeitos do polissacarídeo.

Além disso, os estímulos celulares provocam o surgimento de concentrações intracelulares de cálcio, o que poderia favorecer a ligação da CAM com a PFK, o que revoga os efeitos inibitórios da GXM na PFK. CAM é descrita por induzir a dissociação da conformação tetramérica ativa da enzima em dímeros (Marinho-Carvalho *et al*, 2009, Marinho-Carvalho, Zancan & Sola-Penna, 2006), abolindo os efeitos dos ligantes que

favorece a dissociação do tetramers. GXM é um polímero com propriedades físicas estáveis o qual apresenta uma rede de carga negativa devido à presença de resíduos múltiplos de ácido glucurônico. A rede de GXM na superfície *Cryptococcus neoformans* é, em parte associada através de ligações divalentes, como Ca^{2+} e Mg^{2+} (Nimrichter *et al*, 2007). É razoável supor que GXM livre seria capaz de se ligar a cátions mono e divalentes no meio intracelular quando ocorre a diminuição da disponibilidade de Ca^{2+} podendo ser um efeito adicional causado pela absorção da GXM pela célula do hospedeiro. Por outro lado, GXM é um polissacarídeo muito hidrofílico, o que lhe confere a formação de numerosas ligações de hidrogênio em qualquer solução aquosa. A interação proteína-carboidrato mediadas por ligações de hidrogênio são conhecidos por resultar na perda da estabilidade biológica (Allison *et al.*, 1999), que também poderia estar relacionada com a dissociação tetramérica da PFK na presença de GXM. Portanto, é provável que o mecanismo através da qual PFK é inibida por GXM envolve a dissociação de tetrâmeros da enzima em dímeros.

6- Conclusões

- ✓ O tratamento dos macrófagos murinos RAW 246.7 com GXM promove uma inibição na atividade enzimática da PFK de forma dose e tempo dependente que ocorre em paralelo com a diminuição na viabilidade celular. Esses efeitos são acompanhados pela diminuição do consumo de glicose e produção de lactato também.
- ✓ Esses resultados sugerem um efeito citotóxico da GXM levando a indução da morte celular o qual envolve a inibição do metabolismo glicolítico dos macrófagos.
- ✓ Nossos resultados sugerem que a GXM pode interferir diretamente com a atividade da PFK, uma vez que a co-localização dessas estruturas foi observada.
- ✓ Essa inibição também é observada na PFK purificada, seguido da diminuição da afinidade da enzima pelo seu substrato, F-6-P e ATP. Estes dados sugerem que a GXM internalizada pelas células interage diretamente com PFK.
- ✓ O mecanismo de inibição ocorre através da dissociação da PFK da forma de tetrâmeros, bastante ativa, em dímeros inativos, como revelado por espectro de fluorescência intrínseca da enzima.
- ✓ Os moduladores alostéricos da enzima, os quais são capazes de estabilizar sua conformação tetramétrica, são atenuados pela inibição promovida pela GXM.
- ✓ Em conjunto, nossos resultados sugerem que o mecanismo da morte celular induzida pela GXM envolve a inibição do fluxo glicolítico.

7 – Bibliografia

- AARONSON, R.P., FRIEDEN, C. (1972) **Rabbit muscle phosphofructokinase: studies on the polymerization. The behavior of the enzyme at pH 8, pH 6, and intermediate pH values.** J. Biol. Chem. 1247: 7502-7509.
- ALLISON, S.D., CHANG, B., RANDOLPH, T.W., CARPENTER, J.F. (1999) **Hydrogen bonding between sugar and protein is responsible for inhibition of dehydration-induced protein unfolding.** Arch Biochem Biophys. 365: 289-298.
- ASHKENAZY-SHAHAR, M., BEITNER, R. (1997) **Serotonin decreases cytoskeletal and cytosolic glycolytic enzymes and the levels of ATP and glucose 1,6-bisphosphate in skin, which is prevented by the calmodulin antagonists thioridazine and clotrimazole.** Biochem Mol Med. 60:187-93.
- ALVAREZ, M., CASADEVALL, A. (2006) **Phagosome extrusion and host-cell survival after *Cryptococcus neoformans* phagocytosis by macrophages.** Curr Biol.16: 2161-2165.
- ALVES, G.G., SOLA-PENNA, M. (2003) **Epinephrine modulates cellular distribution of muscle phosphofructokinase.** Molecular Genetics and Metabolism. 78: 302-306.
- ANDRÉS, V., CARRERAS, J., CUSSÓ, R. (1996) **Myofibril-bound muscle phosphofructokinase is less sensitive to inhibition by ATP than the free enzyme, but retains its sensitivity to stimulation by bisphosphorylated hexoses.** International Journal of Biochemistry and Cell Biology. 28: 1179-1184.
- BARBOSA, F.M., FONSECA, F.L., FIGUEIREDO, R.T., BOZZA, M.T., CASADEVALL, A., NIMRICHTER, L., RODRIGUES, M.L. (2007) **Binding of glucuronoxylomannan to the CD14 receptor in human A549 alveolar cells induces interleukin-8 production.** Clinical and Vaccine Immunology. 14: 94-98.
- BARBOSA, F.M., FONSECA, F.L., HOLANDINO, C., ALVIANO, C.S., NIMRICHTER, L., RODRIGUES, M.L. (2006) **Glucuronoxylomannan-mediated interaction of *Cryptococcus neoformans* with human alveolar cells results in fungal internalization and host cell damage.** Microbes and Infection. 8: 493-502.
- BERCHANSKI, A., EISENSTEIN, M. (2003) **Construction of molecular assemblies viadocking: modeling of tetramers with D2 symmetry.** Proteins 53: 817-829.
- BERLAND, K.M., SO, P.T., CHEN, Y., MANTULIN, W.W., GRATTON, E. (1996) **Scanning two-photon fluctuation correlation spectroscopy: particle counting measurements for detection of molecular aggregation.** Biophys. J. 71: 410- 420.
- BICANIC, T., HARRISON, T.S. (2005) **Cryptococcal meningitis.** Br Med Bull. 72: 99-118.

BOCK, P.E., FRIEDEN, C. (1974) **pH-induced cold lability of rabbit skeletal muscle phosphofructokinase.** *Biochemistry*. 13: 4191-4196.

BOSE, I., REESE, A.J., ORY, J.J., JANBON, G., DOERING, T.L. (2003) **A Yeast under Cover: the Capsule of *Cryptococcus neoformans*.** *Eukaryotic Cell*. 2: 655-663.

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.

CAI, G.Z., LEE, L.L., LUTHER, M.A., LEE, J.C. (1990) Regulation and quaternary structural changes in rabbit muscle phosphofructokinase. *Biophysical Chemistry*. 37: 97-106.

CAMPANELLA, M.E., CHU, H., LOW, P.S. (2005) **Assembly and regulation of a glycolytic enzyme complex on the human erythrocyte membrane.** *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 102: 2402-2407.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. National Center for Zoonotic, Vector-Borne, and Enteric Diseases. Disponível em: <http://www.cdc.gov/nczved/dfbmd/disease_listing/cryptococcus_ti.html>. Acesso em: 15 jan. 2010.

CEPPI, E.D., KNOWLES, R.G., CARPENTER, K.M., TITHERADGE, M.A. (1992) **Effect of treatment in vivo of rats with bacterial endotoxin on fructose 2,6-bisphosphate metabolism and L-pyruvate kinase activity and flux in isolated liver cells.** *Biochemical Journal*. 284: 761-766.

CHANG, Z.L., NETSKI, D., THORKILDSON, P., KOZEL, T.R. (2006) **Binding and internalization of glucuronoxylomannan, the major capsular polysaccharide of *Cryptococcus neoformans*, by murine peritoneal macrophages.** *Infection and Immunity*. 74: 144-151.

CHEN-ZION, M., LIVNAT, T., BEITNER, R. (1992) **Insulin rapidly stimulates binding of phosphofructokinase and aldolase to muscle cytoskeleton.** *Int. J. Biochem*. 24: 821-826.

CLARKE, F., STEPHAN, P., MORTON, D.J., WIEDEMANN, J. (1983) **The role of actin and associated structural proteins in the organization of glycolytic enzymes,** in: J. Barden and C. Dos Remedios (Eds.). *Actin: Structure and Function in Muscle and Non-Muscle Cells*, Academic Press, Sydney, pp. 249-257.

CLARKE, F., STEPHAN, P., MORTON, D., WEIDEMANN, J. (1985) **Glycolytic enzyme organization via the cytoskeleton and its role in metabolic regulation.** In *Regulation of Carbohydrate Metabolism* (Beitner R, Ed.). Boca Raton, FL: CRC Press, Vol II, pp 1-31.

COELHO, W.S., COSTA, K.C., SOLA-PENNA, M. (2007) **Serotonin stimulates mouse skeletal muscle 6-phosphofructo-1-kinase through tyrosine-phosphorylation of the enzyme altering its intracellular localization.** *Mol Genet Metab*. 92: 364-370.

COLLINS, B.E., YANG, L.J., SCHNAAR, R.L. (2000) **Lectin-mediated cell adhesion to immobilized glycosphingolipids**. *Methods in Enzymology*. 312: 438-446.

CORRY, D.B., JOOLHAR, F.S., HORI, N.T., TUCK M.L. (2002) **Decreased erythrocyte insulin binding in hypertensive subjects with hyperinsulinemia**. *Am. J. Hypertens.* 15: 296-301.

DEL POETA, M. (2004) **Role of Phagocytosis in the Virulence of *Cryptococcus neoformans***. *Eukaryotic Cell*. 3: 1067-1075.

DEVLIN, T.M. (2002) **Textbook of biochemistry with clinical correlations** . Wiley-Liss New York 5ed. pp 614-615.

DIDLAKE, R., KIRCHNER, K.A., LEWIN, J., BOWER, J.D., MARKOV, A.K. (1989) **Attenuation of ischemic renal injury with fructose 1,6-diphosphate**. *Journal of Surgical Research*. 47: 220-226.

DOERING, T.L., (2009) **How sweet it is! Cell wall biogenesis and polysaccharide capsule formation in *Cryptococcus neoformans***. *Annu Rev Microbiol*. 63: 223-47.

DROZDOV-TIKHOMIROV, L.N., SKURIDA, G.I., ALEXANDROV, A.A. (1999) **The enzyme activity allosteric regulation model based on the composite nature of catalytic and regulatory sites concept**. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*. 16: 917-929.

EDDE, L., ZHOU, X., EATON, J.W., SHERMAN, M.P. (1998) **Induction of nitric oxide synthase in macrophages: inhibition by fructose-1,6-diphosphate**. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 243: 683-687.

EL-BACHA, T.P., DE FREITAS, M.S., SOLA-PENNA, M. (2003) **Cellular distribution of phosphofructokinase activity and implications to metabolic regulation in human breast cancer**. *Molecular and Genetics Metabolism*. 79: 294-299.

EL-BACHA, T. P., SOLA-PENNA, M. (2003) **Alterações no Metabolismo de Células Neoplásicas**. *Integração Hormonal do Metabolismo Energético*. 1 ed. Rio de Janeiro: Atheneu Editora, , v. 1, p. 319-332.

ELLERBROEK, P.M., ULFMAN, L.H., HOEPELMAN, A.I., COENJAERTS, F.E. (2004) **Cryptococcal glucuronoxylomannan interferes with neutrophil rolling on the endothelium**. *Cellular and Microbiology*. 6: 581-592..

FABER-BARATA, J., SOLA-PENNA, M. (2005) **Opposing effects of two osmolytes - trehalose and glycerol - on thermal inactivation of rabbit muscle 6-phosphofructo-1-kinase**. *Mol. Cell Biochem*. 269: 203-207.

FELDMESSER, M., KRESS, Y., NOVIKOFF, P., CASADEVALL, A. (2000a) ***Cryptococcus neoformans* is a facultative intracellular pathogen in murine pulmonary infection**. *Infect Immun*. 68: 4225-4237.

FELDMESSER, M., TUCKER, S., CASADEVALL, A. (2001) **Intracellular parasitism of macrophages by *Cryptococcus neoformans***. Trends in Microbiology. 9: 273-278.

FRASES, S., PONTES, B., NIMRICHTER, L., VIANA, N.B., RODRIGUES, M.L., CASADEVALL, A. (2009) **Capsule of *Cryptococcus neoformans* grows by enlargement of polysaccharide molecules**. Proc Natl Acad Sci USA. 106: 1228-33.

GALZIGNA, L., RIZZOLI, V., BIANCHI, M., RIGOBELLO, M.P., SCURI, R. (1989) **Some effects of fructose-1,6-diphosphate on rat myocardial tissue related to a membrane-stabilizing action**. Cell Biochemistry and Function. 7: 91-96.

GARCIA-HERMOSO, D., JANBON, G., DROMER, F. (1999) **Epidemiological evidence for dormant *Cryptococcus neoformans* infection**. J. Clin. Microbiol. 37: 3204-3209.

GLADDEN, L.B. (2004) **Lactate metabolism: a new paradigm for the third millennium**. J Physiol. 558 :5-30.

GOLDHAMMER, A.R., PARADIES, H.H. (1979) **Phosphofructokinase: structure and function**. Curr. Top. Cell Regul. 15: 109-41.

HARDIN, C.D., ROBERTS, T.M. (1994) Metabolism of exogenously applied fructose 1,6-bisphosphate in hypoxic vascular smooth muscle. American Journal of Physiology. 267: 2325-2332.

HAZEN, S.L.; WOLF, M.J.; FORD, D.A.; GROSS, R.W (1994). **The rapid and reversible association of phosphofructokinase with myocardial membranes during myocardial ischemia** FEBS Letters 339: 213-216

HESTERBERG, L.K., LEE, J.C. (1980) **Sedimentation study of a catalytically active form of rabbit muscle phosphofructokinase at pH 8.55**. Biochemistry. 19: 2030-2039.

HESTERBERG, L.K, LEE, J.C. (1982) **Self-association of rabbit muscle phosphofructokinase: effects of ligands**. Biochemistry 21: 216-222.

HESTERBERG, L.K., LEE, J.C., ERICKSON, H.P. (1981) **Structural properties of an active form of rabbit muscle phosphofructokinase**. J Biol Chem. 256: 9724-9730.

JUANG, P. (2007) Update on new antifungal therapy. AACN Advanced Critical Care. 18: 253-260.

KAUL, R.K., KOHLER, H. (1983) **Interaction of hemoglobin with band 3: a review**. Klin Wochenschr. 61: 831-837.

KEMP, R.G. (1975) Phosphofructokinase. Methods Enzymol. 42: 72-77.

KEMP, R.G., FOE, L.G. (1983) **Allosteric regulatory properties of muscle phosphofructokinase**. Mol. Cell Biochem. 57: 147-154.

KNOBLER, H., WEISS, Y., PELED, M., GRONER, Y. (1997) **Impaired glucose-induced insulin response in transgenic mice over expressing the L-phosphofructokinase gene**. Diabetes 46: 1414-1418.

LAZZARINO, G., NUUTINEN, M.E., TAVAZZI, B., CERRONI, L., DI PIERRO, D., GIARDINA, B. (1991) **Preserving effect of fructose-1,6-bisphosphate on high-energy phosphate compounds during anoxia and reperfusion in isolated langendorff-perfused rat hearts.** J Mol Cell Cardiol. 23: 13-23.

LEHOTZKY, A., TELEGDI, M., LILJOM, K., OVADI, J. (1993) **Interaction of phosphofructokinase with tubulin and microtubules. Quantitative evaluation of the mutual effects.** Journal of Biological Chemistry. 268: 10888-10894.

LEHNINGER, A.L., NELSON, D.L., COX, M.M. (2000) **Lehninger Principles of Biochemistry.** 3^o ed., Worth Publishers, New York, NY.

LEITE, T.C., DA SILVA, D., COELHO, R.G., ZANCAN, P., SOLA-PENNA, M. (2007) **Lactate favors the dissociation of skeletal muscle 6-phosphofructo-1-kinase tetramers down-regulating the enzyme and muscle glycolysis.** Biochemical Journal. 408: 123-130.

LILLING, G., BEITNER, R. (1990) **Decrease in cytoskeleton-bound phosphofructokinase in muscle induced by high intracellular calcium, serotonin and phospholipase A2 in vivo.** Int J Biochem;22: 857-63.

LIN, X. (2009) **Cryptococcus neoformans: Morphogenesis, infection, and evolution.** Infection, Genetics and Evolution. 9: 401-416.

LIN, X., HEITMAN, J. (2006) **The Biology of the Cryptococcus neoformans Species Complex.** Annual Review Microbiology. 60-69-105.

LIU, R.S., ANDERSON, S. (1980) **Activation of rabbit muscle phosphofructokinase by F-actin and reconstituted thin filaments.** Biochemistry 19: 2684-2688.

LOWRY, O.H., ROSENBROUGH, N.L., FARR A.L., RANDALL, R.J. (1951) **Protein measurement with the Folin phenol reagent.** J. Biol. Chem. 193: 265-275.

LUTHER, M.A., HESTERBERG, L.K., LEE, J.C. (1985) **Subunit interaction of rabbit muscle phosphofructokinase: effects of purification procedures.** Biochemistry 24: 2463-2470.

MA, H., CROUDACE, J.E., LAMMAS, D.A., MAY, R.C. (2006) **Expulsion of Live Pathogenic Yeast by Macrophages.** Current Biology. 16: 2156-2160.

MAGEN, A. KOREN-SCHWARTZER, N., CHEN-ZION, M. BEITNER, R. (1995) **Effect of insulin-induced hypoglycemia on cytoskeleton-bound and cytosolic phosphofructokinase and the levels of glucose 1,6-bisphosphate in rat brain.** Biochem Mol Med. 56: 94-8

- MAHRENHOLZ, A.M., LAN, L., MANSOUR, T.E. (1991) **Phosphorylation of heart phosphofructokinase by Ca²⁺/calmodulin protein kinase**. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 174: 1255-1259.
- MAIA, J.C.C., GOMES, S.L., JULIANI, M.H. (1983) **Preparation of [α -³²P] and [γ -³²P] nucleoside triphosphate, with high specific activity**. In: C.M. Morel (Ed.) *Genes and Antigens of Parasites. A Laboratory Manual*. Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, RJ, Brazil, 1983, pp. 146-157.
- MARINHO-CARVALHO, M.M. (2006) **Modulação no equilíbrio oligomérico da Fosfofrutocinase-1 na presença de Ca²⁺ e Calmodulina**. 118 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – Química Biológica) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
- MARINHO-CARVALHO, M.M., COSTA-MATTOS, P.V., SPITZ, G.A., ZANCAN, P., SOLA-PENNA, M. (2009) **Calmodulin upregulates skeletal muscle 6-phosphofructo-1-kinase reversing the inhibitory effects of allosteric modulators**. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1794: 1175-1180.
- MARINHO-CARVALHO, M.M., ZANCAN, P., SOLA-PENNA, M. (2006) **Modulation of 6- phosphofructo-1-kinase oligomeric by calmodulin: Formation of active dimmers**. *Molecular Genetics and Metabolism.* 87: 253-261.
- MARKOV, A.K., DON TURNER, M., OGLETHORPE, N., NEELY, W.A., HELLEMS, H.K. (1981) **Fructose-1,6-diphosphate: An agent for treatment of experimental endotoxin shock**. *Surgery.* 90: 482-488.
- MARKOV, A.K., WARREN, E.T., COHLY, H.H., SAULS, D.J., SKELTON, T.N. (2007) **Influence of fructose-1,6-diphosphate on endotoxin-induced lung injuries in sheep**. *Journal of Surgical Research.* 138: 45-50.
- MARTINEZ, L.R., CASADEVALL, A. (2005) **Specific antibody can prevent fungal biofilm formation and this effect correlates with protective efficacy**. *Infect. Immun.* 73: 6350-6362.
- MARTÍNEZ-COSTA, O.H.; HERMIDA, C.; SÁNCHEZ-MARTÍNEZ, C.; SANTAMARÍA, B.; ARAGÓN, J. (2004). **Identification of C-terminal motifs responsible for transmission of inhibition by ATP of mammalian phosphofructokinase, and their contribution to other allosteric effects**. *Biochemistry Journal* 377, 77-84.
- MCFADDEN, D., JESUS, M., CASADEVALL, A. (2006) **The Physical Properties of the Capsular Polysaccharides from *Cryptococcus neoformans* Suggest Features for Capsule Construction**. *The Journal of Biological Chemistry.* 281: 1868-1875.
- MCFADDEN, D., ZARAGOZA, O., CASADEVALL, A. (2006) **The capsular dynamics of *Cryptococcus neoformans***. *Trends in Microbiology* 14: 497-505.
- MEIRA, D.D., MARINHO-CARVALHO, M.M., TEIXEIRA, C.A., VEIGA, V.F., DA POIAN, A.T., HOLLANDINOC, C., DE FREITAS, M.S., SOLA-PENNA, M. (2005) **Clotrimazole decreases human breast cancer cells viability through alterations in cytoskeleton-associated glycolytic enzymes**. *Molecular Genetics and Metabolism.* 84: 354-362.

- MONARI, C., BISTONI, F., CASADEVALL, A., PERICOLINI, E., PIETRELLA, D., KOZEL, T.R., VECCHIARELLI, A. (2005a) **Glucuronoxylomannan, a microbial compound, regulates expression of costimulatory molecules and production of cytokines in macrophages.** The Journal of Infectious Diseases. 191: 127-137.
- MONARI, C., BISTONI, F., VECCHIARELLI, A. (2006) **Glucuronoxylomannan exhibits potent immunosuppressive properties.** FEMS Yeast Res. 6: 537-542.
- MONARI, C., PERICOLINI, E., BISTONI, G., CASADEVALL, A., KOZEL, T.R., VECCHIARELLI, A. (2005b) ***Cryptococcus neoformans* capsular glucuronoxylomannan induces expression of fas ligand in macrophages.** The Journal of Immunology. 174: 3461-3468.
- NETTELBLAD, F.A., FORSBERG, P.O., HUMBLE, E., ENGSTROM, L. (1986) **Aspects on the phosphorylation of muscle phosphofructokinase by protein kinase C - inhibition by phosphofructokinase stabilizers.** Biochem. Biophys. Res. Commun. 136: 445-453.
- NIMRICHTER, L., FRASES, S., CINELLI, L.P., VIANA, N.B., NAKOUZI, A., TRAVASSOS, L.R., CASADEVALL, A., RODRIGUES, M.L. (2007) **Self-aggregation of *Cryptococcus neoformans* capsular glucuronoxylomannan is dependent on divalent cations.** Eukaryotic Cell. 6: 1400-1410.
- OLIVEIRA, D.L., NIMRICHTER, L., MIRANDA, K., FRASES, S., FAULL, K.F., CASADEVALL, A., RODRIGUES, M.L. (2009) ***Cryptococcus neoformans* cryoultramicrotomy and vesicle fractionation reveals an intimate association between membrane lipids and glucuronoxylomannan.** Fungal Genet Biol. 46: 956-963.
- ORÓSZ, F., CHRISTOVA, T.Y., OVÁDI, J. (1987) **Aldolase decreases the dissociation-induced inactivation of muscle phosphofructokinase.** Biochem. Biophys. Res. Commun. 147: 1121-1128.
- PAETKAU, V., LARDY, H.A. (1967) **Phosphofructokinase. Correlation of physical and enzymatic properties.** J. Biol. Chem. 242: 2035-2042.
- PARMEGGIANI, A., BOWMAN, R.H. (1963) **Regulation of phosphofructokinase activity by citrate in normal and diabetic muscle.** Biochem. Biophys. Res. Commun. 12: 268-273.
- PARMEGGIANI, A., LUFT, J., LOVE, D.S., KREBS, E.G. (1966) **Crystallization and properties of rabbit skeletal muscle phosphofructokinase.** Journal of Biological Chemistry. 241: 4625-4637.
- PASSONNEAU J.V., LOWRY O.H. (1962) **Phosphofructokinase and the Pasteur effect.** Biochem. Biophys. Res. Commun. 7: 10-15.
- PHILIPS, D., BLAKE, C.C.F., WATSON, H.C. (1981) **The enzymes of glycolysis: Structure, activity and evolution.** Philosophical Transactions of the Royal Society. 293: 1-214
- PILKIS, S.J., EL-MAGHRABI, M.R., MCGRANE, M.M., PILKIS, J., CLAUS, T.H. (1981) **The role of fructose 2,6-bisphosphate in regulation of fructose-1,6-bisphosphatase.** J. Biol. Chem. 256: 11489-11495.

POORMAN, R.A.; RANDOLPH, A.; KEMP, R.G.; HEINRIKSON, R.L. (1984). **Evolution of phosphofructokinase: gene duplication and creation of new effectors sites.** Nature (London) 309, 467-469

RAIS, B., ORTEGA, F., PUIGJANER, J., COMIN, B., OROSZ, F., OVADI, J., CASCANTE, M. (2000) **Quantitative characterization of homo- and heteroassociations of muscle phosphofructokinase with aldolase.** Biochimica et Biophysica Acta. 1479: 303-314.

REDDI, K., PHAGOO, S.B., ANDERSON, K.D., WARBURTON, D. (2003) **Burkholderia cepacia-induced IL-8 gene expression in an alveolar epithelial cell line: signaling through CD14 and mitogen-activated protein kinase.** Pediatric Research. 54: 297-305.

RIVERA, J., FELDMESSER, M., CAMMER, M., CASADEVALL, A. (1998) **Organ-dependent variation of capsule thickness in *Cryptococcus neoformans* during experimental murine infection.** Infection and Immunity. 66: 5027–5030.

ROBERTS, S.J., SOMERO, G.N. (1987) **Binding of phosphofructokinase to filamentousactin.** Biochemistry. 26: 3437-3442.

RODRIGUES, M.L., ALVIANO, C.S., TRAVASSOS, L.R. (1999) **Pathogenicity of *Cryptococcus neoformans*: virulence factors and immunological mechanisms.** Microbes and Infection. 1: 293-301.

RODRIGUES, M.L., ALVAREZ, M., FONSECA, F.L., CASADEVALL, A. (2008) **Binding of the Wheat Germ Lectin to *Cryptococcus neoformans* Suggests an Association of Chitinlike Structures with Yeast Budding and Capsular Glucuronoxylomannan.** Eukaryotic Cell. 7:602-609.

RODRIGUES, M.L., FONSECA, F.L., FRASES, S., CASADEVALL, A., NIMRICHTER, L. (2009) **The still obscure attributes of cryptococcal glucuronoxylomannan.** Medical Mycology. 47: 783-788.

RODRIGUES, M.L., NIMRICHTER, L., OLIVEIRA, D.L., FRASES, S., MIRANDA, K., ZARAGOZA, O., ALVAREZ, M., NAKOUZI, A., FELDMESSER, M., CASADEVALL, A. (2007) **Vesicular polysaccharide export in *Cryptococcus neoformans* is a eukaryotic solution to the problem of fungal trans-cell wall transport.** Eukaryotic Cell. 6: 48-59.

RODRIGUES, M.L., TRAVASSOS, L.R., MIRANDA, K.R., FRANZEN, A.J., ROZENTAL, S., DE SOUZA, W., ALVIANO, C.S., BARRETO-BERGTER, E. (2000) **Human antibodies against a purified glucosylceramide from *Cryptococcus neoformans* inhibit cell budding and fungal growth.** Infection and Immunity. 68: 7049-7060.

SALE, E.M, WHITE, M.F., KAHN, C.R. (1987) **Phosphorylation of glycolytic and gluconeogenic enzymes by the insulin receptor kinase.** J. Cell Biochem. 33: 15-26.

SANO, W., WATANABE, F., TAMAI, H., FURUYA, E., MINO, M. (1995) **Beneficial effect of fructose-1,6-bisphosphate on mitochondrial function during ischemia-reperfusion of rat liver.** *Gastroenterology*. 108: 1785-1792.

SILVA, A.P., ALVES, G.G., ARAÚJO, A.H.B., SOLA-PENNA, M. (2004) **Effects of insulin and actin on phosphofructokinase activity and cellular distribution in skeletal muscle.** *Anais da Academia Brasileira de Ciência*. 76: 541-548.

SOLA, A., BERRIOS, M., SHELDON, R.A., FERRIERO, D.M., GREGORY, G.A. (1996) **Fructose-1,6-bisphosphate after hypoxic ischemic injury is protective to the neonatal rat brain.** *Brain Research*. 741: 294-299.

SOLA-PENNA M. (2008) **Metabolic regulation by lactate.** *IUBMB Life*. 60: 605-608.

SOLA-PENNA, M., DOS SANTOS, A.C., ALVES, G.G., EL-BACHA, T., FABER-BARATA, J., PEREIRA, M.F., SEREJO, F.C., DA POIAN, A.T., SORENSON, M.M. (2002) **A radioassay for phosphofructokinase-1 activity in cell extracts and purified enzyme.** *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*. 50: 129-140.

SOUTHARD, J.H.; HULTIN, H.O. (1972). **On latent hexokinase activity in skeletal muscle mitochondria.** *FEBS v.19, n.4*.

TUCKER, S.C., CASADEVALL, A. (2002) **Replication of *Cryptococcus neoformans* in macrophages is accompanied by phagosomal permeabilization and accumulation of vesicles containing polysaccharide in the cytoplasm.** *Proc Natl Acad Sci USA*. 99: 3165-3170.

UYEDA, K. (1979) **Reaction of phosphofructokinase with maleic anhydride, succinic anhydride, and pyridoxal 5'-phosphate.** *Biochemistry*. 8: 2366-2373.

UYEDA, K., FURUYA, E., SHERRY, A.D. (1981) **The structure of "activation factor" for phosphofructokinase.** *J. Biol. Chem*. 256: 8679-8684.

VAN SCHAFTINGEN, E., JETT, M.F., HUE, L., HERS, H.G. (1981) **Control of liver 6-phosphofructokinase by fructose 2, 6-bisphosphate and other effectors.** *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 78: 3483-3486.

VÉRTESSY, B., OROSZ, F., KOVÁCS, J., OVÁDI, J. (1997) **Alternative binding of two sequential glycolytic enzymes to microtubules. Molecular studies in the phosphofructokinase/aldolase/microtubule system.** *Journal of Biological Chemistry*. 272: 25542-25546.

VILLENA, S.N., PINHEIRO, R.O., PINHEIRO, C.S., NUNES, M.P., TAKIYA, C.M., DOSREIS, G.A., PREVIATO, J.O., MENDONÇA-PREVIATO, L., FREIRE-DE-LIMA, C.G. (2008) **Capsular polysaccharides galactoxylomannan and glucuronoxylomannan from *Cryptococcus neoformans* induce macrophage apoptosis mediated by Fas ligand.** *Cell Microbiol*. 10:1274-1285

VORA, S., FRANCKE, U. (1981) **Assignment of the human gene for liver-type 6-phosphofructokinase isozyme (PFKL) to chromosome 21 by using somatic cell hybrids and monoclonal anti-L antibody.** Proceedings of the National Academy of Sciences. 78: 3738-3742.

YAUCH, L.E., MANSOUR, M.K., LEVITZ, S.M. (2005) **Receptor-mediated clearance of *Cryptococcus neoformans* capsular polysaccharide in vivo.** Infect Immun. 73: 8429-8432.

YONEDA, A., DOERING, T.L. (2006) **A eukaryotic capsular polysaccharide is synthesized intracellularly and secreted via exocytosis.** Molecular Biology of the Cell. 17: 5131-5140.

ZANCAN P., SOLA-PENNA, M. (2005a) **Calcium influx: A possible role for insulin modulation of intracellular distribution and activity of 6-phosphofructo-1-kinase in human erythrocytes.** Molecular and Genetics Metabolism. 86: 392-400.

ZANCAN, P., ALMEIDA, F.V., FABER-BARATA, J., DELLIAS, J.M., SOLA-PENNA, M. (2007a) **Fructose-2,6-bisphosphate counteracts guanidinium chloride-, thermal-, and ATP-induced dissociation of skeletal muscle key glycolytic enzyme 6-phosphofructo-1-kinase: A structural mechanism for PFK allosteric regulation.** Arch Biochem Biophys. 467: 275-282.

ZANCAN, P., MARINHO-CARVALHO, M.M., FABER-BARATA, J., DELLIAS, J.M., SOLA-PENNA, M. (2008) **ATP and fructose-2,6-bisphosphate regulate skeletal muscle 6-phosphofructo-1-kinase by altering its quaternary structure.** IUBMB Life. 60: 526-533.

ZANCAN, P., ROSAS, A.O., MARCONDES, M.C., MARINHO-CARVALHO, M.M., SOLA-PENNA, M. (2007b) **Clotrimazole inhibits and modulates heterologous association of the key glycolytic enzyme 6-phosphofructo-1-kinase.** Biochem Pharmacol. 73: 1520-1527.

ZANCAN, P., SOLA-PENNA, M., (2005b) **Regulation of human erythrocyte metabolism by insulin: cellular distribution of 6-phosphofructo-1-kinase and its implication for red blood cell function.** Molecular and Genetics Metabolism. 86: 401-411.

ZARAGOZA, O., CASADEVALL, A. (2004) **Experimental modulation of capsule size in *Cryptococcus neoformans*.** Biological Procedures Online. 6: 10-15.

ZARAGOZA, O., RODRIGUES, M.L., DE JESUS, M., FRASES, S., DADACHOVA, E., CASADEVALL, A. (2009) **The Capsule of the Fungal Pathogen *Cryptococcus neoformans*.** Advances in Applied Microbiology. 68: 133-216.

ZARAGOZA, O., TELZAK, A., BRYAN, R.A., DADACHOVA, E., CASADEVALL, A. (2006) **The polysaccharide capsule of the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans* enlarges by distal growth and is rearranged during budding.** Mol Microbiol. 59: 67-83.

Anexo

Glucuronoxylomannan from *Cryptococcus neoformans* down-regulates the enzyme 6-phosphofructo-1-kinase of macrophages

Juliana Grechi ^{1,2*}, Monica Marinho-Carvalho¹, Patricia Zancan³, Marcio Lourenço Rodrigues ², Leonardo Nimrichter ², Mauro Sola-Penna ¹.

¹Departamento de Fármacos - Faculdade de Farmácia – UFRJ

²Laboratório de Estudos Integrados em Bioquímica Microbiana IMPPG – UFRJ

³Laboratório de Oncobiologia Molecular - Faculdade de Farmácia – UFRJ

article submitted in Glycobiology



Glucuronoxylomannan from *Cryptococcus neoformans* down-regulates the enzyme 6-phosphofructo-1-kinase of macrophages

Journal:	<i>Glycobiology</i>
Manuscript ID:	Draft
Manuscript Type:	Regular Manuscripts
Date Submitted by the Author:	
Complete List of Authors:	Grechi, Juliana; UFRJ, Farmacos Marinho-Carvalho, Monica; UFRJ, Farmacos Zancan, Patricia; UFRJ, Farmacos Rodrigues, Marcio; UFRJ, Farmacos Nimrichter, Leonardo; UFRJ, Farmacos Sola-Penna, Mauro; UFRJ, Farmácia
Key Words:	GXM, metabolism, glycolysis, phosphofructokinase, <i>Cryptococcus neoformans</i>

1
2
3 **Glucuronoxylomannan from *Cryptococcus neoformans* down-regulates the**
4 **enzyme 6-phosphofructo-1-kinase of macrophages**
5

6
7 Keywords: GXM/glycolysis/macrophages/metabolism/phosphofructokinase
8

9
10 Julinana Grechi^{2,3,4}, Monica Marinho-Carvalho^{2,3}, Patricia Zancan⁵, Marcio L.
11 Rodrigues⁴, Leonardo Nimrichter^{1,4}, and Mauro Sola-Penna^{1,3}
12
13

14
15
16 ³ Laboratório de Enzimologia e Controle do Metabolismo - LabECoM, Faculdade
17 de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, Rio de Janeiro, RJ,
18 21941-590, Brazil
19

20
21 ⁴ Laboratório de Estudos Integrados em Bioquímica Microbiana, Instituto de
22 Microbiologia Professor Paulo de Goes - IMPPG, Universidade Federal do Rio de
23 Janeiro - UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, 21941-590, Brazil
24
25

26
27 ⁵ Laboratório de Oncobiologia Molecular - LabOMol, Faculdade de Farmácia,
28 Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, 21941-590,
29 Brazil
30
31

32
33 ¹ LN and MSP share senior authorship on this article. Correspondence to MSP
34 (maurosp@ufrj.br; tel/fax: 55-21-2560-8438) and LN (nimrichter1@yahoo.com; tel:
35 55-21-2562-6740, fax: 55-21-2560-8344)
36
37
38

39
40 ² JG and MMC have equally contributed to this work
41
42

43
44 Running title: GXM from *C. neoformans* down-regulates macrophages metabolism
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Abstract

The encapsulated yeast *Cryptococcus neoformans* is the causative agent of cryptococcosis, an opportunistic life-threatening infection. *C. neoformans* is coated by a polysaccharide capsule mainly composed of glucuronoxylomannan (GXM). GXM is considered a key virulence factor of this pathogen. In macrophages, it regulates cytokine production, nitric oxide synthesis and apoptosis. The present work aimed at evaluating the effects GXM on the key glycolytic enzyme, 6-phosphofructo-1-kinase (PFK). GXM inhibits PFK activity in cultured murine macrophages in a dose- and time-dependent manner, which occurred in parallel to cell viability decrease. The polysaccharide also inhibits purified PFK, promoting a decrease on the enzyme affinity for its substrates. In macrophages GXM co-localizes with PFK, suggesting that internalized polysaccharide directly interacts with this enzyme. The mechanism of PFK inhibition involves dissociation of tetramers into weakly active dimers, as revealed by fluorescence spectroscopy. Allosteric modulators of the enzyme able to stabilize its tetrameric conformation attenuate the inhibition promoted by GXM. Altogether, our results suggest that the mechanism of GXM-induced cell death involves the inhibition of the glycolytic flux.

Introduction

The pathogen *Cryptococcus neoformans* (Cn) is an encapsulated yeast with worldwide distribution (Rodrigues, M.L., Fonseca, F.L., et al. 2009, Zaragoza, O., Rodrigues, M.L., et al. 2009). Cn causes cryptococcosis, a life-threatening invasive disease with higher incidence in immunocompromised patients. The infection usually begins in the lung after inhalation of environmental propagules that can disseminate to different cells and tissues. Meningoencephalitis is the most severe condition of cryptococcosis with considerable indices of mortality.

Cn produces a list of virulence factors including the synthesis of a capsular polysaccharide (PS), a cell-wall associated laccase, and secretion of phospholipase, and urease (Rodrigues, M.L., Fonseca, F.L., et al. 2009). PS production is supposedly the most important virulence factor in *C. neoformans* (McClelland, E.E., Bernhardt, P., et al. 2006). Glucuronoxylomannan (GXM) and galactoxylomannan (GalXM) are the main components of Cn capsule. GXM is a high molecular weight PS (1.7×10^7 to 7×10^7 Daltons (McFadden, D.C., De Jesus, M., et al. 2006)) that accounts for approximately 90% of the capsular mass. It consists of an α 1-3 linked mannan with lateral β 1,2 / β 1,4 xylosyl and β 1,2- glucuronyl substitutions (Cherniak, R., Valafar, H., et al. 1998) and O-acetylation on carbon 6 of mannose residues. The remaining capsular mass is formed by GalXM, an α 1-6 linked galactan containing mannosyl, glucuronyl and xylosyl substitutions (Cherniak, R., Valafar, H., et al. 1998, Heiss, C., Klutts, J.S., et al. 2009, McFadden, D.C., De Jesus, M., et al. 2006, Zaragoza, O., Rodrigues, M.L., et al. 2009). Using an elaborated mechanism of aggregation, PS molecules are assembled at cell surface forming a complex capsular network (Frases, S., Pontes, B., et al. 2009, Nimrichter, L., Frases, S., et al. 2007) that inhibits fungal uptake by host cells (Kozel, T.R. and Gotschlich, E.C. 1982, Kozel, T.R., Pfrommer, G.S., et al. 1988, Mukherjee, S., Feldmesser, M., et al. 1996).

Both GXM and GalXM are constitutively released to the extracellular environment *in vitro* and *in vivo* through secretory vesicles (Nosanchuk, J.D., Nimrichter, L., et al. 2008, Rodrigues, M.L., Nakayasu, E.S., et al. 2008,

1
2
3 Rodrigues, M.L., Nimrichter, L., et al. 2007). In fact, patients with cryptococcosis
4 accumulate GXM in the cerebrospinal fluid (CSF) and serum, where it is
5 associated with a number of immunomodulatory properties that include
6 downregulation of proinflammatory cytokine secretion from host cells and reduction
7 of leukocyte migration into inflammatory sites (Barbosa, F.M., Fonseca, F.L., et al.
8 2007, Ellerbroek, P.M., Walenkamp, A.M., et al. 2004, Monari, C., Bevilacqua, S.,
9 et al. 2009, Rodrigues, M.L., Fonseca, F.L., et al. 2009, Yauch, L.E., Lam, J.S., et
10 al. 2006).

11
12
13
14
15
16
17
18 Macrophages (MO) are considered key cells in cryptococcosis (Bulmer, G.S.
19 and Tacker, J.R. 1975, Kozel, T.R. and Mastroianni, R.P. 1976, Mitchell, T.G. and
20 Friedman, L. 1972, Oliveira, D.L., Freire-de-Lima, C.G., et al. 2010). The outcome
21 of phagocytized Cn is critical to pathogenesis. Although MO can kill Cn (Bolanos,
22 B. and Mitchell, T.G. 1989, Oliveira, D.L., Freire-de-Lima, C.G., et al. 2010), recent
23 reports demonstrate that intracellular replication can occur resulting in yeast
24 extrusion followed or not by host cell lyses (Alvarez, M. and Casadevall, A. 2006,
25 Alvarez, M. and Casadevall, A. 2007, Tucker, S.C. and Casadevall, A. 2002). The
26 mechanism by which Cn survives and replicates within macrophages includes
27 secretion of phospholipases and large amounts of GXM (Tucker, S.C. and
28 Casadevall, A. 2002). Secreted GXM is also internalized by macrophages (Chang,
29 Z.L., Netski, D., et al. 2006) and the PS suppresses the host cell proliferative
30 response in a mechanism that includes apoptosis (Villena, S.N., Pinheiro, R.O., et
31 al. 2008). Exposure of macrophages to GXM results in upregulation of FasL
32 expression which is at least in part responsible for apoptosis induction in
33 macrophages and T cells (Monari, C., Paganelli, F., et al. 2008, Villena, S.N.,
34 Pinheiro, R.O., et al. 2008). Although GXM modulates cellular response during
35 infection, its effects in the first hours is not clear.

36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 **Results**

52
53
54
55 *GXM decreases glycolytic flux*
56
57
58
59
60

1
2
3 Incubation of RAW 264.7 cells for 24 hours in the presence of increasing
4 concentrations of GXM (0, 1, 10 and 100 $\mu\text{g/ml}$) promoted a dose-dependent
5 decrease in cell viability, as assessed through the number of cells that were not
6 permeable to trypan blue (Fig. 1A). In parallel to this effect, mitochondrial reductive
7 function, determined by MTT assay (Fig. 1B), glucose consumption (Fig 1C) and
8 lactate production (Fig. 1D) were decreased. These data indicate that GXM alters
9 cell metabolism, decreasing the glycolytic flux. Aiming at investigating the
10 mechanism by which GXM inhibited the glycolytic flux, we evaluated the activity of
11 the major regulatory enzyme within glycolysis, 6-phosphofructo-1-kinase
12 (phosphofructokinase, PFK) (Zancan, P., Almeida, F.V., et al. 2007, Zancan, P.,
13 Marinho-Carvalho, M.M., et al. 2008), under the same conditions used for the
14 experiments described in Fig. 1. Incubation of RAW 264.7 for 24 hours with
15 increasing concentrations of GXM also promoted the inhibition of PFK activity in a
16 time-dependent fashion (Fig 2A). After the 1-hour incubation, a significant PFK
17 inhibition was observed after exposure to macrophages to 100 $\mu\text{g/ml}$ GXM. After
18 the 3-hour exposure, however, all the concentrations of GXM tested caused PFK
19 inhibition (Fig. 2B). These data are indicative that inhibition of the enzyme is not
20 dependent on translational events and can occur due to a direct effect of GXM over
21 PFK.
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38

GXM co-localizes with PFK within macrophages

39
40 As documented previously, GXM binds to and is taken up by macrophages
41 (Chang, Z.L., Netski, D., et al. 2006, Chiapello, L.S., Baronetti, J.L., et al. 2008),
42 accumulating in the cytosol. Considering that GXM inhibits PFK-1 activity by a
43 mechanism that precedes translational events we investigated whether the
44 polysaccharide (uniformizar PS ou polysaccharide) and PFK-1 co-localize in GXM-
45 treated host cells. As described previously (Chang, Z.L., Netski, D., et al. 2006,
46 Chiapello, L.S., Baronetti, J.L., et al. 2008), GXM accumulated in the cytosol (Fig.
47 3). Co-localization of GXM and PFK in macrophages was observed after 6 and 24
48 hours (Fig. 3), supporting the supposition that both molecules may interact in GXM-
49 treated macrophages.
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

PFK activity is directly influenced by GXM

To investigate whether GXM could exert a direct action over PFK, we evaluated the effects of the PS on the activity of the purified enzyme. Incubation of PFK in the presence of increasing concentrations of GXM resulted in a dose-dependent inhibition of the enzyme (Fig. 4A). This inhibition was not dependent on substrate (F6P and ATP) concentration (Fig. 4B and 4C, respectively) and resulted in the decrease of the affinity of the enzyme for both substrates, as indicated by the increased affinity constants ($K_{0.5}$) for F6P and for ATP at its catalytic site (Table I). On the other hand, upon incubation with 100 $\mu\text{g/ml}$ GXM, PFK exhibited an increased affinity for ATP at the inhibitory allosteric site, as supported by the decreased inhibition constant ($I_{0.5}$) for ATP (Table I). Upon incubation with GXM, PFK also presents a lower maximal velocity (V_{max}). These modifications on the kinetic parameters for the substrates interaction with PFK are compatible with those described when PFK oligomers dissociates from full active tetramers into weakly active dimers (Zancan, P., Almeida, F.V., et al. 2007, Zancan, P., Marinho-Carvalho, M.M., et al. 2008).

The center of mass of the intrinsic fluorescence emission spectrum of PFK is a powerful tool to evaluate the population of the enzyme tetramers and dimer (Da Silva, D., Zancan, P., et al. 2010, Leite, T.C., Da Silva, D., et al. 2007, Marinho-Carvalho, M.M., Costa-Mattos, P.V., et al. 2009, Marinho-Carvalho, M.M., Zancan, P., et al. 2006, Real-Hohn, A., Zancan, P., et al. 2010, Zancan, P., Almeida, F.V., et al. 2007, Zancan, P., Marinho-Carvalho, M.M., et al. 2008, Zancan, P., Rosas, A.O., et al. 2007). Due to exposure to a polar environment, intrinsic fluorescence emission by dimers presents lower energy than by tetramers, and thus the center of mass of the intrinsic fluorescence spectrum shifts towards the red region of the spectrum when tetramers dissociates into dimers. Therefore, we evaluated the center of mass of PFK intrinsic fluorescence emission spectra in the presence of increasing concentrations of GXM. The polysaccharide promoted a dose-dependent shift in the center of mass (Fig. 5, main panel), promoting no

1
2
3 significant alterations on the emission spectra (Fig. 5, inset), which is compatible
4 with the dissociation of PFK tetramers into dimers.
5
6
7

8
9 *GXM inhibition is influenced by regulatory physiological ligands of PFK*

10 Alterations on the oligomeric equilibrium between PFK tetramers and dimers are a
11 common mechanism of regulation of the enzyme, which is affected by many
12 physiologic ligands, such as ATP bound at the inhibitory allosteric site and its
13 counteracting ligand, fructose-2,6-bisphosphate (F2,6BP) (Zancan, P., Almeida,
14 F.V., et al. 2007, Zancan, P., Marinho-Carvalho, M.M., et al. 2008), calmodulin
15 (Marinho-Carvalho, M.M., Costa-Mattos, P.V., et al. 2009, Marinho-Carvalho, M.M.,
16 Zancan, P., et al. 2006) and lactate (Leite, T.C., Da Silva, D., et al. 2007), among
17 others. Therefore, we evaluated the effects of GXM on PFK activity in the presence
18 of several modulators (activators and inhibitors) that promote their effects through
19 altering the equilibrium between PFK tetramers and dimers. These experiments
20 were performed at two major conditions: when the catalytic site of the enzyme for
21 ATP was saturated (1 mM ATP; Fig. 6A), and when the inhibitory allosteric site for
22 ATP was saturated (5 mM ATP; Fig 6B). GXM alone inhibited the enzyme in both
23 conditions as already shown in Fig. 4C. This inhibition was attenuated by PFK
24 activators F2,6BP and ADP and completely abrogated upon phosphorylation of the
25 enzyme by PKA or binding of CaM (Fig. 6). Moreover, GXM potentiated the
26 inhibitory effects of citrate and lactate under both conditions tested (Fig. 6).
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Discussion

During infection, Cn secretes large amounts of GXM, which strongly interferes with host immune response (reviewed by (Ellerbroek, P.M., Walenkamp, A.M., et al. 2004, Rodrigues, M.L., Fonseca, F.L., et al. 2009, Vecchiarelli, A. 2000, Vecchiarelli, A. and Monari, C.). In this context, MOs are believed to be one type of the many recipient cells for secreted (Yauch, L.E., Mansour, M.K., et al. 2005). The receptors and kinetics of GXM internalization by macrophages have been studied, as well as its effects on macrophage response, such as modulation of cytokines and nitric oxide production (Chiapello, L.S., Baronetti, J.L., et al. 2008, Monari, C., Bevilacqua, S., et al. 2009, Monari, C., Bistoni, F., et al. 2005). GXM uptake culminates in apoptosis (Chiapello, L.S., Baronetti, J.L., et al. 2008, Villena, S.N., Pinheiro, R.O., et al. 2008). However, metabolic changes that occur right after GXM internalization was never investigated. In this study we demonstrate the ability of GXM to regulate the glycolytic enzyme 6-phosphofructo-1-kinase (PFK). This could be a new pathogenic mechanism by which *C. neoformans* could interfere with the physiology of host cells. LPS was demonstrated to regulate PFK activity (Ceppi, E.D., Knowles, R.G., et al. 1992) but, to our knowledge, this is the first report showing that a microbial polysaccharide inhibits PFK activity in host cells. We revealed the mechanism by which GXM interferes with PFK under initial times of incubation. Our results could help to explain the elements that trigger proliferative inhibition and apoptosis caused by GXM uptake.

After binding to host receptors, the PS is internalized within few hours (Chang, Z.L., Netski, D., et al. 2006). Under the conditions used in our experiments a minimum of 4-5 hours was required to visualize intracellular GXM. We observed a punctuate distribution of GXM after six hours incubation with macrophages, as similarly described by Chang et al (Chang, Z.L., Netski, D., et al. 2006). GXM co-localized with PFK within macrophages, suggesting that the PS associates to the enzyme. This observation and the fact that GXM decreases glucose consumption led us to investigate whether GXM interferes with PFK activity.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

PFK is the key enzyme regulating glycolysis; therefore, it undergoes a complex regulation by several metabolites and cellular signals (Marinho-Carvalho, M.M., Costa-Mattos, P.V., et al. 2009). Among the molecular mechanisms regulating PFK activity is the stabilization of PFK in distinct oligomeric conformations, where the transition between fully active tetramers and weakly active dimers appears to a key cellular event (Hesterberg, L.K. and Lee, J.C. 1980, Hesterberg, L.K., Lee, J.C., et al. 1981). This transition is involved in the regulation of PFK activity by several modulators, such as its substrates (Zancan, P., Almeida, F.V., et al. 2007, Zancan, P., Marinho-Carvalho, M.M., et al. 2008), allosteric ligands (Leite, T.C., Da Silva, D., et al. 2007), hormones (Alves, G.G. and Sola-Penna, M. 2003, Coelho, W.S., Costa, K.C., et al. 2007, Zancan, P. and Sola-Penna, M. 2005), other intracellular proteins (Cai, G.Z., Callaci, T.P., et al. 1997, Luther, M.A., Cai, G.Z., et al. 1986, Luther, M.A., Gilbert, H.F., et al. 1983, Luther, M.A. and Lee, J.C. 1986, Marinho-Carvalho, M.M., Costa-Mattos, P.V., et al. 2009, Marinho-Carvalho, M.M., Zancan, P., et al. 2006, Rais, B., Ortega, F., et al. 2000) and drugs (Orosz, F., Christova, T.Y., et al. 1988, Penso, J. and Beitner, R. 1998, Spitz, G.A., Furtado, C.M., et al. 2009, Vertessy, B.G., Kovacs, J., et al. 1997, Zancan, P., Rosas, A.O., et al. 2007). Here, GXM appears as another modulator of this equilibrium shifting the enzyme towards the dimeric conformation and thus inhibiting its catalytic activity. Taking that large amounts of this PS is uptake by macrophages and other host cells we believe this effect could also be observed in other cell types. This could be considered a new and important pathogenic mechanism, considering that the glycolytic pathway is highly dynamic and that major regulators of PFK are known to interfere with each other. In fact, it is clear that the inhibitory effects of GXM can be attenuated, abrogated or potentiated, depending on which signal is ruling the enzyme activity. For instance, if the intracellular concentration of F2,6BP rises, e.g. due to insulin signaling (Silva, A.P., Alves, G.G., et al. 2004), GXM inhibitory effects would be supposedly less pronounced since F2,6BP favors the formation of tetramers counteracting the formation of dimers favored by GXM. On the other hand, increased intracellular lactate content, which decreases PFK activity and cellular metabolism (Leite, T.C.,

1
2
3 Da Silva, D., et al. 2007, Sola-Penna, M. 2008), would potentiate the inhibitory
4 action of GXM over PFK possibly turning the cell more susceptible to the effects of
5 the polysaccharide. Moreover, cellular stimuli triggering the rise of intracellular
6 calcium concentrations, would favor the binding of CaM to PFK, which abrogates
7 the inhibitory effects of GXM on PFK. CaM is described to lock PFK in a fully active
8 dimeric conformation (Marinho-Carvalho, M.M., Costa-Mattos, P.V., et al. 2009,
9 Marinho-Carvalho, M.M., Zancan, P., et al. 2006), abolishing the effects of ligands
10 that favors the dissociation of tetramers. GXM is a polymer with physical properties
11 enduring a network negatively charged due to multiple residues of glucuronic acid
12 (ref). The network of GXM at Cn surface is in part associated through divalent
13 bridges of divalent cations, such as Ca^{++} and Mg^{++} (Nimrichter, L., Frases, S., et al.
14 2007). It is reasonable to suppose that free GXM would be able to scavenger mono
15 and divalent cations in the intracellular milieu. Decreasing Ca^{++} availability would
16 be an additional effect caused by GXM uptake by host cells. On the other hand,
17 GXM is a very hydrophilic macro polysaccharide, which gives it the potential to
18 form numerous hydrogen bonds in any aqueous solution. Protein-carbohydrate
19 interactions mediated by hydrogen bonds are known to result in loss of biological
20 stability (Allison, S.D., Chang, B., et al. 1999), which could also be related to the
21 tetrameric dissociation of PFK in the presence of GXM. Therefore, it is likely that
22 the mechanism through which PFK is inhibited by GXM involves the dissociation of
23 the enzyme tetramers into dimers.

24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
Some drugs are able to decrease the glycolytic flux through inhibition of PFK
activity favoring the dissociation of the tetrameric conformation of the enzyme into
dimers. Clotrimazole, an antifungal imidazol derivative, directly interacts with PFK
dissociating the fully-active tetramers into dimers, and thus inhibiting the enzyme
(Zancan, P., Rosas, A.O., et al. 2007). This is the putative mechanism responsible
for triggering apoptosis in the human breast cancer cell line MCF-7 upon
incubation with clotrimazole (Meira, D.D., Marinho-Carvalho, M.M., et al. 2005).
Furthermore, acetylsalicylic acid decreases the viability of cancer cells decreasing
glucose consumption and lactate production through inhibition of PFK due to the
dissociation of the enzyme tetramers (Spitz, G.A., Furtado, C.M., et al. 2009). Our

1
2
3 results show that GXM affects MO metabolism in a similar fashion, decreasing cell
4 viability, glucose consumption and lactate production. It is also described that the
5 polysaccharide triggers apoptosis in these cells (Chiapello, L.S., Baronetti, J.L., et
6 al. 2008, Villena, S.N., Pinheiro, R.O., et al. 2008). All these events can be directly
7 correlated to the inhibition of PFK reported here. Moreover, our results support
8 evidences that GXM promotes these effects inducing the dissociation of PFK fully
9 active tetramers into weakly active dimers.
10
11
12
13
14
15
16

17 **Materials and methods**

20 *Materials*

21
22 ATP, fructose-6-phosphate (F6P), fructose-2,6-bisphosphate, ADP, 3'-5'-
23 adenosine monophosphate cyclic nucleotide (cAMP), cAMP-dependent protein
24 kinase (PKA), lactate, citrate and calmodulin (CaM) were purchased from Sigma
25 Chemical (St. Louis, MO, USA). Purified PFK was obtained from rabbit skeletal
26 muscle according to (Real-Hohn, A., Zancan, P., et al. 2010). ^{32}P i was purchased
27 from IPEN, Brazil. $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ was prepared according to (Maia, J.C.C., Gomes,
28 S.L., et al. 1983). The RAW 264.7 cell line was obtained from (American Type
29 Culture Collection – ATCC) and maintained in DMEM (Dulbecco's modified Eagle's
30 medium; Invitrogen, USA) supplemented with 10% (v/v) FBS (fetal bovine serum;
31 Invitrogen, USA). Protein content measurements were performed according to
32 (Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., et al. 1951). All other chemicals were of the
33 highest purity available. LPS-free water was used to prepare culture media and
34 reagents.
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46

47 *Fungi and culture conditions*

48
49 *C. neoformans* strain H99 was cultivated under shaking for 48h, at 25°C, in a
50 chemically defined medium containing dextrose (15 mM), MgSO_4 (10 mM),
51 KH_2PO_4 (29.4 mM), glycine (13 mM), and thiamine-HCl (3 μM). For GXM isolation,
52 fungal cells were cultivated for five days at 30°C under shaking.
53
54
55
56
57
58
59
60

Macrophages

Murine macrophage cell line RAW 264.7 (American Type Culture Collection – ATCC) was cultivated in complete DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 2 mM L-glutamine, 1 mM sodium pyruvate, 10 mg ml⁻¹ gentamicin, MEM non-essential amino acids (Gibco- Invitrogen 11360), 10 mM HEPES and 50 mM 2- β-mercaptoethanol. Cells were maintained at 37 °C in a 7.5% CO₂ atmosphere.

Polysaccharide isolation by filtration of culture supernatants

C. neoformans cells and debris were removed from culture supernatants by centrifugation and the resulting supernatant was concentrated approximately 20-fold using an Amicon (Millipore, Danvers, MA) ultrafiltration cell (cutoff = 100 kDa, total capacity of 200 ml) with stirring and Biomax polyethersulfone ultrafiltration discs (76 mm Millipore, Danvers, MA). After formation of a viscous film over the filtering disc, the fluid phase was discarded and the remaining jellified material was recovered with a cell scraper. The final PS was quantified by antibody-based assays, using a protocol established previously (Casadevall, A., Mukherjee, J., et al. 1992) and modified by Fonseca and colleagues (Fonseca, F.L., Frases, S., et al. 2009).

Immunofluorescence microscopy

Macrophage were plated onto wells of a 24-well plate covered with glass coverslips (5x10⁵ cells per well). GXM (10 µg/ml, final concentration) was added to the macrophage monolayers and incubated for 6 or 24 hours. The cells were then washed with PBS, fixed with 4% paraformaldehyde in PBS for 30 minutes and then blocked with PBS containing 5% BSA for 1 h at room temperature. After washing, cells were incubated with anti-GXM monoclonal antibodies (1 µg/ml) (18B7, gently provided by Dr. Arturo Casadevall, Albert Einstein College of Medicine) followed by anti-PFK polyclonal antibodies produced as previously described (Meira, D.D., Marinho-Carvalho, M.M., et al. 2005). Cells were washed again and then incubated with secondary antibodies for 1 h at room temperature. Texas Red-labeled anti-rat

1
2
3 IgG (Millipore, São Paulo, Brazil) was used (at 1:100 dilution) to recognize anti-
4 GXM antibodies and Fluorescein isothiocyanate (FITC) labeled goat anti-mouse
5 IgG (Sigma) was used (at 1:100 dilution) to detect anti-PFK. Controls consisted of
6 similar systems that lacked incubation with primary antibodies. Glass coverslips
7 were placed in mounting medium (50% glycerol and 50 mM *N*-propyl gallate in
8 PBS) over glass slides and the systems analyzed using an Axioplan 2 (Zeiss,
9 Germany) fluorescence microscope. Images were acquired using a Color View SX
10 digital camera and processed with the software system analySIS (Soft Image
11 System). Images were finally processed using the Photoshop software.
12
13
14
15
16
17
18
19

20 *MTT assay, glucose consumption and lactate production*

21 MTT assay, evaluation of glucose consumption and lactate production were
22 performed as described previously (Spitz, G.A., Furtado, C.M., et al. 2009). Briefly,
23 RAW 264.7 cells were grown in DMEM medium supplemented with 10 % FBS until
24 confluence was achieved. The medium was removed and fresh medium containing
25 the desired concentrations of GXM was added and cells were returned to the
26 incubator for 24 hours. After this incubation, the medium was removed and used to
27 evaluate the glucose consumption and lactate production, while the remaining cells
28 were used for cell viability evaluation through MTT assay. Glucose consumption
29 was performed assessing the glucose content that remained in the culture media
30 using a coupled enzyme system containing glucose oxidase/catalase (Glucox 500,
31 Doles Ltda, GO, Brazil). Lactate production was evaluated assessing the lactate
32 content in the culture media incubating the media in the presence of lactate
33 dehydrogenase and NAD⁺, and measuring the formation of NADH
34 spectrophotometrically at 340 nm. As for MTT assay, cells were washed twice with
35 PBS and 20 µl of 5 mg/ml MTT reagent (3,4,5-dimethylazol-2,5-diphenyltetrazolium
36 bromide, Sigma-Aldrich Co. MA, USA) was added. After 3 hours at the incubator,
37 the reagent was removed and the formazan crystals formed were dissolved in 200
38 µl DMSO. Afterwards, the formazan content was evaluated in a microplate reader
39 set at 560 nm and subtracting the background at 670 nm.
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Radiometric assay for PFK activity

PFK activity was measured by the method described in (Sola-Penna, M., dos Santos, A.C., et al. 2002) with the modifications introduced in (Zancan, P. and Sola-Penna, M. 2005, Zancan, P. and Sola-Penna, M. 2005), using a reaction medium containing 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 5 mM MgCl₂, 5 mM (NH₄)₂SO₄, 1 mM [γ -³²P]ATP (4 μ Ci/nmol), 1 mM fructose-6-phosphate (F6P) and 1 μ g/ml purified PFK. Modifications to pH and the concentrations of ATP, F6P and PFK are specified for each experiment in the figure legends. The reaction was stopped by addition of a suspension of activated charcoal in 0.1 M HCl and 0.5 M mannitol. After centrifugation, the supernatant, which contained [1-³²P]fructose-1,6-bisphosphate, was analyzed in a liquid scintillation counter. Appropriate controls in the absence of fructose-6-phosphate were performed and subtracted from all measurements to discount ATP hydrolysis. One mU was considered as the formation of 1 nmol fructose-1,6-bisphosphate per minute.

Spectrophotometric assay for PFK activity

PFK activity was assayed as described previously (Coelho, W.S., Costa, K.C., et al. 2007) in a medium containing: 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 5 mM MgCl₂, 5 mM (NH₄)₂SO₄, the indicated concentrations of fructose 6-P and ATP, 0.5 mM NADH, 2 mU/ml aldolase, 2 mU/ml triosephosphate isomerase, 2 mU/ml α -glycerophosphate dehydrogenase and 0.5 μ g/ml of protein for purified PFK or 50 μ g/ml protein for cell lysate in a final volume of 200 μ l. Other reagents used are indicated for each experiment. Reaction was started by the addition of protein and NADH oxidation was followed by measuring the decrease in absorbance at 340 nm in a microplate reader. Blanks in the absence of the coupled enzymes were performed to control non-specific NADH oxidation.

Intrinsic fluorescence measurements

Intrinsic fluorescence measurements of PFK were performed as described previously (Marinho-Carvalho, M.M., Zancan, P., et al. 2006) using the same conditions described for the radioassay. Excitation wavelength was fixed at 280

nm, and fluorescence emission was scanned from 300 to 400 nm. The center of mass of the intrinsic fluorescence spectra (CM) was calculated using:

$$CM = \frac{\sum \lambda \times I_{\lambda}}{\sum I_{\lambda}} \quad (1),$$

where λ is the wavelength and I_{λ} is the fluorescence intensity at a given λ . Center of mass is used to evaluate the oligomeric state of PFK because the dissociated enzyme exposes its tryptophans to the aqueous milieu to a greater extent than the oligomer; thus, the fluorescence emitted by these tryptophans is of lower energy. Consequently, the center of mass of a population of tetramers is smaller than that of a population of dimers, as confirmed in many recent publications (Leite, T.C., Da Silva, D., et al. 2007, Marinho-Carvalho, M.M., Costa-Mattos, P.V., et al. 2009, Marinho-Carvalho, M.M., Zancan, P., et al. 2006, Spitz, G.A., Furtado, C.M., et al. 2009, Zancan, P., Almeida, F.V., et al. 2007, Zancan, P., Marinho-Carvalho, M.M., et al. 2008).

Statistics and calculations

Statistical analyses were performed using the software SigmaPlot 10.0 integrated with SigmaStat 3.51 (Systat, CA, USA). Student's t-test or one-tailed ANOVA were used to evaluate the significance of different numerical values. $P < 0.05$ was considered to be statistically significant.

Kinetic parameters for the effects of ATP on PFK were calculated considering the two components for PFK modulation by this metabolite. The first component is the stimulatory component for the substrate saturation curve, in which PFK exhibits an allosteric pattern that is described by the equation:

$$v = \frac{V_{\max_{\text{app}}} \times [\text{ATP}]^{n_s}}{K_{0.5}^{n_s} + [\text{ATP}]^{n_s}} \quad (2),$$

where v is the PFK activity at a given concentration of ATP ($[\text{ATP}]$), $V_{\max_{\text{app}}}$ is the apparent maximal velocity calculated, $K_{0.5}$ is the affinity constant for this component and n_s is the cooperativity index for this component. The second component is the inhibitory component that can be adjusted by the equation:

$$v = \frac{V_{\text{sat}} \times I_{0.5}^{n_i}}{I_{0.5}^{n_i} + [\text{ATP}]^{n_i}} \quad (3),$$

where v is the PFK activity at a given concentration of ATP ($[\text{ATP}]$), $I_{0.5}$ is the affinity constant for this component, n_i is the cooperativity index for this component and V_{sat} is the PFK activity when the first component is saturated. Assuming this statement, V_{sat} is a function of the first component of the curve and can be substituted by equation 2 to result in the following equation:

$$v = \frac{\frac{V_{\text{max_app}} \times [\text{ATP}]^{n_s}}{K_{0.5}^{n_s} + [\text{ATP}]^{n_s}} \times I_{0.5}^{n_i}}{I_{0.5}^{n_i} + [\text{ATP}]^{n_i}} \quad (4),$$

which was fitted to the experimental data through non-linear regression for the effects of ATP on PFK activity.

Kinetic parameters for the effects of F6P on PFK were calculated through non-linear regression using the experimental data to fit the parameters of the equation:

$$v = \frac{V_{\text{max}} \times [\text{F6P}]^n}{K_{0.5} + [\text{F6P}]^n} \quad (5),$$

where v is the PFK activity calculated for a given concentration of F6P ($[\text{F6P}]$), V_{max} is the maximal velocity calculated at saturating concentrations of F6P, $K_{0.5}$ is the affinity constant for F6P, which is equal to the concentration of F6P responsible for half-activation of the PFK by F6P, and n is the cooperativity index for this phenomenon.

Acknowledgments

We thank Prof. Luis Mauricio T.R. Lima for discussions concerning this work.

Funding

LN, MLR, MSP and PZ are supported by grants from the Brazilian agencies CNPq and FAPERJ. MMC and JG are supported by CNPq.

Abbreviations

BSA, bovine serum albumin; CaM, calmodulin; cAMP, 3'-5'-cyclic adenosine monophosphate; Cn, *Cryptococcus neoformans*; DMEM, Dubelco's modified Eagle medium; F6P, fructose-6-phosphate; F2,6BP, fructose-2,6-bisphosphate; GalXM, galactoxylomannan; GXM, glucoronoxylomannan; LPS, lipopolysaccharide; MO, macrophages; MTT, (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; PBS, phosphate buffer saline; PKA, cAMP-dependent protein kinase, EC 2.7.11.11; PFK, 6-phosphofructo-1-kinase phosphofructokinase, EC 2.7.1.11; PS, polysaccharide.

Bibliography

- Allison, S.D., Chang, B., et al. (1999) Hydrogen bonding between sugar and protein is responsible for inhibition of dehydration-induced protein unfolding. *Arch Biochem Biophys*, 365, 289-298.
- Alvarez, M. and Casadevall, A. (2006) Phagosome extrusion and host-cell survival after *Cryptococcus neoformans* phagocytosis by macrophages. *Curr Biol*, 16, 2161-2165.
- Alvarez, M. and Casadevall, A. (2007) Cell-to-cell spread and massive vacuole formation after *Cryptococcus neoformans* infection of murine macrophages. *BMC Immunol*, 8, 16.
- Alves, G.G. and Sola-Penna, M. (2003) Epinephrine modulates cellular distribution of muscle phosphofructokinase. *Mol.Genet.Metab*, 78, 302-306.
- Barbosa, F.M., Fonseca, F.L., et al. (2007) Binding of glucuronoxylomannan to the CD14 receptor in human A549 alveolar cells induces interleukin-8 production. *Clin Vaccine Immunol*, 14, 94-98.
- Bolanos, B. and Mitchell, T.G. (1989) Phagocytosis and killing of *Cryptococcus neoformans* by rat alveolar macrophages in the absence of serum. *J Leukoc Biol*, 46, 521-528.
- Bulmer, G.S. and Tacker, J.R. (1975) Phagocytosis of *Cryptococcus neoformans* by alveolar macrophages. *Infect Immun*, 11, 73-79.
- Cai, G.Z., Callaci, T.P., et al. (1997) Regulation of rabbit muscle phosphofructokinase by phosphorylation. *Biophys.Chem.*, 64, 199-209.
- Casadevall, A., Mukherjee, J., et al. (1992) Monoclonal antibody based ELISAs for cryptococcal polysaccharide. *J Immunol Methods*, 154, 27-35.
- Ceppi, E.D., Knowles, R.G., et al. (1992) Effect of treatment in vivo of rats with bacterial endotoxin on fructose 2,6-bisphosphate metabolism and L-pyruvate kinase activity and flux in isolated liver cells. *Biochem.J*, 284 (Pt 3), 761-766.
- Chang, Z.L., Netski, D., et al. (2006) Binding and internalization of glucuronoxylomannan, the major capsular polysaccharide of *Cryptococcus neoformans*, by murine peritoneal macrophages. *Infect Immun*, 74, 144-151.

- 1
2
3 Cherniak, R., Valafar, H., et al. (1998) *Cryptococcus neoformans* Chemotyping by
4 Quantitative Analysis of ¹H Nuclear Magnetic Resonance Spectra of
5 Glucuronoxylomannans with a Computer-Simulated Artificial Neural
6 Network. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 5, 146-159.
7
8
9
10 Chiapello, L.S., Baronetti, J.L., et al. (2008) *Cryptococcus neoformans*
11 glucuronoxylomannan induces macrophage apoptosis mediated by nitric
12 oxide in a caspase-independent pathway. *Int. Immunol.*, 20, 1527-1541.
13
14 Coelho, W.S., Costa, K.C., et al. (2007) Serotonin stimulates mouse skeletal
15 muscle 6-phosphofructo-1-kinase through tyrosine-phosphorylation of the
16 enzyme altering its intracellular localization. *Mol.Genet.Metab*, 92, 364-370.
17
18
19
20
21 Da Silva, D., Zancan, P., et al. (2010) Metformin reverses hexokinase and 6-
22 phosphofructo-1-kinase inhibition in skeletal muscle, liver and adipose
23 tissues from streptozotocin-induced diabetic mouse. *Arch Biochem Biophys*,
24 DOI 10.1016/j.abb.2010.01.013.
25
26
27
28 Ellerbroek, P.M., Walenkamp, A.M., et al. (2004) Effects of the capsular
29 polysaccharides of *Cryptococcus neoformans* on phagocyte migration and
30 inflammatory mediators. *Curr Med Chem*, 11, 253-266.
31
32
33 Fonseca, F.L., Frases, S., et al. (2009) Structural and functional properties of the
34 *Trichosporon asahii* glucuronoxylomannan. *Fungal Genet Biol*, 46, 496-505.
35
36
37 Frases, S., Pontes, B., et al. (2009) Capsule of *Cryptococcus neoformans* grows
38 by enlargement of polysaccharide molecules. *Proceedings of the National*
39 *Academy of Sciences*, 106, 1228-1233.
40
41
42 Heiss, C., Klutts, J.S., et al. (2009) The structure of *Cryptococcus neoformans*
43 galactoxylomannan contains beta-D-glucuronic acid. *Carbohydr Res*, 344,
44 915-920.
45
46
47
48 Hesterberg, L.K. and Lee, J.C. (1980) Sedimentation study of a catalytically active
49 form of rabbit muscle phosphofructokinase at pH 8.55. *Biochemistry*, 19,
50 2030-2039.
51
52
53 Hesterberg, L.K., Lee, J.C., et al. (1981) Structural properties of an active form of
54 rabbit muscle phosphofructokinase. *J.Biol.Chem.*, 256, 9724-9730.
55
56
57
58
59
60

- 1
2
3 Kozel, T.R. and Gotschlich, E.C. (1982) The capsule of *Cryptococcus neoformans*
4 passively inhibits phagocytosis of the yeast by macrophages. *J Immunol*,
5 129, 1675-1680.
6
7
8 Kozel, T.R. and Mastroianni, R.P. (1976) Inhibition of phagocytosis by cryptococcal
9 polysaccharide: dissociation of the attachment and ingestion phases of
10 phagocytosis. *Infect Immun*, 14, 62-67.
11
12 Kozel, T.R., Pfrommer, G.S., et al. (1988) Role of the capsule in phagocytosis of
13 *Cryptococcus neoformans*. *Rev Infect Dis*, 10 Suppl 2, S436-439.
14
15 Leite, T.C., Da Silva, D., et al. (2007) Lactate favours the dissociation of skeletal
16 muscle 6-phosphofructo-1-kinase tetramers down-regulating the enzyme
17 and muscle glycolysis. *Biochem.J.*, 408, 123-130.
18
19 Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., et al. (1951) Protein measurement with the Folin
20 phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265-275.
21
22 Luther, M.A., Cai, G.Z., et al. (1986) Thermodynamics of dimer and tetramer
23 formations in rabbit muscle phosphofructokinase. *Biochemistry*, 25, 7931-
24 7937.
25
26 Luther, M.A., Gilbert, H.F., et al. (1983) Self-association of rabbit muscle
27 phosphofructokinase: role of subunit interaction in regulation of enzymatic
28 activity. *Biochemistry*, 22, 5494-5500.
29
30 Luther, M.A. and Lee, J.C. (1986) The role of phosphorylation in the interaction of
31 rabbit muscle phosphofructokinase with F-actin. *J.Biol.Chem.*, 261, 1753-
32 1759.
33
34 Maia, J.C.C., Gomes, S.L., et al. (1983) Preparation of [γ - 32 P] and [α - 32 P]-
35 nucleoside triphosphate, with high specific activity. *Genes and Antigens of*
36 *Parasites: a Laboratory Manual*. FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil, pp. 146-
37 157.
38
39 Marinho-Carvalho, M.M., Costa-Mattos, P.V., et al. (2009) Calmodulin upregulates
40 skeletal muscle 6-phosphofructo-1-kinase reversing the inhibitory effects of
41 allosteric modulators. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins &*
42 *Proteomics*, 1794, 1175-1180.
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
- Marinho-Carvalho, M.M., Zancan, P., et al. (2006) Modulation of 6-phosphofructo-1-kinase oligomeric equilibrium by calmodulin: formation of active dimers. *Mol.Genet.Metab*, 87, 253-261.
- McClelland, E.E., Bernhardt, P., et al. (2006) Estimating the relative contributions of virulence factors for pathogenic microbes. *Infect Immun*, 74, 1500-1504.
- McFadden, D.C., De Jesus, M., et al. (2006) The Physical Properties of the Capsular Polysaccharides from *Cryptococcus neoformans* Suggest Features for Capsule Construction. *Journal of Biological Chemistry*, 281, 1868-1875.
- Meira, D.D., Marinho-Carvalho, M.M., et al. (2005) Clotrimazole decreases human breast cancer cells viability through alterations in cytoskeleton-associated glycolytic enzymes. *Mol.Genet.Metab*, 84, 354-362.
- Mitchell, T.G. and Friedman, L. (1972) In vitro phagocytosis and intracellular fate of variously encapsulated strains of *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun*, 5, 491-498.
- Monari, C., Bevilacqua, S., et al. (2009) A microbial polysaccharide reduces the severity of rheumatoid arthritis by influencing Th17 differentiation and proinflammatory cytokines production. *J Immunol*, 183, 191-200.
- Monari, C., Bistoni, F., et al. (2005) Glucuronoxylomannan, a microbial compound, regulates expression of costimulatory molecules and production of cytokines in macrophages. *J Infect Dis*, 191, 127-137.
- Monari, C., Paganelli, F., et al. (2008) Capsular polysaccharide induction of apoptosis by intrinsic and extrinsic mechanisms. *Cell Microbiol*, 10, 2129-2137.
- Mukherjee, S., Feldmesser, M., et al. (1996) J774 murine macrophage-like cell interactions with *Cryptococcus neoformans* in the presence and absence of opsonins. *J Infect Dis*, 173, 1222-1231.
- Nimrichter, L., Frases, S., et al. (2007) Self-aggregation of *Cryptococcus neoformans* capsular glucuronoxylomannan is dependent on divalent cations. *Eukaryot Cell*, 6, 1400-1410.

- 1
2
3 Nosanchuk, J.D., Nimrichter, L., et al. (2008) A role for vesicular transport of
4 macromolecules across cell walls in fungal pathogenesis. *Commun Integr*
5 *Biol*, 1, 37-39.
6
7
8 Oliveira, D.L., Freire-de-Lima, C.G., et al. (2010) Extracellular vesicles from
9 *Cryptococcus neoformans* modulate macrophage functions. *Infect Immun*,
10 DOI 10.1128/IAI.01171-09.
11
12
13 Orosz, F., Christova, T.Y., et al. (1988) Functional in vitro test of calmodulin
14 antagonism: effect of drugs on interaction between calmodulin and glycolytic
15 enzymes. *Mol.Pharmacol.*, 33, 678-682.
16
17
18 Penso, J. and Beitner, R. (1998) Clotrimazole and bifonazole detach hexokinase
19 from mitochondria of melanoma cells. *Eur.J.Pharmacol.*, 342, 113-117.
20
21
22 Rais, B., Ortega, F., et al. (2000) Quantitative characterization of homo- and
23 heteroassociations of muscle phosphofructokinase with aldolase.
24 *Biochim.Biophys.Acta*, 1479, 303-314.
25
26
27 Real-Hohn, A., Zancan, P., et al. (2010) Filamentous actin and its associated
28 binding proteins are the stimulatory site for 6-phosphofructo-1-kinase
29 association within the membrane of human erythrocytes. *Biochimie*, DOI
30 10.1016/j.biochi.2010.01.023.
31
32
33 Rodrigues, M.L., Fonseca, F.L., et al. (2009) The still obscure attributes of
34 cryptococcal glucuronoxylomannan. *Med Mycol*, 1-7.
35
36
37 Rodrigues, M.L., Nakayasu, E.S., et al. (2008) Extracellular vesicles produced by
38 *Cryptococcus neoformans* contain protein components associated with
39 virulence. *Eukaryot Cell*, 7, 58-67.
40
41
42 Rodrigues, M.L., Nimrichter, L., et al. (2007) Vesicular polysaccharide export in
43 *Cryptococcus neoformans* is a eukaryotic solution to the problem of fungal
44 trans-cell wall transport. *Eukaryot Cell*, 6, 48-59.
45
46
47 Silva, A.P., Alves, G.G., et al. (2004) Effects of insulin and actin on
48 phosphofructokinase activity and cellular distribution in skeletal muscle.
49 *An.Acad.Bras.Cienc.*, 76, 541-548.
50
51
52 Sola-Penna, M. (2008) Metabolic regulation by lactate. *IUBMB.Life*, 60, 605-608.
53
54
55
56
57
58
59
60

- 1
2
3 Sola-Penna, M., dos Santos, A.C., et al. (2002) A radioassay for
4 phosphofructokinase-1 activity in cell extracts and purified enzyme.
5 J.Biochem.Biophys.Methods, 50, 129-140.
6
7
8
9 Spitz, G.A., Furtado, C.M., et al. (2009) Acetylsalicylic acid and salicylic acid
10 decrease tumor cell viability and glucose metabolism modulating 6-
11 phosphofructo-1-kinase structure and activity. Biochemical Pharmacology,
12 77, 46-53.
13
14
15
16 Tucker, S.C. and Casadevall, A. (2002) Replication of *Cryptococcus neoformans* in
17 macrophages is accompanied by phagosomal permeabilization and
18 accumulation of vesicles containing polysaccharide in the cytoplasm. Proc
19 Natl Acad Sci U S A, 99, 3165-3170.
20
21
22
23 Vecchiarelli, A. (2000) Immunoregulation by capsular components of *Cryptococcus*
24 *neoformans*. Med Mycol, 38, 407-417.
25
26
27 Vecchiarelli, A. and Monari, C. Microbial polysaccharide: new insights for treating
28 autoimmune diseases. Front Biosci (Schol Ed), 2, 256-267.
29
30
31 Vertessy, B.G., Kovacs, J., et al. (1997) Characterization of microtubule-
32 phosphofructokinase complex: specific effects of MgATP and vinblastine.
33 Biochemistry, 36, 2051-2062.
34
35
36 Villena, S.N., Pinheiro, R.O., et al. (2008) Capsular polysaccharides
37 galactoxylomannan and glucuronoxylomannan from *Cryptococcus*
38 *neoformans* induce macrophage apoptosis mediated by Fas ligand.
39 Cellular Microbiology, 10, 1274-1285.
40
41
42
43 Yauch, L.E., Lam, J.S., et al. (2006) Direct inhibition of T-cell responses by the
44 *Cryptococcus* capsular polysaccharide glucuronoxylomannan. PLoS
45 Pathog, 2, e120.
46
47
48 Yauch, L.E., Mansour, M.K., et al. (2005) Receptor-mediated clearance of
49 *Cryptococcus neoformans* capsular polysaccharide in vivo. Infect Immun,
50 73, 8429-8432.
51
52
53 Zancan, P., Almeida, F.V., et al. (2007) Fructose-2,6-bisphosphate counteracts
54 guanidinium chloride-, thermal-, and ATP-induced dissociation of skeletal
55 muscle key glycolytic enzyme 6-phosphofructo-1-kinase: A structural
56
57
58
59
60

1
2
3 mechanism for PFK allosteric regulation. Arch.Biochem.Biophys., 467, 275-
4 282.
5

6
7 Zancan, P., Marinho-Carvalho, M.M., et al. (2008) ATP and fructose-2,6-
8 bisphosphate regulate skeletal muscle 6-phosphofructo-1-kinase by altering
9 its quaternary structure. IUBMB.Life, 60, 526-533.
10

11 Zancan, P., Rosas, A.O., et al. (2007) Clotrimazole inhibits and modulates
12 heterologous association of the key glycolytic enzyme 6-phosphofructo-1-
13 kinase. Biochem.Pharmacol., 73, 1520-1527.
14

15 Zancan, P. and Sola-Penna, M. (2005) Calcium influx: a possible role for insulin
16 modulation of intracellular distribution and activity of 6-phosphofructo-1-
17 kinase in human erythrocytes. Mol.Genet.Metab, 86, 392-400.
18

19 Zancan, P. and Sola-Penna, M. (2005) Regulation of human erythrocyte
20 metabolism by insulin: cellular distribution of 6-phosphofructo-1-kinase and
21 its implication for red blood cell function. Mol.Genet.Metab, 86, 401-411.
22

23 Zaragoza, O., Rodrigues, M.L., et al. (2009) The capsule of the fungal pathogen
24 Cryptococcus neoformans. Adv Appl Microbiol, 68, 133-216.
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Legends to Figures

Fig. 1. Effects of GXM on the viability and metabolism of RAW 264.7 cells. Cells were cultured as described under Materials and Methods in 96-well plates until confluence of cells was reached (~48 h), when the culture medium was replaced by fresh medium containing the concentrations of GXM indicated on the abscissa. After 24 hours incubation, the medium was removed and used for determine glucose consumption and lactate production rates. The remaining cells were used to determine the cell number and to perform MTT assay. All procedures were performed as described under Material and Methods. Panel A: relative number of cells per well calculated dividing the number of cells found after incubation for 24 hours in the presence of the indicated concentration of GXM by the number of cells remaining after the same incubation in the absence of GXM (8.3×10^4 cells/well). Panel B: MTT assay was performed as indicated under Materials and Methods and represented as the relative values dividing the arbitrary units obtained in the presence of the indicated concentration of GXM by values obtained in the absence of GXM. Panel C: relative glucose consumption rate. The average glucose consumption rate found in the absence of GXM were 21 ± 3 pmol $\times 10^{-4}$ cells \times h⁻¹. Panel D: relative lactate production rate. The average lactate production rate found in the absence of GXM were 34 ± 4 pmol $\times 10^{-4}$ cells \times h⁻¹. Bars are mean \pm standard error of 4 independent experiments performed in octuplicate. * P < 0.05 comparing to control in the absence of GXM (Student's t-test).

Fig. 2. Effects of GXM on the PFK activity of RAW 264.7 cells. Cells were cultured as described under Materials and Methods in 96-well plates until confluence of cells was reached (~48 h), when the culture medium was replaced by fresh medium containing the indicated concentrations of GXM. After 24 hours incubation (panel A) or the incubation time indicated on the abscissa of panel B, the medium was removed and the remaining cells were lysed by adding 50 μ l of freshly prepared 10 mM Tris-HCl (pH 7.4) followed by quick freezing in liquid nitrogen. Lysed cells were used for evaluating PFK activity as described under Materials and

1
2
3 Methods. The average value for PFK activity in the absence of GXM was $0.43 \pm$
4 $0.04 \text{ mU} \times 10^{-4}$ cells and did not significantly alter up to 48 hours incubation in the
5 absence of GXM (data not shown, $P > 0.05$, Student's t-test). Plotted values are
6 mean \pm standard error of 4 independent experiments performed in quadruplicate. *
7
8
9
10 $P < 0.05$ comparing to control in the absence of GXM (Student's t-test).
11
12

13
14 **Fig. 3.** Internalized GXM co-localizes with PFK in macrophages. GXM was
15 incubated with RAW 264.7 macrophages for 6 or 24 hours and then incubated with
16 antibodies against GXM (red) and PFK (green) followed by fluorescent labeled
17 secondary antibodies. Merged image in the right shows that internalized GXM co-
18 localizes with PFK (white arrows). Scale bar, 5 μm .
19
20
21
22
23

24
25 **Fig. 4.** Effects of GXM on purified PFK. Assays were performed as described
26 under Materials and Methods in the presence of the indicated concentrations of
27 GXM. Panel A: PFK was pre-incubated for 15 min in the presence of GXM
28 indicated on the abscissa and assayed for PFK activity in the presence of 1 mM
29 ATP and 1 mM F6P. Panels B: PFK was pre-incubated in the absence or in the
30 presence of 100 $\mu\text{g/ml}$ GXM and assayed for PFK activity in the presence of 1 mM
31 ATP and the indicated concentrations of F6P. Panel C: PFK was pre-incubated in
32 the absence or in the presence of 100 $\mu\text{g/ml}$ GXM and assayed for PFK activity in
33 the presence of 1 mM F6P and the indicated concentrations of ATP. Plotted values
34 are mean \pm standard error of 4 independent experiments performed in
35 quadruplicate.
36
37
38
39
40
41
42
43
44

45
46 **Fig. 5.** Effects of GXM on the center of mass of the intrinsic fluorescence emission
47 spectra of purified PFK. Fluorescence measurements were performed as indicated
48 under Materials and Methods in the presence of the indicated concentrations of
49 GXM. The center of mass of the spectra were calculated using equation 1
50 described in Materials and Methods. Plotted values are mean \pm standard error of 4
51 independent experiments. Inset: representative fluorescence emission spectra of
52 purified PFK in the presence of different concentrations of GXM.
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5 **Fig. 6.** Effects of GXM on PFK activity in the presence of different allosteric
6 modulators of the enzyme. PFK activity was evaluated as described in Materials
7 and Methods in the absence or in the presence of 100 µg/ml GXM. Experiments
8 were performed in the presence of 1 mM F6P and 1 mM ATP (panel A) or 5 mM
9 ATP (panel B). The other allosteric modulators used were: 100 µM fructose-2,6-
10 bisphosphate (F2,6BP), 10 mM ADP, 1 U PKA, 30 nM calmodulin (CaM) plus 100
11 µM Ca²⁺, 10 mM citrate and 10 mM lactate. Bars are mean ± standard error of 4
12 independent experiments. * P < 0.05 comparing to control in the same group and
13 in the absence of GXM. # P < 0.05 comparing to the respective bar in the absence
14 of allosteric modulator (no addition).
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Footnotes

¹ LN and MSP share senior authorship on this article. Correspondence to MSP (maurosp@ufri.br; tel/fax: 55-21-2560-8438) and LN (nimrichter1@yahoo.com; tel: 55-21-2562-6740, fax: 55-21-2560-8344)

² JG and MMC have equally contributed to this work

For Peer Review

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Table I. Effects of GXM on the kinetic parameters for ATP or F6P stimulation of PFK activity.

		control	100 µg/ml GXM
ATP	$K_{0.5}$ (mM)	0.31 ± 0.03	$0.62 \pm 0.07^*$
	n_s	1.3 ± 0.2	$2.5 \pm 0.3^*$
	$V_{max_{app}}$ (mU/µg)	39.7 ± 3.7	$13.6 \pm 1.3^*$
	$I_{0.5}$ (mM)	2.7 ± 0.3	$1.6 \pm 0.2^*$
	n_i	1.6 ± 0.2	1.9 ± 0.2
F6P	V_{max} (mU/µg)	38.9 ± 3.4	$15.2 \pm 2.1^*$
	$K_{0.5}$ (mM)	0.29 ± 0.03	$0.51 \pm 0.05^*$
	n	1.2 ± 0.1	$2.7 \pm 0.2^*$

The parameters for ATP stimulation of PFK activity were calculated fitting equation 4 to the experimental data presented in Fig 4C. The parameters for F6P stimulation of PFK activity were calculated fitting equation 5 to the experimental data presented in Fig 4B.

* $P < 0.05$ compared to control (Student's t-test)

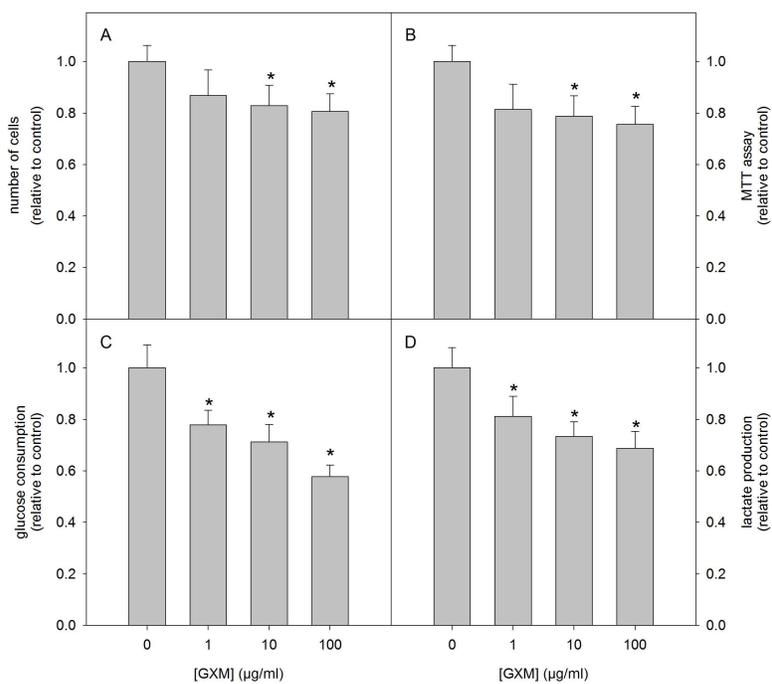


Figure 1
209x297mm (300 x 300 DPI)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

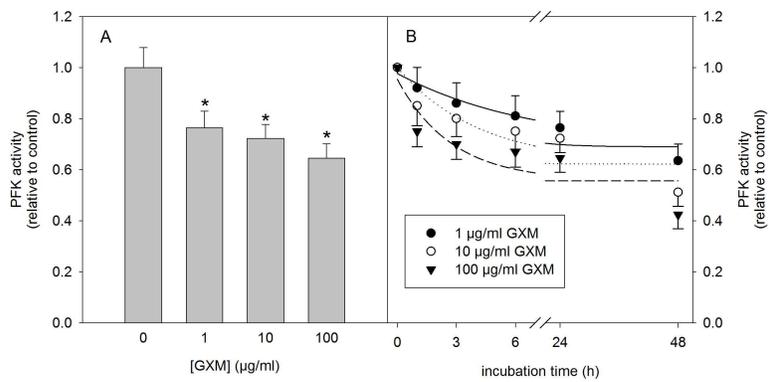


Figure 2
209x297mm (300 x 300 DPI)

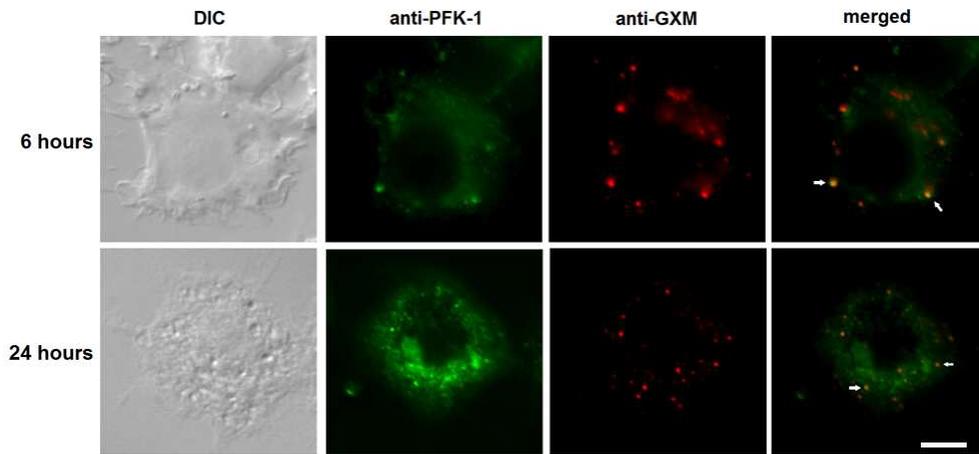


Figure 3
84x40mm (300 x 300 DPI)

Peer Review

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

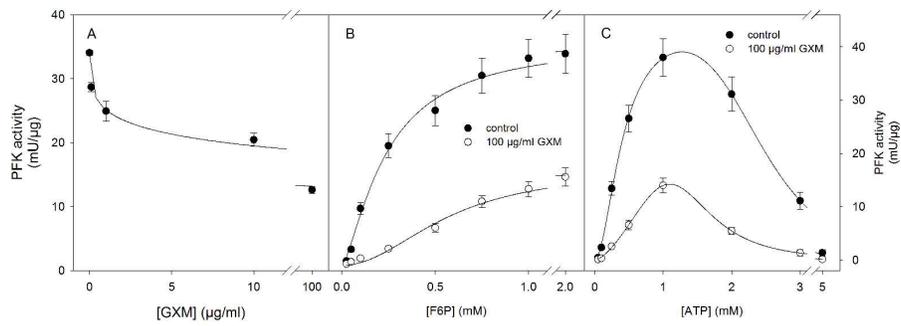


Figure 4
296x209mm (300 x 300 DPI)

review

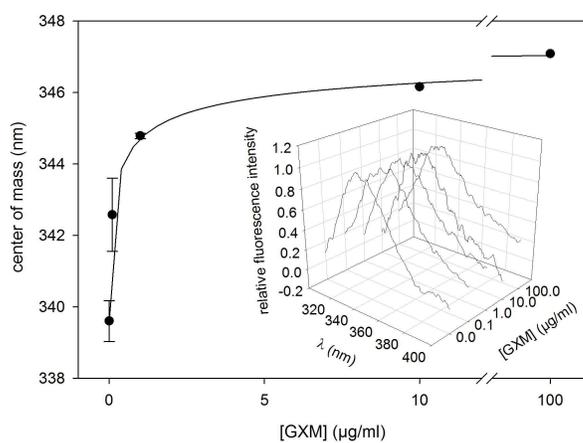


Figure 5
209x297mm (300 x 300 DPI)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

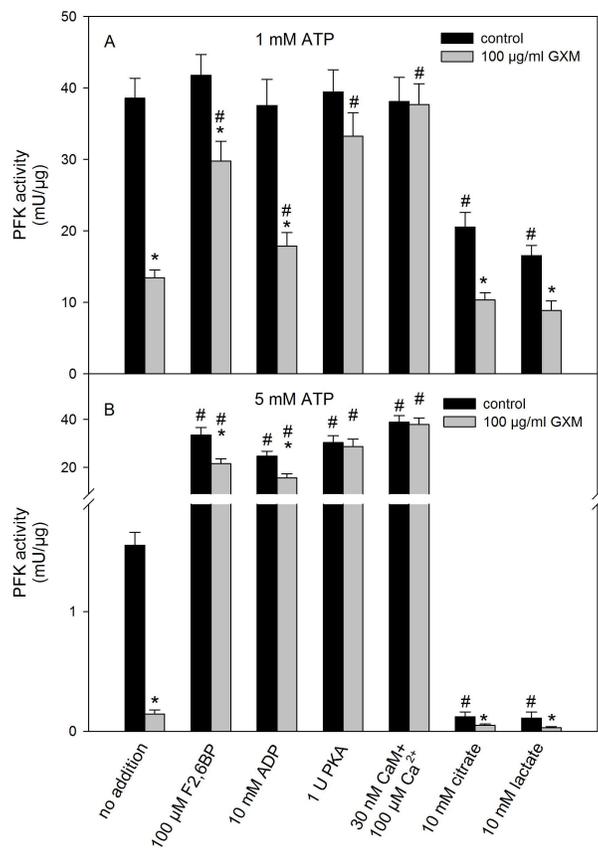


Figure 6
209x297mm (300 x 300 DPI)