

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE ARARAQUARA
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS

Jaqueline Derissi Braz

**“EXPRESSÃO GÊNICA DAS ADESINAS E FATORES DE VIRULÊNCIA DA
FASE MICELIAR E LEVEDURIFORME DO COMPLEXO *Paracoccidioides* E
DE SUA INTERAÇÃO COM CÉLULAS EPITELIAIS E FAGÓCITOS.”**

Araraquara
2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE ARARAQUARA
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS

Jaqueline Derissi Braz

**“EXPRESSÃO GÊNICA DAS ADESINAS E FATORES DE VIRULÊNCIA DA
FASE MICELIAR E LEVEDURIFORME DO COMPLEXO *Paracoccidioides* E
DE SUA INTERAÇÃO COM CÉLULAS EPITELIAIS E FAGÓCITOS.”**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP como pré-requisito para obtenção do título de Mestre.

ORIENTADORA: Profa. Dra. Maria José Soares Mendes Giannini

ARARAQUARA
2013

Braz, Jaqueline Derissi
B827e Expressão gênica das adesinas e fatores de virulência da fase miceliar e leveduriforme do complexo *paracoccidioides* e de sua interação com células epiteliais e fagócitos / Jaqueline Derissi Braz. – Araraquara, 2013
77 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia
Orientador: Maria José Soares Mendes Giannini

1. *Paracoccidioides brasiliensis*. 2. *Paracoccidioides lutzii*. 3. Fatores de virulência. 4. PCR em tempo real. I. Giannini, Maria José Soares Mendes orient. II. Título.

CAPES: 40300005

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Micologia Clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP Araraquara. Recebeu apoio financeiro da FAPESP (Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo), da CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), do CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico)

Oração da Serenidade

“Eu seguro a minha mão na sua,

Uno meu coração ao seu,

para que juntos possamos fazer

aquilo que sozinho não consigo.

Concedei-me Senhor a Serenidade necessária

para aceitar as coisas que não posso modificar,

Coragem para modificar aquelas que posso

e Sabedoria para distinguir umas das outras”

(Adaptada por Amor Exigente)

Dedico

Ao meu pai, Luiz (in memorian) e à minha mãe, Vera. Por todo amor, dedicação e carinho, que me tornaram um ser humano melhor. Mesmo dentro de suas limitações me deram o melhor e me encaminharam para que eu pudesse alcançar meus objetivos. Obrigada pelo apoio incondicional. Vocês serão meus exemplos por toda vida.

Mãe, você é meu amor maior, minha heroína, a mulher mais forte e corajosa que conheci. Obrigada pela preocupação comigo, pelas orações diárias, pelos beijos e pelos abraços. Perdoe-me a ausência constante. Sou muito grata por tê-la como exemplo. Amo muito você...

Pai... Sinto tanta saudade... Você me fez muita falta nesses dois anos. Você sempre tinha algo bom pra me dizer... Mesmo que fosse apenas pra me fazer rir. Sempre acreditou na minha capacidade e sempre se orgulhou de mim. Na verdade sinto e sei que sempre estarás comigo... Amo você...

Às minhas irmãs Cintia e Camila... Mesmo agora um pouco mais distantes, temos um elo que nunca será rompido. Foi um presente de Deus ter nascido no mesmo lar abençoado que vocês. Obrigada por estarem presentes nos melhores anos da minha vida. Obrigada por fazerem parte de mim. Amo vocês!

Aos meus preciosos sobrinhos Felipe e Nathália... mais que especiais e amados. Obrigada por trazerem luz às nossas vidas...

Ofereço

Aos meus sogros, Jaime e Margot e minhas cunhadas Milena e Naiara.

Querida Margot, eu não tenho palavras para expressar e agradecer sua presença em minha vida. Cada abraço, cada lágrima compartilhada e cada sorriso sincero que recebi desde o dia que a conheci. Obrigada por tudo que tem feito por nós, por me aceitar do jeito que sou e me dar um cantinho nesse coração imenso. Deus não me deu uma sogra, Ele me deu outra mãe... Amo muito você!

Ao meu marido Samuel... Ter você ao meu lado em um momento tão especial como este só faz aumentar a certeza de que fiz a escolha certa. Perdoe-me a ausência, não física, mas mental, que essa etapa exigiu. Cada passo que eu dou em busca do melhor não é só por mim, é por nós. Obrigada pelos conselhos, por querer que eu seja sempre uma pessoa melhor e mais focada. Diante de tudo que passamos desde que estamos juntos, terminar esse Mestrado é uma vitória. E essa vitória é sua também. Amo você.

Agradecimentos especiais

À professora Maria José Soares Mendes Giannini

Zeze, não tenho palavras para expressar a gratidão de estar em seu laboratório todos esses anos sob sua orientação. Obrigada pelo profissionalismo impecável e pelo seu amor à pesquisa, que nos faz crescer e ver as coisas de perspectivas diferentes. Obrigada por abrir as portas do seu laboratório para que eu me desenvolvesse como profissional, sempre exigindo o meu melhor. Muito obrigada por sempre manter as portas de sua sala abertas e me enxergar como pessoa quando precisei. Cada conselho, cada ensinamento, foi muito importante na minha formação profissional e pessoal. Dizer obrigada é pouco... Mas é de coração!

À professora Ana Marisa Fusco Almeida.

Má, você foi a primeira a me receber e me aceitar, com quem me dei bem logo no primeiro dia. Sempre presente e sempre disposta a me ajudar, qualquer que fosse o meu problema. Obrigada pela incansável luta em nos dar o melhor dentro da universidade. Obrigada pelos valiosos conselhos, pelos momentos de descontração e pelos ensinamentos.

À Dra. Janaina de Cássia Orlandi Sardi, por toda ajuda madrugadas adentro, pelo exemplo de profissionalismo e perseverança. Não existem palavras para agradecer o que você fez por mim. Profissionalmente e pessoalmente, não me deixando desanimar, me empurrando pra frente e sempre dizendo que tudo ia dar certo. Obrigada pelos almoços, pelo ombro quando eu precisei e por sempre ter algo bom a dizer. Obrigada de todo meu coração.

À Dra. Aline Raquel Voltan, nem sei por onde começar a te agradecer. Obrigada por toda ajuda e toda compreensão em um ano tão difícil para mim. Você sempre foi exemplo de dedicação e força. Obrigada por toda ajuda em todas as etapas desse Mestrado. Obrigada pela paciência, pela ajuda com a estatística e com as incansáveis explicações e discussões. A você toda minha gratidão.

À Rosângela Moraes da Silva, minha amiga de todas as horas... Rô, obrigada por ser quem você é. Por toda ajuda, pelos conselhos, por enxugar minhas lágrimas e dividir os sorrisos.

À Caroline Barcelos Costa Orlandi, (Carol Mineira), que com seu jeitinho mineiro conquistou minha confiança e se tornou uma amiga com quem eu pude dividir minhas aflições. Obrigada por toda ajuda. É muito bom ter você por perto! Só me desculpe não ter avisado antes que eu era sonâmbula!!!

Agradecimentos

A Deus e a Nossa Senhora, por estarem comigo toda minha vida, me fazendo enxergar que meus problemas são pequenos e as dificuldades existem para nos tornar mais fortes.

Aos amigos do Laboratório de Micologia Clínica: Haroldo, Fer Sangalli, Fer Gullo, Nayla, Junia, Carol (Panta), Carol (Tatoo), Lili, Nanda (Campos), Julhiany, Natália, Warley, Kayla, Regina, Claudia, Luana, Patricia (Laranja) e Suélen. Obrigada pela convivência. Cada um de vocês ocupa um lugar especial em meu coração.

À Dra. Flavia Karina Delella, por ter aceitado compor banca de qualificação, contribuindo com suas valiosas sugestões. Obrigada por todos esses anos de amizade e carinho.

Ao Dr. Gil Bernard, por aceitar o convite para compor a banca de defesa da dissertação.

À Rosemira, pelos almoços, cafés da manhã e pelos momentos bons de descontração.

Às queridas amigas e secretárias da FCFar, Eliana e Tirene, pelos bons momentos compartilhados.

Às funcionárias da sessão de Pós-graduação, por estarem sempre dispostas a atender minhas solicitações e me ajudar no que fosse possível.

E por último, e não menos importante, a minha amada bolinha de pelos: Tequila, que trouxe mais paz e alegria para minha vida. Que não tem a menor noção do que são Paracoccidioides e não sabe o significado de um título, mas mesmo assim me acompanhou nas longas madrugadas enquanto eu escrevia, sempre ao meu lado com seu ronronar reconfortante. Que me acorda todos os dias pedindo carinho e faz com que eu me sinta a pessoa mais especial do mundo. Porque mãe de gata, também é mãe!

*“O sucesso é a soma de pequenos
esforços –repetidos dia sim, e no outro
dia também.”*

Robert Collier

RESUMO

A interação fungo-hospedeiro resulta em um processo complexo cujo conhecimento permite melhor entendimento da patogênese das micoses sistêmicas. Espécies de *Paracoccidioides* são agentes causadores da paracoccidioidomicose (PCM), doença progressiva, crônica e sistêmica, geograficamente confinada na América Latina. O fungo é termodimórfico e a infecção ocorre após a inalação de conídios ou fragmentos de hifas, que ao entrarem em contato com o hospedeiro podem ser transformadas em formas leveduriformes. Esse evento é importante para o estabelecimento da PCM, associado a fatores ligados ao fungo bem como ao hospedeiro. A virulência fúngica é descrita como um evento altamente complexo onde em diferentes estágios da infecção ocorre a expressão de múltiplos genes, podendo estar fortemente associados ao estabelecimento da doença. A adesão e a sobrevivência no interior do hospedeiro são extremamente importantes para o estabelecimento da patogênese. Alguns genes de *Paracoccidioides* spp se apresentam diferencialmente expressos durante a transição dimórfica do fungo, apresentando baixos níveis de expressão na forma micelial quando comparadas com a forma leveduriforme, sugerindo que estes possivelmente seriam fatores na composição de estratégias moleculares que *P. brasiliensis* utiliza para morfo-adaptação e sobrevivência no hospedeiro. O objetivo deste trabalho foi estudar a expressão de genes relacionados a alguns dos fatores de virulência de *P. brasiliensis* e *P. lutzii* na fase micelial e leveduriforme, visando verificar o nível de expressão no fungo bem como na interação com células fagocíticas e epiteliais. Para tanto foram realizados ensaios de infecção com *P. brasiliensis* (Pb18) e *P. lutzii* (P01), nas fases micelial e leveduriforme em células epiteliais pulmonares (MRC-5) e macrófagos alveolares (AMJ2-C11) utilizando a técnica de PCR em tempo real (qRT-PCR). Os genes eleitos para este estudo foram os que expressam a glicoproteína de 43 kDa (gp43), enolase, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), 14-3-3 (30kDa), fosfolipase, proteinase e hemolisina (gene Duf). Os resultados mostraram um aumento significativo nos níveis de expressão da enolase, gp43 e GAPDH na fase leveduriforme da cepa 18 de *P. brasiliensis*. Na RT-PCR das células infectadas com *P. brasiliensis* houve uma diminuição da expressão dos genes,

porém a enolase apresentou uma alta expressão na situação do fungo em contato com as células, tanto para macrófagos, quanto para as células epiteliais pulmonares. Os mesmos padrões foram observados para a espécie *P. lutzii*, porém não foi observada expressão de gp43 para essa espécie. A expressão de fosfolipase em *P. brasiliensis* foi menor na fase leveduriforme quando comparada a fase miceliar e quando o fungo foi colocado em contato com macrófagos houve um grande aumento em sua expressão. O mesmo padrão foi observado em *P. lutzii*. Em nossos estudos, aspartil protease foi diferencialmente expressa em *P. brasiliensis* na interação com macrófagos, com maior expressão na fase leveduriforme, o que demonstra que o aumento desta enzima pode ser relacionado ao dano celular. *P. brasiliensis* apresentou expressão elevada do gene Duf na fase leveduriforme, mas quando em contato com as células a expressão foi reduzida. Em *P. lutzii*, a expressão, apesar de baixa, provavelmente devido à baixa virulência do fungo, era muito semelhante na fase leveduriforme e na infecção de macrófagos. Apesar destes resultados, a função deste gene em *Paracoccidioides* ainda não é clara, sendo necessários mais estudos sobre a função do gene. Os resultados obtidos nesse estudo corroboram informações adicionais sobre a virulência das duas espécies filogenéticas de *Paracoccidioides* e sua interação com o hospedeiro.

ABSTRACT

The fungus - host interaction results in a complex process whose knowledge allows a better understanding of the pathogenesis of systemic mycoses. *Paracoccidioides* species are causative agents of paracoccidioidomycosis (PCM), a progressive, chronic and systemic disease, geographically confined to Latin America. The fungus is thermally and infection occurs after inhalation of conidia or hyphal fragments, which on contact with the host can be transformed into yeast forms. This event is important for the establishment of PCM besides other factors related to the host-fungus interaction. The fungal virulence is described as a highly complex event that enables the expression of multiple genes of the fungus in different stages of infection and can be strongly associated with the development of the disease. Adherence and survival within the host are extremely important for the establishment of pathogenesis. *Paracoccidioides* spp differentially expressed some genes during the dimorphic fungus transition, having low expression levels in the mycelial form compared with yeast-form, suggesting that these factors were likely to be in the composition of molecular strategies of *P. brasiliensis* that uses to morpho-adaptation and survival in the host. The aim of this study was to compare the gene expression of the some virulence factors of *Paracoccidioides* species by real-time PCR. For the assays, the infection was performed with the yeast and mycelial phase of *P. brasiliensis* (Pb18) and *P. lutzii* (P01) in pulmonary epithelial cells (MRC-5) and alveolar macrophages (AMJ2 -C11) using RT-PCR. The genes chosen for this study were those which express the 43 kDa glycoprotein (gp43), enolase, glyceraldehyde-3- phosphate dehydrogenase (GAPDH), 14-3-3 (30kDa), phospholipase, protease and hemolysin (Duf gene). The results showed a significant increase in the levels expression of enolase, gp43 and GAPDH in the yeast phase of *P. brasiliensis*. Enolase was more expressed in the two species when in contact with the both cells, macrophages and lung epithelial cells; although the cells infected with *P. brasiliensis* showed reduced expression of all genes. The same patterns were observed for the species *P. lutzii*, but no expression of gp43 was observed for this specie. Expression of phospholipase in *P. brasiliensis* yeast phase was lower compared to mycelial phase and when the fungus was placed in contact with

macrophages there was a large increase in gene expression. The same expression pattern was observed in *P. lutzii*. In our studies, *P. brasiliensis* aspartyl protease was differentially expressed in macrophage infection with a higher expression in the yeast phase, which demonstrates that the increase of this enzyme may be related to cellular damage. *P. brasiliensis* showed high gene expression of Duf gene in the yeast phase, but in cells infected the expression was reduced. In *P. lutzii*, the expression, despite being low, probably due to the lower virulence of the fungus, was very similar in the yeast phase and macrophage infection. Despite these results, the function of this gene in *Paracoccidioides* is still not clear and more research is needed. The results of this study corroborate information about the virulence of the two species of *Paracoccidioides* and its interaction with the host.

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1. Revisão histórica

A paracoccidioidomicose (PCM) é uma doença fúngica descrita pela primeira vez em 1908 por Adolpho Lutz, ao isolar o fungo após a anamnese de um paciente com lesões orais e linfadenopatia cervical. Em 1912, Alfonso Splendore realizou a caracterização morfológica e biológica do patógeno, classificado como *Zymonema brasiliensis*. Posteriormente, o médico Floriano Paulo de Almeida incluiu um novo gênero dentro do reino Fungi – o *Paracoccidioides* – revalidando a espécie *brasiliensis* descoberta anteriormente por Splendore. A partir de 1930, os estudos sobre a paracoccidioidomicose intensificaram-se devido aos avanços na imunologia, na descoberta de drogas para o tratamento da doença e na descoberta do dimorfismo fúngico, o qual passou a ser analisado por microscopia eletrônica, possibilitando a melhor compreensão de sua biologia celular (LACAZ, 1994). Durante muito tempo a doença recebeu o nome Blastomicose Sul Americana, mas foi retirado devido ao fato da sua ocorrência na América Central e México. Em 1971, foi adotado definitivamente o nome Paracoccidioidomicose (ACORCI *et al.*, 2009, DE ABREU E SILVA *et al.*, 2013), na reunião dos micologistas das Américas, em Medellin (Colômbia) e, até hoje, persiste como nomenclatura oficial (VALLE; COSTA, 2001). O gênero *Paracoccidioides* compreende um complexo de, no mínimo, quatro espécies filogenéticas. Análises de diferentes isolados indicam que o gênero se divide em duas espécies: *Paracoccidioides brasiliensis* e *Paracoccidioides lutzii*, que compreende o isolado Pb01 (MATUTE *et al.*, 2006; CARRERO *et al.*, 2008; TEIXEIRA *et al.*, 2009).

1.2. Gênero e espécies *Paracoccidioides*

Paracoccidioides spp está taxonomicamente classificado no Reino Fungi, Filo *Ascomycota*, Classe *Pleyomicetes*, Ordem *Onigenales*, Família *Onygenaceae*, Gênero *Paracoccidioides*, Espécie *brasiliensis*. (SAN-BLAS, *et al.*, 2002).

Até o ano de 2006 o gênero *Paracoccidioides* era considerado como uma única espécie, tendo como agente etiológico, *Paracoccidioides brasiliensis*. Porém, através da sequência de análises utilizando *Multi Locus Sequence Typing* (MLST), revelou-se a existência de três espécies filogenéticas, classificadas como S1, PS2 e PS3, a partir do complexo *Paracoccidioides brasiliensis* e uma quarta espécie, *Paracoccidioides lutzii*, originalmente classificada como Pb01-like, posteriormente descrita e publicada por Teixeira e colaboradores no ano de 2009 (TEIXEIRA *et al.*, 2009; THEODORO *et al.*, 2012).

Paracoccidioides spp, são filogeneticamente considerados fungos ascomicetos, capazes de adaptar-se para sobreviver no hospedeiro causando a doença paracoccidioidomicose (PCM), a mais prevalente micose sistêmica na América Latina (RESTREPO *et al.*, 2001).

1.3. Epidemiologia e ecologia

A doença tem grande impacto social, uma vez que afeta principalmente trabalhadores rurais e do sexo masculino, sendo a sétima causa de morte entre as doenças crônicas infecciosas no Brasil (BARROZO *et al.*, 2009). A predominância de homens em relação às mulheres afetadas pela PCM ocorre devido ao possível efeito protetor hormonal, este definido pela presença de receptores para estrógenos na parede do fungo, capazes de bloquear a transformação de micélios ou conídios para forma leveduriforme (infectante) (PINZAN *et al.*, 2010). Uma das características mais peculiares da PCM é a sua distribuição geográfica global restrita, podendo ser encontrada na América Central, no Sul do México e Argentina. Sendo assim, as áreas de endemismo são contidas nos trópicos de câncer e capricórnio (BRUMER *et al.*, 1993; LACAZ *et al.*, 2002; NUCCI *et al.*, 2009; SHANKAR *et al.*, 2011). Além disso, a distribuição de PCM não é homogênea dentro de um determinado país endêmico, mas prevalece em áreas que possuem condições adequadas para a sobrevivência e crescimento do fungo, facilitando assim, a exposição humana (SHANKAR *et al.*, 2011). A doença é limitada à América Latina e Central, com regiões de maior endemicidade no Brasil, Colômbia, Venezuela, seguidas por outras áreas, de menor incidência, como Bolívia, Paraguai, Argentina, Uruguai

e regiões da América Central (SHIKANAI-YASUDA, TELLES FILHO *et al.*, 2006). Entretanto, outros casos foram relatados fora desta área em geral com períodos longos de latência, representando reativações endógenas de focos infecciosos previamente adquiridos nessas regiões (MANNIS, BAYLIS *et al.*, 1996). Pouco se sabe sobre o habitat de *P. brasiliensis*, porém, esse fungo tem sido encontrado no solo, na água, em plantas de áreas endêmicas e, mais recentemente em tatus, mas nenhum desses estudos até o momento pode estabelecer definitivamente seu nicho ecológico (BAGAGLI, BOSCO *et al.*, 2006). O Brasil responde por mais de 80% dos casos relatados, seguido por Colômbia, Venezuela, Equador e Argentina, onde as últimas as taxas de prevalência são muito baixas. Outros países da América Latina relataram menor número de casos, assim como todos os países da América Central (NUCCI *et al.*, 2009). A taxa de incidência anual no Brasil é estimada por volta de 10 a 30 casos por milhão de habitantes e a taxa média de mortalidade é de 1,4 mortes por milhão de habitantes (COUTINHO *et al.*, 2002;BITTENCOURT *et al.*, 2005; JOHANN, *et al.*, 2010)

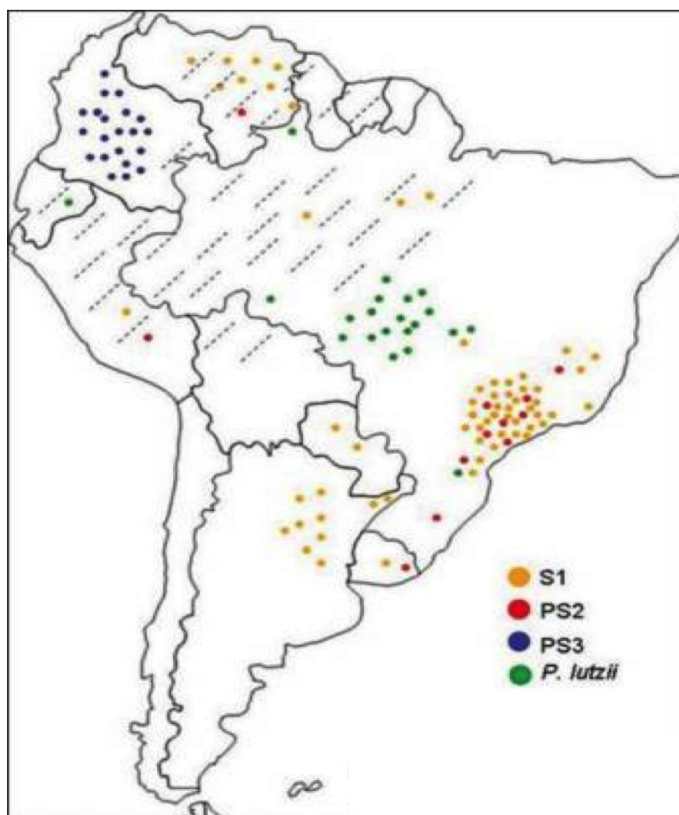


Figura 1. Distribuição geográfica das espécies filogenéticas de *Paracoccidioides* (Adaptado de THEODORO *et al.*, 2012)

1.4. Infecção e Doença

Hoje é amplamente aceito que a infecção por *Paracoccidioides brasiliensis* é adquirida através da inalação de propágulos fúngicos (BERNARD 2008). Estes invadem as vias aéreas e encontram macrófagos alveolares e células epiteliais, onde ocorre a transição de micélio para levedura. Depois disso, a migração de células do patógeno para outras células do hospedeiro é considerada um pré-requisito para invasão de múltiplos órgãos e disseminação do fungo (PERES DA SILVA *et al.*, 2011). Essa disseminação por via linfática e hematogênica para outros órgãos depende da quantidade de inóculo, da patogenicidade e da virulência do fungo, assim como da integridade do sistema de defesa e de possíveis fatores genéticos (BERNARD & MENDES-GIANNINI, 2013).

O estudo desta micose é de suma importância em face da prevalência e gravidade de algumas de suas formas anátomo-clínicas, de suas sequelas e das taxas de mortalidade (COUTINHO *et al.*, 2002; TRAVASSOS *et al.*, 2008).

Existem duas formas clínicas diferentes da PCM: a infecção e a doença. A infecção é assintomática e ocorre frequentemente em indivíduos saudáveis, que residem ou residiram em áreas endêmicas e possuem reatividade ao teste de pele com paracoccidioidina (RESTREPO-MORENO, 1993). Indivíduos com lesões residuais inativas que contenham *Paracoccidioides* spp também são incluídos nessa forma clínica. A PCM doença é sintomática e divide-se nas formas: aguda/subaguda ou crônica. A forma aguda acomete principalmente crianças e adolescentes, mas eventualmente pode atingir indivíduos com até 35 anos de idade e corresponde a aproximadamente 5% dos casos e é caracterizada por pequenos períodos de incubação do fungo (semanas a meses). A distribuição da forma aguda / subaguda é semelhante em crianças dos gêneros masculino e feminino, (multifocal), causando principalmente linfadenomegalia, manifestações digestivas, hepatoesplenomegalia, envolvimento ósteo-articular e lesões cutâneas (SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 2006).

A forma crônica (adulto) corresponde a cerca de 90% dos casos, apresentando um curso mais lento (meses a anos), acometendo com maior

frequência indivíduos do sexo masculino com idade superior a 30 anos. Afeta primeiramente os pulmões (unifocal) e posteriormente disseminando-se para outros órgãos e tecidos (multifocal), causando lesões secundárias em membranas, mucosas, pele, linfonodos, glândulas adrenais e sistema nervoso central (RESTREPO *et al.*,2008; TABÓN *et al.*, 2010).

Tabela 1. Principais características das formas: aguda e crônica da PCM

	Forma aguda (juvenil)	Forma crônica (adulto)
Idade do paciente	Inferior a 30 anos	Acima de 25 anos
Quadro clínico típico	Adenomegalia cervical ou generalizada	Pneumopatia e/ou ulceração na mucosa bucofaríngea
Alterações e lesões	Hepatomegalia, esplenomegalia, lesão de pele, mucosa bucofaríngea, intestinal e óssea	Adenomegalia, submandibular e/ou cervical, lesão de pele, laringe, supra-renais e sistema nervoso central
Anticorpos anti-<i>Paracoccidioides</i>	Títulos altos	Títulos médios / altos
Imunidade celular e hipersensibilidade retardada	Depressão moderada a intensa	Preservada ou depressão moderada
Histopatologia	Granulomas frouxos, muitas leveduras, evolução para necrose e supuração	Granulomas compactos, menor número de leveduras, evolução para necrose e fibrose

(Adaptado: MARTINEZ,2004)

1.5. Fatores de Virulência

Vários patógenos apresentam estratégias para sobreviver e se replicar dentro das células hospedeiras. *Candida albicans* invade as células epiteliais bucais, induzindo a sua própria endocitose e assim tendo acesso aos compartimentos vacuolares do epitélio. *Cryptococcus neoformans* sobrevive em ambiente ácido no fagolisossomo (LEVITZ *et al.*, 1999), como os conídios de *Aspergillus fumigatus*, (WASYLNKA *et al.*, 2003) e outros microrganismos (VOLTAN *et al.*, 2013).

Paracoccidioides spp são considerados fungos intracelulares facultativos que podem aderir às células epiteliais *in vivo* e *in vitro* (DE BRITO *et al.* 1973; HANNA *et al.*, 2000; MENDES-GIANNINI *et al.*, 2000;). O uso de moléculas de superfície envolve estratégias do microrganismo para evadir-se do sistema imune e para a sua própria sobrevivência nos sistemas do hospedeiro. A adesão está intimamente associada ao controle transcricional envolvendo várias vias regulatórias.

Na última década, abordagens com métodos moleculares foram utilizados na caracterização de fatores de virulência fúngica, tornando-se um ponto de partida para o conhecimento da patogênese desses microrganismos. Os avanços na caracterização de adesinas de *P. brasiliensis* têm sido obtidos com os estudos de transcriptoma (FELIPE *et al.*, 2005; NUNES *et al.*, 2005). Castro *et al.*, 2005 realizaram um *screening* das proteínas GPI ancoradoras deste fungo, entre estas há adesinas ligantes da matriz extracelular. A matriz extracelular (MEC) desempenha um papel importante na regulação da célula, a migração de diferenciação, adesão e proliferação de células (BAILÃO *et al.*, 2012). Da mesma forma, Tomazetti *et al.*, (2005) estudaram genes codificantes para enzimas possivelmente envolvidas na biossíntese e remodelagem de polissacarídeos da parede celular, que tem potencial de influenciar na adesão a células do hospedeiro. Marcos *et al.*, (2012) sugeriram que a enzima glicolítica enolase, uma ligante de fibronectina, executa funções adicionais relacionadas com a via glicolítica e também desempenha um papel de aderência em *P. brasiliensis*. Uma característica vital dos microrganismos é a sua capacidade de adaptação às alterações do ambiente em que se encontra o que envolve a regulação da expressão gênica em resposta aos diferentes sinais ambientais (KATO-MAEDA *et al.*, 2001).

A endocitose deste fungo ativa os microfilamentos e microtúbulos, além de induzir apoptose (MENDES-GIANNINI *et al.*, 2004). Embora a invasão de células não fagocíticas seja de extrema importância na patogênese da doença e algumas adesinas já foram descritas, há ainda falta de maior compreensão sobre quais genes e moléculas de superfície têm papel na adesão e podem induzir a invasão durante o processo infeccioso tão variado como o apresentado por este fungo. Em estudos utilizando cultura celular, foi

verificada a cinética do processo de interação de *P. brasiliensis* às culturas celulares Vero e HeLa, respectivamente, e os prováveis fatores envolvidos nesta interação. Além dessas, foram analisadas as interações de *P. brasiliensis* com pneumócitos e queratinócitos, procurando correlacionar os eventos de entrada do fungo via pulmonar e sua disseminação, chegando até o epitélio bucal (MONTEIRO DA SILVA *et al.*, 2001; PERES DA SILVA *et al.*, 2011). Deste modo, diferentes modelos de culturas celulares foram estudados com o objetivo de avaliar a interação fungo-célula e assim delinear a patogênese da doença, já que *P. brasiliensis* interage com uma grande variedade de tipos celulares ao longo da infecção. As interações entre as formas infectantes e o epitélio respiratório levam a doenças fúngicas como a paracoccidiodomicose, que ocorre após a inalação dos conídios presentes no meio ambiente (BENARD & GIANNINI, 2009). Assim, as células epiteliais das vias aéreas são as primeiras células do trato respiratório a receber os conídios inalados e outros patógenos transmitidos pelo ar (KHOUFACHE *et al.*, 2009). A mucosa das vias aéreas é uma importante barreira que protege a entrada de microrganismos. Um componente essencial desta barreira é a polaridade das células da superfície epitelial (SCHNEEBERGER *et al.*, 2004). A utilização de sistemas de cultura de células epiteliais de origem respiratória do trato superior é de importância central no desenvolvimento dos conhecimentos sobre a patogênese das infecções respiratórias. Assim, o estudo da interação de *P. brasiliensis* e culturas de células pulmonares e macrófagos, podem constituir-se em abordagem importante para o conhecimento dos passos iniciais de infecção deste fungo.

Por outro lado, a invasão de *P. brasiliensis* afeta a estrutura do citoesqueleto das células epiteliais, interferindo em aspectos morfológicos da actina, tubulina e citoqueratina (MENDES-GIANNINI *et al.*, 2004). A degradação de citoqueratina por *P. brasiliensis* pode ser devido aos efeitos de enzimas específicas ou pela glicoproteína 43-kD (MENDES-GIANNINI *et al.*, 1990; PUCCIA *et al.*, 1998), causando a perda das características de rede filamentosa. Alguns estudos têm analisado a glicoproteína gp43, que é um dos principais antígenos. Ela se liga especificamente à laminina, tendo um papel importante na adesão, o que pode ser concluído após relatos de que o soro

anti-gp43 inibem a adesão em 85% (HANNA, *et al.*, 2000; MARCOS *et al.*, 2012). Esta degradação de citoqueratina pode explicar tanto o processo de invasão *in vitro* como a capacidade de *P. brasiliensis* de atravessar as barreiras epiteliais *in vivo* (MENDES-GIANNINI *et al.*, 2005). A secreção de enzimas tais como fosfolipase e proteínase, tem sido proposta como uma das estratégias utilizadas por bactérias e fungos para a invasão do hospedeiro e estabelecimento de infecção (TAVARES *et al.*, 2005; SOARES *et al.*, 2010). O papel das fosfolipases extracelulares, como potenciais fatores de virulência para fungos patogênicos, incluindo *Candida albicans* (MUKHERJEE *et al.*, 2003; MA *et al.*, 2008), *Cryptococcus neoformans* (COX, *et al.*, 2001), e *Aspergillus fumigatus* (KARKOWSKA-KULETA *et al.*, 2009), foi relatado, embora a base de seu mecanismo não tenha sido completamente elucidado. Atividade de fosfolipase e proteinase extracelular foram também detectadas em culturas *in vitro* de *P. brasiliensis* (ASSIS *et al.*, 1999), sendo este um fator de virulência potencial para este patógeno (TAVARES *et al.*, 2005).

Paracoccidioides spp cresce na forma filamentosa em temperaturas abaixo de 24°C, apresentando a forma de colônias brancas, aderente ao meio. Microscopicamente são observadas hifas delgadas, hialinas, septadas, multinucleadas e ramificadas, com produção de clamidósporos terminais ou intercalares, conídios e ausência de corpos de frutificação, sendo denominada saprofítica ou micélio. Quando cultivado a 37°C, em meios suplementados, são observadas colônias de coloração creme e aspecto cerebriforme. Microscopicamente são observadas células arredondadas ou ovais, com paredes birrefringentes e formação de multibrotramentos, denominada leveduriforme, conhecida também como parasitária, capaz de causar lesões nos tecidos do hospedeiro, humano ou animal (LACAZ, 1994; BRUMMER *et al.*, 1993; HERNANDEZ, *et al.* 2011). Por ser um fungo dimórfico, *P. brasiliensis* apresenta as formas miceliar e leveduriforme sendo a transição das fases um requerimento essencial para ocorrência da PCM. No entanto, doenças causadas por fungos dimórficos e os mecanismos moleculares que controlam essa transição permanecem obscuros (NEMECEK *et al.*, 2006). Assim, como outros fungos dimórficos patogênicos, a transição da fase miceliar para a fase leveduriforme é essencial para *P. brasiliensis* estabelecer a doença, visto que estudos têm mostrado que linhagens que não tem

capacidade de se diferenciar para levedura não são virulentas. (FRANCO, 1987; SAN BLAS & NINO-VEGA, 2001; NEMECEK *et al.*, 2006). *P. brasiliensis* tem se tornado um importante modelo para estudar o processo de transição dimórfico em fungos patogênicos (SAN BLAS *et al.*, 2002; SAN BLAS & NINO-VEGA, 2004). Niño – Vega *et al.*, (2007) caracterizaram e analisaram o perfil de expressão de transcritos durante a transição dimórfica do gene codificante da actina. A expressão do gene foi acompanhada por análises de *Northern blotting* durante a transição de micélio para leveduras e de leveduras para micélio, e os resultados mostraram que o transcrito é detectado em ambas as fases, mas com expressão preferencial após 48 horas do início da transição de micélio para levedura, sugerindo que a proteína tem uma resposta adaptativa rápida ao estresse térmico.

A virulência fúngica é descrita como um evento altamente complexo onde em diferentes estágios da infecção ocorre a expressão de múltiplos genes, podendo estar fortemente associados ao estabelecimento da doença. A adesão e a sobrevivência no interior do hospedeiro são extremamente importantes para o estabelecimento da patogênese. Neste contexto, fatores importantes para o estabelecimento da infecção por fungos patogênicos vêm sendo descritos (KWON-CHUNG, 1998; ODDS *et al.*, 2001; YANG, 2003). Genes envolvidos no controle da transição dimórfica e expressão de fatores de virulência em fungos dimórficos foram descritos por Nemecek *et al.*, (2006) os quais demonstraram fortes evidências da existência de um controle global para ambos, a morfogênese e a patogenicidade. Os autores descreveram um sistema de sinalização de dois componentes – o híbrido histidina quinase (DRK- 1) que controla a transição dimórfica e a virulência em *Blastomyces dermatitidis* e em *Histoplasma capsulatum*. Diversos trabalhos têm relacionado alteração morfológica ao perfil de virulência (KUROKAWA *et al.*, 2005).

As vias de sinalização que controlam a transição morfológica em *P. brasiliensis* ainda são pouco conhecidas (MARQUES *et al.*, 2004). A via de sinalização por meio do cAMP (adenosina monofosfato cíclico) parece ser importante pois a adição exógena do composto inibe a transição de leveduras para micélios, mantendo a forma patogênica do fungo (CHEN *et al.*, 2007). Vários outros estudos têm sido realizados visando avaliar o dimorfismo em *P. brasiliensis*. Alguns genes de *P. brasiliensis* apresentam expressão diferencial

durante a transição dimórfica do fungo. Os genes codificantes para a proteína de choque térmico de 70 kDa (HSP70) (SILVA et al., 1999), proteína homologa à flavodoxina PbY20 (DAHER et al. 2005), a Chaperona ClpB (JESUINO et al., 2002), Manosiltransferase (COSTA et al., 2002), HSP90 (NICOLA et al., 2008), apresentaram baixos níveis de expressão na forma micelar quando comparadas com a forma leveduriforme, sugerido que estas proteínas possivelmente seriam fatores na composição de estratégias moleculares que *P. brasiliensis* utiliza para morfo-adaptação e sobrevivência no hospedeiro.

A grande maioria dos estudos relacionados à interação fungo-hospedeiro tem sido realizada com a fase leveduriforme do fungo. Assim, para se estudar a fase inicial da doença e como o fungo se adapta às condições do hospedeiro, a melhor opção seria o estudo comparativo das fases micelar e leveduriforme.

Objetivo

2. OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho foi estudar a expressão de genes relacionados a alguns dos fatores de virulência de *P. brasiliensis* e *P. lutzii* na fase micelial e leveduriforme, visando verificar o nível de expressão no fungo bem como na interação com células fagocíticas e epiteliais.

2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a expressão gênica de adesinas e enzimas hidrolíticas (fosfolipases, proteinases e hemolisinas) na fase micelial e leveduriforme de *Paracoccidioides brasiliensis* e *P. lutzii*.
- Avaliar a expressão gênica de adesinas e enzimas hidrolíticas (fosfolipases, proteinases e hemolisinas) na adesão com células epiteliais pulmonares (MRC-5) infectadas com *P. brasiliensis* e *P. lutzii*.
- Avaliar a expressão gênica de adesinas e enzimas hidrolíticas (fosfolipases, proteinases e hemolisinas) em macrófagos AMJ2-C11, infectados com *P. brasiliensis* e *P. lutzii*.

Metodologia

3. METODOLOGIA

3.1. Isolados, condições de cultivo e diferenciação do fungo *Paracoccidioides* spp

Neste estudo foram utilizadas as espécies *Paracoccidioides brasiliensis* S1, (Pb18) e *P. lutzii*, na fase leveduriforme. A fase saprobiótica das duas espécies (micelilar) foi crescida em meio de Fava-Netto, semi-sólido à 22°C. O mesmo meio de cultura foi utilizado para o cultivo da fase leveduriforme à 37°C.

3.2. Cultura celular

Para avaliar a interação da fase de transição com os diferentes tipos celulares foram utilizadas as linhagens: AMJ2-C11 de macrófagos alveolares de camundongo e a linhagem celular MRC-5, (fibroblasto de pulmão), cultivadas em meio HAM-F12 com 5% de CO₂ a 37 °C, obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro.

3.3. Cultura de macrófagos e linhagem celular MRC-5

Os macrófagos e as células pulmonares foram cultivados em garrafas plásticas, em meio DMEM (*DULBECCO'S MODIFIED EAGLE MEDIUM* - Sigma-Aldrich, Brazil) suplementado com soro fetal bovino (SFB) 10% e antibióticos, e mantidos à temperatura de 36,5 °C. Decorridos 3 a 4 dias, as garrafas de células foram submetidas à tripsinização. Para isso, a monocamada formada foi lavada com 01 mL de PBS (solução tampão fosfato salino) 0,05 M, pH 7.2 estéril e, após lavagem, esta desprezada para então ser acrescentado 1 mL de ATV-solução de tripsina 0,2% e EDTA 0,02% (Adolfo Lutz). Seguidos 1-2 minutos, as células foram homogeneizadas com volumes variados do meio correspondente acrescido de soro fetal bovino (SFB). Nesta etapa, a tripsina (ATV) foi neutralizada pelo SFB presente no meio de cultura. O volume total da suspensão celular obtido foi transferido para outras garrafas, de modo que obteve uma concentração celular de 10⁶ células/ mL.

3.4. Preparo e padronização do inóculo

As cepas 18 de *P. brasiliensis* e 01 de *P. lutzii* foram cultivadas em tubo contendo meio Ágar Fava-Netto, durante quatro dias, a 35 °C. Foi adicionada uma quantidade suficiente de PBS estéril, quantidade de fungo para obtenção de uma suspensão turva e homogênea, correspondente a 1×10^5 células/ mL, de acordo com a escala de MacFarland e ajustada também através de leitura em espectrofotômetro (D.O.550nm = 0,5).

Para os ensaios na fase miceliar, o fungo foi cultivado em meio Ágar Fava Netto de 2/4 meses a 23 °C. O preparo do inóculo foi o mesmo utilizado na fase leveduriforme.

3.5. Ensaios de infecção com *P. brasiliensis* e *P. lutzii* em células epiteliais e macrófagos

Para os ensaios de infecção foram escolhidas duas situações do fungo: a fase miceliar e a fase leveduriforme.

Após a formação da monocamada celular, o meio de cultura foi desprezado e foram acrescentados 3 mL de meio de cultura e 3 mL da suspensão do inóculo. As garrafas contendo células de pulmão infectadas com a suspensão foram incubadas por 5 horas e as garrafas contendo macrófagos infectados foram incubadas por 6 horas. Após o período de infecção as células foram removidas com o auxílio de um raspador (Scraper) e transferidas para um tubo tipo Falcon. As células foram lavadas 3x com PBS e armazenadas a -80 °C para posterior extração do RNA.

3.6. Ensaio de infecção em células epiteliais e macrófagos para reação de imunofluorescência

Uma suspensão de 10^6 células por mL dos dois modelos de células utilizados neste estudo e foram distribuídos em uma placa de 96 poços. As placas foram incubadas a 37 °C em estufa de CO₂. Após 24 horas as placas foram retiradas da estufa e foi adicionada a suspensão fúngica na fase miceliar e leveduriforme. As placas foram novamente incubadas e após 5 horas a placa

contendo células epiteliais de pulmão foi retirada, lavada três vezes com PBS. Aos poços foi adicionado 100 µL de paraformaldeído a 4%. O mesmo procedimento foi realizado com a placa contendo macrófagos após 6 horas de incubação.

3.7. Reação de Imunofluorescência

Para estudar a interação do fungo com as células epiteliais e macrófagos infectados com *P. brasiliensis* (Pb 18) foi realizado o ensaio de Imunofluorescência indireta. Após o tempo de incubação da infecção, a monocamada de células infectadas com *P. brasiliensis* foram permeabilizadas com Triton X-100 0,5% em PBS e incubadas a temperatura ambiente por 30 min. Após lavagens em PBS-Tween-20 0,25% (PBS-T) gelado, a monocamada foi incubada com solução de bloqueio (BSA 2,5% (Sigma) + leite Mólico desnatado® 1% + Soro fetal bovino 8%), por 30 minutos à temperatura ambiente. Após o período de incubação, a solução de bloqueio foi desprezada e então foi adicionado 300 µL de anti-GP43 (diluído 1:50 em PBS). Logo após foram novamente lavadas com PBS-Tween-20 gelado e incubadas com anticorpo marcado com Alexa Fluor® 594 de cabra anti-IgG de coelho, (diluído 1:300 em PBS) por 1 hora a 37 °C. As amostras foram lavadas três vezes com PBS-Tween-20 gelado e marcadas com Faloidina (diluída 1:50 em PBS) e permaneceram incubadas em temperatura ambiente por uma hora. Foram lavadas novamente e foi adicionado 100 µL de DAP, para marcação do núcleo, por 10 minutos, lavadas com PBS e levadas ao aparelho In Cell Analyzer para visualização de foto documentação.

3.8. Análise de expressão diferencial de genes por PCR em tempo real (Real Time PCR)

3.8.1. Extração de RNA total e síntese de cDNA

Em experimentos independentes, as células fúngicas do isolado 18 e 01 foram maceradas depois de congeladas com nitrogênio líquido em um tubo tipo Falcon contendo três mL de Trizol e pérolas de vidro. A amostra foi agitada

vigorosamente em vórtex por 15 minutos e após 10 minutos em repouso, centrifugadas a 3000 RPM por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo, adicionado 200 μ L de clorofórmio para cada 750 μ L de trizol recuperado, agitado vigorosamente e deixado em repouso por 10 minutos. Após o repouso, a amostra foi centrifugada a 3000 RPM por 15 minutos e o sobrenadante transferido para um novo tubo. Foram acrescentados 250 μ L de isopropanol, 250 μ L de solução de citrato de sódio 0,4 M e cloreto de sódio 0,8 M para cada 750 μ L de Trizol recuperado inicialmente. As amostras foram agitadas gentilmente e deixadas em repouso por 10 minutos a temperatura ambiente. Logo após foram centrifugadas a 3000 RPM por 30 minutos, o sobrenadante descartado e o precipitado lavado com etanol a 75%, centrifugado a 3000 RPM por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado seco no equipamento *SpeedVac*. Após a secagem o “pellet” foi ressuspenso em 40 μ L de água DEPC (Dietil Pirocarbonato) 0,01% e as amostras foram armazenadas a -80 °C.

3.8.2. Síntese de cDNA

A síntese da primeira fita de cDNA foi feita em uma reação contendo 1 μ g de RNA total, 10pmol/ μ L da sequência iniciadora (5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCGGG-3') e essa mistura foi aquecida por 2 minutos a 72°C. Em seguida foi acrescentado 10pmol/ μ L do oligo dT modificado (5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACT(30)N1N, onde N=A, C, G ou T; N1=A, G ou C), 2 μ L de uma mistura de dNTPs (10 mM), 2 μ L de RNaseOUT (40U/ μ L)(Invitrogen), 0,4 μ L de DTT (100mM), 1,2 μ L de cloreto de magnésio (50mM), 2 μ L da enzima transcriptase reversa (200U/ μ L) (RT Superscript II - Invitrogen) e 4 μ L de tampão 5X (Tris-HCl 250mM pH 8,3; KCl 375mM; MgCl₂ 15mM). Esta reação foi incubada a 42°C durante 1 hora e trinta minutos. Após este período foi adicionado 80 μ L de TE (Tris-HCl 10mM; EDTA 1mM pH 8,0) e aquecido por mais 10 minutos a 72°C.

3.8.3. PCR em Tempo Real

Para a análise da expressão diferencial de genes por PCR em Tempo Real, foram utilizados iniciadores específicos para genes codificantes das proteínas diferencialmente expressas em *P. brasiliensis* e *P. lutzii* (Tabela 2). Os mesmos genes foram testados somente para o fungo, nas fases miceliar e leveduriforme e para o fungo em contato com os diferentes tipos celulares.

Tabela 2: Iniciadores específicos para genes codificantes

	Primers
gp43	Sense 5'-CTTGTCTGGGCCAAAAACTC-3' Antisense 5'-GCCAGGGTTTGTTGACTGT-3'
Enolase	Sense 5'-TAGGCACCTCACTGAATCC-3' Antisense 5'-GCTCTCAATCCCACAACGAT-3'
Fosfolipase	Sense 5'-TGTGGTGGATCAAAAAGAC-3' Antisense 5'-GGATACGACGTCGCCACTAT-3'
Aspartil protease	Sense 5'-AAAGGAAACACGGAAACACG-3' Antisense 5'-CGTCCIGAGACGGTGGTAT-3'
14-3-3 (30 kDa)	Sense 5'-GTTTCGCTCTGGAGACAAGC-3' Antisense 5'-AGCAACCTCAGTTGCGTCT-3'
GAPDH	Sense 5'-AAATGCTGTTGAGCACGATG-3' Antisense 5'-CTGTGCTGGATATCGCCTTT-3'
Hemolisina (Duf)	Sense 5'-CCCATCCGACAGCACAGACT-3' Antisense 5'-GGAGTTGGGCCCCGTCTA-3'

As reações foram realizadas utilizando-se 1 µL de cDNA, 10 µL de Máxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2 x) (Thermo Scientific), e 0,5 µM de cada primer, sendo adicionado a reação água até atingir o volume de 20 µL. As reações foram realizadas com temperatura inicial de 50 °C por 2 minutos, seguido por 10 minutos a 95 °C. Depois, 40 ciclos de 95 °C há 15 segundos, seguidos de anelamento e síntese a 60 °C por um minuto. Em seguida a PCR a análise da curva de melting foi realizada em que foi confirmada a emissão de sinal correspondente a um único produto. As reações foram realizadas em triplicata com o aparelho Applied Biosystems 7500 cyclor.

3.8.4. Análise estatística

A expressão dos genes relacionados à fase miceliar e leveduriforme da cepa 18 de *P. brasiliensis* e da cepa 01 de *P. lutzii*, de macrófagos infectados e células do epitélio pulmonar infectados com Pb18 e P01 foram avaliados segundo a normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk. Quando se mostraram paramétricos, foi utilizado o Test t de Student. Todos os dados foram avaliados pelo programa BioEstat 5.0, utilizando $p < 0.05$.

Resultados

4. RESULTADOS

4.1. Imunofluorescência indireta

Foi utilizada a imunofluorescência indireta e soro anti-GP43 para caracterizar e revelar a presença de *Paracoccidioides brasiliensis*, nas duas fases dimórficas do fungo, bem como em macrófagos (figura 2) e células epiteliais pulmonares infectadas (figura 3). Foram utilizadas como controle células não infectadas. Nossos resultados mostram a presença de gp43, nas fases leveduriforme e miceliar (figuras 4 e 5) do fungo, bem como a presença do fungo após a infecção. Essa glicoproteína é constantemente secretada nas fases de crescimento exponencial de alguns isolados do fungo, mas também está constitutivamente ligada à sua parede celular.

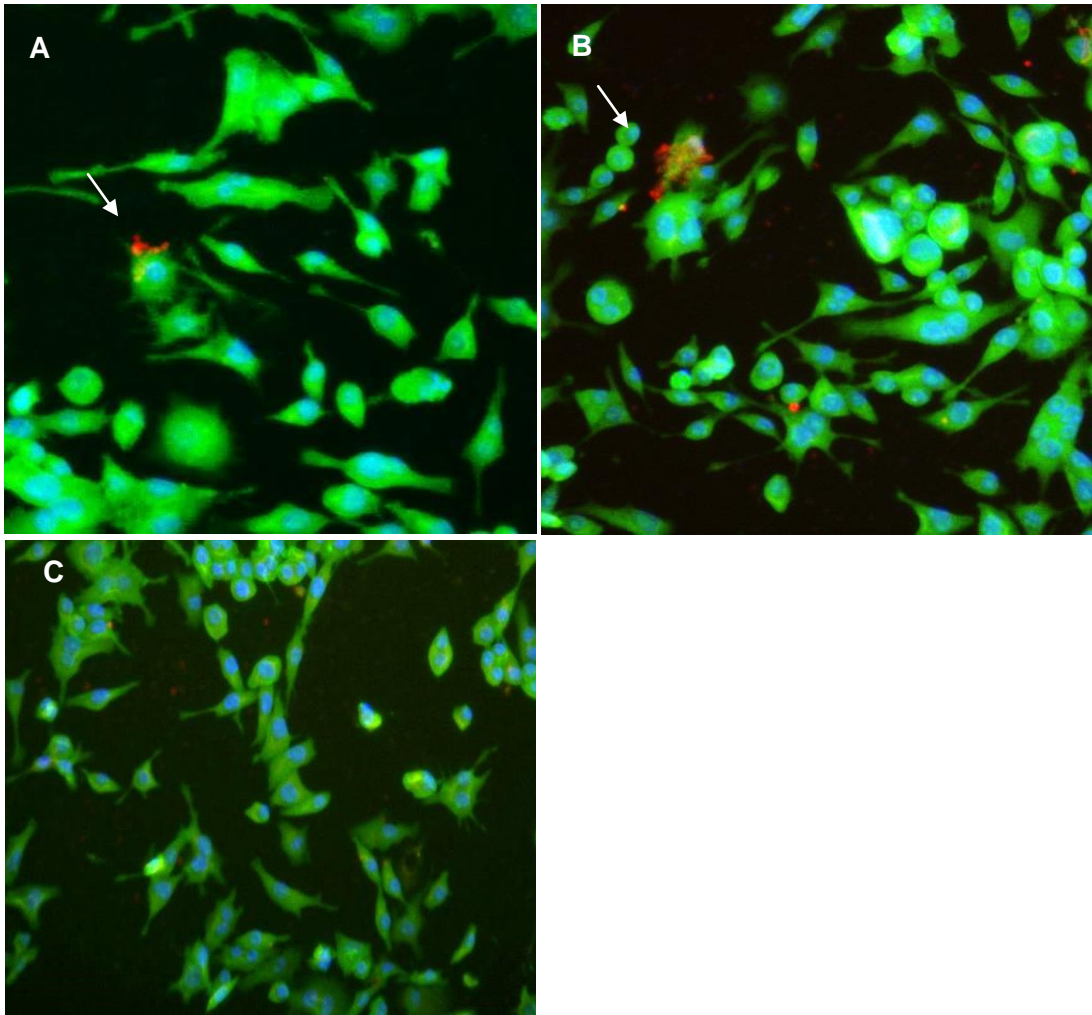


Figura 2: Imunofluorescência indireta de macrófagos infectados e não infectados com *P. brasiliensis* na fase micélica (A), fase leveduriforme (B) e macrófagos não infectados (C). Soro anti gp 43 e conjugado marcado com Alexa Fluor® 594 foi empregado para marcação do fungo e faloidina para marcação da actina.

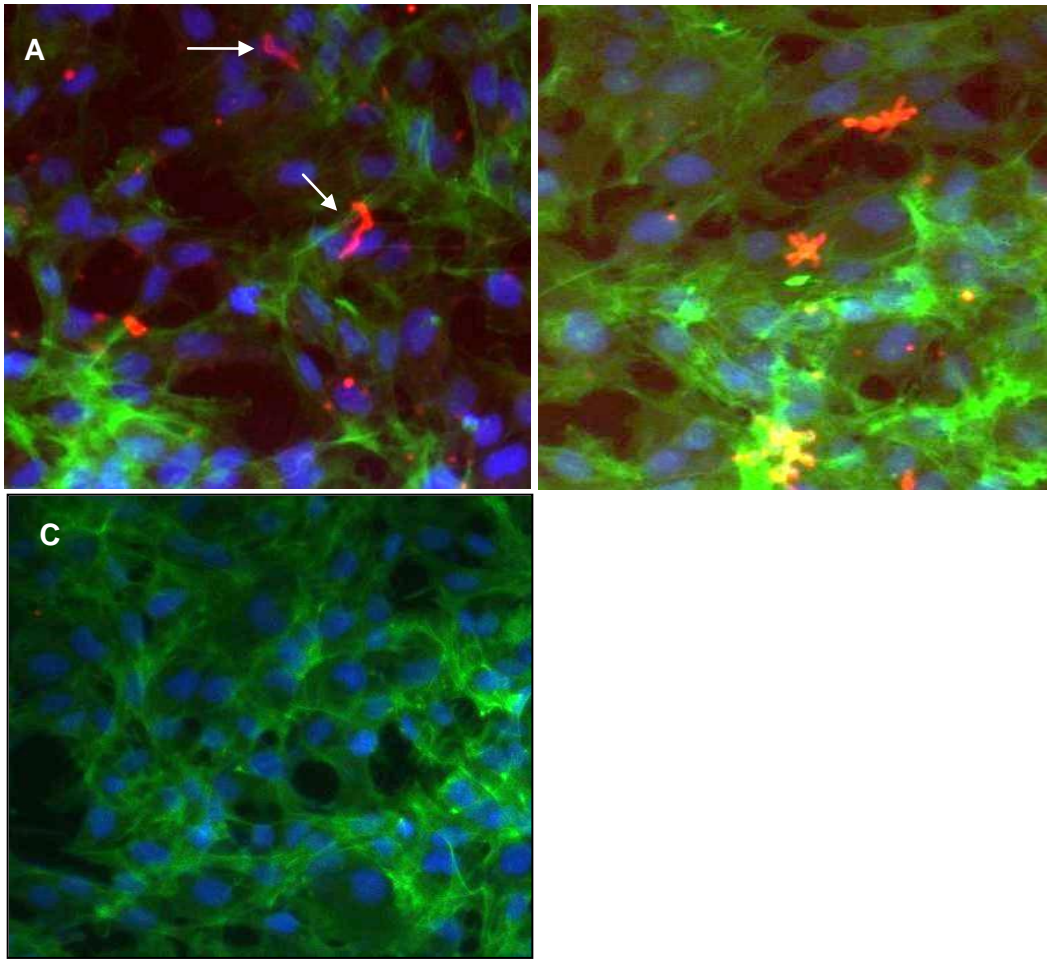


Figura 3: Imunofluorescência indireta de células epiteliais pulmonares infectadas com *P. brasiliensis* na fase miceliar (A), fase leveduriforme (B) e células não infectadas (C). Soro anti-gp43, conjugado marcado com Alexa Fluor® 594 e faloidina foram empregados para marcação da célula fungica e da actina, respectivamente.

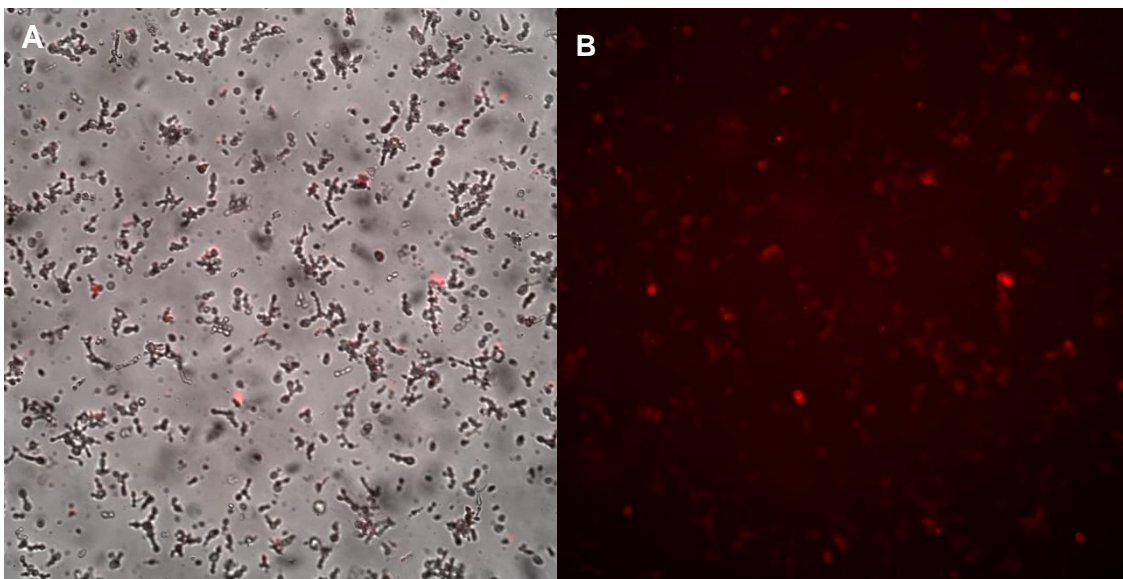


Figura 4: Imunofluorescência indireta de *P. brasiliensis* na fase leveduriforme (A). A figura B indica a expressão da proteína gp43. Microscopia de campo claro (A) e filtro Texas Red (B) por imunofluorescência com Alexa Fluor® 594 empregado para marcação do fungo.

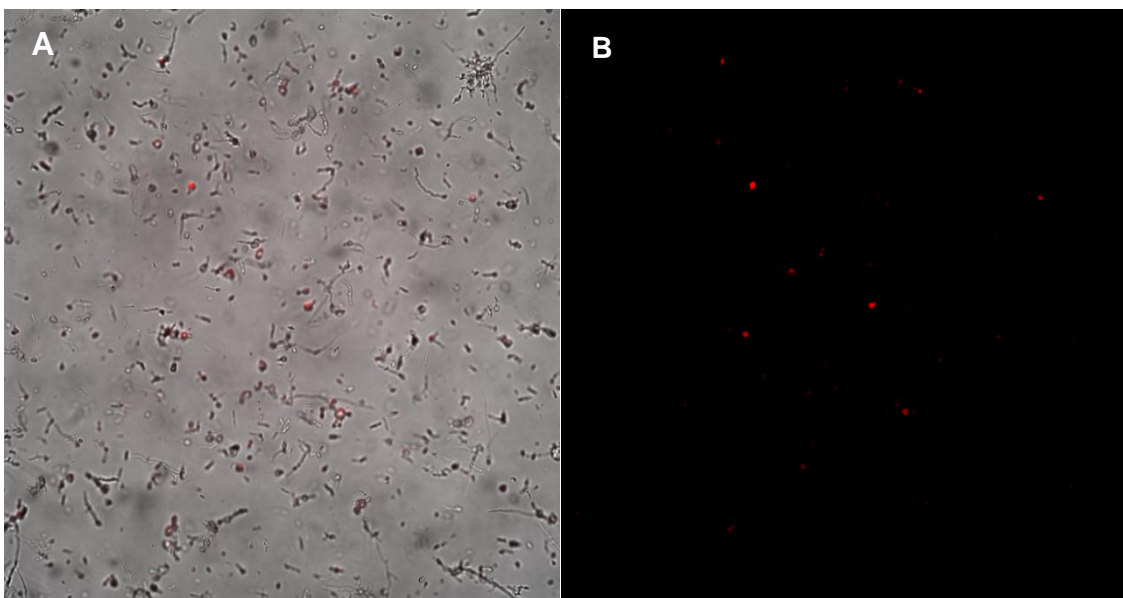


Figura 5: Imunofluorescência indireta de *P. brasiliensis* na fase miceliar (A). A figura B indica a expressão da proteína gp43. Microscopia de campo claro (A) e filtro Texas Red (B) por imunofluorescência com Alexa Fluor® 594 empregado para marcação do fungo.

4.2. PCR em tempo real

Para a reação de PCR em tempo real, foram utilizados oligonucleotídeos específicos para genes codificantes de proteínas diferencialmente expressas em *P. brasiliensis* e *P. lutzii*. As proteínas foram selecionadas primeiramente por pertencerem a grupos de proteínas essenciais para a via de produção de energia do fungo, adesão às células do hospedeiro e por serem classificadas potencialmente como fatores de virulência. Os resultados são expressos como médias e erro padrão de três repetições técnicas. O RNA foi isolado a partir da mistura de três experiências independentes. Valores ΔCT foram utilizados para análise estatística (Livak & Schmittgen 2001), utilizando gene rRNA de *Paracoccidioides* como o controle interno [* : $p < 0,05$ (ANOVA , teste de Tukey- Kramer)]. Na figura 6 estão representadas as curvas de dissociação representativas das amostras.

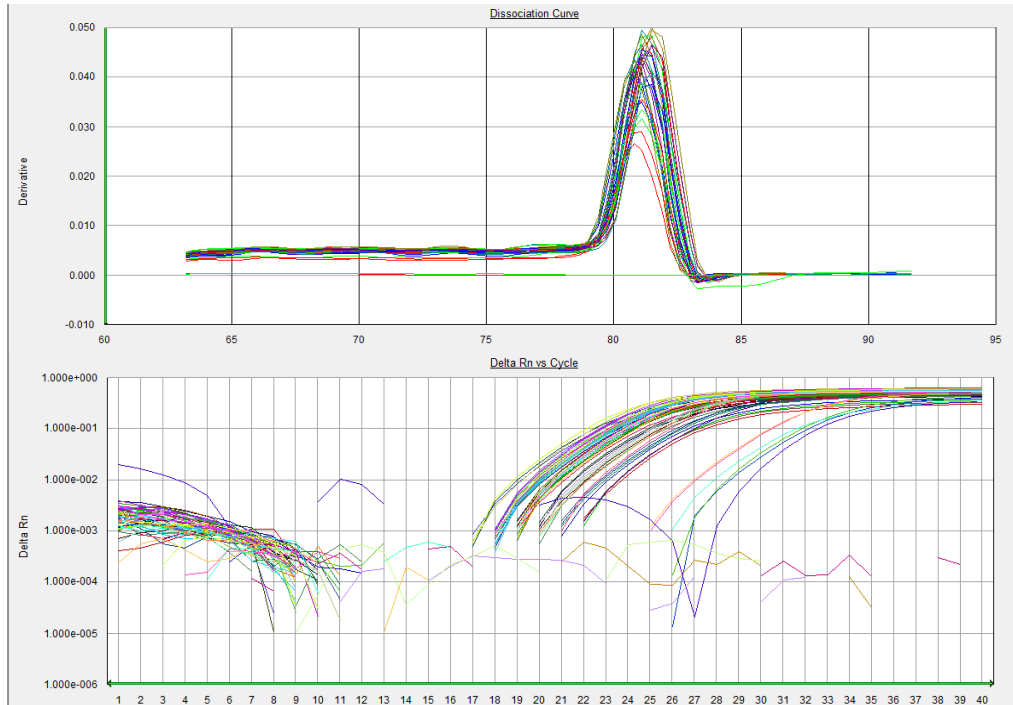


Figura 6: Curva de dissociação representativa das amostras.

4.3. PCR em tempo real de *P. brasiliensis* na fase miceliar e leveduriforme

A expressão relativa indica o número de vezes em que o gene foi variavelmente expresso em determinada situação. Nestes resultados pode-se observar que após o isolamento 18 de *P. brasiliensis* estar em contato com as células pulmonares e macrófagos, houve um aumento da expressão na maioria dos genes avaliados (figuras 7 a 13; quadro 1), sendo o gene da hemolisina (*Duf*) o único mais expresso na situação do fungo sem contato com os diferentes tipos celulares (figura 13).

Os resultados abaixo estão apresentados em gráficos para cada gene avaliado (Figuras 7 a 13). Todos os gráficos apresentam os resultados da PCR em tempo real para as seguintes situações: fase leveduriforme (FL), macrófagos infectados com *P. brasiliensis* na fase leveduriforme (FL+AMJ2-C11), células epiteliais pulmonares infectadas com *P. brasiliensis* na fase leveduriforme e na fase miceliar (FM), macrófagos infectados com *P. brasiliensis* na fase miceliar (AMJ2-C11+FM) e células leveduriformes infectadas com *P. brasiliensis* na fase miceliar (MRC-5+FM), para ambas as espécies de *Paracoccidioides*.

4.3.1. PCR em tempo real da expressão do gene gp43

A análise do resultado da PCR em tempo real mostrou que gp43 está presente na fase leveduriforme de Pb18 e na miceliar não houve expressão (figura 7). Nas situações do fungo em contato com os macrófagos e células epiteliais foi observada uma maior expressão na fase leveduriforme quando se compara com a fase miceliar e nesta condição uma maior expressão em macrófagos quando comparada à expressão nas células epiteliais pulmonares infectadas (figura 7). No caso de *P. lutzii*, não foi detectada a presença desta glicoproteína tanto na fase M e L do fungo. No entanto, expressão relativamente maior foi encontrada em células epiteliais quando infectadas com a fase miceliar. Deve-se destacar que a expressão foi 10 vezes menor do que em *P. brasiliensis*.

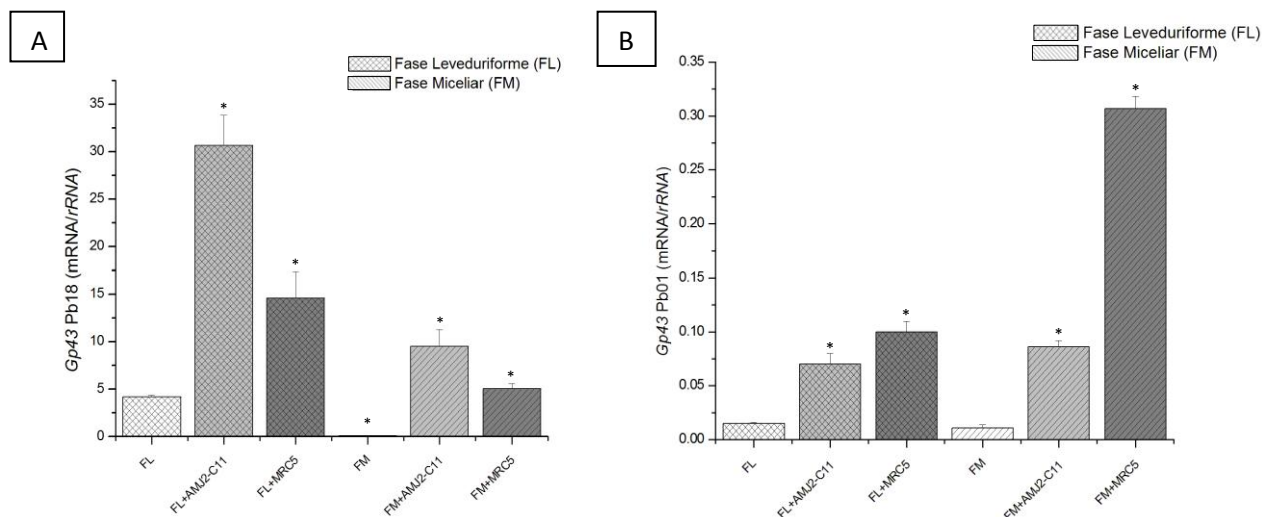


Figura 1: Gráfico da PCR em tempo real do fungo Pb18 na avaliação da expressão do gene gp43: fase leveduriforme (FL), macrófagos infectados (FL+AMJ2-C11), células pulmonares infectadas (FL+MRC-5), fase micelar (FM), macrófagos infectados (FM+AMJ2-C11) e células pulmonares infectadas (FM+MRC-5). Significância estatística: **(A)** * $p < 0,05$ quando comparados FL vs. FM; * $p < 0,05$ FL+AMJC-11 vs. FM+AMJ2C-11; * $p < 0,05$ FL+MRC-5 vs. FM+MRC-5 **(B)** * $p < 0,05$ quando comparados FL+AMJC-11 vs. FM+AMJ2C-11; $p < 0,05$ FL+MRC-5 vs. FM+MRC-5; (Anova).

4.3.2. PCR em tempo real da expressão do gene enolase

Os resultados da análise mostraram que na fase leveduriforme, a enolase foi mais expressa significativamente ($p < 0,05$) quando comparada à fase micelar do fungo. Nas situações em que os macrófagos foram infectados, tanto com as formas leveduriformes quanto com a micelar de *P. brasiliensis*, a expressão da enolase foi maior do que a expressão nas células epiteliais pulmonares infectadas. No entanto, quando se compara ambas as linhagens infectadas com as duas formas (FL com FM), a resposta não é significativa. Destaca-se o aumento significativo quando se compara a expressão no fungo tanto na fase L como na fase M isoladamente, com este na infecção ($p < 0,05$)

No fungo *P. lutzii*, a expressão da enolase foi baixa nas fases leveduriforme e micelar do fungo. A enolase foi mais expressa significativamente em ambas as situações de infecção na fase leveduriforme quando comparada a fase leveduriforme sem o contato com as células ($p < 0,05$). Também foi observado um aumento significativo na infecção de macrófagos com a fase M ($p < 0,05$).

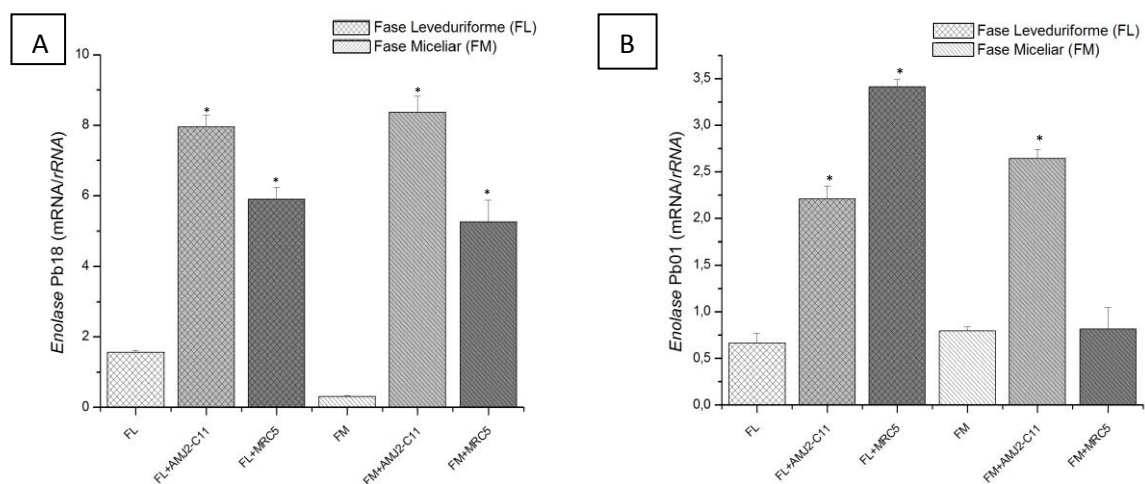


Figura 2: Gráfico da PCR em tempo real do fungo Pb18 (A) e do fungo P01 (B), avaliando a expressão do gene enolase: fase leveduriforme (FL), macrófagos infectados (FL+AMJ2-C11), células pulmonares infectadas (FL+MRC-5), fase miceliar (FM), macrófagos infectados (FM+AMJ2-C11) e células pulmonares infectadas. Significância estatística: **(A)** * $p < 0,05$ quando comparados FL+AMJC-11 e FL+MRC-5 vs. FL; **(B)** * $p < 0,05$ FM+AMJC-11 e FM+MRC-5 vs. FM; **(B)** * $p < 0,05$ FL+AMJC-11 e FL+MRC-5 vs. FL; * $p < 0,05$ FM+AMJC-11 vs. FM (Anova).

4.3.3. PCR em tempo real da expressão do gene fosfolipase

A expressão da fosfolipase de *P. brasiliensis* na fase leveduriforme foi menor comparada à expressão na fase miceliar ($p < 0,05$). A expressão gênica na infecção de macrófagos infectados com as formas leveduriformes foi significativamente maior quando comparada à infecção com a fase miceliar ($p < 0,05$). A expressão da fosfolipase em *P. lutzii* nas fases leveduriforme e miceliar foi semelhante e baixa. A maior expressão observada foi na situação em que os macrófagos foram infectados com as formas leveduriformes seguido pela infecção de macrófagos com o fungo na fase miceliar. As infecções das células epiteliais pulmonares foram as que apresentaram menor expressão da fosfolipase, tanto na fase miceliar, quanto na leveduriforme.

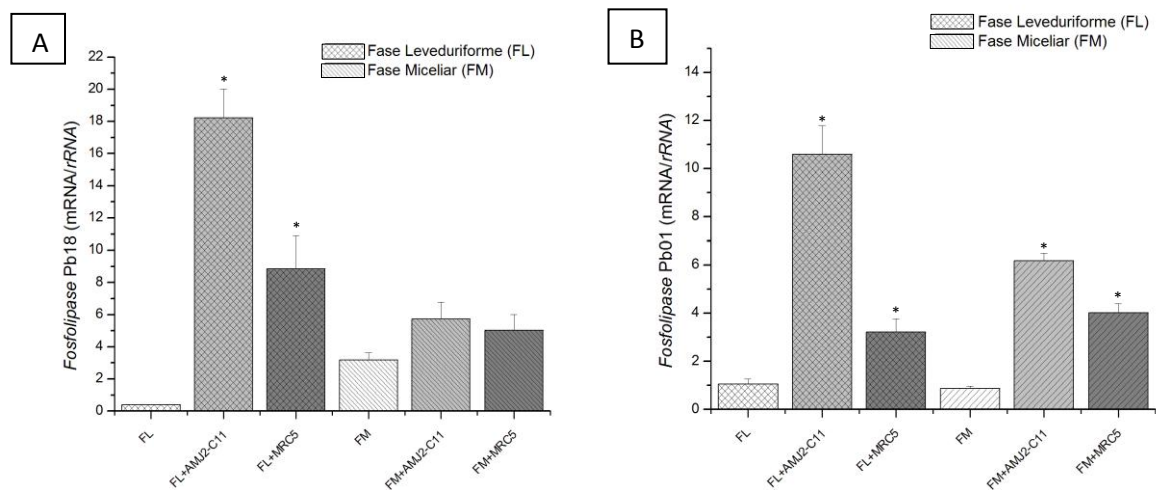


Figura 3: Gráfico da PCR em tempo real do fungo Pb18 (A) e do fungo P01 (B), avaliando a expressão do gene fosfolipase: fase leveduriforme (FL), macrófagos infectados (FL+AMJ2-C11), células pulmonares infectadas (FL+MRC-5), fase micelar (FM), macrófagos infectados (FM+AMJ2-C11) e células pulmonares infectadas (FM+MRC-5). Significância estatística: **(A)** *p<0,05 quando comparados FL+AMJC-11 vs. FM+AMJ2C-11; FL+MRC-5 vs. FM+MRC-5; **(B)** *p<0,05 quando comparados FL+AMJC-11 vs. FM+ AMJC-11; p<0,05 FL+ MRC-5 vs. FM +MRC-5; (Anova).

4.3.4. PCR em tempo real da expressão do gene aspartil protease

Na fase micelar do fungo Pb18, foi observada uma expressão significativamente maior de aspartil protease quando comparada à fase leveduriforme ($p < 0,05$). A expressão foi mais elevada na infecção de macrófagos infectados com as formas leveduriformes, porém a infecção de macrófagos com micélio apresentou alta expressão da enzima hidrolítica, quando comparada à expressão na infecção de células epiteliais pulmonares nas fases leveduriforme e micelar ($p < 0,05$).

A expressão da aspartil protease em P01 foi baixa na fase leveduriforme e a fase micelar foi a menos expressa. A maior expressão foi observada na infecção de células epiteliais pulmonares com o fungo na fase leveduriforme e na infecção de células epiteliais a expressão foi aproximadamente 50% menor na fase micelar. Em macrófagos infectados com leveduras a expressão foi maior do que os mesmos infectados com micélio.

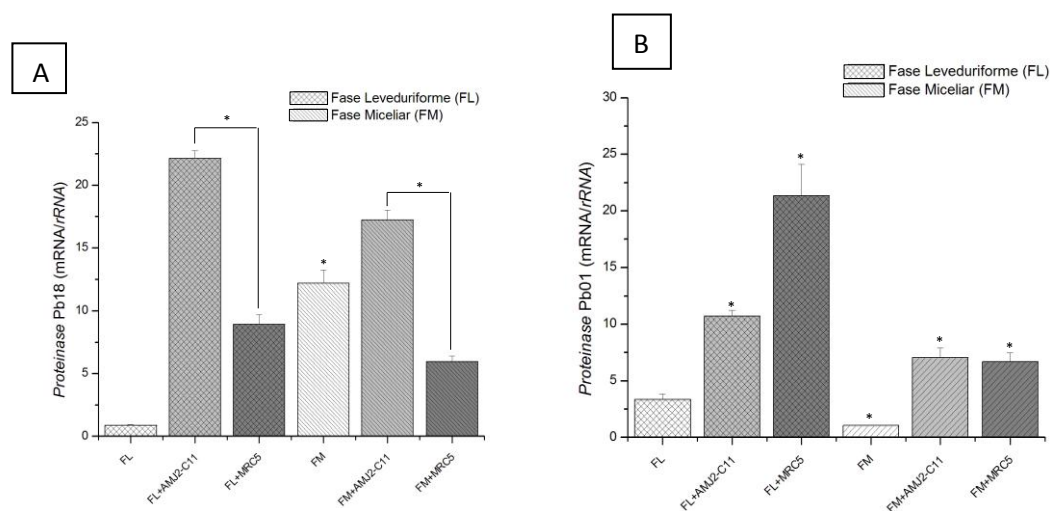


Figura 4: Gráfico da PCR em tempo real do fungo Pb18 (A) e do fungo P01 lutzii (B) avaliando a expressão do gene proteínase: fase leveduriforme (FL), macrófagos infectados (FL+AMJ2-C11), células pulmonares infectadas (FL+MRC-5), fase miceliana (FM), macrófagos infectados (FM+AMJ2-C11) e células pulmonares infectadas (FM+MRC-5). Significância estatística: **(A)** * $p < 0,05$ quando comparados FL vs. FM; FL+AMJ2-C11 vs. FM+AMJ2-C11; FL+MRC-5 vs. FM+MRC-5 **(B)** * $p < 0,05$ quando comparados FL vs. FM; FL+AMJ2-C11 vs. FM+AMJ2-C11; $p < 0,05$ FL+MRC-5 vs. FM+MRC-5; (Anova).

4.3.5. PCR em tempo real da expressão do gene GAPDH

A expressão de GAPDH no fungo nas fases leveduriforme e miceliana foi baixa quando comparadas com as situações em que as células foram infectadas com *P. brasiliensis*. A maior expressão foi observada quando as células epiteliais foram infectadas com as formas leveduriformes. Para esta mesma situação com macrófagos infectados a expressão de GAPDH foi mais baixa e nas situações em que ambas as células foram infectadas com o fungo na fase miceliana, a expressão foi semelhante.

GAPDH apresentou expressão basal em *P. lutzii* na fase leveduriforme e miceliana. Na infecção de macrófagos com as formas leveduriformes de *P. lutzii*, a expressão apresentou pouca diferença quando comparada a infecção de macrófagos com a fase miceliana do fungo. A maior expressão de GAPDH foi observada na infecção de células epiteliais pulmonares com a levedura e na situação de infecção com a fase miceliana a expressão foi a mais baixa em todas as situações.

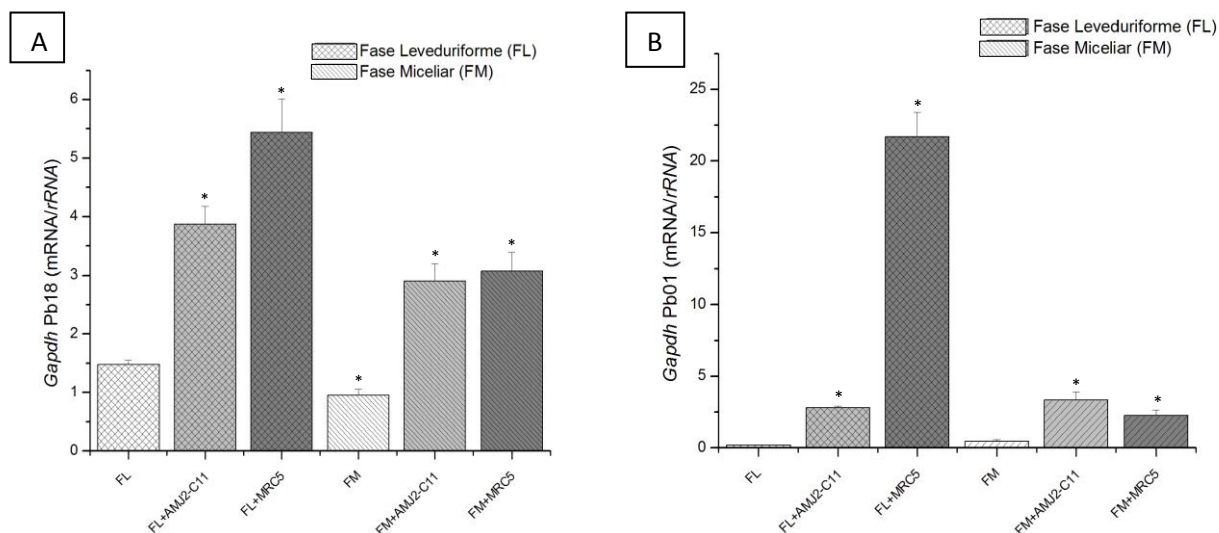


Figura 5: Gráfico da PCR em tempo real do fungo Pb18 (A) e do fungo P01 (B), avaliando a expressão do gene GAPDH: fase leveduriforme (FL), macrófagos infectados (FL+AMJ2-C11), células pulmonares infectadas (FL+MRC-5), fase miceliana (FM), macrófagos infectados (FM+AMJ2-C11) e células pulmonares infectadas (FM+MRC-5). Significância estatística: **(A)** * $p < 0,05$ quando comparados FL vs. FM; FL+AMJ2-C11 vs. FM+AMJ2-C11; FL+MRC-5 vs. FM+MRC-5 **(B)** * $p < 0,05$ quando comparados; FL+AMJ2-C11 vs. FM+AMJ2-C11; $p < 0,05$ FL+MRC-5 vs. FM+MRC-5; (Anova).

4.3.6. PCR em tempo real da expressão do gene 30kDa (14-3-3)

Os resultados da expressão da 14-3-3 no fungo Pb18 foram muito baixos em ambas as condições do fungo. A 14-3-3 foi altamente expressa quando macrófagos foram infectados com as formas leveduriformes de *P. brasiliensis* e na fase miceliana, a expressão foi 50% menor. A expressão da 14-3-3 na infecção com células epiteliais pulmonares em ambas as condições do fungo não apresentou diferença significativa. Esta proteína é que apresentou maior expressão relativa quando se compara com as outras avaliadas.

No fungo P01, os resultados obtidos na expressão gênica da 14-3-3 mostram que na fase leveduriforme do fungo a expressão foi muito baixa, comparada à expressão apresentada pelo fungo nas situações em que ele foi colocado em contato com as células fagocíticas e epiteliais. A expressão na fase miceliana do fungo foi baixa na situação em que o fungo não estava em contato com as células e na infecção de macrófagos a expressão da 14-3-3 foi maior do que a expressão em *P. lutzii* em contato com as células epiteliais pulmonares.

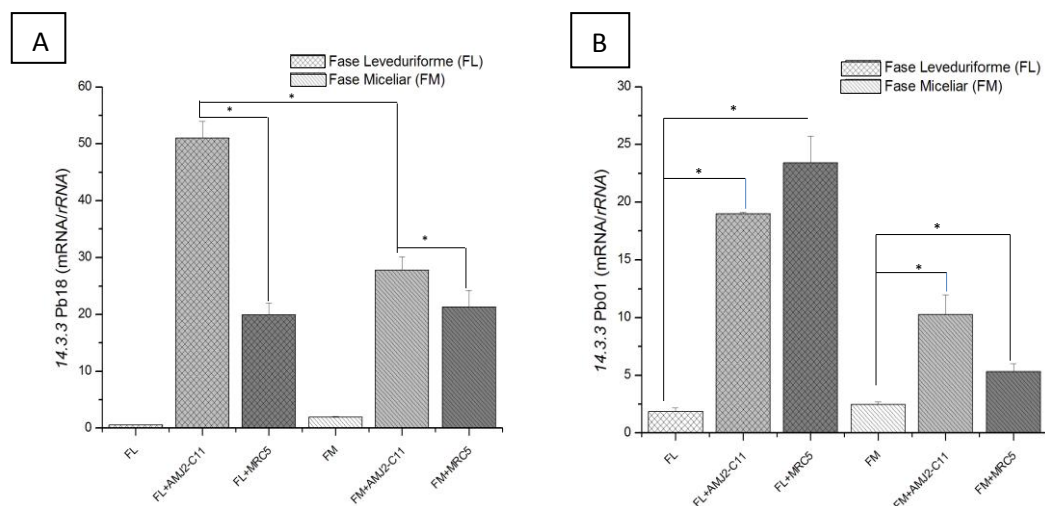


Figura 6: Gráfico da PCR em tempo real do fungo Pb18 (A) e do fungo P01 (B) avaliando a expressão do gene 30kDa (14-3-3): fase leveduriforme (FL), macrófagos infectados (FL+AMJ2-C11), células pulmonares infectadas (FL+MRC-5), fase micelilar (FM), macrófagos infectados (FM+AMJ2-C11) e células pulmonares infectadas (FM+MRC-5). Significância estatística: **(A)** * $p < 0,05$ quando comparados FL+AMJC-11 vs. FM+AMJ2C-11; FL+MRC-5 vs. FM+MRC-5 **(B)** * $p < 0,05$ quando comparados FL+AMJC-11 vs. FM+ AMJC-11; $p < 0,05$ FL+ MRC-5 vs. FM +MRC-5; (Anova)

4.3.7. PCR em tempo real da expressão do gene Duf (hemolisina)

A expressão do gene Duf foi maior que 50% na fase leveduriforme de *P. brasiliensis* quando comparada à expressão na fase micelilar. Nos resultados da expressão com macrófagos infectados na fase leveduriforme foi a que apresentou maior expressão gênica e nas células epiteliais infectadas a maior expressão foi observada na fase micelilar.

O gene Duf foi mais expresso na fase leveduriforme do fungo P01. Na situação em que as células fagocíticas foram infectadas com leveduras de *P. lutzii* a expressão também foi alta e Duf foi menos expresso em leveduras de *P. lutzii* quando foi colocado em contato com as células epiteliais pulmonares. Na avaliação da expressão do gene na fase micelilar de *P. lutzii*, a maior expressão do gene Duf foi do fungo em contato com os macrófagos, porém quando comparados os resultados observou-se que a expressão do gene na fase micelilar entre as situações não foi significativa.

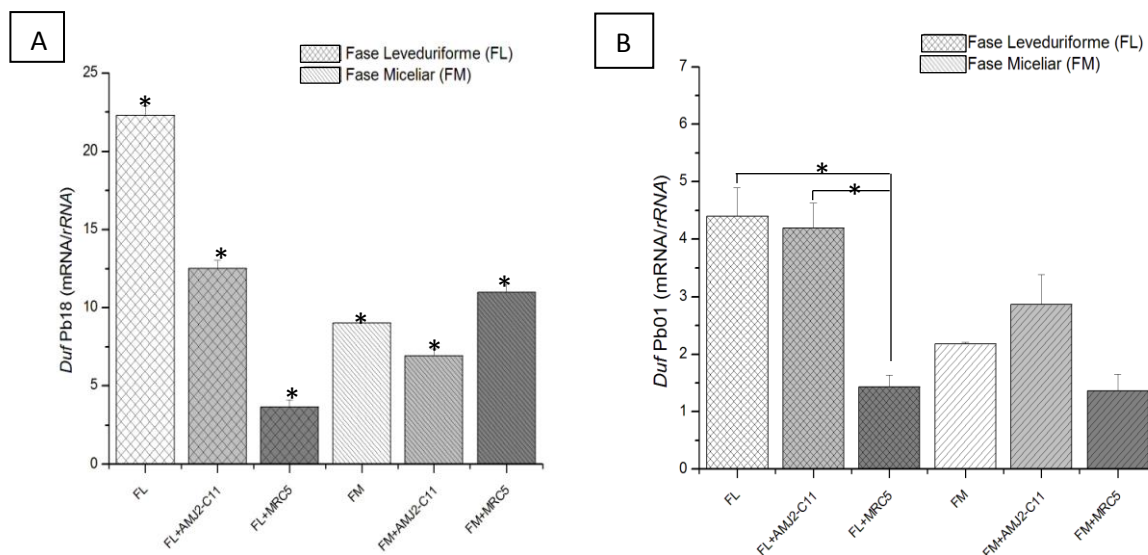


Figura 7: Gráfico da PCR em tempo real do fungo Pb18 (A) e do fungo P01 (B), avaliando a expressão do gene Duf (hemolisina): fase leveduriforme (FL), macrófagos infectados (FL+AMJ2-C11), células pulmonares infectadas (FL+MRC-5), fase miceliar (FM), macrófagos infectados (FM+AMJ2-C11) e células pulmonares infectadas (FM+MRC-5). Significância estatística: **(A)** * $p < 0,05$ quando comparados FL+AMJC-11 vs. FM+AMJ2C-11; FL+MRC-5 vs. FM+MRC-5; * $p < 0,05$ FL significativa quando comparadas a todas as situações. **(B)** * $p < 0,05$ quando comparados FL vs. FM; FL+AMJC-11 e FL+ MRC-5 vs. FL (Anova).

4.3.8. Resultado das análises da expressão gênica das espécies *Paracoccidioides*

Os quadros abaixo demonstram de forma simplificada os resultados da expressão de cada gene para cada situação testada para *P. brasiliensis* (quadro 1A) e para *P. lutzii* (quadro 1B)

Quadro 1: Resultado das análises da expressão gênica das situações testadas para ambas as espécies de *Paracoccidioides*.

<i>Paracoccidioides lutzii</i>						
A	Fase L	AMJ2- C11+FL	MRC- 5+FL	Fase M	AMJ2- C11+FM	MRC- 5+FM
gp 43	-	+	++	-	+	++++
enolase	+	+++	++++	-	++++	+
fosfolipase	-	++++	+	-	++	+
aspartil protease	+	++	++++	-	+	+
14.3.3	+	+++	++++	+	++	+
GAPDH	-	+	++++	-	+	+
Duf	++++	++++	+	++	+++	+

<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>						
B	Fase L	AMJ2- C11+FL	MRC- 5+FL	Fase M	AMJ2- C11+FM	MRC- 5+FM
gp 43	+	++++	++	-	++	+
enolase	+	++++	+++	-	++++	++
fosfolipas e	-	++++	++	+	+	+
aspartil protease	-	++++	++	+++	++++	+
14.3.3	-	++++	+	-	++	+
GAPDH	+	+++	++++	+	++	++
Duf	++++	++	+	++	+	++

Discussão

5. DISCUSSÃO

Paracoccidioides spp é um fungo dimórfico e apresenta as formas micelial e leveduriforme; e a transição dessas formas é essencial para que ocorra a PCM. Apesar disso, mecanismos moleculares que controlam essa transição ainda merecem atenção. No presente trabalho pode-se observar a diferença no perfil da expressão gênica de algumas moléculas descritas como antígeno e ou adesinas ou com características enzimas hidrolíticas ligadas a prováveis fatores de virulência das duas espécies de *Paracoccidioides* estudadas, em ambas as fases. A infecção de *P. brasiliensis* e *P. lutzii* aos diferentes tipos celulares pode auxiliar no melhor entendimento dos mecanismos envolvidos na PCM e o papel dos diferentes fatores de virulência deste fungo. Fatores de virulência são importantes para o estabelecimento de uma infecção por fungos invasivos, incluindo dimorfismo, a adesão às células hospedeiras, composição da parede celular e a produção de enzimas hidrolíticas como proteases, lipases, fosfolipases e hemolisinas (SAN-BLAS *et al.*, 2000, MENDES-GIANNINI *et al.*, 2004).

Considerando a patogênese da PCM, as fases iniciais são de grande importância, pois nessa fase os macrófagos pulmonares residentes interagem com o fungo pela primeira vez e podem ser ativados. Neste contexto, várias características têm sido propostas como fatores de virulência que permitem que o micro-organismo invasor possa causar infecções disseminadas em hospedeiros susceptíveis. A capacidade de reconhecer e aderir aos tecidos do hospedeiro e as secreções das enzimas hidrolíticas são importantes fatores de virulência, porém, a habilidade do fungo em aderir e invadir depende da virulência do isolado (HANNA *et al.*, 2000).

A gp43 é um componente da superfície celular, liberada pelo fungo em sua fase exponencial de crescimento, com atividade de proteinase em meio ácido; podendo ser processada e secretada através do retículo endoplasmático. Tem sido usada no diagnóstico da PCM, mostrando alta especificidade e sensibilidade (PUCCIA *et al.*, 1986; TRAVASSOS *et al.*, 1995; MENDES-GIANNINI *et al.*, 1989, 1990; SALINA *et al.*, 1998; STRAUSS *et al.*, 1996). A gp43 atua também como adesina, favorecendo a adesão de *P. brasiliensis* às células epiteliais do hospedeiro (MENDES-GIANNINI *et al.*,

2008), além de ser considerada o antígeno imunodominante em *P. brasiliensis*, reconhecida 100% nos anticorpos de pacientes (PUCCIA *et al.*, 1996; CAMARGO, 1993), sabe-se que pacientes infectados e com as formas graves de PCM mostram níveis elevados de anticorpos anti - gp43, que diminuem ao longo do tratamento da doença, na maioria dos casos (MENDES GIANNINI *et al.*, 1990, BLOTTA & CAMARGO 1993). Em nossos estudos, no ensaio de Imunofluorescência, gp43 marca adequadamente as células miceliares e leveduriformes, tanto do fungo isoladamente, destacando-se aparentemente maior presença de marcação na fase leveduriforme. Vicentini e colaboradores (1994) demonstraram que a gp43 secretada se liga aos anticorpos do hospedeiro, deixando a célula fúngica livre para agir em receptor de laminina da matriz extracelular. Assim, as células leveduriformes conseguem se ligar a laminina e tem aumentada sua habilidade para invadir e destruir tecidos infectados. Além disso, essa proteína parece ter atividade proteolítica sobre colágeno, elastina e caseína (MENDES-GIANNINI, 1990).

A gp43 secretada no ambiente do fungo ou na corrente sanguínea é processada pelas células dendríticas, ativando uma resposta Th1, ou também pelas células B, induzindo a ativação da resposta Th2 (ALMEIDA *et al.*, 1998; FERREIR; LOPES; ALMEIDA, 2003). Essa glicoproteína contém epítomos apresentados às células T e B, sugerindo que a resposta imunológica a estes epítomos pode ser relevante para a progressão da doença (TABORDA *et al.*, 1998), além de ser capaz de ativar a produção de anticorpos e induzir resposta imune celular experimentalmente e em pacientes com a doença benigna (SHIKANAI-YASUDA, 2003).

Em nosso trabalho foi observada a maior expressão da gp43 nos ensaios de macrófagos infectados com *P. brasiliensis*, na fase leveduriforme. Considerando que macrófagos são fundamentais no controle de infecções fúngicas, é pertinente a hipótese de que gp43 está envolvida em um mecanismo de evasão do fungo. Segundo Popi e colaboradores (2002), a gp43 prejudica a fagocitose de *P. brasiliensis* e também inibe a liberação de reativos intermediários de oxigênio e nitrogênio, envolvidos na atividade microbicida de macrófagos, considerando-se que o tratamento de macrófagos com a gp43 impediu a capacidade fungicida dessas células.

Nossos resultados com a cepa P01 de *P. lutzii* mostraram valores de expressão da gp43 significativamente baixos. Recentes estudos de Machado e colaboradores (2013) demonstraram através de ensaios de imunodifusão que há uma variação na taxa de produção da gp43 nos isolados das espécies S1, PS2 e PS3 e que *P. lutzii* tem, geralmente, uma expressão baixa da gp43, podendo este evento estar relacionado a eventuais alterações na região promotora do gene entre os isolados, além de interferências nos processos pós-transcrição, como por exemplo, silenciamento por RNA de interferência, podendo influenciar esta variabilidade.

A enolase é uma das enzimas citoplasmáticas mais abundantemente expressas em muitos organismos (PANCHOLI, 2001). Em células de mamíferos, já foram identificadas três isoformas de enolase, α -(ENO1), β -(ENO3) e γ -(ENO2). ENO1 é vastamente distribuída em uma variedade de tecidos, enquanto ENO2 e ENO3 são encontradas exclusivamente nos tecidos neuroendócrino e músculo, respectivamente (CHANG *et al.*, 2006). Além de sua função glicolítica, ENO1 já foi encontrada na superfície de monócitos e neutrófilos atuando como um receptor de plasminogênio, implicando num possível papel na invasão tecidual (REDLITZ *et al.*, 1995). A enolase já foi observada em várias doenças uma vez que anticorpos anti-enolase têm sido encontrados em condições autoimunes, incluindo a doença inflamatória de Bowel e o lúpus eritematoso discoide (YOUSEFI *et al.*, 2000).

A descrição de enolase como adesina foi feita em vários grupos de bactérias e são descritas como proteínas *moonlighting* (Henderson & Martin, 2013) e mais recentemente em *P. brasiliensis*. Donófrío *et al* em 2009 descreveram que a enolase tem capacidade de se ligar ao fibrinogênio do hospedeiro, o que facilitaria a disseminação do patógeno, estabelecendo o processo de infecção. Segundo Nogueira *et. al*, (2010) a enolase pode ser encontrada tanto no citosol quanto na superfície celular do fungo, além de estar relacionada com a virulência fúngica, aumentando a capacidade de colonizar e invadir tecidos do hospedeiro. Através da ligação ao receptor de plasminogênio, o fungo seria capaz de adquirir atividade proteolítica, pois a plasmina gerada é uma enzima chave do sistema plasminogênio e contribui para a degradação dos constituintes da matriz. A ligação ao plasminogênio e a

sua conversão à plasmina (uma serina protease) pode contribuir para a patogenicidade de *P. brasiliensis* por facilitar a invasão tecidual no hospedeiro.

O sistema plasminogênio (Plg) desempenha duas funções gerais na defesa do hospedeiro. Em primeiro lugar, ele participa da via central para a dissolução de coágulos de fibrina, que é essencial para a manutenção da homeostasia. Em segundo lugar, o sistema Plg facilita a migração celular por ajudar na penetração através de barreiras protéicas. Em condições fisiológicas, essa ativação é finamente regulada. Os ativadores do Plg são serina-proteases que catalisam a conversão do Plg à plasmina e foram classificados como sendo de dois tipos: ativador do Plg tipo tecidual (tPA) e ativador do Plg tipo uroquinase (uPA). A permeação através das membranas basais é um passo importante na patogênese de muitos microrganismos. Sendo assim, alguns patógenos podem adquirir a atividade proteolítica pela ligação do plasminogênio a sua superfície celular onde ele é ativado por um fator tecidual (tPA) ou do tipo uroquinase. Uma vez gerada o potencial proteolítico, através da plasmina, ela pode ser capaz de promover a disseminação de alguns microrganismos através da degradação de componentes da matriz celular do hospedeiro (Plow *et al.*, 1995; Coleman & Benach, 1999).

Nossos resultados mostraram que para ambas as espécies de *Paracoccidioides*, porém de maneira desigual, quando as células foram submetidas à infecção houve um aumento na expressão da enolase, evidenciando assim que esta pode estar potencialmente desempenhando um importante papel no estabelecimento da PCM, uma vez que a enolase tem sido descrita também como uma adesina. A expressão gênica da enolase aumentada na infecção em macrófagos poderia estar relacionada com o estresse do fungo na tentativa de evadir-se das células fagocíticas, na tentativa de evitar a fagocitose. Porém, o aumento da expressão da enolase em células epiteliais poderia indicar que essa enzima seria utilizada na adesão do fungo.

Outra enzima bastante importante e bem descrita em *P. brasiliensis* é a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), molécula chave da via glicolítica, desempenhando um papel crucial no catabolismo e anabolismo de carboidratos. Essa enzima é um homotetrâmero e catalisa a reação de oxidação da gliceraldeído 3-fosfato em 1,3 bifosfoglicerato, usando o NAD⁺ como coenzima (CHESTER *et al.*, 2005). Atualmente as enzimas da glicólise

de muitos organismos já foram cuidadosamente purificadas e estudadas, como por exemplo, a enzima gliceraldeído-3- fosfato desidrogenase de *P. brasiliensis* (BARBOSA *et al.*, 2004). GAPDH também é descrita como a principal proteína de superfície do grupo A de *Streptococcus pyogenes*, sendo relacionada com a virulência e patogênese. Assim como já relatado para *C. albicans*, a GAPDH, de *S.pyogenes* se liga a várias proteínas de mamíferos como: lisozima, fibronectina, actina, miosina e plasmina. Essa proteína (GAPDH) também ativa a tirosina quinase de células faríngeas humanas. O tratamento dessas células com inibidores de quinase inibe significativamente o poder de invasão deste patógeno no hospedeiro humano (PANCHOLI & FISCHETTI, 1997).

A habilidade de GAPDH de *C.albicans* de ligar-se às proteínas da matriz extracelular e conseqüentemente em estar associada ao estabelecimento da infecção tem sido descrita (GOZALBO *et al.*, 1998). A GAPDH foi também detectada na superfície celular de *C. albicans* presente em tecidos infectados, o que suporta a sugestão do papel da proteína na infecção, por ligação aos tecidos do hospedeiro. Crowwe *et al.*, 2003, analisaram o proteoma de *C. albicans* e indicaram que a GAPDH é uma proteína de superfície celular potencialmente ligadora ao plasminogênio, o que adicionada a outros fatores, aumenta a capacidade desse fungo na invasão e necrose tecidual. *Porphyromonas gingivalis* e *Streptococcus oralis* são micro-organismos que possuem como característica a invasão de células epiteliais de revestimento da mucosa, causando infecções e inflamações na cavidade oral. Foi descrito que a GAPDH desses micro-organismos atua como receptor dominante da matriz extracelular, o que tem contribuído para a colonização dessa bactéria no hospedeiro (MAEDA *et al.*, 2004; HAKIMUDDIN & GENCO, 2005,).

Além do seu papel no metabolismo de carboidratos e outras funções celulares como já citado, a enzima GAPDH tem sido descrita como antígeno em vários micro-organismos patogênicos, exercendo em alguns deles função protetora contra infecção em modelos experimentais (GOUDOT-CROZEL, 1989). Tallima *et al.* (TALLIMA *et al.*, 2003), demonstraram o potencial papel da GAPDH de *Schistosoma mansoni* como molécula antigênica, sendo forte candidata na incorporação de vacinas contra esquistossomose em humanos.

Barbosa *et al.* (2006), após realizarem experimentos de citolocalização (imunomicroscopia), verificaram que a GAPDH de *P. brasiliensis* além de estar

presente no citoplasma, onde desempenha funções relacionadas as reações metabólicas da via glicolítica, também está localizada na parede celular, onde provavelmente é receptora comum de proteínas da matriz extracelular, desempenhando papel crucial para a aderência de *P. brasiliensis* aos tecidos do hospedeiro. Foi demonstrado também que a presença da proteína recombinante, bem como do anticorpo policlonal anti-GAPDH, promove a inibição da adesão e invasão de *P. brasiliensis* em culturas de células *in vitro*. Nossos resultados demonstraram uma maior expressão do gene GAPDH na infecção de células epiteliais pulmonares para ambas as espécies. Esses resultados evidenciam o envolvimento da GAPDH no processo de adesão do fungo, sugerindo que a GAPDH provavelmente desempenha um papel no início do processo de colonização e disseminação do fungo nos tecidos do hospedeiro, contribuindo para o estabelecimento da doença (PANIAGO *et al.*, 2003). Na interação de macrófagos com as espécies de *Paracoccidioides*, GAPDH apresentou baixos níveis de expressão, uma vez que estas são as principais células do hospedeiro, capazes de regular a patogenicidade da PCM. A baixa expressão pode estar relacionada com a capacidade dos macrófagos em bloquear nutrientes necessários para o fungo e se um agente patogênico é incapaz de sintetizar, por exemplo, ácidos nucléicos e aminoácidos necessários para o crescimento, são improváveis a sua proliferação (TIRACH *et al.*, 2008). Rezende e colaboradores (2011), em análises proteômicas, observaram o aumento de varias enzimas da via glicolítica, entre elas a GAPDH, sugerindo que tanto a fermentação quanto a respiração estão preferencialmente expressas na fase leveduriforme, assim como em nossos resultados, que também apresentaram aumento da expressão gênica de GAPDH na fase leveduriforme, para ambas as espécies.

A invasão de *P. brasiliensis* afeta a estrutura do citoesqueleto das células epiteliais pulmonares e também de queratinócitos, interferindo em aspectos morfológicos da actina, tubulina e citoqueratina (MENDES-GIANNINI, HANNA *et al.*, 2004; PERES DA SILVA, *et al.*, 2011). Também foi verificado que a proteína de 30 kDa de *P. brasiliensis* (proteína 14-3-3) causa modificação estrutural de microfilamentos polimerizados de actina e citoqueratina, além de induzir apoptose durante o processo de interação às células epiteliais, mas o exato mecanismo de como esse processo acontece

permanece desconhecido (ANDREOTTI, MONTEIRO DA SILVA *et al.*, 2005; MENDES-GIANNINI, ANDREOTTI *et al.*, 2006).

A adesina de 30 kDa foi caracterizada através de sequenciamento de aminoácidos, mostrando que esta é uma proteína pertencente à família 14-3-3 de *P. brasiliensis* (ANDREOTTI, MONTEIRO DA SILVA *et al.*, 2005). Em geral, as proteínas 14-3-3 formam uma família altamente conservada de proteínas diméricas ácidas e receberam esta denominação em 1867 durante uma classificação sistemática de proteínas cerebrais, sendo que os números presentes no nome são baseados no fracionamento de coluna após cromatografia DEAE- celulose e sua mobilidade eletroforética (DELILLE, SEHNKE *et al.*, 2001). Durante os anos 60-70 acreditava-se que a família 14-3-3 estava limitada ao tecido nervoso e presente apenas entre os mamíferos, no entanto, as proteínas 14-3-3 foram encontradas praticamente em todos os eucariotos (VAN HEUSDEN, WENZEL *et al.*, 1992; VAN HEUSDEN, GRIFFITHS *et al.*, 1995) e em todos os tipos de tecido (DELILLE, SEHNKE *et al.*, 2001). Essas proteínas 14-3-3 podem interagir com mais de 200 outras proteínas, apresentando assim uma ampla gama de funções. As proteínas 14-3-3 exibem sequências bastante conservadas entre as espécies, o que indica um alto grau de conservação funcional (WANG E SHAKES, 1996). As proteínas 14-3-3 são um grupo de proteínas ácidas pequenas e altamente conservadas, que foram implicadas numa variedade de processos celulares em eucariotos (DARLING, YINGLING *et al.*, 2005; VAN HEUSDEN, 2009; OBSIL E OBSILOVA, 2011). Contudo, apesar de já observada a função dessas proteínas em apoptose, transdução de sinal, regulação do ciclo celular e transcrição, seu exato papel nesses processos permanece desconhecido (FU, SUBRAMANIAN *et al.*, 2000). Esse grupo de proteínas deve funcionar como acessórias em vários processos, atuar como determinantes específicos, que alteram a localização celular de outras proteínas com as quais interagem (VAN HEMERT *et al.*, 2001; DA SILVA *et al.*, 2013).

Estudos utilizando queratinócitos demonstraram que proteínas 14-3-3 são capazes de interagir com integrinas e modularem sua capacidade de sinalização do lado extracelular (SANTORO, GAUDINO *et al.*, 2003; WILKER E YAFFE, 2004; OH, JANG *et al.*, 2009). Além disso, esta interação induz desarranjos de hemidesmosomos na formação de contato focal, necessário

para migração das células. Estes achados sugerem que as proteínas 14-3-3 participam da sinalização mediada por integrinas, tanto intracelular como extracelularmente (Santoro, Gaudino *et al.*, 2003; Wilker e Yaffe, 2004; OH, JANG *et al.*, 2009). As leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *Schizosaccharomyces pombe* têm dois genes que codificam para proteínas 14-3-3, BMH1 e BMH2 e rad24 e rad25, respectivamente. Estas proteínas são essenciais nestas leveduras, como em eucariotos superiores, em que estas se ligam a numerosas outras envolvidas em uma variedade de processos celulares (VAN HEUSDEN E STEENSMA, 2006; BRUCKMANN, HENSBERGEN *et al.*, 2007). Além disso, o fungo filamentoso *Aspergillus nidulans* possui uma proteína com região conservada de alta homologia com 14-3-3 (artA) que previne a formação de septo. Entretanto, em vez de bloquear a septação, o aumento da expressão de artA causa grande demora na polarização dos conidióforos, sugerindo que essas proteínas tenham um importante papel na morfogênese da hifa (KRAUS, HOFMANN *ET AL.*, 2002; KIM, ISLAM *et al.*, 2011). Ainda, essa proteína também exerce um papel fundamental na infecção de *Escherichia coli* enteropatogênica, uma vez que este patógeno secretou uma adesina denominada intimina que recruta componentes das células hospedeiras para modificar a arquitetura celular e assim conseguir invadir estas células e se multiplicar dentro delas. Tir é a principal proteína efetora que é recrutada para a membrana plasmática das células eucarióticas onde esta atua como receptor para a adesina bacteriana. Entre as proteínas recrutadas para o local da adesão, também estão proteínas do citoesqueleto que contribuem para a formação de um pedestal. Foi demonstrado que uma proteína 14-3-3 se liga especificamente à Tir de maneira independente de fosforilação, e que a interação ocorre durante o processo de infecção (PATEL, CUMMINGS *et al.*, 2006).

A família de proteínas 14-3-3 é conhecida por participar na regulação e organização do citoesqueleto por ativação de Rho GTPases (JIN, SMITH *et al.*, 2004), atuando como mediadores em alterações do citoesqueleto via integrinas e desempenhando um papel importante na ativação de Cdc42 (Bialkowska, ZAFFRAN *et al.*, 2003). Assim, a hipótese de que *P. brasiliensis* estaria usando essa proteína como um importante fator de virulência durante a patogênese é reforçada e a proteína Pb14-3-3 estaria ativando proteínas do citoesqueleto

intracelular, resultando em alterações conformacionais da célula que poderia auxiliar no processo de invasão.

Nossos resultados estão de acordo com os de Andreotti e colaboradores (2005), em que a proteína 14-3-3 foi mais expressa em isolados mais virulentos de espécies de *Paracoccidioides*, neste caso a cepa 18 de *P. brasiliensis*, indicando que esta proteína pode contribuir para a virulência do patógeno.

Os dados obtidos nesse trabalho demonstram a diferença no perfil das duas espécies de *Paracoccidioides* estudadas, em ambas as fases. A infecção de *P. brasiliensis* e *P. lutzii* aos diferentes tipos celulares pode auxiliar no melhor entendimento dos mecanismos envolvidos na paracoccidiodomicose e o papel dos diferentes fatores de virulência deste fungo. Fatores de virulência em potencial podem ser expressos no estabelecimento de uma infecção por fungos invasivos. Entre estes se tem a capacidade de crescer em diferentes temperaturas-dimorfismo, a adesão às células hospedeiras, composição da parede celular e a produção de enzimas, por exemplo, proteases, lipases e fosfolipases (PLs) (SAN-BLAS *et al.* 2000, MENDES-GIANNINI *et al.* 2004).

Em nosso estudo pode-se verificar que a maior expressão da fosfolipase ocorreu durante a infecção dos macrófagos com o fungo na fase leveduriforme, para ambas as espécies de *Paracoccidioides*, porém a maior expressão foi observada na cepa 18 de *P. brasiliensis*, evidenciando que a secreção de enzimas, como a fosfolipase, tem sido proposta como uma das estratégias utilizadas por bactérias, parasitas e fungos patogênicos para a invasão dos tecidos do hospedeiro e o estabelecimento da infecção (GHANNOUM MA, 2000), o que explicaria a baixa expressão da fosfolipase na situação em que o fungo não está em contato com as células. O papel das fosfolipases extracelulares como potenciais fatores de virulência de fungos patogênicos, incluindo *C. albicans* (Mukherjee *et al.*, 2003; Ma *et al.*, 2008), *Cryptococcus neoformans* (Ganendren *et al.*, 2006; Cox *et al.*, 2001), e *Aspergillus fumigatus*, (Karkowska-Kuleta *et al.*, 2009), tem sido relatado, embora o mecanismo subjacente ainda tem que ser esclarecido. Atividades de fosfolipases extracelulares foram também detectadas em culturas *in vitro* de *P. brasiliensis* (ASSIS *et al.*, 1999) e tem sido postulada como um fator de virulência potencial para este agente patogênico por análise *in silico* (TAVARES *et al.*, 2005). As fosfolipases são enzimas ubíquas que estão

envolvidas em uma ampla gama de funções biológicas, tais como a homeostase da membrana, aquisição de nutrientes e a geração de moléculas bioativas. Estas enzimas são conhecidas por contribuir para a virulência bacteriana e fúngica através de uma variedade de diferentes interações com as células hospedeiras eucarióticas, (SCHMIEL *et al.*, 1999), e para modular a resposta imune inata e adquirida do hospedeiro por meio da geração de substâncias mensageiras, como o diacilglicerol (NOVERR *et al.*, 2003). Além disso, a fosfolipase mediada por interleucina - 8 (IL-8) induz a resposta inflamatória do hospedeiro (SCHMIEL *et al.*, 1999).

Estudos tem demonstrado a fosfolipase como um de fator de virulência determinante em *C. neoformans*, necessária para a iniciação da criptococose pulmonar intersticial, sendo importante para a ligação deste fungo às células epiteliais do pulmão humano, antes da sua internalização, sendo o gene CnPLB1, uma enzima multifuncional que pode degradar a dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), o principal componente tensoativo dos pulmões (Chen *et al.*, 2000). Tavares e colaboradores (2007) relataram em estudos anteriores, a expressão diferencial de genes Fosfolipase B (PLB) na transição micélio-levedura em *P. brasiliensis* além da importância da PLB em ligação e internalização de levedura em superfícies de macrófagos.

Outro fator de virulência abordado nesse estudo foi a aspartil protease, uma vez que, proteases de várias famílias têm sido associadas à virulência em patógenos humanos. Aspartil proteases são um grupo de peptidases que apresentam um sítio catalítico conservado, tem preferência por clivagem de aminoácidos hidrofóbicos e possuem um pH ideal de ação ácido (TANG & WONG, 1987)

Em *C. albicans* as aspartil proteases secretadas são detectadas em sobrenadantes de cultura e são associadas a danos teciduais no epitélio vaginal, facilitando a invasão e a disseminação no hospedeiro (SCHALLER *et al.*, 2003). Exposição de *C. albicans* a agentes antifúngicos aumenta a expressão de SAP (LIAN & LIU, 2007), sugerindo sua indução ser um mecanismo de defesa relacionada ao estresse. Em *C. neoformans* foram identificadas, através de análises proteômicas, proteases secretadas e associadas à parede, capazes de clivar citosinas e componentes da matriz

extracelular, evento este relacionado à virulência do fungo (EIGENHEER *et al.*, 2007).

Poucas proteases foram caracterizadas em *P. brasiliensis* (PARENTE *et al.*, 2010). Um gene codificante para uma ClpB protease foi identificado através do rastreamento de biblioteca genômica de *P. brasiliensis*, e através da técnica de *Northern blot* foi demonstrado que o transcrito desta chaperonina é expresso preferencialmente na fase leveduriforme de *P. brasiliensis* (JESUÍNO *et al.*, 2002).

Aspartil proteases constituem uma das quatro super-famílias de enzimas proteolíticas que mostram ótima atividade em pH ácido. Elas são geralmente semelhantes à pepsina, que é totalmente inibida por pepstatina e mostram especificidade preferencial para clivagem de ligações peptídicas entre resíduos de aminoácidos hidrofóbicos (Tang *et al.*, 1997; Tacco *et al.*, 2009).

Proteases extracelulares de fungos patogênicos possuem um número de funções especializadas durante o processo de infecção, além de digerir moléculas para aquisição de nutrientes. *Candida albicans* possui uma família multigene aspartil protease secretada (SAP), com pelo menos 10 membros identificados (Naglik *et al.*, 2003). Exposição de *C. albicans* a agentes antifúngicos aumenta a expressão de SAP4 - 6, sugerindo que sua indução poderia estar relacionada ao mecanismo de estresse em *C. albicans* (Barelle *et al.*, 2008). *Aspergillus fumigatus*, secreta uma aspartil protease (aspergilopepsina) em grandes quantidades durante a infecção pulmonar em camundongos (Lee *et al.*, 1995). Uma aspartil protease associada com a parede da célula foi detectada em *Coccidioides posadasii* e a proteína recombinante foi relatada como uma candidata para uma nova vacina (Tarcha *et al.*, 2006).

Nas fases leveduriforme e micelial de *P. brasiliensis*, foram detectados em bibliotecas de cDNAs transcritos codificantes de proteases (FELIPE *et al.*, 2005). A primeira aspartil protease de *P. brasiliensis* foi caracterizada por Tacco e colaboradores em 2009. Um total de 53 ORF que codificam proteases dependentes e independentes de energia em *P. brasiliensis* foi descrita. As proteases foram classificadas de acordo com os domínios presentes nos sítios ativos como: aspartil, cisteína, serina, metalo proteases e subunidades do proteassoma (PARENTE *et al.*, 2005; PARENTE *et al.*, 2010).

Em nossos estudos, analisamos a expressão gênica da aspartil protease e pudemos observar que essa enzima de *P. brasiliensis* mostrou-se diferencialmente expressa na infecção com macrófagos, com uma maior expressão na fase leveduriforme demonstrando assim que o aumento dessa enzima poderia estar relacionado a danos celulares. Parente e colaboradores (2010) estudaram uma serina protease e demonstraram que a expressão do transcrito codificante é induzida durante a internalização de células leveduriformes de *P. brasiliensis* em macrófagos.

Outro fator de virulência de fungos patogênicos avaliado neste estudo foi a expressão do gene *Duf*. Em vários eucariotos e procariotos esse gene está relacionado à produção de hemolisina, porém em *P. brasiliensis* esse gene é hipotético. A hemolisina é vastamente descrita na literatura para espécies de *Candida*. Neste aspecto, a atividade hemolítica é considerada um fator de virulência que contribui para a disseminação da candidíase. O fator hemolítico secretado por *C. albicans* provoca a liberação de hemoglobina, que depois é usado como uma fonte de ferro pela levedura (WATANABE, *et al.*, 1997; SARDI *et al.*, 2012).

Nossos resultados mostraram que a cepa 18 de *P. brasiliensis* apresentou uma alta expressão gênica do gene *Duf* na fase leveduriforme, porém nas células infectadas com *P. brasiliensis* a expressão foi reduzida. Na cepa 01 de *P. lutzii* a expressão, apesar de ter sido baixa, provavelmente pela menor virulência do fungo, foi bem semelhante na fase leveduriforme e na infecção dos macrófagos. Apesar desses resultados, a função desse gene em *P. brasiliensis* ainda é indefinida, sendo necessários mais estudos.

Este trabalho veio colaborar com mais dados sobre a interação fungo/célula das fases micelial e leveduriforme de espécies de *Paracoccidioides* nos estudos de virulência desse fungo.

Conclusões

6. CONCLUSÕES

A luz dos objetivos deste trabalho pode-se concluir que:

- A análise dos genes expressos em *P. brasiliensis* e *P. lutzii* sem contato com as células apresentou-se baixa tanto na fase leveduriforme quanto na miceliar, com exceção do gene Duf que foi mais expresso na fase leveduriforme, em ambas as espécies.
- A expressão gênica das adesinas e enzimas hidrolíticas aqui estudadas demonstraram diferenças quando comparadas as espécies *P. brasiliensis* e *P. lutzii*.
- Quando comparadas as fases leveduriforme das duas espécies, foi possível observar que *P. brasiliensis* possui aumento da expressão das adesinas e uma ligeira redução das enzimas fosfolipase e aspartil protease, e 14-3-3, inversamente do que ocorre com *P.lutzii*.
- O comparativo da expressão nas espécies de *Paracoccidioides* em contato com macrófagos mostrou que os genes foram mais expressos em *P. brasiliensis* e somente para GAPDH em ambas as espécies, a expressão foi semelhante, tanto na fase leveduriforme, quanto na fase miceliar;
- A interação de macrófagos com células leveduriformes de *P. brasiliensis* e *P. lutzii* por 6 horas promoveu um aumento na expressão da maioria dos genes analisados, bem como na interação com a fase miceliar. Assim como o contato com as células epiteliais pulmonares por 5 horas promoveu um aumento na expressão dos mesmos genes analisados para ambas as espécies.
- A enzima hidrolítica fosfolipase foi mais expressa na interação de células leveduriformes com células fagocíticas, em ambas as espécies de *Paracoccidioides*.

- Aspartil protease foi mais expressa na interação de *P. brasiliensis* com macrófagos e na interação de células epiteliais pulmonares com *P. lutzii* quando na fase leveduriforme.
- Os dados em conjunto mostram que os genes analisados podem ser mais expressos na interação fungo-célula e, portanto podem ser potencialmente envolvidos na patogênese da paracoccidiodomicose.

Referências

7. Referências

ABREU E SILVA, M.A.; SALUM, F.G.; FIGUEIREDO, M.A.; CHERUBINI, K. Important aspects of oral paracoccidioidomycosis--a literature review. **Mycoses**, v.56, n.3, p. 189-199, 2013.

ACORCI, M.J.; DIAS-MELICIO, L.A.; GOLIM, M.A.; BORDON-GRACIANI, A.P.; PERAÇOLI, M.T.; SOARES, A.M. Inhibition of human neutrophil apoptosis by *Paracoccidioides brasiliensis*: role of interleukin-8. **Scand. J. Immunol.**, v.69, n.2, p.73-79, 2009.

ANDREOTTI, P.F.; MONTEIRO DA SILVA, J.L.; BAILÃO, A.M.; SOARES, C.M.; BERNARD, G.; SOARES, C.P.; MENDES-GIANINNI, M.J. Isolation and partial characterization of a 30 kDa adhesin from *Paracoccidioides brasiliensis*. **Microbes Infect.**, v. 5, p. 875-881, 2005.

ASSIS, C.M.; GAMBALE, W.; PAULA, C.R. Production of proteinase and phospholipase by *Paracoccidioides brasiliensis*. **Mycopathologia**, v.146, p.13-17, 1999.

BAGAGLI, E. BOSCO, S.M.; FRANCO, M. Phylogenetic and evolutionary aspects of *Paracoccidioides brasiliensis* reveal a long coexistence with animal hosts that explain several biological features of the pathogen. **Infect. Genet. Evol.**, v. 6, n. 5, p. 344-351, 2006.

BAILÃO, A.M.; NOGUEIRA, S.V.; RONDON CAIXETA BONFIM, S.M.; DE CASTRO, K.P.; DE FÁTIMA DA SILVA, J.; MENDES GIANNINI, M.J.; PEREIRA, M.; DE ALMEIDA SOARES, C.M. Comparative transcriptome analysis of *Paracoccidioides brasiliensis* during in vitro adhesion to type I collagen and fibronectin: identification of potential adhesins. **Res. Microbiol.**, v.163, n.3, p.182-191, 2012.

BARBOSA, M.S.; BAO, S.N.; ANDREOTTI, P.F.; DE FARIA, F.P.; FELIPE, M.S.; DOS SANTOS FEITOSA, L.; MENDES-GIANNINI, M.J.; SOARES, C.M. 100 Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Paracoccidioides brasiliensis* is a cell surface protein involved in fungal adhesion to extracellular matrix proteins and interaction with cells. **Infect. Immun.**, v. 74, p. 382-389, 2006.

BARELLE, C.J.; DUNCAN, V.M.; BROWN, A.J.; GOW, N.A.; ODDS, F.C. Azole antifungals induce up-regulation of SAP4, SAP5 and SAP6 secreted proteinase genes in filamentous *Candida albicans* cells in vitro and in vivo. **J. Antimicrob. Chemother.**, v.61, n.2, p.315-322, 2008.

BARROZO, L.V.; MENDES, R.P.; MARQUES, S.A.; BENARD, G.; SILVA, M.E.; BAGAGLI, E. Climate and acute/subacute paracoccidioidomycosis in a hyper-endemic area in Brazil. **Int. J. Epidemiol.**, v.38, v.6, p.1642-1649, 2009.

BENARD, G. An overview of the immunopathology of human paracoccidioidomycosis. **Mycopathologia**, v.165, v.4-5, p.209-221, 2008.

BENARD, G.; MENDES GIANNINI, M. J. **Textbook of pediatric infectious diseases: paracoccidioidomycosis**. 6th ed. Philadelphia: Saunders-Elsevier, 2009. p.2762-2776.

BIALKOWSKA, K.; ZAFFRAN, Y.; MEYER, S.C.; FOX, J.E. 14-3-3 zeta mediates integrin-induced activation of Cdc42 and Rac. Platelet glycoprotein Ib-IX regulates integrin-induced signaling by sequestering 14-3-3 zeta. **J. Biol. Chem.**, v. 278, n.35, p. 33342-33350, 2003.

BITTENCOURT, J. I. M.; OLIVEIRA, R. M.; COUTINHO, Z. F. Paracoccidioidomycosis in the State of Paraná, Brazil, 1980/1998. **Cad. Saúde Pública**, v. 21, n. 6, p. 1856-1864, 2005.

BLOTTA, M.H.; CAMARGO, Z.P. Immunological response to cell-free antigens of *Paracoccidioides brasiliensis*: relationship with clinical forms of paracoccidioidomycosis. **J. Clin. Microbiol.**, v.31, n.3, p.671-676, 1993.

BRUCKMANN, A.; HENSBERGEN, P.J.; BALOG, C.I.; DEELDER, A.M.; DE STEENSMA, H.Y.; VAN HEUSDEN, G.P. Post-transcriptional control of the *Saccharomyces cerevisiae* proteome by 14-3-3 proteins. **J. Proteome Res.**, v. 6, n. 5, p. 1689-99, 2007.

BRUMMER, E.; CASTANEDA, E.; RESTREPO, A. Paracoccidioidomycosis: an update. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.6, p.89-117, 1993.

CARRERO, L.L.; NIÑO-VEGA, G.; TEIXEIRA, M.M.; CARVALHO, M.J.; SOARES, C.M.; PEREIRA, M.; JESUINO, R.S.; MCEWEN, J.G.; MENDOZA, L.; TAYLOR, J.W.; FELIPE, M.S.; SAN-BLAS, G. New *Paracoccidioides brasiliensis* isolate reveals unexpected genomic variability in this human pathogen. **Fungal Genet. Biol.**, v.45, n.5, p.605-612, 2008.

CASTRO, N.S.; MAIA, Z.A.; PEREIRA, M.; SOARES, C.M. Screening for glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins in the *Paracoccidioides brasiliensis* transcriptome. **Genet. Mol. Res.**, v.4, n.2, p.326-345, 2005.

CHANG, G.C.; LIU, K.J.; HSIEH, C.L.; HU, T.S.; CHAROENFUPRASERT, S.; LIU, H.K.; LUH, K.T.; HSU, L.H.; WU, C.W.; TING, C.C.; CHEN, C.Y.; CHEN, K.C.; YANG, T.Y.; CHOU, T.Y.; WANG, W.H.; WHANG-PENG, J.; SHIH, N.Y. Identification of alpha-enolase as an autoantigen in lung cancer: its

overexpression is associated with clinical outcomes. **Clin. Cancer Res.**, v.12, n.19, p.5746-5654, 2006.

CHEN, D.; JANGANAN, T.K.; CHEN, G.; MARQUES, E.R.; KRESS, M.R.; GOLDMAN, G.H.; WALMSLEY, A.R.; BORGES-WALMSLEY, M.I. The cAMP pathway is important for controlling the morphological switch to the pathogenic yeast form of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Mol. Microbiol.**, v.65, n.3, p.761-779, 2007.

CHESTER, E.; RODRIGUEZ, C.E.; FUKUTO, J.M.; TAGUCHI, K.; FROINES, J.; CHO, A.K. The interactions of 9,10-phenanthrenequinone with glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), a potential site for toxic actions. **Chem. Biol. Interact.**, v. 155, p.96-110, 2005.

COLEMAN, J.L.; BENACH, J.L. Use of the plasminogen activation system by microorganisms. **J. Lab. Clin. Med.**, v.134, n.6, p.567-576, 1999.

COUTINHO, Z.F.; SILVA, D.; LAZERA, M.; PETRI, V.; OLIVEIRA, R.M. Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980-1995). **Cad. Saúde Pública**, v.18, n. 5, p.1441-1454, 2002.

COX, G.M.; MCDADE, H.C.; CHEN, S.C.; TUCKER, S.C.; GOTTFREDSSON, M.; WRIGHT, L.C.; SORRELL, T.C.; LEIDICH, S.D.; CASADEVALL, A.; GHANNOUM, M.A.; PERFECT, J.R. Extracellular phospholipase activity is a virulence factor for *Cryptococcus neoformans*. **Mol. Microbiol.**, v.39, p.166-175, 2001.

CROWE, J.D.; SIEVWRIGHT, I.K.; AULD, G.C.; MOORE, N.R.; GOW, N.A.; BOOTH, N.A. *Candida albicans* binds human plasminogen: identification of eight plasminogen-binding proteins. **Mol. Microbiol.**, v. 47, n.6, p. 1637-1651, 2003.

DA SILVA, J. F.; OLIVEIRA, H.C.; MARCOS, C.M.; SILVA, R.A.; COSTA, T.A.; CALICH, V.L.; ALMEIDA, A.M.; MENDES-GIANNINI, M.J. *Paracoccidioides brasiliensis* 30 kDa adhesin: identification as a 14-3-3 protein, cloning and subcellular localization in infection models. **PLoS One**, v.8, n.4, p. e62533, 2013.

DA SILVA, S.P.; BORGES-WALMSLEY, M.I.; PEREIRA, I.S.; SOARES, C.M.; WALMSLEY, A.R.; FELIPE, M.S. Differential expression of an hsp70 gene during transition from the mycelial to the infective yeast form of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **Mol. Microbiol.**, v.31, n. 4, p.1039-1050, 1999.

DAHER, B.S.; VENANCIO, E.J.; DE FREITAS, S.M.; BÁO, S.N.; VIANNEY, P.V.; ANDRADE, R.V.; DANTAS, A.S.; SOARES, C.M.; SILVA-PEREIRA, I.; FELIPE, M.S. The highly expressed yeast gene pby20 from *Paracoccidioides*

brasiliensis encodes a flavodoxin-like protein. **Fungal Genet. Biol.**, v.42, n.5, p.434-443, 2005.

DARLING, D. L.; YINGLING, J.; WYNshaw-BORIS, A. Role of 14-3-3 proteins in eukaryotic signaling and development. **Curr. Top. Dev. Biol.**, v. 68, p. 281-315, 2005.

DE ALMEIDA, S.R.; DE MORAES, J.Z.; DE CAMARGO, Z.P.; GESZTESI, J.L.; MARIANO, M.; LOPES, J.D. Pattern of immune response to GP43 from *Paracoccidioides brasiliensis* in susceptible and resistant mice is influenced by antigen-presenting cells. **Cell Immunol.**, v.190, n.1, p.68-76, 1998.

DE BRITO, T.; FURTADO J.S.; CASTRO, R.M.; MANINI, M. Intraepithelial parasitism as an infection mechanism in human paracoccidioidomycosis (South American blastomycosis). **Virchows Arch. A Pathol. Pathol. Anat.**, v.361, n.2, p.129-138, 1973.

DONOFRIO, F.C.; CALIL, A.C.; MIRANDA, E.T.; ALMEIDA, A.M.; BENARD, G.; SOARES, C.P.; VELOSO, S.N.; SOARES, C.M.; MENDES GIANNINI, M.J. Enolase from *Paracoccidioides brasiliensis*: isolation and identification as a fibronectin-binding protein. **J. Med. Microbiol.**, v.58, pte. 6, p.706-713, 2009.

EIGENHEER, R.A.; JIN LEE, Y.; BLUMWALD, E.; PHINNEY, B.S.; GELLI, A. Extracellular glycosylphosphatidylinositol-anchored mannoproteins and proteases of *Cryptococcus neoformans*. **FEMS Yeast Res.**, v.7, n.4, p.499-510, 2007.

FELIPE, M.S.S.; ANDRADE, R.V.; ARRAES, F.B.; NICOLA, A.M.; MARANHÃO, A.Q.; TORRES, F.A.; SILVA-PEREIRA, I.; POCAS-FONSECA, M. J.; CAMPOS, E.G.; MORAES, L.M.; ANDRADE, P.A.; TAVARES, A.H.; SILVA, S.S.; KYAW, C.M.; SOUZA, D.P.; PEREIRA, M.; JESUINO, R.S.; ANDRADE, E.V.; PARENTE, J.A.; OLIVEIRA, G.S.; BARBOSA, M.S.; MARTINS, N.F.; FACHIN, A.L.; CARDOSO, R.S.; PASSOS, G.A.; ALMEIDA, N.F.; WALTER, M.E.; SOARES, C.M.A.; CARVALHO, M.J.; BRIGIDO, M.M. Pangenome network. Transcriptional profiles of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* in mycelium and yeast cells. **J. Biol. Chem.**, v. 280, p. 24706-24714, 2005.

FERREIRA, K.S.; LOPES, J.D.; ALMEIDA, S.R. Regulation of T helper cell differentiation in vivo by GP43 from *Paracoccidioides brasiliensis* provided by different antigen-presenting cells. **Scand. J. Immunol.**, v.58, n.3, p.290-297, 2003.

FRANCO, M. F. Host parasite relationship in paracoccidioidomycosis. **J. Med. Trop.**, v. 20, p. 32, 1987.

FU, H.; SUBRAMANIAN, R. R.; MASTERS, S. C. 14-3-3 proteins: structure, function, and regulation. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 40, p. 617-647, 2000.

GANENDREN, R.; CARTER, E.; SORRELL, T.; WIDMER, F.; WRIGHT, L. Phospholipase B activity enhances adhesion of *Cryptococcus neoformans* to a human lung epithelial cell line. **Microbes Infect.**, v.8, n.4, p.1006-1015, 2006.

GHANNOUM, M.A. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.13, n.1, p.122-143, 2000.

GOUDOT-CROZEL, V.; CAILLOL, D.; DJABALI, M.; DESSEIN, A.J. The major parasite surface antigen associated with human resistance to schistosomiasis is a 37-kD glyceraldehyde-3P-dehydrogenase. **J. Exp. Med.**, v.170, n.6, p.2065-2080, 1989.

GOZALBO, D.; GIL-NAVARRO, I.; AZORÍN, I.; RENAU-PIQUERAS, J.; MARTÍNEZ, J.P.; GIL, M.L. The cell wall-associated glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Candida albicans* is also a fibronectin and laminin binding protein. **Infect. Immun.**, v. 66, n.5, p. 2052-2059, 1998.

HANNA, S.A.; MONTEIRO DA SILVA, J.L.; GIANNINI, M.J. Adherence and intracellular parasitism of *Paracoccidioides brasiliensis* in Vero cells. **Microbes Infect.**, v.2, n.8, p.877-884, 2000.

HENDERSON, B.; MARTIN, A. Bacterial moonlighting proteins and bacterial virulence. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.**, v.358, p.155-213, 2013.

HERNANDEZ, O.; GARCIA, A.M.; ALMEIDA, A.J.; TAMAYO, D.; GONZALEZ, A.; RESTREPO, A.; MCEWEN, J.G. Gene expression during activation of *Paracoccidioides brasiliensis* conidia. **Yeast**, v.28, n.11, p.771-781, 2011.

JESUINO, R.S.; AZEVEDO, M.O.; FELIPE, M.S.; PEREIRA, M.; DE ALMEIDA SOARES, C.M. Characterization of a chaperone ClpB homologue of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Yeast**, v.19, n.11, p.963-972, 2002.

JIN, J. ; SMITH, F.D.; STARK, C.; WELLS, C.D.; FAWCETT, J.P.; KULKARNI, S.; METALNIKOV, P.; O'DONNELL, P.; TAYLOR, P.; TAYLOR, L.; ZOUGMAN, A.; WOODGELT, J.R.; LANGE BERG, L.K.; SCOTT, J.D.; PAWSON, T. Proteomic, functional, and domain-based analysis of in vivo 14-3-3 binding proteins involved in cytoskeletal regulation and cellular organization. **Curr. Biol.**, v. 14, n. 16, p. 1436-1450, 2004.

JOHANN, S.; CISALPINO, P.S.; WATANABE, G.A.; COTA, B.B.; DE SIQUEIRA, E.P.; PIZZOLATTI, M.G.; ZANI, C.L.; DE RESENDE, M.A. Antifungal activity of extracts of some plants used in Brazilian traditional

medicine against the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **Pharm. Biol.**, v.48, n.4, p.388-396, 2010.

KARKOWSKA-KULETA, J.; RAPALA-KOZIK, M.; KOZIK, A. Fungi pathogenic to humans: molecular bases of virulence of *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigatus*. **Acta Biochim. Pol.**, v.56, p.211-224, 2009.

KATO-MAEDA, M.; GAO, Q.; SMALL, P.M. Microarray analysis of pathogens and their interaction with hosts. **Cell Microbiol.**, v.3, n.11, p.713-719, 2001.

KHOUFACHE, K.; LÉBOUDER, F.; MORELLO, E.; LAURENT, F.; RIFFAULT, S.; ANDRADE-GORDON, P.; BOULLIER, S.; ROUSSET, P.; VERGNOLLE, N.; RITEAU, B. Protective role for protease-activated receptor-2 against influenza virus pathogenesis via an IFN-gamma-dependent pathway. **J. Immunol.**, v.182, n.12, p.7795-7802, 2009.

KIM, Y.; ISLAM, N.; MOSS, B.J.; NANDAKUMAR, M.P.; MARTEN, M.R. Autophagy induced by rapamycin and carbon-starvation have distinct proteome profiles in *Aspergillus nidulans*. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 108, n. 11, p. 2705-2715, 2011.

KRAUS, P. R.; HOFMANN, A. F.; HARRIS, S. D. Characterization of the *Aspergillus nidulans* 14-3-3 homologue, ArtA. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 210, n.1, p. 61-66, 2002.

KUROKAWA, C.S.; LOPES, C.R.; SUGIZAKI, M.F.; KURAMAE, E.E.; FRANCO, M.F.; PERAÇOLI, M.T. Virulence profile of ten *Paracoccidioides brasiliensis* isolates: association with morphologic and genetic patterns. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v.47, p.257-262, 2005.

KWON-CHUNG, K. Gene disruption to evaluate the role of fungal candidate virulence genes. **Curr. Opin. Microbiol.**, v.1, n.4, p.381-389, 1998.

LACAZ, C.S. Historical evolution of the knowledge on paracoccidioidomycosis and its etiologic agent, *Paracoccidioides brasiliensis*. In: FRANCO, M.; LACAZ, C.S.; RESTREPO, A.M.; DEL NEGRO, G.(Ed.) **Paracoccidioidomycosis**. London: CRC Press, 1994. p. 13–25.

LACAZ, C.S.; PORTO, E.; MARTINS, J.E.C.; HEINS-VACCARI, E.M.; TAKAHASHI DE MELO, N. **Tratado de micologia médica**. 9. ed. São Paulo: Sarvier, 2002. 1104p.

LEE, J.D.; KOLATTUKUDY, P.E. Molecular cloning of the cDNA and gene for an elastinolytic aspartic proteinase from *Aspergillus fumigatus* and evidence of its secretion by the fungus during invasion of the host lung. **Infect. Immun.**, v.63, n.10, p.3796-3803, 1995.

LEVITZ, S.M.; NONG, S.H.; SEETOO, K.F.; HARRISON, T.S.; SPEIZER, R.A.; SIMONS, E.R. *Cryptococcus neoformans* resides in an acidic phagolysosome of human macrophages. **Infect. Immun.**, v.67, n.2, p.885-890, 1999.

LIAN, C.H.; LIU, W.D. Differential expression of *Candida albicans* secreted aspartyl proteinase in human vulvovaginal candidiasis. **Mycoses**, v.50, n.5, p.383-390, 2007.

LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-Delta Delta C(T)} **Method. Methods**, v.25, n.4, p. 402-408, 2001.

MA, L.; XIE, L.X.; DONG, X.G.; SHI, W.Y. Virulence of extracellular phospholipase B of *Candida albicans* in rabbit experimental keratomycosis. **Zhonghua Yan Ke Za Zhi**, v.44, p.237-243, 2008.

MACHADO, G.C.; MORIS, D.V.; ARANTES, T.D.; SILVA, L.R.; THEODORO, R.C.; MENDES, R.P.; VICENTINI, A.P.; BAGAGLI, E. Cryptic species of *Paracoccidioides brasiliensis*: impact on paracoccidioidomycosis immunodiagnosis. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.108, n.5, p.637-643, 2013.

MAEDA, K.; NAGATA, H.; KUBONIWA, M.; KATAOKA, K.; NISHIDA, N.; TANAKA, M.; SHIZUKUISHI, S. Characterization of binding of *Streptococcus oralis* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase to *Porphyromonas gingivalis* major fimbriae. **Infect. Immun.**, v.72, n.9, p.5475-5477, 2004.

MANNS, B.J.; BAYLIS, B.W.; URBANSKI, S.J.; GIBB, A.P.; RABIN, H.R. Paracoccidioidomycosis: case report and review. **Clin. Infect. Dis.**, v.23, n.5, p.1026-1032, 1996.

MARCOS, C.M.; DE FÁTIMA DA SILVA, J.; DE OLIVEIRA, H.C.; MORAES DA SILVA, R.A.; MENDES-GIANNINI, M.J.; FUSCO-ALMEIDA, A.M. Surface-expressed enolase contributes to the adhesion of *Paracoccidioides brasiliensis* to host cells. **FEMS Yeast Res.**, v.12, n.5, p. 557-570, 2012.

MARQUES, E.R.; FERREIRA, M.E.; DRUMMOND, R.D.; FELIX, J.M.; MENOSSI, M.; SAVOLDI, M.; TRAVASSOS, L.R.; PUCCIA, R.; BATISTA, W.L.; CARVALHO, K.C.; GOLDMAN, M.H.; GOLDMAN, G.H. Identification of genes preferentially expressed in the pathogenic yeast phase of *Paracoccidioides brasiliensis*, using suppression subtraction hybridization and differential macroarray analysis. **Mol. Genet Genomics**, v.271, n.6, p.667-677, 2004.

MARTINEZ, R. Paracoccidioidomycose. In: SIDRIM, J.J.C.; ROCHA, M.F.G. (Ed.) **Micologia médica à luz de autores contemporâneos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p. 204-221.

MATUTE, D.R.; SEPULVEDA, V.E.; QUESADA, L.M.; GOLDMAN, G.H.; TAYLOR, J.W.; RESTREPO, A.; MCEWEN, J.G. Microsatellite analysis of three phylogenetic species of *Paracoccidioides brasiliensis*. **J. Clin. Microbiol.**, v.44, n.6, p.2153-2157, 2006.

MENDES-GIANNINI, M.J.; MONTEIRO DA SILVA, J.L.; DE FÁTIMA DA SILVA, J.; DONOFRIO, F.C.; MIRANDA, E.T.; ANDREOTTI, P.F.; SOARES, C.P. Interactions of *Paracoccidioides brasiliensis* with host cells: recent advances. **Mycopathologia**, v.165, n.4-5, p.237-248, 2008.

MENDES-GIANNINI, M.J.; ANDREOTTI, P.F.; VINCENZI, L.R.; DA SILVA, J.L.; LENZI, H.L.; BENARD, G.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R.; DE MATOS GUEDES, H.L.; SOARES, C.P. Binding of extracellular matrix proteins to *Paracoccidioides brasiliensis*. **Microbes Infect.**, v. 6, p. 1550-1559, 2006.

MENDES-GIANNINI, M.J.; HANNA, S.A.; DA SILVA, J.L.; ANDREOTTI, P.F.; VINCENZI, L.R.; BENARD, G.; LENZI, H.L.; SOARES, C.P. Invasion of epithelial mammalian cells by *Paracoccidioides brasiliensis* leads to cytoskeletal rearrangement and apoptosis of the host cell. **Microbes Infect.**, v.6, n.10, p.882-891, 2004.

MENDES-GIANNINI, M.J.; MORAES, R.A.; RICCI, T.A. Proteolytic activity of the 43,000 molecular weight antigen secreted by *Paracoccidioides brasiliensis*. **Rev. Inst. Med. Trop.**, Sao Paulo, v.32, n.5, p.384-385, 1990.

MENDES-GIANNINI MJ, BUENO JP, SHIKANAI-YASUDA MA, FERREIRA AW, MASUDA A. Detection of the 43,000-molecular-weight glycoprotein in sera of patients with paracoccidioidomycosis. **J Clin Microbiol.** Dec;27(12):2842-5.1989

MENDES-GIANNINI, M.J.; SOARES, C.P.; DA SILVA, J.L.; ANDREOTTI, P.F. Interaction of pathogenic fungi with host cells: Molecular and cellular approaches. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v.45, n.3, p.383-394, 2005.

MENDES-GIANNINI, M.J.; TAYLOR, M.L.; BOUCHARA, J.B.; BURGER, E.; CALICH, V.L.; ESCALANTE, E.D.; HANNA, S.A.; LENZI, H.L.; MACHADO, M.P.; MIYAJI, M.; MONTEIRO DA SILVA, J.L.; MOTA, E.M.; RESTREPO, A.; RESTREPO, S.; TRONCHIN, G.; VINCENZI, L.R.; XIDIEH, C.F.; ZENTENO, E. Pathogenesis II: fungal responses to host responses: interaction of host cells with fungi. **Med. Mycol.**, v.38, suppl. 1, p.113-123, 2000.

MONTEIRO DA SILVA, J.L.; ANDREOTTI, P.F.; BENARD, G.; SOARES, C.P.; MIRANDA, E.T.; MENDES-GIANNINI, M.J. Epithelial cells treated with genistein inhibit adhesion and endocytosis of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Antonie Van Leeuwenhoek.**, v.92, n.1, p.129-135, 2007.

MUKHERJEE, P.K.; CHANDRA, J.; KUHN, D.M.; GHANNOUM, M.A. Differential expression of *Candida albicans* phospholipase B (PLB1) under various environmental and physiological conditions. **Microbiology**, v.149, p.261-267, 2003.

NAGLIK, J.R.; CHALLACOMBE, S.J.; HUBE, B. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v.67, n.3, p.400-428, 2003.

NEMECEK, J.C.; WÜTHRICH, M.; KLEIN, B.S. Global control of dimorphism and virulence in fungi. **Science**, v.312, p.583-588, 2006.

NICOLA, A.M.; ANDRADE, R.V.; DANTAS, A.S.; ANDRADE, P.A.; ARRAES, F.B.; FERNANDES, L.; SILVA-PEREIRA, I.; FELIPE, M.S.; The stress responsive and morphologically regulated hsp90 gene from *Paracoccidioides brasiliensis* is essential to cell viability. **BMC Microbiol.**, v.8, p.158, 2008.

NIÑO-VEGA, G.; PÉREZ-SILVA, C.; SAN-BLAS, G. The actin gene in *Paracoccidioides brasiliensis*: organization, expression and phylogenetic analyses. **Mycol. Res.**, v.111, p.363-369, 2007.

NOGUEIRA, S.V.; FONSECA, F.L.; RODRIGUES, M.L.; MUNDODI, V.; ABICHACRA, E.A.; WINTERS, M.S.; ALDERETE, J.F.; DE ALMEIDA SOARES, C.M. *Paracoccidioides brasiliensis* enolase is a surface protein that binds plasminogen and mediates interaction of yeast forms with host cells. **Infect. Immun.**, v.78, n.9, p.4040-4050, 2010.

NOVERR, M.C.; COX, G.M.; PERFECT, J.R.; HUFFNAGLE, G.B. Role of PLB1 in pulmonary inflammation and cryptococcal eicosanoid production. **Infect. Immun.**, v.71, n.3, 1538-1347, 2003.

NUCCI, M.; COLOMBO, A.L.; QUEIROZ-TELLES, F. Paracoccidioidomycosis. **Curr. Fung. Infect. Rep.**, v.3, p.15-20, 2009.

NUNES, L.R.; COSTA DE OLIVEIRA, R.; LEITE, D.B.; DA SILVA, V.S.; DOS REIS MARQUES, E.; DA SILVA FERREIRA, M.E.; RIBEIRO, D.C.; DE SOUZA BERNARDES, L.A.; GOLDMAN, M.H.; PUCCIA, R.; TRAVASSOS, L.R.; BATISTA, W.L.; NÓBREGA, M.P.; NOBREGA, F.G.; YANG, D.Y.; DE BRAGANÇA PEREIRA, C.A.; GOLDMAN, G.H. Transcriptome analysis of *Paracoccidioides brasiliensis* cells undergoing mycelium-to-yeast transition. **Eukaryot Cell.**, v. 4, n.12, p. 2115-2128, 2005.

OBSIL, T.; OBSILOVA, V. Structural basis of 14-3-3 protein functions. **Semin. Cell Dev. Biol.**, v.22, n.7, p.663-672, 2011.

ODDS, F.C.; GOW, N.A.; BROWN, A.J. Fungal virulence studies come of age **Genome Biol.**, v.2, n.3, 2001.

OH, J. E.; JANG, H.; KIM, H.; KANG, H.K.; CHUNG, C.P.; PARK, W.H.; MIN, B.M. Alpha3beta1 integrin promotes cell survival via multiple interactions between 14-3-3 isoforms and proapoptotic proteins. **Exp. Cell Res.**, v. 315, n. 18, p. 3187-3200, 2009.

PANCHOLI, V. Multifunctional alpha-enolase: its role in diseases. **Cell Mol. Life Sci.**, v.58, n.7, p.902-920, 2001.

PANCHOLI, V.; FISCHETTI, V.A. Regulation of the phosphorylation of human pharyngeal cell proteins by group A streptococcal surface dehydrogenase: signal transduction between streptococci and pharyngeal cells. **J. Exp. Med.**, v. 186, n.10, p. 1633-1643, 1997.

PANIAGO, A.M.; AGUIAR, J.I.; AGUIAR, E.S.; DA CUNHA, R.V.; PEREIRA, G.R.; LONDERO, A.T.; WANKE, B. *Paracoccidioidomycosis*: a clinical and epidemiological study of 422 cases observed in Mato Grosso do Sul. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.36, n.4, p.455-459, 2003.

PARENTE, J.A.; COSTA, M.; PEREIRA, M.; SOARES, C.M. Transcriptome overview of *Paracoccidioides brasiliensis* proteases. **Genet. Mol. Res.**, v.4, n.2, p.358-371, 2005.

PARENTE, J.A.; SALEM-IZACC, S.M.; SANTANA, J.M.; PEREIRA, M.; BORGES, C.L.; BAILÃO, A.M.; SOARES, C.M. A secreted serine protease of *Paracoccidioides brasiliensis* and its interactions with fungal proteins. **BMC Microbiol.**, v.10, p. 292, 2010.

PATEL, A.; CUMMINGS, N.; BATCHELOR, M.; HILL, P.J.; DUBOIS, T.; MELLITIS, K.H.; FRANKEL, G.; CONNERTON, I. Host protein interactions with enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC): 14-3-3tau binds Tir and has a role in EPEC-induced actin polymerization. **Cell Microbiol.**, v. 8, n. 1, p. 55-71, 2006.

PERES DA SILVA, R.; MATSUMOTO, M.T.; BRAZ, J.D.; VOLTAN, A.R.; DE OLIVEIRA, H.C.; SOARES, C.P.; MENDES GIANNINI, M.J. Differential gene expression analysis of *Paracoccidioides brasiliensis* during keratinocyte infection. **J. Med. Microbiol.**, v.60, pte. 3, p.269-280, 2011.

PINZAN, C.F.; RUAS, L.P.; CASABONA-FORTUNATO, A.S.; CARVALHO, F.C.; ROQUE-BARREIRA, M.C. Immunological basis for the gender differences in murine *Paracoccidioides brasiliensis* infection. **PLoS One**, v.5, n.5, e10757, 2010

PLOW, E.F.; HERREN, T.; REDLITZ, A.; MILES, L.A.; HOOVER-PLOW, J.L. The cell biology of the plasminogen system. **FASEB J.**, v.9, n.10, p.939-945, 1995.

POPI, A.F.; GODOY, L.C.; XANDER, P.; LOPES, J.D.; MARIANO, M. B-1 cells facilitate *Paracoccidioides brasiliensis* infection in mice via IL-10 secretion. **Microbes Infect.**, v.10, n.7, p.817-824, 2008.

PUCCIA, R.; SCHENKMAN, S.; GORIN, P.A.; TRAVASSOS, L.R. Exocellular components of *Paracoccidioides brasiliensis*: identification of a specific antigen. **Infect. Immun.**, v.53, n.1, p.199-206, 1986.

PUCCIA, R.; CARMONA, A.K.; GESZTESI, J.L.; JULIANO, L.; TRAVASSOS, L.R. Exocellular proteolytic activity of *Paracoccidioides brasiliensis*: cleavage of components associated with the basement membrane. **Med. Mycol.**, v.36, n.5, p.345-348, 1998.

REDLITZ, A.; FOWLER, B.J.; PLOW, E.F.; MILES, L.A. The role of an enolase-related molecule in plasminogen binding to cells. **Eur. J. Biochem.**, v.227, n.1-2, p.407-415, 1995.

RESTREPO, A.; BENARD, G.; DE CASTRO, C.C.; AGUDELO, C.A.; TOBÓN, A.M. Pulmonary paracoccidioidomycosis. **Semin. Respir. Crit. Care Med.**, v.29, n.2, p. 182-197, 2008.

RESTREPO, A.; MCEWEN, J.G.; CASTAÑEDA, E. The habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*: how far from solving the riddle? **Med. Mycol.**, v.39, n.3, p.233-241, 2001.

RESTREPO-MORENO, A. *Paracoccidioidomycosis*. In: MURPHY, J. W.; FRIEDMAN, H.; BENDINELLI, M. (Ed.) **Fungal infections and immune responses**. New York: Plenum, 1993. p.251-276.

REZENDE, T.C.; BORGES, C.L.; MAGALHÃES, A.D.; DE SOUSA, M.V.; RICART, C.A.; BAILÃO, A.M.; SOARES, C.M. A quantitative view of the morphological phases of *Paracoccidioides brasiliensis* using proteomics. **J. Proteomics**, v.75, p.572-587, 2011.

SAN-BLAS, G.; NIÑO-VEJA, G.; ITURRIAGA, T. *Paracoccidioides brasiliensis* and paracoccidioidomycosis: molecular approaches to morphogenesis, diagnosis, epidemiology, taxonomy and genetics. **Med. Mycol.**, v.40, n.3, p.225-242, 2002.

SAN-BLAS, G.; TRAVASSOS, L.R.; FRIES, B.C.; GOLDMAN, D.L.; CASADEVALL, A.; CARMONA, A.K.; BARROS, T.F.; PUCCIA, R.; HOSTETTER, M.K.; SHANKS, S.G.; COPPING, V.M.; KNOX, Y.; GOW, N.A. Fungal morphogenesis and virulence. **Med. Mycol.**, v.38, suppl.1, p.79-86, 2000.

SALINA MA, SHIKANAI-YASUDA MA, MENDES RP, BARRAVIERA B, MENDES GIANNINI MJ. Detection of circulating *Paracoccidioides brasiliensis*

antigen in urine of paracoccidioidomycosis patients before and during treatment. **J Clin Microbiol.**1998.

SAN-BLAS, G.; NIÑO-VEGA, G. Morphogenesis of agents of endemic mycoses. In: SAN-BLAS, G.; CALDERONE, R. (Ed.) **Pathogenic fungi: structural biology and taxonomy**. Wymondham: Caister Academic, 2004. cap. 5.

SAN-BLAS, G.; NINO-VEGA G. *Paracoccidioides brasiliensis*: virulence and host response. In: CIHLAR, R.L.; CALDERONE, R.A. (Ed.) **Fungal pathogenesis: principles and clinical applications**. New York: Marcel Dekker, 2001. p. 205-226.

SAN-BLAS, G.; NIÑO-VEGA, G.; ITURRIAGA, T. *Paracoccidioides brasiliensis* and paracoccidioidomycosis: molecular approaches to morphogenesis, diagnosis, epidemiology, taxonomy and genetics. **Med. Mycol.**, v.40, p. 225-242, 2002.

SANTORO, M. M.; GAUDINO, G.; MARCHISIO, P. C. The MSP receptor regulates alpha6beta4 and alpha3beta1 integrins via 14-3-3 proteins in keratinocyte migration. **Dev. Cell**, v. 5, n. 2, p. 257-271, 2003.

SARDI, J.C.; DUQUE, C.; HÖFLING, J.F.; GONÇALVES, R.B. Genetic and phenotypic evaluation of *Candida albicans* strains isolated from subgingival biofilm of diabetic patients with chronic periodontitis. **Med. Mycol.**, v.50, n.5, p.467-475, 2012.

SCHALLER, M.; KRnjaic, N.; NIEWERTH, M.; HAMM, G.; HUBE, B.; KORTING, H.C. Effect of antimycotic agents on the activity of aspartyl proteinases secreted by *Candida albicans*. **J. Med. Microbiol.**, v.52, pte. 3, p.247-249, 2003.

SCHMIEL, D.H.; MILLER, V.L. Bacterial phospholipases and pathogenesis. **Microbes Infect.**, v.1,,n.13, p.1103-1112, 1999.

SCHNEEBERGER, P.M.; DORIGO-ZETSMA, J.W.; VAN DER ZEE, A.; VAN BON M.; VAN OPSTAL J.L. Diagnosis of atypical pathogens in patients hospitalized with community-acquired respiratory infection. **Scand. J. Infect. Dis.**, v.36, n.4, p. 269-273, 2004.

SHANKAR, J.; WU, T.D.; CLEMONS, K.V.; MONTEIRO, J.P.; MIRELS, L.F.; STEVENS, D.A. Influence of 17 β -estradiol on gene expression of *Paracoccidioides* during mycelia-to-yeast transition. **PLoS One**, v. 6, n.12, p.e28402, 2011.

SHIKANAI-YASUDA, M.A.; TELLES FILHO, F.Q.; MENDES, R.P.; COLOMBO, A.L.; MORETTI, M.L. Guidelines in Paracoccidioidomycosis. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.39, n.3, p.297-310, 2006.

SOARES, D.A.; DE ANDRADE, R.V.; SILVA, S.S.; BOCCA, A.L.; SOARES FELIPE, S.M.; PETROFEZA, S. Extracellular *Paracoccidioides brasiliensis* phospholipase B involvement in alveolar macrophage interaction. **BMC Microbiol.**, v.10, p.241, 2010.

SOJAR, H.T.; GENCO, R.J. Identification of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of epithelial cells as a second molecule that binds to *Porphyromonas gingivalis* fimbriae. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v.45, n.1, p.25-30, 2005.

STRAUS, A.H.; FREYMÜLLER, E.; TRAVASSOS, L.R.; TAKAHASHI, H.K. Immunochemical and subcellular localization of the 43 kDa glycoprotein antigen of *Paracoccidioides brasiliensis* with monoclonal antibodies. **J. Med. Vet. Mycol.**, v.34, n.3, p.181-186, 1996.

TABORDA, C.P.; JULIANO, M.A.; PUCCIA, R.; FRANCO, M.; TRAVASSOS, L.R. Mapping of the T-cell epitope in the major 43-kilodalton glycoprotein of *Paracoccidioides brasiliensis* which induces a Th-1 response protective against fungal infection in BALB/c mice. **Infect. Immun.**, v.66, n.2, p.786-793, 1998.

TACCO, B.A.; PARENTE, J.A.; BARBOSA, M.S.; BÁO, S.N.; GSÓES, T.S.; PEREIRA, M.; SOARES, C.M. Characterization of a secreted aspartyl protease of the fungal pathogen *Paracoccidioides brasiliensis*. **Med. Mycol.**, v.47, n.8, p.845-854, 2009.

TALLIMA, H.; MONTASH, M.; VEPREK, P.; VELEK, J.; JEZEK, J.; EL RIDI, R. Differences in immunogenicity and vaccine potential of peptides from *Schistosoma mansoni* glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase. **Vaccine**, v.21, n.23, p.3290-3300, 2003.

TANG, J.; WONG, R.N. Evolution in the structure and function of aspartic proteases. **J. Cell Biochem.**, v.33, n.1, p.53-63, 1987.

TARCHA, E.J.; BASRUR, V.; HUNG, C.Y.; GARDNER, M.J.; COLE, G.T. Multivalent recombinant protein vaccine against coccidioidomycosis. **Infect. Immun.**, v.74, n.10, p.5802-5813, 2006.

TAVARES, A.H.; SILVA, S.S.; BERNARDES, V.V.; MARANHÃO, A.Q.; KYAW, C.M.; POÇAS-FONSECA, M.; SILVA-PEREIRA, I. Virulence insights from the *Paracoccidioides brasiliensis* transcriptome. **Genet. Mol. Res.**, v.4, n.2, p.372-389, 2005.

TEIXEIRA, M.M.; THEODORO, R.C.; DE CARVALHO, M.J.; FERNANDES, L.; PAES, H.C.; HAHN, R.C.; MENDOZA, L.; BAGAGLI, E.; SAN-BLAS, G.; FELIPE, M.S. Phylogenetic analysis reveals a high level of speciation in the *Paracoccidioides* genus. **Mol. Phylogenet. Evol.**, v.52, n.2, p.273-283, 2009.

THEODORO, R.C.; TEIXEIRA, M.M.; FELIPE, M.S.; PADUAN, K.S.; RIBOLLA, P.M.; SAN-BLAS, G.; BAGAGLI, E. Genus paracoccidioides: Species recognition and biogeographic aspects. **PLoS One**, v.7, n.5, p.e37694, 2012.

TOBÓN, A.M.; AGUDELO, C.A.; RESTREPO, C.A.; VILLA, C.A.; QUICENO, W.; ESTRADA, S.; RESTREPO, A. Adrenal function status in patients with paracoccidioidomycosis after prolonged post-therapy follow-up. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.83, n.1, p.111-114, 2010.

TOMAZETTI, J.; AVILA, D.S.; FERREIRA, A.P.; MARTINS, J.S.; SOUZA, F.R.; ROYER, C.; RUBIN, M.A.; OLIVEIRA, M.R.; BONACORSO, H.G.; MARTINS, M.A.; ZANATTA, N.; MELLO, C.F. Baker yeast-induced fever in young rats: characterization and validation of an animal model for antipyretics screening. **J. Neurosci. Methods**, v.147, n.1, p.29-35, 2005.

TRAVASSOS, L.R.; PUCCIA, R.; CISALPINO, P.; TABORDA, C.; RODRIGUES, E.G.; RODRIGUES, M.; SILVEIRA, J.F.; ALMEIDA, I.C. Biochemistry and molecular biology of the main diagnostic antigen of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Arch. Med. Res.**, v.26, n.3, p.297-304, 1995.

TRAVASSOS, L. R.; TABORDA, C. P.; COLOMBO, A. L. Treatment options for paracoccidioidomycosis and new strategies investigated. **Expert Rev. Anti Infect. Ther.**, v. 6, p. 251-262, 2008.

VALLE, A. C. F., COSTA, R. L. B. Paracoccidioidomicose. In: BATISTA, K. S.; IGREJA, R. P.; GOMES, A. D.; HUGGINS, D. W. **Medicina tropical: abordagem atual das doenças infecciosas e parasitárias**. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 2001. p. 943-958.

VAN HEMERT, M. J.; STEENSMA, H. Y.; VAN HEUSDEN, G. P. 14-3-3 proteins: key regulators of cell division, signalling and apoptosis. **Bioessays**, v. 23, n. 10, p. 936-946, 2001.

VAN HEUSDEN, G. P. 14-3-3 Proteins: insights from genome-wide studies in yeast. **Genomics**, v. 94, n. 5, p. 287-293, 2009.

VAN HEUSDEN, G. P.; WENZEL, T.J.; LAGENDIJK, E.L.; DE STEENSMA, H.Y.; VAN DEN BERG, J.A. Characterization of the yeast BMH1 gene encoding

a putative protein homologous to mammalian protein kinase II activators and protein kinase C inhibitors. **FEBS Lett.**, v. 302, n. 2, p.145-150, 1992.

VAN HEUSDEN, G. P.; GRIFFITHS, D.J.; FORD, J.C.; CHIN-A-WOENG, T.F.; SCHRADER, P.A.; CARR, A.M.; STEENSMA, H.Y. The 14-3-3 proteins encoded by the BMH1 and BMH2 genes are essential in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and can be replaced by a plant homologue. **Eur. J. Biochem.**, v. 229, n. 1, p. 45-53, 1995.

VAN HEUSDEN, G. P.; STEENSMA, H. Y. Yeast 14-3-3 proteins. **Yeast**, v. 23, n. 3, p. 159-171, 2006.

VICENTINI, A. P.; GESZTESI, J. L.; FRANCO, M. F.; DE SOUZA, W.; DE MORAES, J. Z.; TRAVASSOS, L. R.; LOPES, J. D. Binding of *Paracoccidioides brasiliensis* to laminin through surface glycoprotein gp43 leads to enhancement of fungal pathogenesis. **Infect. Immun.**, v. 62, n. 4, p. 1465 – 1469, 1994.

VOLTAN, A.R.; SARDI, J.D.; SOARES, C.P.; PELAJO MACHADO, M.; FUSCO ALMEIDA, A.M.; MENDES-GIANNINI, M.J. Early endosome antigen 1 (EEA1) decreases in macrophagesinfected with *Paracoccidioides brasiliensis*. **Med. Mycol.**, v.51, n.7, p.759-764, 2013.

WASYLNKA, J.A.; MOORE, M.M. *Aspergillus fumigatus* conidia survive and germinate in acidic organelles of A549 epithelial cells. **J. Cell Sci.**, v.116, pte. 8, p.1579-1587, 2003.

WATANABE, H.; ASAI, O.; TADA, N.; YANO, S.; KATOH, A.; KATORI, M.; KOBAYASHI, T.; KURAIISHI, Y.; HOSHI, Y.; ITOH, K.; AIZAWA, S. Rapid onset of hemolytic anemia after allogeneic bone marrow transplantation from an unrelated ABO major mismatched donor. **Rinsho Ketsueki.**, v.38, n.1, p.14-20, 1997.

WILKER, E.; YAFFE, M. B. 14-3-3 Proteins--a focus on cancer and human disease. **J. Mol. Cell Cardiol.**, v. 37, n. 3, p. 633-642, 2004.

YANG, Y.L. Virulence factors of *Candida* species. **J. Microbiol. Immunol. Infect.**, v.36, n.4, p.223-228, 2003.

YOUSEFI, S.; COOPER, P.R.; MUECK, B.; POTTER, S.L.; JARAI, G. cDNA representational difference analysis of human neutrophils stimulated by GM-CSF. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.227, n.2, p.401-409, 2000.