



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS**

Aline Raquel Voltan

**“Determinação de genes/ proteínas endossomais em
Paracoccidioides brasiliensis e em macrófagos infectados
e não infectados”**

Araraquara

2013

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS**

Aline Raquel Voltan

**“Determinação de genes/ proteínas endossomais em
Paracoccidioides brasiliensis e em macrófagos infectados
e não infectados”**

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP – Araraquara, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia.

Orientadora: Profa. Dra. Maria José Soares Mendes Giannini

Co-orientadora: Profa. Dra. Ana Marisa Fusco Almeida

Araraquara

2013

Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

Voltan, Aline Raquel
V935d Determinação de gene proteínas endossomais em *Paracoccidioides brasiliensis* e em macrófagos infectados e não infectados / Aline Raquel Voltan. – Araraquara, 2013
109 f.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia

Orientador: Maria José Soares Mendes Giannini
Coorientador: Ana Marisa Fusco Almeida

1. *Paracoccidioides brasiliensis*. 2. Via endocítica. 3. Depleção de metais e tensão de oxigênio. I. Giannini, Maria José Soares Mendes, orient.. II. Almeida, Ana Marisa Fusco, coorient. III. Título.

CAPES: 40300005

E agora, eis o que diz o Senhor, aquele que te criou, Jacó, e te formou, Israel:

Nada temas, pois eu te resgato, eu te chamo pelo nome, és meu.

Se tiveres de atravessar a água, estarei contigo. E os rios não te submergirão;

se caminhares pelo fogo, não te queimarás, e a chama não te consumirá

Pois eu sou o Senhor, teu Deus, o Santo de Israel, teu salvador. Dou o Egito

por teu resgate, a Etiópia e Sabá em compensação.

Porque és precioso a meus olhos, porque eu te aprecio e te amo, permuto

reinos por ti, entrego nações em troca de ti.

Fica, tranqüilo, pois estou contigo...

...Eis o que diz o Senhor que abriu uma passagem através do mar, um caminho

em meio às ondas, que pôs em campo carros e cavalos, a tropa de soldados e

chefes: eles caíram então para nunca mais se levantar; Extinguiram-se como

um pavio de vela.

Não vos lembreis mais dos acontecimentos de outrora, não recordeis mais as

coisas antigas, porque eis que vou fazer obra nova, a qual já surge: não a

vedes? Vou abrir uma via pelo deserto, e fazer correr arroios pela estepe.

(Isaías 43)

Dedicatória

Aos meus pais (Lúcio e Cidinha), minha vó Cida e minha tia Maria pelo amor, incentivo e principalmente por suportar meu mau humor e minhas ausências.

Que Deus ilumine cada um de vocês hoje e sempre!!!

Amo muito vocês!!!

Agradecimentos

Ao Prof. Henrique L. Lenzi por toda atenção e conhecimento dispendido a cada visita minha ao Rio de Janeiro. Agradeço, apesar de ser *in memoriam*, por despertar em mim o desejo pelo saber, por ensinar que toda pesquisa tem que ter verdade científica, que resultado é resultado e devemos estudar sempre!!!

À Profa. Dra. Maria José, que com seu coração generoso, me deu um voto de confiança, e assim foi possível trabalharmos juntas!!! Obrigada por me aceitar em seu laboratório e fazer parte da minha formação profissional!!!

À Profa. Ana Marisa Fusco Almeida, por me incentivar em todos os momentos delicados durante esses anos de pós-graduação e por toda a contribuição científica!!!

À amiga e pós-doc, Janaína de Cassia Orlandi Sardi, pela ajuda e incentivo constante, sem a sua ajuda esse trabalho não teria os resultados que tem hoje. Obrigada pela amizade e pelas boas risadas durante todo esse tempo.

À técnica Rosangela (Rô), obrigada pela amizade de longa data... pelos conselhos, pelas risadas e pela ajuda!!!

À Profa. Elisabeth L. Pizzolitto pelo apoio e incentivo durante esses anos de pesquisa, sem o seu apoio Bete, muita coisa não teria sido feita. Muito obrigada!!!

À amiga Gabriella Bettio.... sempre pronta para colaborar com qualquer atividade, e além de tudo por exercer a profissão de psicóloga, praticamente todos os dias nos últimos meses!!!

Aos amigos do NAC, principalmente à Micro-hemato, que inclui Maria Helena, Marcia Alboy, Marilisa, Laura e Rodrigo, esses pertencentes à hemato, e aos pertencentes à micro, Sabrina e Natália. E eu não podia deixar de esquecer duas pessoas fora do setor micro-hemato, mas que estiverem sempre presentes me incentivando, uma tirando minhas dúvidas de estatística (Tânia Navarro Nunes) e outra minha amiga de pedalada (Cristina Marta). E para o pessoal da micro-hemato...fica a frase...vamos começar gente!!! Obrigada pelas boas risadas!!!

Aos amigos da micologia... alguns de muito tempo, outros nem tanto!!! No entanto, cada um com uma participação especial... agradeço pela atenção e carinho à Nayla (sempre disposta à ajudar), Fer Gullo (que fazia eu gastar meus abraços com ela!!!), Fer Sangali, Tati (a super sincera!!!), Suélen, Thais, Haroldo, Panta, Patrícia (Laranja), Carol (Tatoo), Lili, Carol MG, Junya, Kayla, Jaque, Julhyani, Natália, Fernanda Campos, Regina e Cláudia. Aos alunos de iniciação... Vanessa, Tamires, Juliana... Obrigada pelo convívio, pelas risadas, e claro pelos almoços, mesmo nunca sendo meu prato favorito...

As meninas da limpadora, dona Maria, Jandira e a Cida, que sempre me fizeram companhia na ausência dos meus amigos de pós-graduação, obrigada pelas boas risadas!!! Aos vigias (principalmente seu Silvio e seu Lazareto), que mesmo nos bastidores, fizeram a diferença para que esse trabalho fosse conduzido e obtidos os resultados aqui apresentados, obrigada!!!

À plataforma de Microscopia Confocal da FIOCRUZ, onde sempre fui muito bem recebida por todos!!! Agradeço ao pesquisador chefe Marcelo Pelajo Machado pela disponibilidade e ao técnico do microscópio confocal, Pedro Paulo, que sempre foi muito atencioso e prestativo!!!

À Profa. Raquel Mantuanéli Scarel Caminaga que auxiliou intensamente neste trabalho. À sua aluna Livia Finoti pelo auxílio parte estatística... a ajuda de vocês foi imprescindível!!! Muito obrigada!!!

À Profa. Christiane P. Soares pela ajuda no desenvolvimento deste trabalho... suas idéias foram de extrema importância!!! Obrigada pela sua colaboração!!!

Aos agregados da micologia: ROSEMIRA, que nos seus almoços, sempre fez minha comida preferida, obrigada pelo ótimo convívio e pelas risadas!!! Márcia (da portaria) e Eliana (secretária), obrigada pelo apoio e descontração!!! E a todos aqueles que contribuíram com a execução deste trabalho de forma direta ou indireta... muito obrigada!!!

Às meninas da pós-graduação, que durante todos esses anos de convívio sempre foram muito atenciosas!!!

À Fapesp e PADC pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

Capítulo 1	18
1. Introdução	19
1.1 <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> : considerações gerais	19
1.2 Via endocítica	26
1.2.1 Expressão de proteínas de via endocítica em microrganismos	31
2. Objetivos	34
2.1 Objetivo Geral	34
2.2 Objetivos Específicos	34
3. Materiais e Métodos	35
3.1 Fluxograma dos experimentos realizados	35
3.2 Microrganismos	35
3.3 Preparo dos meios de cultura para cultivo de <i>P. brasiliensis</i>	36
3.4 Cultivo de <i>P. brasiliensis</i>	36
3.4.1 Cultivo de <i>P. brasiliensis</i> na depleção de micronutrientes	36
3.4.2 Cultivo de <i>P. brasiliensis</i> em diferentes tensões de oxigênio	37
3.5 Cultura de macrófagos AMJ2-C11	37
3.6 Infecção de macrófagos por <i>P. brasiliensis</i>	38
3.6.1 Preparo do inóculo de <i>P. brasiliensis</i>	38
3.6.2 Períodos de Infecção	38
3.7 Ensaio de infecção total de macrófagos alveolares AMJ2-C11 com <i>P. brasiliensis</i>	38
3.8 Preparação de anticorpos anti - <i>P. brasiliensis</i>	39
3.8.1 Extrato <i>cell-free</i>	39
3.8.2 Produção de anticorpos policlonais anti- <i>cell-free</i>	40
3.8.2.1 Soro anti- <i>cell-free</i> de <i>P. brasiliensis</i>	40
3.9 Reação de imunofluorescência dupla segundo Heesemann e Laufs (1985)	40
3.10 Extração de RNA total de macrófagos AMJ2-C11 e <i>P. brasiliensis</i> ...	42

3.10.1 Síntese de cDNA fita simples	42
3.11 Transcriptase reversa – PCR semi-quantitativo (RT-PCR).....	43
3.12 RT-PCR quantitativo (qRT-PCR)	44
3.13 Análise estatística	45
4. Resultados	46
4.1 Imunomarcção de proteínas de via endocítica da fase leveduriforme de <i>P. brasiliensis</i> (Pb18)	46
4.2 Análise da expressão dos genes de via endocítica de <i>P. brasiliensis</i> (Pb18) cultivado em diferentes condições de nutrição	47
4.3 Infecção de macrófagos por <i>P. brasiliensis</i> (Pb18)	50
4.3.1 Fungo cultivado em diferentes condições de nutrição e tensão de oxigênio	50
4.3.2 Fungo cultivado em diferentes tensões de oxigênio	51
4.4 Expressão de genes de via endocítica em macrófagos infectados com <i>P. brasiliensis</i> (Pb18) cultivado em diferentes tensões de oxigênio	52
4.4.1. Expressão de <i>Clatrina</i>	52
4.4.2 Expressão de <i>Rab5</i>	53
4.4.3 Expressão de <i>Rab7</i>	55
4.4.4 Expressão de <i>Lamp-1</i>	56
4.5 Expressão de genes de via endocítica de macrófagos infectados com <i>P. brasiliensis</i> (Pb18) em diferentes condições de incubação	57
4.5.1 Expressão de <i>Clatrina</i>	55
4.5.2 Expressão de <i>Eea1</i>	58
4.5.3 Expressão de <i>Rab5</i>	59
4.5.4 Expressão de <i>Rab7</i>	61
4.5.5 Expressão de <i>Lamp-1</i>	62
4.6 Expressão de proteínas de via endocítica por imunofluorescência em macrófagos infectados com <i>P. brasiliensis</i> (Pb18) em diferentes condições de interação	63
4.6.1 Expressão de clatrina	63
4.6.2 Expressão de EEA1	64
4.6.3 Expressão de Rab5	66
4.6.4 Expressão de Rab7	67

4.6.5 Expressão de LAMP-1	--
5. Discussão	72
6. Conclusões	81
7. Referências Bibliográficas	82
Capítulo 2	
1. Artigo científico	

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Matriz extracelular	20
Figura 2: Vias de entrada nas células	27
Figura 3: Fluxograma da avaliação da via endocítica da fase leveduriforme de <i>P. brasiliensis</i> (Pb18) cultivado na depleção de metais e avaliação da via endocítica de macrófagos infectados com a fase leveduriforme de <i>P. brasiliensis</i> (Pb18) em diferentes tensões de oxigênio.....	35
Figura 4: Reação de imunofluorescência para as proteínas da via endocítica em <i>P. brasiliensis</i>	47
Figura 5: Eletroforese em gel de agarose para expressão do gene <i>Clatrina</i> de <i>P. brasiliensis</i> cultivado na depleção de metais por RT-PCR	48
Figura 6: Expressão Relativa do gene <i>Clatrina</i> por <i>P. brasiliensis</i> na depleção de metais.....	49
Figura 7: Eletroforese em gel de agarose para o gene <i>Ypt7</i> de <i>P. brasiliensis</i> cultivado na depleção de metais por RT-PCR.....	49
Figura 8: Expressão relativa do gene <i>Ypt7</i> por <i>P. brasiliensis</i> na depleção de metais.....	50
Figura 9: Resultado de infecção total de macrófagos alveolares AMJ2-C11 com Pb18 cultivado na depleção de metais.....	51
Figura 10: Infecção de macrófagos alveolares AMJ2-C11 com Pb18 cultivado em aerobiose (A) e microaerofilia (B)	52
Figura 11: Expressão relativa do gene <i>Clatrina</i> por qRT-PCR em macrófagos infectados com Pb18 cultivado em condições de aerobiose (A) e microaerofilia (B)	53
Figura 12: Expressão relativa de <i>Rab5</i> por qRT-PCR em macrófagos infectados com Pb18 cultivado em condições de aerobiose (A) e microaerofilia (B)	54
Figura 13: Expressão relativa de <i>Rab7</i> por qRT-PCR em macrófagos infectados com Pb18 cultivado em condições de aerobiose (A) e microaerofilia (B)	55
Figura 14: Expressão relativa de <i>Lamp-1</i> por qPCR em macrófagos	

infectados com Pb18 cultivado em condições de aerobiose (A) e microaerofilia (B)	56
Figura 15: Expressão relativa de <i>Clatrina</i> por qRT-PCR em macrófagos infectados com <i>P. brasiliensis</i>	58
Figura 16: Expressão relativa de <i>Eea1</i> por qRT-PCR em macrófagos infectados com <i>P. brasiliensis</i>	59
Figura 17: Expressão relativa de <i>Rab5</i> por qRT-PCR em macrófagos infectados com <i>P. brasiliensis</i>	60
Figura 18: Expressão relativa de <i>Rab7</i> por qRT-PCR em macrófagos infectados com <i>P. brasiliensis</i>	62
Figura 19: Expressão relativa de <i>Lamp-1</i> por qRT-PCR em macrófagos infectados com <i>P. brasiliensis</i>	63
Figura 20: Expressão de clatrina em macrófagos infectados e não infectados com <i>P. brasiliensis</i> por 6h.....	64
Figura 21: Expressão de EEA1 em condição de microaerofilia e co-localização de <i>P. brasiliensis</i> em macrófagos.....	65
Figura 22: Expressão de EEA1 em condição de anaerobiose. A – Macrófagos não infectados.....	66
Figura 23: Expressão de Rab5 em macrófagos infectados e não infectados com <i>P. brasiliensis</i>	67
Figura 24: Expressão de Rab7 em macrófagos infectados com <i>P. brasiliensis</i> por 6h em aerobiose.....	68
Figura 25: Expressão de LAMP-1 em macrófagos infectados com <i>P. brasiliensis</i> em aerobiose em 24h.....	69

LISTA DE ABREVIATURAS

A	Adenina
BCS	Batocuproinadisulfonato sódico
BSA	Soro albumina bovina
cDNA	Ácido desoxirribonucléico complementar
C	Citosina
Cu	Cobre
°C	Graus celsius
D.O.	Densidade ótica
DEPC	Dietilpirocarbonato
dNTP	Desoxirribonucleosídeo(s) trifosfato(s)
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DTT	Ditiotreitol
EP	Endossomo precoce
EST	Sequência expressa/ <i>Expressed Sequence Tags</i>
Fe	Ferro
FITC	anti-IgG conjugado com isotiocianato de fluoresceína
GAPDH	Glicose-6-fosfato desidrogenase
GDP	Guanosina difosfato
GTP	Guanosina trifosfato
kDa	Kilodáltons
LAMPs	Proteínas 1 de membranas associadas a lisossomo
LDH	Lactato desidrogenase
LIMPs	Proteínas integral de membrana lisossomal
M	molar
MEC	Matriz extracelular
mm	Milímetro
µg	Micrograma
mM	Milimolar
MVM	McVeigh & Morton
pb	Pares de base
Pb	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>

PBS	Tampão salina fosfato
PBS-T	PBS-Tween-20
PCM	Paracoccidiodomicose
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em cadeia da polimerase)
pH	Potencial hidrogeniônico
PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinase
PtdIns 3 P	Fosfatidil inositol-3-fosfato
PKs	Proteíno-quinase
PM	Peso molecular
%	Porcentagem
pmol	Picomol
rDNA	DNA ribossômico
RNA	Ácido Ribonucleico
rpm	Rotação por minuto
RT	Transcriptase reversa/ <i>Reverse transcriptase</i>
SFB	Soro fetal bovino
T	Timina
TBE	Tris/Ácido Bórico/EDTA
TLRs	Receptores <i>Toll-Like</i>
TPEN	N´N´N´_,N´_ tetrakis (2-pyridyl-methyl) ethylenediamine
TPI	Triose fosfato isomerase
TRITC	anti-IgG conjugado com isotiocianato de tetrametil rodamina
U	Uracila
v/v	Volume/ volume
x g	Força da gravidade
Zn	Zinco

RESUMO

Os fungos dimórficos, *Paracoccidioides brasiliensis* (espécies crípticas S1, PS2, PS3) e *Paracoccidioides lutzii* (Pb01-like espécies), são agentes da paracoccidioidomicose (PCM), doença granulomatosa crônica, endêmica na América Latina, principalmente no Brasil. A doença apresenta grande variedade de manifestações clínicas, desde formas localizadas até disseminadas evoluindo para letalidade. O fungo tem capacidade de aderir, invadir e extravasar barreiras impostas pelos tecidos do hospedeiro. *P. brasiliensis* (Pb18) já foi observado tanto no interior de macrófagos, como no interior de células epiteliais *in vivo* e *in vitro*. A identificação do mecanismo pelo qual este fungo sobrevive no interior da célula hospedeira é campo fértil para a descoberta de sua patogênese, já que este microrganismo possui a capacidade de induzir sua própria endocitose em células epiteliais e muito provavelmente em macrófagos. A absorção de micronutrientes pelo fungo apresenta papel singular, tanto para sua nutrição e processo invasivo, como para sua sobrevivência no interior da célula hospedeira. A via endocítica em microrganismos é de fundamental importância na regulação de todo esse processo. O objetivo deste estudo foi avaliar a via endocítica de Pb18 e também de macrófagos infectados com este fungo. A avaliação da via endocítica de Pb18 foi realizada na condição de depleção de metais, onde foram analisados os genes *Clatrina* e *Ypt7* (Homólogo de Rab7) por RT-PCR semi-quantitativo e PCR em tempo real (RT-PCR quantitativo). Também foi analisada a infecção de macrófagos por Pb18 cultivado na depleção de metais e em diferentes tensões de oxigênio. A via endocítica de macrófagos foi analisada por RT-PCR quantitativo e imunofluorescência. Esta análise foi realizada quando o fungo foi cultivado em diferentes tensões de oxigênio e os macrófagos foram infectados com este e quando a infecção foi incubada em diferentes tensões de oxigênio. Os genes avaliados foram *Clatrina*, *EEA1* (Antígeno de endossomo precoce 1), *Rab5*, *Rab7* e *LAMP-1*. Nossos resultados demonstram aumento na expressão de *Clatrina* e *Ypt7* por Pb18 cultivado na depleção de metais. A infecção de macrófagos foi maior quando Pb18 foi cultivado na depleção de ferro e cobre. A expressão de *Clatrina* aumentou na depleção de cobre e principalmente na depleção de ferro+cobre+zinco e a expressão de *Ypt7* demonstrou aumento, principalmente, na condição de depleção zinco, cobre e ferro+cobre. Quando Pb18 foi cultivado

em aerobiose houve diminuição na expressão dos genes *Clatrina*, *Rab5* e *LAMP-1*. A expressão dos genes de via endocítica foi influenciada pela condição de oxigênio a que foram expostos os macrófagos e também por fatores inerentes ao fungo. *P. brasiliensis* foi co-localizado em vacúolo revestido por clatrina e fagossomo EEA1 positivo. Deste modo, concluí-se que a endocitose de alguns metais é dependente de *Clatrina* e *Ypt7* e que Pb18 modula a expressão de *EEA1* e outros genes de via endocítica, juntamente com a tensão de oxigênio para, possivelmente, favorecer sua sobrevivência no organismo do hospedeiro.

Palavras-chave: *Paracoccidioides brasiliensis*, via endocítica, depleção de metais e tensão de oxigênio.

ABSTRACT

The dimorphic fungus, *Paracoccidioides brasiliensis* (cryptic species S1, PS2, PS3) and *Paracoccidioides lutzii* (Pb01-like species), are agents of paracoccidioidomycosis (PCM), chronic granulomatous disease, endemic in Latin America, especially in Brazil. The disease has a wide variety of clinical manifestations, from localized forms to disseminated evolving to lethality. The fungus is able to adhere, invade and spill barriers imposed by host tissues. *P. brasiliensis* (Pb18) has already been observed both within macrophages, but also inside of epithelial cells *in vivo* and *in vitro*. Identification of the mechanism by which this fungus survive within the host cell is a fertile field for the discovery of their pathogenesis, since this microorganism has the ability to induce its own endocytosis in epithelial cells and most probably in macrophages. The micronutrient uptake by the fungus presents unique role, both for its nutritional and invasive procedure, such as for survival within the host cell. The endocytic pathway in microorganisms is of fundamental importance in the regulation of this process. The aim of this study was to evaluate the endocytic pathway of Pb18 and also macrophages infected with this fungus. The evaluation of the endocytic pathway of Pb18 was performed under the condition that depletion of metals, where the genes were analyzed *Clathrin* and *Ypt7* (Rab7 homolog) by RT-PCR semi-quantitative and real-time PCR (RT-PCR quantitative). Was also analyzed by Pb18 infection of macrophages cultured in the depletion of metals at different oxygen tensions. The endocytic pathway of macrophages was analyzed by quantitative RT-PCR and immunofluorescence. This analysis was performed when the fungus was grown at different oxygen tensions and macrophages were infected with this and when the infection was incubated at different oxygen tensions. The genes were evaluated *Clathrin*, *EEA1* (early endosome antigen 1), *Rab5*, *Rab7* and *LAMP-1*. Our results demonstrate increased expression of *Clathrin* and *Ypt7* by Pb18 grown in depletion of metals. Infection of macrophages was higher when Pb18 was cultured in the depletion of iron and copper. The increased expression of *Clathrin* in depletion of copper and iron depletion particularly in + copper + zinc and *Ypt7* showed increased expression mainly in the depletion condition of zinc, copper and iron + copper. When Pb18 was cultivated under aerobic decreased expression of genes *Clathrin*, *Rab5* and

LAMP-1. Gene expression of endocytic pathway was influenced by the condition of the oxygen that were exposed macrophages and also by factors inherent in the fungus. *P. brasiliensis* was co-located in clathrin-coated vesicle and EEA1 positive phagosome. Thus, it can be concluded that in *P. brasiliensis*, nutrient like metals is *Clathrin*- endocytosis dependent and *Ypt7* and *Pb18* modulates the expression of EEA1 and other endocytic pathway genes, together with the oxygen tension to possibly promote their survival in the host organism.

Keywords: *Paracoccidioides brasiliensis*, endocytic pathway, depletion of metals and oxygen tension.

Capítulo 1

1. Introdução

1.1 Complexo *Paracoccidioides*: considerações gerais

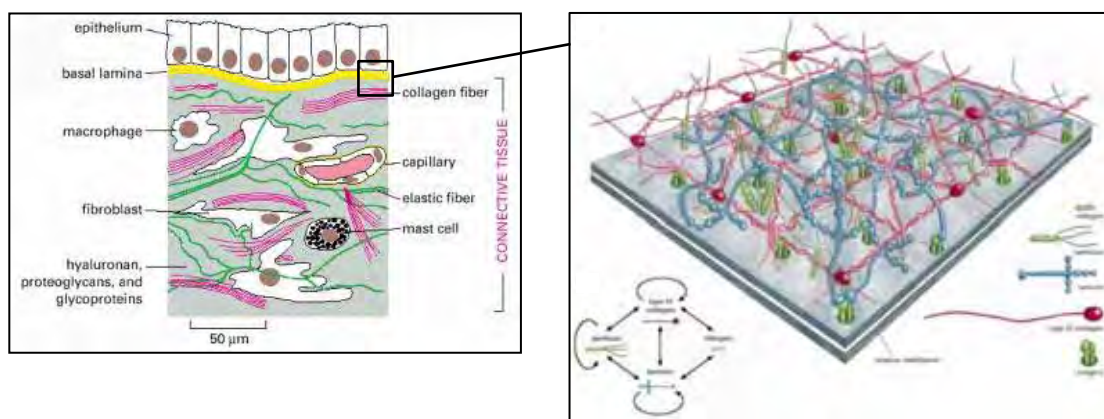
Os fungos dimórficos do complexo *Paracoccidioides*, espécies *P. brasiliensis* (espécies crípticas S1, PS2, PS3) e *P. lutzii* (Pb01-like espécies) são os agentes etiológicos da paracoccidioidomicose (PCM), doença granulomatosa crônica, endêmica na América Latina, principalmente no Brasil (MATUTE et al., 2006a; MATUTE et al., 2006b; CARRERO et al., 2008; TEIXEIRA et al., 2009). Este fungo pertence ao Reino Fungi, está classificado na Divisão Eumycota, Subdivisão Ascomycota, Ordem Onygenales e família Onygenaceae (LECLERC et al., 1994; NINO-VEGA et al., 2007; SAN-BLÁS et al., 2002) de acordo com análise da subunidade de rDNA, outras sequências gênicas e estrutura de galactomananas da parede celular (SAN-BLAS et al., 2005). Até 2006, acreditava-se que havia uma única espécie dentro do gênero *Paracoccidioides*. Nesse mesmo ano, Matute et al. descreveram a existência de três espécies filogenéticas diferentes (S1, PS2 e PS3) do complexo *P. brasiliensis*. Carrero et al. (2008), propuseram Pb01, como uma nova espécie do gênero *Paracoccidioides*, já que esta se diferenciava das espécies filogenéticas descritas por Matute et al. em 2006. Em 2009, estudando outros isolados, Teixeira et al. classificaram os isolados Pb01 como uma nova espécie, *P. lutzii*. Recentemente, Teixeira et al. (2013) demonstraram a possível presença de fase sexual nas espécies do gênero *Paracoccidioides*, este até então classificado como organismo assexuado.

A relevância de se estudar estes fungos se deve à sua prevalência no Brasil, principalmente nas regiões sul, sudeste e centro-oeste, além da gravidade de algumas de suas formas anátomo-clínicas, de suas sequelas e das taxas de mortalidade. O complexo *P. brasiliensis* está presente nas regiões norte, sul, sudeste e centro-oeste e *P. lutzii* na região centro-oeste e mais recentemente foram descritos dois casos na região Amazônica (THEODORO et al., 2012; MARQUES DA SILVA et al., 2012). Além do Brasil, a PCM é endêmica em países da América Central e em outros da América do Sul, como Colômbia, Venezuela e Argentina (COUTINHO et al., 2002; NEGRONI, 1993; SANTO et al., 2008; TRAVASSOS et al., 2008; WANKE; LONDERO, 1994; PRADO et al., 2009).

A maioria dos estudos foi realizado em *P. brasiliensis* e só mais

recentemente na espécie *P. lutzii*. A PCM é uma doença que pode afetar diferentes órgãos e conseqüentemente, *P. brasiliensis* têm mecanismos que o capacitam a aderir, extravasar e invadir barreiras impostas pelos tecidos do hospedeiro (LOPES et al., 1985; MENDES-GIANNINI et al., 1994; LENZI et al., 2000). Os agentes de micoses sistêmicas possuem alguns fatores que permitem o seu crescimento nas condições adversas proporcionadas pelo hospedeiro, que podem contribuir para o desenvolvimento da doença (CASADEVALL; PIROFSKI, 1999).

A adesão de *Paracoccidioides* spp. aos tecidos do hospedeiro representa uma fase crítica no desenvolvimento da infecção fúngica. Esse tipo de adesão é mediado por componentes específicos na superfície da célula fúngica, chamadas de adesinas (Figura 1), as quais frequentemente ligam-se aos componentes da matriz extracelular (MEC) (LENZI et al., 1991; PATTI et al., 1994).



ALBERTS (2004)

Figura 1: Matriz extracelular. A - Tecido conjuntivo subjacente ao epitélio. B – Estrutura molecular da lamina basal.

Depois da adesão sobre as estruturas complementares do hospedeiro, o fungo pode expressar diferentes fenótipos dependendo do isolado, do hospedeiro (susceptível ou resistente), local de inoculação e outros fatores. *Paracoccidioides* spp. têm a capacidade de espalhar-se do foco primário, invadir o sangue e os vasos linfáticos, sendo transportado através dos vasos para então disseminar-se para outras partes do organismo (MENDES-GIANNINI et al., 2000). A literatura descreve diversas adesinas e enzimas, e acredita-se que tenham papel importante na patogênese de *Paracoccidioides* spp. (VICENTINI et al., 1994;

ANDREOTTI et al., 2005; GONZALEZ et al., 2005; BARBOSA et al., 2006; PEREIRA et al., 2007; MENDES-GIANNINI et al., 2006; DONÓFRIO et al., 2009; DA SILVA NETO et al., 2009; SOARES et al., 2010; HERNANDEZ et al. 2011).

Paracoccidioides spp. tem acesso ao organismo via inalação de propágulos da fase miceliana, arthroconídios e aleuroconídios, que invadem as vias aéreas terminais, alvéolos e bronquíolos terminais, onde se transformam em células leveduriformes (RESTREPO, 1985). Quando os propágulos infecciosos interagem com as células do hospedeiro, o primeiro contato ocorre nos alvéolos pulmonares. Neste momento, a capacidade invasiva do fungo irá depender de mecanismos adaptativos do mesmo em resistir à temperatura corporal e à fagocitose (CAMARGO; FRANCO, 2000).

Sabe-se que as condições de oxigênio influenciam o processo infeccioso, e um passo fundamental para compreender as interações fungo-hospedeiro é elucidar como as tensões micro-ambientais encontradas pelos patógenos e células hospedeiras interagem na dinâmica da infecção. Muito pouco se conhece sobre como os fungos patogênicos humanos respondem a limitação de oxigênio, particularmente quando as condições de hipóxia são encontrados no tecido do hospedeiro (SHEPARDSON et al., 2012).

O oxigênio é necessário para sobrevivência dos fungos e das células hospedeiras e, quando os níveis de oxigênio são insuficientes para os processos celulares normais, um estresse significativo é colocado sobre organismos eucarióticos aeróbicos obrigatórios. O oxigênio é um elemento importante para a produção de ATP por meio da fosforilação oxidativa, na produção de esterol, na síntese de ácidos graxos, e outras vias que estão envolvidos no metabolismo e crescimento celular (SHEPARDSON et al., 2012).

No ambiente, a disponibilidade de oxigênio é geralmente descrita como anaeróbia ou anóxica (completa ausência de oxigênio), hipóxica (redução do oxigênio disponível em comparação com os níveis atmosféricos) ou normóxica (geralmente níveis atmosféricos de O₂ de 21%). No contexto da patogênese microbiana, os locais de infecção são geralmente um ambiente de hipóxia. O nível de oxigênio exato que define hipóxia localizada *in vivo* é difícil de ser identificado, e provavelmente vai variar de acordo com as diferentes patologias e a localização anatômica. Em tecidos saudáveis do corpo humano, os níveis de oxigênio

considerados normais variam de 2,5 a 9%. No pulmão humano saudável a disponibilidade de oxigênio está em torno de 14% (GRAHL et al., 2012).

Paracoccidioides spp podem acometer diferentes órgãos, entre eles o pulmão, e sabe-se que a superfície da mucosa pulmonar apresenta uma interface entre o compartimento interno do corpo e a atmosfera externa, que fornece o oxigênio necessário para a maior parte da atividade celular metabólica, sendo a chave para a sobrevivência do organismo. Quando um microrganismo patogênico interage com as células do tecido do hospedeiro, ocorrem danos como inflamação, trombose e necrose, e assim há diminuição da perfusão tecidual com consequente diminuição da concentração de oxigênio local (GRAHL et al., 2012). Os níveis de oxigênio em locais de infecção parecem desempenhar papéis importantes para determinar o resultado de interações imune do hospedeiro com patógenos celulares e o maior regulador de adaptação à hipóxia celular é o fator indutor de hipóxia 1-alfa (HIF-1 α).

Em condições de baixa tensão de oxigênio (hipóxia), *Candida albicans* alterna de levedura para crescimento em forma de hifas, uma alteração fenotípica que é associada com invasão e virulência (DOEDT et al., 2004; MULHERN et al., 2006). Em 2012, Shepardson et al. demonstraram que o ambiente de hipóxia *in vivo*, altera a dinâmica da parede celular de *Aspergillus fumigatus* e pode afetar a patogenia da aspergilose pulmonar invasiva. Assim as condições de oxigênio encontradas no organismo contribuem para a virulência de diversos fungos patogênicos.

A principal defesa do hospedeiro contra o complexo *Paracoccidioides* é a imunidade mediada por células, embora os anticorpos também estejam envolvidos na proteção de camundongos infectados (BORGES-WALMSLEY et al. 2002; MATTOS-GROSSO et al., 2003). A infecção induz a formação de granuloma compacto, uma reação inflamatória crônica, produzida pelo organismo para tentar limitar a disseminação do fungo. Pacientes com doença grave tem menos granulomas e número maior de leveduras viáveis nas lesões. Na ausência de granuloma compacto, o fungo se espalha para diversos órgãos através do sistema circulatório e linfático, resultando em lesões disseminadas por todo o corpo (BORGES-WALMSLEY et al. 2002; XIDIEH et al. 1999).

Segundo Kerr et al. (1988), a resposta inflamatória na formação da lesão granulomatosa de *P. brasiliensis* é dividida em três fases: neutrofílica ou macrofágica neutrofílica, pré-granulomatosa e granulomatosa.

O contato do *P. brasiliensis* com o tecido do hospedeiro desencadeia inicialmente reação inflamatória congestivo-exsudativa com afluxo predominante de neutrófilos (FORTES et al., 2011). Através de estudos histopatológicos, foi observado que apesar da grande quantidade de neutrófilos no início da infecção, estes não foram capazes de matar o fungo. Uma vez que esse não foi completamente eliminado, houve uma mudança no padrão de resposta do hospedeiro com uma subsequente substituição de leucócitos polimorfonucleares para fagócitos mononucleares. Durante a fase pré-granulomatosa os macrófagos vão adquirindo certo grau de maturidade e o exsudato neutrofilico vai diminuindo. Biagioni et al. (1987) sugerem que IgG e C3 desempenham papel importante no início da defesa do hospedeiro contra *P. brasiliensis*, cooperando com a organização e atividade fungicida do granuloma. Os anticorpos específicos ligam-se aos fungos, bloqueando a difusão antigênica, a ativação do sistema complemento, e ajudando na destruição do fungo através de fagocitose ou lise.

O granuloma pode mostrar necrose central do tipo de coagulação em adição à supuração central. Nas últimas fases da progressão do granuloma, observa-se a fase pós-necrose, que no centro de algumas reações granulomatosas ocorre a substituição do tecido necrótico por uma densa rede de fibras de colágeno argirofílicas e proteoglicanos, uma área que favorece a multiplicação de fungos, favorecendo seu crescimento e impedindo a ação fungicida dos componentes da inflamação (KERR et al., 1988; TEIXEIRA et al., 1965). Segundo Nishikaku et al. (2009), a produção de óxido nítrico (NO) pelos monócitos, estimulados por *P. brasiliensis*, parece exercer efeito modulador negativo na formação de granulomas e positivo na disseminação fungica, levando a disseminação da PCM.

O processo de fagocitose está restrito a fagócitos profissionais, como neutrófilos, macrófagos e células dendríticas, enquanto outros eventos de internalização ocorrem em quase todos os tipos celulares (VEIGA; COSSART, 2006).

McEwen et al. (1987) demonstraram que os conídios inalados são rapidamente convertidos em formas leveduriformes nos pulmões de

camundongos infectados. Em 1992, Cano et al. demonstraram que macrófagos pulmonares ativados inibem a transformação de conídios de *P. brasiliensis* em formas leveduriformes e que estes possivelmente destroem os conídios, sendo importantes para a defesa pulmonar nos estágios iniciais da infecção (CANO et al., 1992). Um dos mecanismos de defesa do organismo é controlar a transformação de conídios em leveduras através da restrição de ferro, assim controlam o crescimento e a transformação intracelular dos conídios ingeridos (CANO et al., 1994). Gonzalez et al. (2000) evidenciaram que macrófagos de camundongo ativados com IFN- γ são capazes de destruir conídios de *P. brasiliensis* através da via do óxido nítrico. O recrutamento de leucócitos pró-inflamatórios e a produção de citocinas podem participar no controle da infecção por organizar a resposta imunitária no hospedeiro expostos aos conídios de *P. brasiliensis* (GONZALEZ et al., 2003). Já macrófagos ativados com TNF- α são capazes de inibir a transição de conídios para leveduras por uma via NO-independente (GONZALEZ et al., 2004). Gonzalez et al. (2007) sugeriram que o mecanismo fungicida de macrófagos ativados por IFN- γ , contra conídios de *P. brasiliensis*, é dependente de uma interação com ferro. IFN- γ diminuiu a conversão de conídios de *P. brasiliensis* para a forma de levedura em macrófagos B10R, mas não em macrófagos B10S. A opsonização de conídios aumenta a percentagem de fagocitose e macrófagos B10R apresentaram maior percentual de células associadas a conídios e maior número de conídios por macrófagos que B10S (JIMENEZ et al., 2006).

Em relação à fase leveduriforme, Brummer et al. (1988) demonstraram que leveduras de *P. brasiliensis* podem ser mortas por macrófagos ativados por IFN- γ sem os produtos do “burst” oxidativo. Formas leveduriformes de *P. brasiliensis* fagocitadas por macrófagos ativados são digeridas e mortas após 48h. Deste modo, estas formas estão presentes em fagossomos de macrófagos residentes não ativados, e estes permitem a multiplicação intracelular de formas leveduriformes, enquanto que macrófagos ativados restringem a multiplicação, por sua atividade fungicida (MOSCARDI-BACCHI et al., 1994; BRUMMER et al., 1989). Inúmeros fatores podem influenciar na resistência do hospedeiro à infecção por *P. brasiliensis*, mas a ação do IFN- γ pode desempenhar papel central nessa resistência (HOSTETLER et al., 1993).

Em 1998, Almeida et al. demonstraram que a glicoproteína de 43kDa (gp43) está envolvida na adesão e fagocitose de *P. brasiliensis* por macrófagos peritoneais de camundongo. Popi et al. (2002) verificaram que *P. brasiliensis* modula sua fagocitose através da glicoproteína gp43, sendo esta responsável pela evasão do fungo e também por facilitar a sua implantação, na infecção primária, nos tecidos de hospedeiro susceptível. Em 1990, Mendes-Giannini et al. descreveram os efeitos proteolíticos da gp43 sobre colágeno, elastina e caseína, inferindo que a digestão de proteínas estruturais parece ter importante papel na instalação do fungo nos tecidos do hospedeiro. Além da gp43, a presença de melanina também inibe a fagocitose de leveduras de *P. brasiliensis* por macrófagos alveolares e peritoneais (DA SILVA et al., 2006).

Além dos macrófagos, *P. brasiliensis* também é fagocitado por células dendríticas (FERREIRA et al., 2006). Em 2007, Ferreira et al. demonstraram que a fagocitose de *P. brasiliensis* por células dendríticas é mais eficiente em camundongos sensíveis à infecção, mas ressaltam que estas não foram capazes de matar *P. brasiliensis*.

Tavian et al. (2008) verificaram que neutrófilos humanos conseguem matar *P. brasiliensis* através da via oxidativa na presença de interleucina-15 (IL-15). Dias et al. (2008) demonstraram que neutrófilos apresentam capacidade de destruir *P. brasiliensis in vitro* por ativação do “burst” respiratório durante o processo de fagocitose, mas ressalta que a ativação de NAD(P)-oxidase não é o principal mecanismo envolvido na morte de *P. brasiliensis*, por estas células. Assim, a fagocitose de *P. brasiliensis*, por diferentes tipos celulares depende da capacidade do fungo de impedir a fagocitose, através de seus fatores de virulência, bem como de fatores inerentes ao hospedeiro, como sua resistência e susceptibilidade. Assim, os macrófagos apresentam papel central na imunidade anti-*P. brasiliensis* (FRANCO, 1987). De tal modo, *P. brasiliensis* já foi observado tanto no interior dos macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, bem como no interior de células epiteliais *in vivo* e *in vitro* (De BRITO et al., 1973; HANNA et al., 2000).

Acredita-se que macrófagos alveolares ou células dendríticas fagocitam o fungo e o transportam pelo sistema linfático para região de linfonodos, onde será gerada uma resposta imune específica (CALICH et al., 2008). Lenzi HL e Restrepo A., demonstraram células leveduriformes de *P. brasiliensis* gemulando

no interior de macrófagos e sendo transportadas pelo sistema linfático (dados não publicados). Assim, os macrófagos apresentam duplo papel na PCM, podendo ser instrumento de disseminação da infecção ou instrumento de defesa do organismo. Em ambos os casos, eles são críticos no resultado da infecção (BENARD, 2008).

A resposta do hospedeiro à infecção é iniciada pela secreção de diferentes proteínas antimicrobianas pelo epitélio pulmonar e também pela atividade fagocítica de macrófagos alveolares residentes (JANEWAY, 1992; JANEWAY; MEDZHITOV, 2002; ROMANI, 2004). A interação inicial macrófago-patógeno resulta na internalização do patógeno por essas células, as quais podem destruir o mesmo através da ação de espécies reativas do oxigênio ou enzimas líticas (BEUTLER, 2004; ZAAS; SHWARTZ, 2005; JANEWAY, 1992). Quando microrganismos são fagocitados, estes por sua vez, são conduzidos pela via fagolisossomo, onde alguns conseguem escapar e outros sobrevivem no interior das células do hospedeiro.

1.2 Via endocítica

Endocitose é um processo celular básico que é utilizado pelas células para internalizar uma variedade de moléculas (MAYOR; PAGANO, 2007). Macromoléculas e grandes estruturas entram nas células por endocitose, a qual é definida como invaginação de uma porção da membrana plasmática contendo proteínas e lipídeos, e ligantes extracelulares e/ou moléculas solúveis. Já íons e pequenas moléculas, como aminoácidos e açúcares, podem atravessar a membrana através de canais. Diferentes tipos de endocitose foram descritos, diferindo no tamanho da vesícula endocítica, tamanho da “carga” e do mecanismo de formação da vesícula. Isto inclui fagocitose, macropinocitose, endocitose mediada por clatrina, endocitose mediada por caveolina e endocitose independente de clatrina e caveolina (VEIGA; COSSART, 2006). A endocitose independente de clatrina e caveolina pode ocorrer através das CLICs (*Clathrin and dynamin independent carriers*), que é uma vesícula independente de clatrina e dinamina, derivada da membrana plasmática. Algumas vias podem apresentar rotas por compartimento intermediário, como os caveossomos (MAYOR; PAGANO, 2007), ou por proteína rica em glicosilfosfatidilinositol (GEEC – *glycosyl*

phosphatidylinositol-anchored protein enriched early endosomal compartments) que são direcionadas para o endossomo precoce (Figura 2).

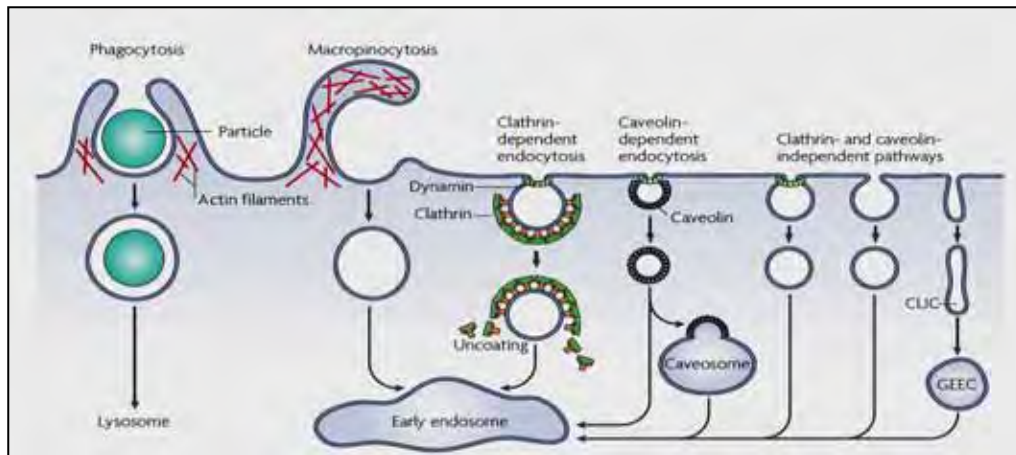


Figura 2: Vias de entrada nas células (MAYOR; PAGANO, 2007)

Para o processo de internalização é necessário inicialmente o surgimento de uma vesícula, que pode ser revestida por clatrina, que facilita o englobamento de nutrientes e também muitos receptores de sinalização após sua ligação com a molécula cargo. Existe a endocitose independente de clatrina, com estruturas revestidas por caveolina, nos casos de endocitose das células endoteliais. Existem dois outros mecanismos estritamente dependentes da actina cortical que é a fagocitose e a macropinocitose (DONALDSON et al., 2009). A endocitose mediada por clatrina é um modelo de transporte vesicular que está envolvido na internalização e reciclagem de receptores por vesículas endocíticas (DOHERTY; MCMAHON, 2009). Além disso, a mesma está envolvida na internalização de uma grande variedade de patógenos, incluindo vírus e bactérias (CONNER; SCHMID, 2003; MARSH; HELENIUS, 2006; VEIGA et al., 2007). Recentemente, Moreno-Ruiz et al. (2009) descreveram que clatrina está envolvida na endocitose de *C. albicans*.

A via endocítica apresenta várias rotas entre a membrana plasmática, endossomo, lisossomo e complexo de Golgi. Assim, logo depois da internalização, as vesículas de transporte ligadas à membrana fundem-se com o endossomo precoce, enquanto que os ligantes internalizados, como proteínas e lipídeos de membrana retornam para a membrana, ou são transportados para o endossomo tardio e lisossomo para a degradação final (GRUENBERG, 2003). A existência de algumas moléculas, como as Rabs, que são pequenas GTPases da

superfamília Ras, enzimas que convertem GTP (5`-Trifosfato de guanosina) a GDP (difosfato de guanosina), orquestram uma sequência de eventos de fusão (ZERIAL; McBRIDE, 2001). Rabs são proteínas utilizadas como marcadores da via fagolisossomal, assim como as proteínas de membrana associadas ao lisossomo (LAMPs) e outras proteínas presentes na membrana lisossomal. LAMPs e proteína integral de membrana lisossomal (LIMPs) representam mais de 50% das proteínas de endossomo tardio e lisossomo (MARSH et al., 1987; SCHWAKE et al., 2013). Considerando o tráfego de membrana, Rab GTPases e suas proteínas efetoras divalentes, por exemplo EEA1 (antígeno de endossomo precoce 1), estão implicadas na seleção da carga, brotamento, motilidade, fusão da vesícula e função das organelas (ZERIAL; McBRIDE, 2001; JOVIC et al., 2010). Rab5 é a Rab de endossomo precoce mais extensivamente analisada (GORVEL et al., 1991, BUCCI et al., 1992, BARBIERI et al., 1996; ZERIAL; McBRIDE, 2001; GROSSHANS et al., 2006). Ela regula a entrada da molécula cargo da membrana plasmática ao endossomo precoce, a geração de fosfatidilinositol-3-fosfato (PtdIns (3 P) lipídica que se enriquece no endossomo precoce (CHRISTOFORIDIS et al., 1999; MURRAY et al., 2002), fusão homotípicas (GORVEL et al., 1991) e regula a motilidade do endossomo pelos feixes de actina e microtúbulos (NIELSEN et al., 1999; PAL et al., 2006).

Muitos microrganismos patogênicos podem invadir células eucarióticas e utilizar este ambiente para se multiplicar ou escapar da resposta imune do hospedeiro. Quando os microrganismos são fagocitados, tanto podem ser destruídos, como também desenvolver diferentes estratégias que permitam sua replicação e sobrevivência no interior de células fagocíticas ou não fagocíticas (FINLAY; FALKOW, 1997). Diferentes patógenos desenvolveram estratégias na rota endocítica que permitem sua sobrevivência e replicação dentro da célula hospedeira. *Shigella flexneri*, *Listeria monocytogenes* e *Rickettsiae* sp dissolvem a ligação membrana-vacúolo após a entrada e assim têm acesso direto ao citoplasma rico em nutrientes. Alguns organismos como a *Coxiella burnetii* apresentam mecanismos que permitem sua sobrevivência aos agentes bactericidas liberados pela célula hospedeira no fagolisossomo e assim podem crescer no ambiente lisossomal. Outros organismos como *Salmonella*, *Mycobacterium* e *Legionella* utilizam mecanismos que evitam ou inibem alvos de internalização da bactéria pela fusão da via fagolisossomo, no entanto não foi

estabelecido o mecanismo comum utilizado por esses microrganismos (FINLAY; FALKOW, 1997; AMER; SWANSON, 2002).

O estudo da via endocítica em células infectadas com diferentes microrganismos já foi amplamente estudado. Batista et al. (2006) demonstraram que em cardiomiócitos, após a invasão por *Trypanosoma cruzi*, a expressão de EEA1 foi reduzida nas células infectadas, o que poderia contribuir para alteração no brotamento e transporte de vesículas e eventos de fusão de endossomo precoce. Wozniak et al. (2008) descreveram a via endossomal e lisossomal em células dendríticas quando estas fagocitam *Cryptococcus neoformans*, demonstrando a presença do fungo no ambiente lisossomal. Fernandez-Arenas et al. (2009) demonstraram que *C. albicans* utiliza múltiplas estratégias de sobrevivência intracelular, o que leva a persistência da infecção, sendo considerado um mecanismo de evasão da mesma.

A via endocítica em células infectadas com *P. brasiliensis* ainda é pouco conhecida. Especula-se que o mesmo se dissemine pelo organismo através dos macrófagos. Em nosso estudo da via endocítica com macrófagos AMCJ2-C11 infectados com *P. brasiliensis*, foi observado diminuição na expressão da proteína EEA1, o que talvez possa contribuir para a sobrevivência de *P. brasiliensis* no interior das células infectadas ou mesmo alterar processos celulares básicos (VOLTAN, 2008). EEA1, em coordenação com os membros da família SNAREs, é essencial para a fusão do endossomo precoce *in vivo* (MILLS et al., 1998; 1999), esta pode interagir diretamente com sintaxina-6 e sintaxina-13, duas meta-Snares (t-SNAREs) (McBRIDE et al., 1999; SIMONSEN et al., 1999; MILLS et al., 2001). EEA1 também contém um domínio que especificamente se liga a PtdIns (3)P (RAIBORG et al., 2001). Assim a dupla ligação do EEA1 para GTP-Rab5 e PtdIns (3) P modula a sua localização nas membranas do endossomo precoce (LAWRE et al., 2002).

Os mecanismos de escape de microrganismos patogênicos na célula hospedeira compreendem uma série de eventos de sinalização, possibilitando a propagação do microrganismo. Diferentes classes de proteíno-quinases (PKs) apresentam papel na transdução de sinais extracelulares e regulação de processos essenciais nas células de mamíferos, como crescimento, diferenciação, transcrição, doença e morte celular (COURTNEIDGE, 1994; DICKMAN; YARDEN, 1999; HUNTER, 1995; JARVIS et al., 1994). A fagocitose

de alguns fungos pelas células é dependente da atividade de proteíno-quinase C (KAPOSZTA et al., 1999; BELANGER et al., 2002; LIMONGI et al., 2003). Estudos prévios demonstraram que alguns patógenos dependem da via de sinalização de fosfolipídios de membrana, através do fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K), para a regulação da via fagolisossomal. Andrade e Andrews (2004), utilizando wortmanina, um inibidor de PI3, verificaram a inibição da entrada das formas tripomastigotas de *T. cruzi*. Monteiro da Silva (2004) avaliou a necessidade da fosforilação da tirosino-quinase, tanto em *P. brasiliensis* como nas células epiteliais através da inibição da via com genisteína, o que acarretou uma inibição significativa da invasão fúngica, concluindo que a via de sinalização nas células epiteliais, envolvendo o receptor de tirosino-quinase, é necessária para possibilitar a invasão de *P. brasiliensis*. Além dos fungos, outros microrganismos também necessitam da atividade das proteínas tirosino-quinases para a invasão de células hospedeiras.

Além deste possível mecanismo, sabe-se que *P. brasiliensis* induz apoptose (morte celular programada) quando invade células epiteliais ou fagócitos, o que beneficia sua sobrevivência intracelular (MENDES-GIANNINI et al., 2004). Em 2008, Silva et al. demonstraram que *P. brasiliensis* induz a apoptose de macrófagos através da expressão de caspase 2, 3 e 8. Caspases 2 e 8 desencadeiam a transdução de sinais para clivagem de outras caspases, como a caspase-3, que acarretará em eventos celulares que leva a apoptose. A indução de apoptose também foi observada por Del Vecchio et al. (2009), quando verificaram que *P. brasiliensis* modulava a apoptose de células epiteliais A549 através da expressão de moléculas apoptóticas, como bcl-2, bak, caspase-3, confirmando que através da indução da apoptose o fungo pode sobreviver e se disseminar para outras partes do organismo. Por outro lado, alguns estudos têm avaliado danos teciduais através da liberação de LDH (lactato desidrogenase). Um exemplo é a infecção de macrófagos por diferentes cepas de *Rickettsia*, que demonstrou baixa taxa de lise celular (RADULOVIC et al., 2002). Danelishvili et al. (2003) descreveram que a morte de macrófagos infectados com *M. tuberculosis* esta associada à apoptose, enquanto que a morte de células epiteliais alveolares está associada à necrose. Em 2011, Silva et al. demonstraram que a interação de *C. albicans* e *C. glabrata* com epitélio oral provoca dano tecidual e aumento da liberação de LDH pelo epitélio.

1.2.1 Expressão de proteínas de via endocítica em microrganismos

Além da análise da presença de via endocítica em células infectadas com microrganismos, a literatura tem apresentado a expressão de proteínas de via endocítica também em microrganismos. Côrrea et al. (2008) demonstraram a expressão de clatrina nas formas epimastigotas de *T. cruzi*. Já a primeira descrição de clatrina em leveduras foi realizada por Muller e Branton (1984), na levedura *Saccharomyces cerevisiae*. A expressão de clatrina em leveduras está envolvida principalmente na endocitose de receptores, mas na ausência de clatrina, a endocitose de receptores continua a acontecer, mas de forma mais lenta (BAGGETT; WENDLAND, 2001). Em 2008, Voltan descreveu a expressão de clatrina no fungo *P. brasiliensis* pela técnica de imunofluorescência. Endocitose mediada por clatrina é um processo no qual todas as células eucarióticas internalizam nutrientes, antígenos, fatores de crescimento, patógenos e reciclam receptores (TAKEI; HAUCKE, 2001). Além da clatrina, outras proteínas de via endocítica foram descritas em microrganismos, como as GTPases monoméricas (200 – 230 aminoácidos), que em mamíferos é denominada de Rab e em leveduras é chamada de Ypt, a qual apresenta papel na regulação dos diferentes estágios do tráfego de vesículas. A família de Ypt GTPases pertencem a superfamília de proteínas Ras, sendo que há 29 membros dessa superfamília em *S. cerevisiae* (LAZAR et al., 1997; GOTTE et al., 2000). Em 1992, Wichmann et al. descreveram pela primeira vez a proteína homóloga de Rab7, Ypt7p, em leveduras. Schimmöller e Riezman (1993) propuseram o papel de Ypt7p na regulação do transporte de vacúolo para endossomo tardio em leveduras. Além da expressão em leveduras, as proteínas Rabs também já foram descritas em *Entamoeba histolytica* (TANAKA et al., 1997; TEMESVARI et al., 1999), em *Paramecium* sp (SURMACZ et al., 2003), em *Lentinula edodes* (Shiitake) (LEE et al., 2007), entre outros. Também em 2008, Voltan relatou a presença de expressão de Rab7 por leveduras de *P. brasiliensis*, mas pouco se conhece sobre a via endocítica deste microrganismo, principalmente nas diferentes condições do hospedeiro, como na depleção de micronutrientes (ferro, cobre e zinco), já que esta depleção está fortemente relacionada com a interação parasito-hospedeiro.

O suprimento de cobre, ferro e zinco são essenciais para todos os organismos vivos (SILVA et al., 2011). Ferro e cobre são necessários devido ao

seu papel como cofatores em funções metabólicas essenciais e ao mesmo tempo, a sua reatividade com peróxido de hidrogênio resulta na formação de radicais hidroxilas, altamente tóxicos, o que determina o requerimento de mecanismos que regulam a captação e estocagem desses nutrientes (RATLEDGE; DOVER, 2000). Em resposta à infecção, o hospedeiro tem desenvolvido estratégias para limitar a disponibilidade de ferro para o patógeno, já que nos tecidos não há ferro livre (SCHAIBLE; KAUFMANN, 2004). O cobre é um metal essencial para muitos organismos aeróbicos, o qual serve também como cofator estrutural e enzimático para enzimas envolvidas na geração de energia, aquisição de ferro, transporte de oxigênio e metabolismo celular, entre outros processos. Além do ferro e cobre, o zinco é também um metal crítico, já que é o centro catalítico de numerosas enzimas, além de apresentar papel importante na funcionalidade de uma ampla variedade de proteínas (SILVA et al., 2011).

Homeostase de ferro no organismo é finamente regulada para assegurar disponibilidade suficiente de ferro para as numerosas funções essenciais na qual o ferro está envolvido, mas evitando o excesso de ferro, que promove dano tecidual através da formação de espécies reativas de oxigênio (ROS). Os macrófagos são células chave na tentativa de manter o equilíbrio ideal de ferro no processo inflamatório. No local da inflamação, o nível de retenção de ferro, em macrófagos inflamatórios previne acesso de ferro para patógenos extracelulares, mas favorece aqueles que têm sido capaz de adaptar-se à vida intracelular. Por exemplo, em relação à defesa do hospedeiro, uma vez que quase todos os agentes patogênicos necessitam de ferro para seu crescimento, estratégias destinadas a restringir a disponibilidade de ferro podem representar caminhos promissores para defesa do organismo (RECALCATI et al., 2013).

Quando em excesso, esses metais podem ser tóxicos, portanto distúrbios nos níveis de ferro e cobre, podem causar graves efeitos no metabolismo celular, crescimento e desenvolvimento dos organismos (DE FREITAS, 2002).

O transporte desses metais para o interior das células é realizado através da via endocítica (GOTTE; LAZAR, 1999). É sabido que o receptor de transferrina leva para interior da célula a transferrina (transportador de ferro), e após liberar o ferro para o endossomo, o receptor é reciclado novamente para a membrana plasmática juntamente com a apotransferrina (transferrina livre do átomo de ferro). Assim, a transferrina circula para dentro e para fora da célula através do

compartimento endossômico (ALBERTS, 2004). Doherty e McMahon (2009) descreveram que o transporte do receptor de transferrina ocorre através de vesículas revestidas por clatrina (a mesma é um tipo de revestimento de vesícula entre outros existentes, para endocitose de microrganismos, substâncias, receptores, entre outros elementos). A transcrição de transportadores de zinco (ZTR1 e ZTR2) é induzida na limitação de zinco na célula, que é mediado pelo ativador transcricional ZAP1 (ZHAO; EIDE, 1997). Em baixas condições de zinco, ZAP-1 ativa a expressão do gene ZTR1 e ZTR2, sendo zinco o regulador da endocitose de ZTR (GITAN et al., 1998).

Assim, por meio da determinação da rota endocítica, tanto em macrófagos infectados, como em *P.brasiliensis*, será possível avançar nos conhecimentos relativos à interação deste fungo com macrófagos e deste modo contribuir para possíveis alvos terapêuticos.

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a expressão de genes/ proteínas de via endocítica em *P. brasiliensis* e em macrófagos infectados com o fungo na fase leveduriforme.

2.2 Objetivos Específicos

- Determinar alterações na via endocítica de *P. brasiliensis* cultivado na depleção de metais através de PCR em tempo real;
- Determinar por PCR em tempo real as alterações na via endocítica de macrófagos infectados com *P. brasiliensis*, quando este foi incubado em diferentes tensões de oxigênio;
- Determinar por PCR em tempo real as alterações na via endocítica de macrófagos infectados por *P. brasiliensis*, quando a infecção foi incubada em diferentes tensões de oxigênio;
- Co-localizar *P. brasiliensis* dentro de fagossomos formados em macrófagos, determinando as proteínas endossomais/lisossomais envolvidas.

3. Materiais e Métodos

3.1 Fluxograma dos experimentos realizados

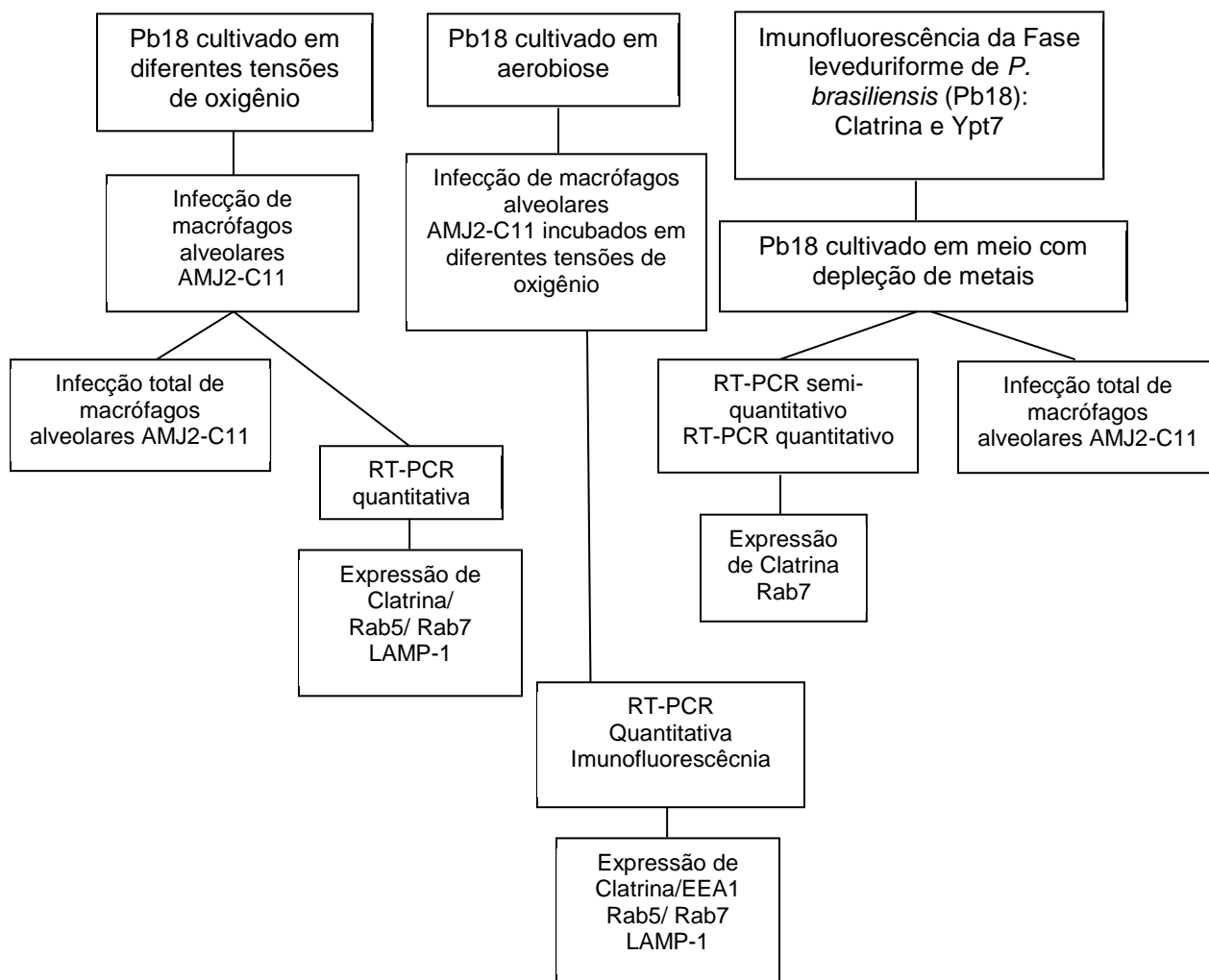


Figura 3: Fluxograma da avaliação da via endocítica da fase leveduriforme de *P. brasiliensis* (Pb18) cultivado na depleção de metais e avaliação da via endocítica de macrófagos infectados com Pb18 em diferentes tensões de oxigênio.

3.2 Microrganismos

Foi empregado o isolado 18 de *P. brasiliensis* (Pb) na fase leveduriforme, procedente da micoteca da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo Medicina da Universidade de São Paulo (FM-USP), gentilmente cedido pela Profa. Dra. Vera Calich. Este foi obtido de caso de paracoccidiodomicose no

Brasil. Durante a realização deste trabalho, o isolado havia sido recentemente isolado de animal e foi mantido em meio de Fava-Netto em estufa a 35°C e repicado a cada 3-4 dias.

3.3 Preparo dos meios de cultura para cultivo de *P. brasiliensis*

Foi utilizado o ágar e caldo Fava-Netto (Fava-Netto, 1955) e o meio quimicamente definido conhecido como MVM (McVEIGH; MORTON, 1965, modificado por RESTREPO; JIMENEZ, 1980) contendo: glicose 1%, fosfato de potássio monobásico (KH₂SO₄) 11 mM, sulfato de magnésio (MgSO₄) 2 mM, cloreto de cálcio (CaCl₂) 1 mM, sulfato de amônio (NH₄SO₄) 15 mM, L-asparagina 0,02%, L-cistina 0,002%, solução de vitaminas 1% e solução de elementos traços 0,1%.

A solução de vitaminas consistiu de cloridrato de timina 0,6 mg, niacina 0,6 mg, pantotenato de cálcio 0,6 mg, inositol 0,1 mg, biotina 0,01 mg, riboflavina 0,1 mg, ácido fólico 1 mg, cloreto de colina 1 mg, cloridrato de piridoxina 1 mg, H₂O quantidade para 10 mL de solução e a Solução de elementos de traços de ácido bórico (H₃BO₃) 900 mM, sulfato de cobre (CuSO₄) 600 mM, sulfato ferroso amoniacal (Fe(NH₄)₂(SO₄)₂) 4 mM, sulfato de manganês (MnSO₄) 200 mM, molibdato de amônia ((NH₄)₆Mo₇O₂₄) 29 mM, sulfato de zinco (ZnSO₄) 2,75 mM.

O meio então sofreu modificações para se adequar às diferentes condições de depleção de micronutrientes, como: MVM completo (Controle), MVM sem sulfato de cobre, MVM sem sulfato de ferroso, MVM sem sulfato de zinco, MVM sem sulfato ferroso e sem sulfato de cobre e MVM sem sulfato de cobre/ sulfato ferroso e sulfato de zinco (MVM incompleto). Além da retirada do metal do meio, para garantir a ausência desse íon foi utilizado, de acordo com a necessidade, o quelante de cobre (batocuproinadisulfonato sódico - BCS) 50µM, o quelante de ferro (batofenantrolinadisulfonato - BPS) 50µM e o quelante de zinco [N´N´_,N´_ tetrakis (2-pyridyl-methyl) ethylenediamine – TPEN].

3.4 Cultivo de *P. brasiliensis*

3.4.1 Cultivo de *P. brasiliensis* na depleção de metais

Para os experimentos, células leveduriformes de Pb18 foram removidas do ágar Fava-Netto e transferidas para caldo Fava-Netto, que foi mantido durante 72h a 37°C sob agitação de 200rpm. Após o período de incubação, a cultura foi centrifugada a 12.000g/10min e as células foram lavadas uma vez com tampão salina-fosfato (PBS) 0,05M pH 7,2 estéril e em seguida foram ressuspensas em 5 mL de MVM. Um inóculo de 2×10^6 células foi colocado em MVM e incubado por 16h a 37°C sob agitação de 200rpm. Posteriormente, as células foram transferidas para o MVM adaptado para os metais e incubadas por 3h a 37°C sob agitação de 200rpm. Em seguida, as células foram centrifugadas a 12.000g/10min e depois lavadas uma vez com PBS 0,05M estéril, o fungo foi utilizado para os ensaios de infecção com macrófagos e também para a extração de RNA, onde o *pellet* foi armazenado em freezer -70°C.

3.4.2 Cultivo de *P. brasiliensis* em diferentes tensões de oxigênio

Para os ensaios de análise de via endocítica de macrófagos infectados com Pb18, este foi cultivado em diferentes tensões de oxigênio. O cultivo de *P. brasiliensis* foi realizado em caldo Fava-Netto, sendo que este foi incubado por cinco dias em condições de aerobiose e microaerofilia. Após este período, a cultura foi centrifugada à 2500rpm/ 10min e o *pellet* lavado 2x com PBS estéril e com este realizada a infecção de macrófagos. A viabilidade das leveduras foi testada com azul de Trypan.

3.5 Cultura de macrófagos AMJ2-C11

Neste estudo foi utilizada a linhagem de macrófagos alveolares de camundongo - AMJ2-C11 (ATCC CRL-2456), obtida do banco de células do Rio de Janeiro (BCRJ). Estes foram cultivados em garrafas plásticas, em meio DMEM (Sigma) suplementados com soro fetal bovino (SFB) 10% e antibióticos 1%, e mantidos à temperatura de 36,5°C.

Decorridos 3 a 4 dias, as garrafas de células foram submetidas a tripsinização. Para isso, a monocamada formada foi lavada com PBS 0,05M, pH 7.2 estéril e, após lavagem, este foi desprezado para então acrescentar 2mL 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 DMEM acrescido de SFB e antibióticos. O volume total da suspensão celular obtido foi transferido para outras garrafas, de modo a se obter uma concentração celular de 10^6 células/mL.

3.6 Infecção de macrófagos por *P. brasiliensis*

3.6.1 Preparo do inóculo de *P. brasiliensis*

A fase leveduriforme de Pb18 foi cultivada em meio Fava-Netto e MVM a 35°C. Foi adicionada uma quantidade suficiente de PBS 0,05M estéril, uma quantidade de fungo para obtenção de uma suspensão turva e homogênea, correspondente a 1×10^5 células/mL, quantidade esta estabelecida pela contagem das células em hemocitômetro. A viabilidade (> 90%) foi avaliada pelo azul de Trypan.

3.6.2 Períodos de Infecção

A infecção de macrófagos AMJ2-C11 com a fase leveduriforme de Pb18 foi avaliada nos intervalos de tempo de 2, 6, 12 e 24h, de acordo com Silva et al. (2008).

3.7 Ensaio de infecção total de macrófagos alveolares AMJ2-C11 com *P. brasiliensis*

Os ensaios de infecção foram realizados em placas de 24 orifícios contendo no interior uma lamínula redonda 13 mm, de acordo com Monteiro da Silva et al. (2004) com modificações. Para os ensaios foi utilizada uma suspensão de macrófagos alveolares padronizada de 10^5 células/mL. Assim, após a tripsinização e homogeneização da suspensão celular, 200µL desta foi retirada da garrafa, e diluída em 1,8 mL de meio de cultivo DMEM e então foi realizada a contagem das células em hemocitômetro, para que, através de diluições adequadas, fosse ajustada a concentração desejada. Ao término desta etapa, 1,0mL dessa suspensão de células foi dispensada em cada orifício da placa e

esta incubada a 36,5°C por 24h, para que a monocamada celular fosse formada sobre a lamínula.

Após a formação do tapete celular sobre as lamínulas contidas na placa de 24 orifícios, o sobrenadante foi desprezado e as células lavadas por 3 vezes com 1mL cada de PBS 0,05 M, pH 7.2 estéril. Para infecção com a fase leveduriforme de Pb18, cada poço foi inoculado com 500µL da suspensão padronizada de Pb18 em PBS e então acrescentado 500µL de meio de cultivo e em outros poços foram acrescentados apenas de 1,0 mL de meio de cultivo. A seguir, as células infectadas e não infectadas foram incubadas em estufa a 36,5°C, em diferentes períodos de tempo.

Foram realizados ensaios de infecção com macrófagos alveolares com Pb18 cultivado na depleção de micronutrientes, Pb18 cultivado em ambiente de aerobiose e microaerofilia. Os ensaios de infecção com Pb18 cultivado na depleção de metais foi realizado com o período de 6h e com o Pb18 cultivado em aerobiose e microaerofilia foi realizado com 2, 6, 12 e 24h. Após os períodos de infecção citados, as células foram lavadas 3x com PBS estéril e então lisadas com 500 µL de água estéril gelada. A partir do lisado obtido, 100µL deste foi plaqueado em meio 192 e após 10 dias de incubação à 37°C foram contadas as UFC (unidade formadora de colônias) obtidas.

3.8 Preparação de anticorpos anti - *P. brasiliensis*

3.8.1 Extrato *cell-free*

Este extrato foi obtido com o isolado 18, na fase leveduriforme, de acordo com Camargo et al. (1991). Cerca de 300mg de crescimento com 3-4 dias em meio Fava Netto foram adicionados em 1mL de PBS, pH 7,4 0,01M estéril. Esta mistura foi agitada em *vortex* por 30 segundos e centrifugada a 400 x *g* por 1 minuto. O sobrenadante (antígeno *cell-free*) foi retirado, aliquoteado e armazenado a -20°C. A concentração proteica foi quantificada pelo método de Lowry et al. (1951) e em seguida a amostra foi avaliada por SDS-PAGE (LAEMMLI, 1970; STUDIER, 1973).

3.8.2 Produção de anticorpos policlonais anti-*cell-free*

3.8.2.1 Soro anti-*cell-free* de *P. brasiliensis*

Soro anti-*cell-free* de *P. brasiliensis* foi produzido a partir do antígeno *cell-free* do isolado 18. Quantidades de 0,2; 0,5; 0,7 e 1,0mL do antígeno (500µg/mL) foram inoculados intradermicamente em coelho, intercaladas as inoculações a cada quatro dias, sendo que nas duas primeiras a suspensão foi emulsificada com adjuvante incompleto de Freund. Decorridos 15 dias da última inoculação, uma sangria de prova foi realizada e a avaliação do título de anticorpos foi feita através da técnica de imunoblot. Em seguida, foram feitas quatro doses de reforço de 1,0mL cada, em um intervalo de 15 dias de cada aplicação. Nova sangria de prova foi realizada e após 15 dias da última inoculação a sangria total. O anti-soro obtido foi precipitado com sulfato de amônio, aliquotado e estocado a -70°C.

3.9 Reação de imunofluorescência dupla segundo Heesemann e Laufs (1985)

Foi realizada a imunofluorescência com as lamínulas preparadas com monocamada de macrófagos infectados e não-infectados com *P. brasiliensis* (conídios e fase leveduriforme). O uso de dois fluoróforos possibilitou a observação do fungo intra e extracelular e das proteínas celulares como descrito por Heesemann e Laufs (1985). A reação dupla foi realizada com anticorpo primário anti-*cell-free* (Pb18) para a marcação do fungo e anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado com Alexa Fluor®594 (Molecular Probe). Para a observação de proteínas da via fagolisossomal celular foi utilizado anticorpo primário específico e anticorpo secundário anti-IgG conjugado com Alexa Fluor® 488 (Molecular Probe).

As lamínulas contendo 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 com PBS-Tween-20 0,25% (PBS-T) gelado, foram incubadas com solução de bloqueio (BSA 2,5% - Sigma-Aldrich® + leite Mólico desnatado® 1% + Soro fetal bovino 8%) (FERNANDES DA SILVA, 1998) por 30 minutos à temperatura ambiente. Após o período de

incubação, a solução de bloqueio foi desprezada e então foi adicionado o anticorpo primário anti-*cell-free* do isolado de Pb18 (título 1:50 em PBS) por uma hora a 37°C. Após novas lavagens com PBS-T gelado, as lamínulas foram incubadas com anti-IgG de coelho conjugado com Alexa Fluor®594 (título 1:300 em PBS) por uma hora a 37°C. Após novas lavagens com PBS-T foi realizada a incubação com anticorpo primário utilizado, como descrito na tabela 1, por 1h a 37°C e o anticorpo secundário anti-IgG camundongo conjugado com Alexa Fluor®488, por 30 minutos a 37°C. Por último, as lamínulas foram novamente lavadas com PBS-T gelado e foi adicionado 300µL de DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) (0,5µg/mL) e incubados por 10 minutos à 37°C. Após novas lavagens com PBS-T gelado, as lamínulas foram montadas com anti-fading (phenylenediamine (Sigma-Aldrich®)/ glicerol/ PBS 0.01M pH 8.6) e as imagens foram analisadas por microscopia confocal a laser (LSM 510 – META, Zeiss®). Na tabela 1 estão descritos os reagentes empregados neste trabalho e seus respectivos títulos e origem.

Tabela 1: Reagentes utilizados nas reações de imunofluorescência.

Reagentes	Título	Origem	Marca/ Código
Clatrina	1/50	Monoclonal camundongo	Sigma-Aldrich® Cód. C1860
EEA1	1/100	Monoclonal camundongo	Sigma-Aldrich® Cód. E7659
Rab5	1/100	Monoclonal camundongo	Sigma-Aldrich® Cód. R7904
Rab7	1/100	Monoclonal camundongo	Sigma-Aldrich® Cód. R8779
LAMP-1	1/100	Monoclonal camundongo	Santa Cruz Biotech Cód. Sc-17768
Alexa®Fluor 488	1/300	Camundongo	Molecular Probe® Cód. A11029
Alexa®Fluor 594	1/300	Coelho	Molecular Probe® Cód. A11012

3.10 Extração de RNA total de macrófagos AMJ2-C11 e *P. brasiliensis* (adaptação de Sokolovsky *et al.*, 1990)

Após o período de infecção da monocamada celular em garrafas 75 cm² em diferentes condições de oxigênio, as células foram lavadas com PBS 0,05M estéril e as células removidas das garrafas mecanicamente com “scraper” e colocadas em tubo (tipo Falcon). As células foram lavadas uma vez com PBS 0,05M estéril e o *pellet* armazenado no -70°C. Foi extraído RNA total dos macrófagos infectados e não-infectados com a fase leveduriforme de *P. brasiliensis* e apenas do fungo *P. brasiliensis* cultivado na depleção dos micronutrientes. Para a extração de RNA total foi adicionado 3,5mL de Trizol e o mesmo volume de pérolas de vidro. A amostra foi agitada vigorosamente em vórtex por 15 minutos e após, centrifugadas a 1620 x g por 10 minutos. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo, adicionado de 0,2mL de clorofórmio para cada 0,75mL de trizol recuperado, agitado vigorosamente e deixado em repouso por 10 minutos. Após o repouso, a amostra foi centrifugada a 1620 x g por 15 minutos e a fase aquosa, transferida para um novo tubo. Foram acrescentados 0,25mL de isopropanol e 0,25mL de solução de citrato de sódio 0,4M e cloreto de sódio 0,8M para cada 0,75mL de trizol recuperado inicialmente, agitado gentilmente e deixado em repouso por 10 minutos a temperatura ambiente. A amostra foi centrifugada a 1620 x g por 30 minutos, o sobrenadante foi descartado e o precipitado, lavado com etanol a 75%. Nova centrifugação foi realizada a 1620 x g por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi seco a temperatura ambiente. Após a secagem, o precipitado foi ressuscitado em 30µL de água DEPC (Diethyl Pirocarbonato) 0,01%. Foi realizada a quantificação e avaliada a pureza do RNA total (razão 260/280), e este foi armazenado a -70°C.

3.10.1 Síntese de cDNA fita simples

A síntese da primeira fita de cDNA foi feita em uma reação contendo 1µg de RNA total, 10pmol/µL da seqüência iniciadora (5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCGGG-3') e essa mistura foi aquecida por 2 minutos a 72°C. Em seguida foi acrescentado 10pmol/µL do oligo dT

modificado (5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACT₍₃₀₎N₁N, onde N=A, C, G ou T; N₁=A, G ou C), 2µL de uma mistura de dNTPs (10 mM), 2µL de RNaseOUT (40U/µL) (Invitrogen), 0,4µL de DTT (100mM), 1,2µL de cloreto de magnésio (50mM), 2µL da enzima transcriptase reversa (200U/µL) (RT Superscript II - Invitrogen) e 4µL de tampão 5X (Tris-HCl 250mM pH 8,3; KCl 375mM; MgCl₂ 15mM). Esta reação foi aquecida durante 1 hora e trinta minutos a 42°C. Após este período foi adicionado 80µL de TE (Tris-HCl 10mM; EDTA 1mM pH 8,0) e aquecida por mais 10 minutos a 72°C.

3.11 Transcriptase reversa – PCR semi-quantitativo (RT-PCR)

Para as reações de RT-PCR foram desenhados iniciadores específicos para as ESTs através dos programas **Primer3** Input (version 0.4.0) e Primer Express (Applied Biosystems), estes estão descritos na tabela 2. Para controle da reação e ajuste da concentração de cDNA, foi utilizado iniciadores específico, como GAPDH (Gliceraldeído desidrogenase-3-fosfato) Pb18 e *Mus musculus*. As reações foram realizadas utilizando-se concentrações de 2pmol de cada seqüência iniciadora e 200ng/µL de cDNA num tubo contendo uma mistura de Master mix (Fermentas®). As reações de amplificação foram realizadas com temperatura inicial de 95°C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos com temperatura de desnaturação de 95°C por 30 segundos; a temperatura de anelamento foi diferente, como mostra a tabela 2, para os diferentes iniciadores, 72°C por 30 segundos e um ciclo final a 72°C por 5 minutos, utilizando-se aparelho termociclador Perkin Elmer modelo *GeneAmp PCR System 9700*. O produto amplificado foi separado em gel de agarose 1,8%, em tampão TBE 1X, durante 1,5 hora a 100 volts, corados com GelRed (Biotium) e observados à luz ultravioleta.

Tabela 2: Seqüências iniciadoras para as ESTs.

	To. de anelamento	Peso molecular	Seqüência iniciadora
<i>Gapdh</i>	55°C	151pb	F- 5'TATACCGCCACCCAGAAGAC3'
Pb18			R- 5'TGAGAGCTGGGATGACCTTT3'

<i>Clatrina</i>	45°C	148pb	F- 5' AACCTTCTGGCTAGCGTTGA3'
Pb18			R- 5' GGGCATTGTAAACTGCCTGT3'
<i>Ypt7</i>	45°C	151pb	F- 5' TAGTGCCAAGGAGGCGATTA3'
Pb18			R- 5' TTAACAAGCACAGCCGTCAC3'
<i>Gapdh</i>	60°C		F- 5' TGCGACTTCAACAGCAACTC3'
<i>Mus musculus</i>			R-5' ATGTAGGCCATGAGGTCCAC3'
<i>Clatrina</i>	60°C		F-5' ATGACTTGCTCATGGTGCTG3'
<i>Mus musculus</i>			R- 5' GTGGTTCTGCACTGAGCGTA3'
<i>Eea1</i>	60°C	129pb	F- 5' CCAAGACCTACAGGCCTCAC3'
<i>Mus musculus</i>			R- 5' GCTGACGAATCAGTCACCAA3'
<i>Rab5</i>	60°C	116pb	F- 5' GGCTAATCGAGGAGCAACAA3'
<i>Mus musculus</i>			R- 5' AGCGAAGAACCAGGCTTGA3'
<i>Rab7</i>	60°C	124pb	F- 5' AGGACTCTGCACAACCTCAA3'
<i>Mus musculus</i>			R- 5' CGGTTGGTTGAAGCTTCTCT3'
<i>Lamp-1</i>	60°C	118pb	F- 5' TCAAGGTGGACAGTGACAGG3'
<i>Mus musculus</i>			R-5' ATGAGGACGATGAGGACCAG3'

3.12 RT-PCR quantitativo (qRT-PCR)

Para avaliar a expressão de genes de via endocítica foi realizado qRT-PCR para *Clatrina* e *Ypt7* de *P. brasiliensis* cultivado na depleção de micronutrientes e também para *Clatrina*, *Eea1*, *Rab5*, *Rab7* e *Lamp-1* para macrófagos infectados e não infectados com a fase leveduriforme de *P. brasiliensis* em diferentes tensões de oxigênio. As reações foram realizadas utilizando-se 25ng/μL de cDNA, 12,5μL de SYBR green ROX mixture (Applied Biosystems), e 0,5μM de cada primer, sendo adicionado a reação água até atingir o volume de 20μL. 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 a 15 segundos, seguidos de anelamento e síntese a 60°C por um minuto. Em seguida da PCR, a análise da curva de melting foi realizada para confirmar a emissão de sinal correspondente a um único produto. As reações foram realizadas em triplicata com o aparelho Applied Biosystems 7500 cycler e os dados foram analisados pelo método $2^{-\Delta CT}$, onde $\Delta Ct = \Delta Ct \text{ alvo} - \Delta Ct \text{ endógeno}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Com os valores obtidos para as amostras em triplicata foi calculado a média e então o valor $2^{-\Delta CT}$ (GAPDH foi utilizado como controle endógeno da reação), sendo normalizado a partir da amostra de cDNA para situação completa e para os genes relacionados a via endocítica, a normalização foi a célula não-infectada para cada período de infecção. Como controle negativo foi utilizada água e todos os reagentes, exceto a amostra de cDNA. Depois de 40 ciclos de amplificação, nenhum produto de amplificação foi detectado para o controle negativo.

3.13 Análise estatística

A expressão dos genes relacionados à via endocítica da fase leveduriforme de Pb18 e de macrófagos infectados e não infectados com Pb18 foram avaliados segundo a normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk. Quando se mostraram paramétrico foi utilizado o Test t de Student e ANOVA. Todos os dados foram avaliados pelo programa BioEstat 5.0, utilizando $p < 0.05$.

4. Resultados

Inicialmente neste trabalho foi realizada a pesquisa da presença de genes e proteínas ligadas à via endocítica em *P. brasiliensis*. Para tanto o fungo foi avaliado em meios de cultura com depleção de micronutrientes - condições aproximadas dos tecidos do hospedeiro e em meio dito completo, com todos os componentes necessários ao seu crescimento.

4.1 Imunomarcção de proteínas de via endocítica da fase leveduriforme de *P. brasiliensis* (Pb18)

Nesta etapa foram pesquisadas em *P. brasiliensis* as proteínas clatrina e Ypt7 ligadas à via endocítica. Para tanto, foi realizada imunofluorescência da fase leveduriforme de Pb18 e fez-se marcação com anticorpo primário anti-clatrina e anti-Rab7 (Ypt7) seguido do anticorpo secundário conjugado com Alexa Fluor®488. De acordo com a figura 4 pode-se verificar que este fungo apresenta a expressão de clatrina e Ypt7.

A expressão de clatrina foi mais intensa nas regiões que se verifica a presença de brotamentos já completos ou em fase inicial. Já a Ypt7 foi expressa mais esparsamente pela célula.

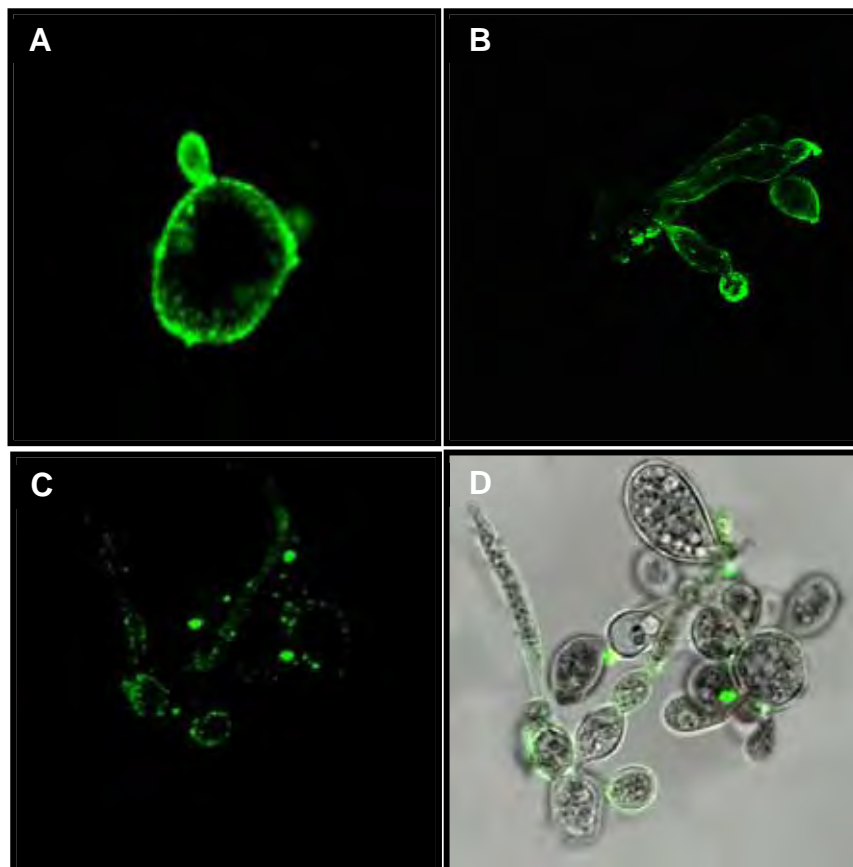


Figura 4: Reação de imunofluorescência para as proteínas da via endocítica em *P.brasiliensis*. Imunomarcacão da fase leveduriforme de Pb18 com soro anti-clatrina, com anti-Rab7 (Ypt7) e secundário conjugado com Alexa®Fluor 488. A e B – Expressão de clatrina. C e D – Expressão de Ypt7 (D – Normasky). (LSM 510 – META Zeiss®).

Na sequência do trabalho outras metodologias foram empregadas para a verificação da expressão destas moléculas, por outro lado também foi examinado como a depleção de micronutrientes poderia influenciar na expressão dessas proteínas.

4.2 Análise da expressão dos genes de via endocítica de *P. brasiliensis* (Pb18) cultivado em diferentes condições de nutrição

Foi avaliada a expressão dos genes de via endocítica, *Clatrina* e *Ypt7*, por Pb18 em diferentes condições de nutrição através da técnica de RT-PCR e qRT-

PCR. Através da RT-PCR, foi observada aparente diminuição da expressão do gene *Clatrina* de Pb18 (Figura 5) nas condições de depleção de zinco (2), cobre (3) e ferro+cobre (5). A expressão do gene *Clatrina* analisada por qRT-PCR, apresentou redução significativa ($p < 0.05$) nas diferentes condições de nutrição, quando comparado à situação completa (Figura 6).

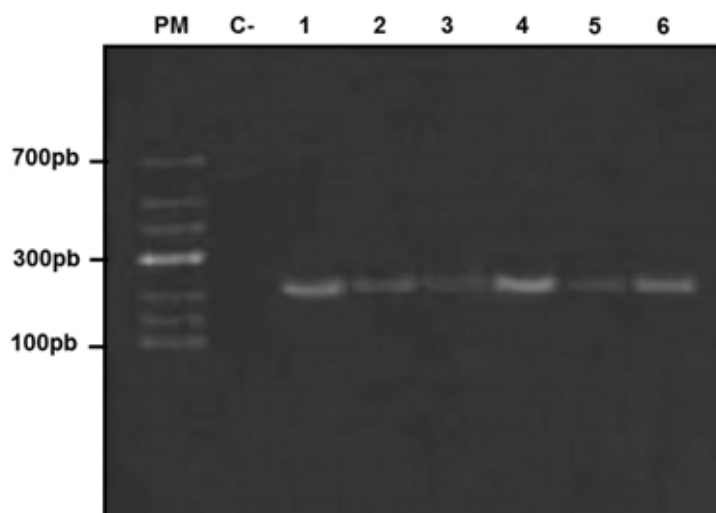


Figura 5: Eletroforese em gel de agarose para expressão do gene *Clatrina* de Pb18 cultivado na depleção de metais por RT-PCR. C- Controle negativo; 1 – MVM completo; 2 – MVM/ depleção de zinco; 3 – MVM/ depleção de cobre; 4 – MVM/ depleção de ferro; 5 – MVM/ depleção de ferro+cobre; 6 – MVM incompleto.

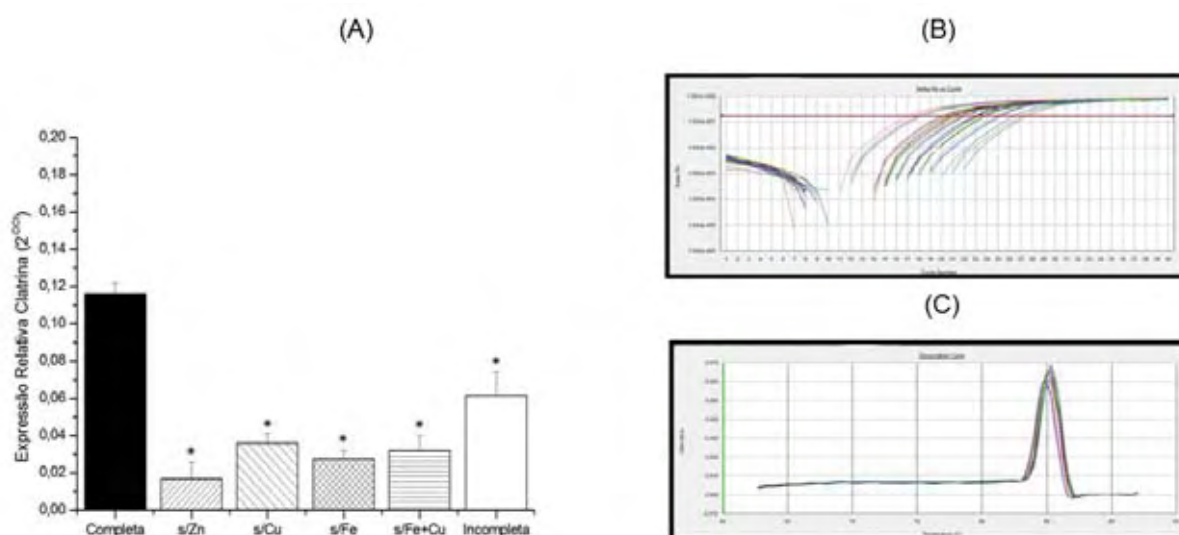


Figura 6: Expressão relativa do gene *Clatrina* por Pb18 na depleção de metais. A – Gráfico da Expressão relativa *Clatrina*. B - Curva de amplificação. C - Curva de dissociação da reação. Teste t, $p < 0.05$.

A expressão do gene *Ypt7* de Pb18 cultivado em diferentes condições de nutrição foi avaliada através da técnica de RT-PCR e qRT-PCR. Através da RT-PCR, aparentemente, houve alteração de expressão do gene *Ypt7* em algumas das condições avaliadas (Figura 7). Esses dados foram confirmados por qRT-PCR em que se observa redução significativa ($p < 0.05$) na expressão do gene *Ypt7* na depleção de ferro e ferro+cobre frente à situação completa (Figura 8).

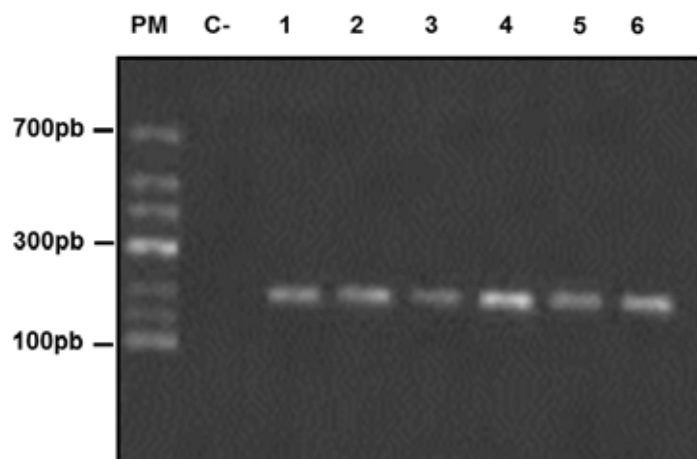


Figura 7: Eletroforese em gel de agarose para o gene *Ypt7* de Pb18 cultivado na depleção de metais por RT-PCR. C- Controle negativo; 1 – MVM completo; 2 – MVM/ depleção de zinco; 3 – MVM/ depleção de cobre; 4 – MVM/ depleção de ferro; 5 – MVM/ depleção de ferro+cobre; 6 – MVM incompleto.

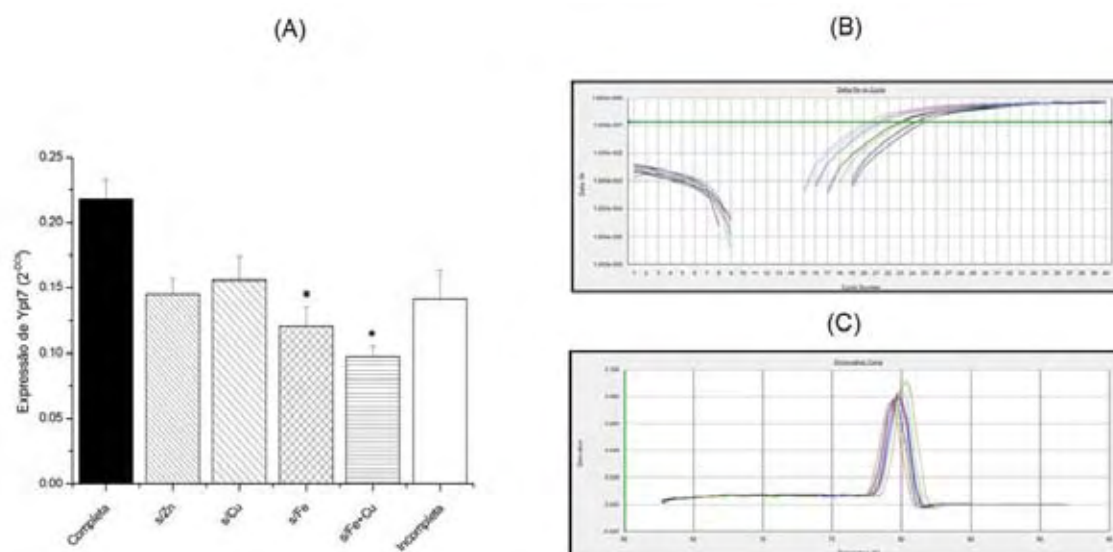


Figura 8: Expressão relativa do gene *Ypt7* por Pb18 na depleção de metais. A – Gráfico da Expressão relativa *Ypt7*. B - Curva de amplificação. C - Curva de dissociação da reação. $p < 0.05$.

4.3 Infecção de macrófagos por *P. brasiliensis* (Pb18)

4.3.1 Fungo cultivado em diferentes condições de nutrição e tensão de oxigênio

A infecção de macrófagos com Pb18 cultivado em diferentes condições com meio completo e com depleção de metais foi avaliada pela técnica de plaqueamento e o resultado foi expresso em UFC/mL. Todos os resultados foram significativos ($p < 0.05$) em relação à situação completa. Os resultados demonstraram aumento na interação em todas as condições, exceto na depleção de zinco, que frente à situação completa apresentou infecção reduzida. As maiores taxas de infecção foram obtidas quando o fungo foi cultivado na condição de depleção de ferro (28,6%), de cobre (21,2%), depleção de ferro+cobre (19,7%), depleção de ferro+cobre+zinco (15,7%), na presença de ferro+cobre+zinco (10,6%) respectivamente (Figura 9).

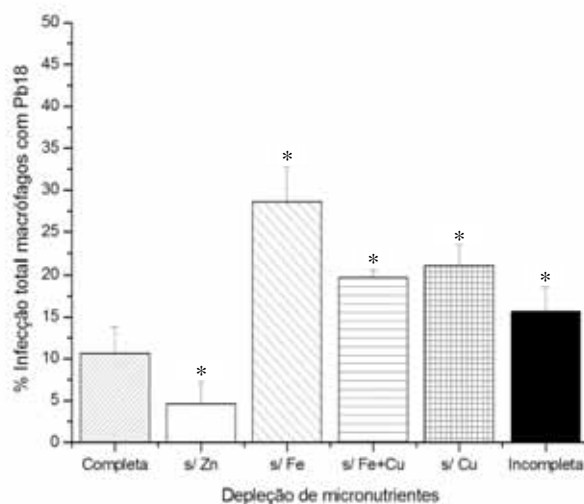


Figura 9: Resultado de infecção total de macrófagos alveolares AMJ2-C11 com Pb18 cultivado na depleção de metais, obtida por plaqueamento, e feitas contagens por UFC/mL. Teste t ($p < 0.05$).

Na sequência dos experimentos, o fungo foi cultivado em diferentes tensões de oxigênio seguindo-se a infecção de macrófagos.

4.3.2 Fungo cultivado em diferentes tensões de oxigênio

A infecção de macrófagos com Pb18 cultivado em aerobiose (figura 10A) apresentou aumento crescente significativo ($p < 0.05$) entre os períodos analisados. Após 2h de infecção a porcentagem foi de 13,7%, 6h (16,3%), 12h (30%) e 24h (40%). A figura 10B demonstra a infecção de macrófagos com Pb18 cultivado em microaerofilia, onde após 2h, a infecção foi de (31%), 6h (26,6%), 12h (12,8%) e 24h (23,3%).

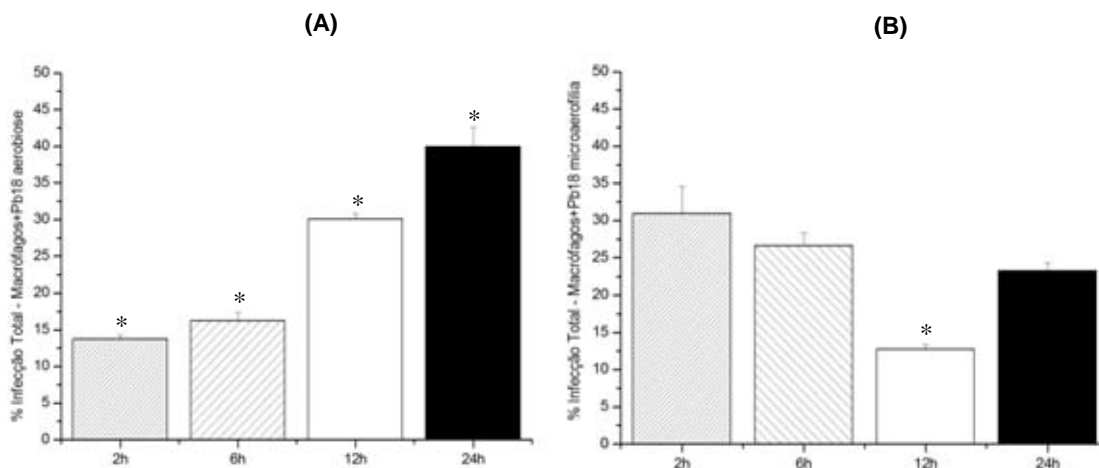


Figura 10: Infecção de macrófagos alveolares AMJ2-C11 com Pb18 cultivado em aerobiose (A) e microaerofilia (B), ANOVA ($p < 0.05$).

4.4 Expressão de genes de via endocítica em macrófagos infectados com *P. brasiliensis* (Pb18) cultivado em diferentes tensões de oxigênio

4.4.1. Expressão de *Clatrina*

A expressão relativa do gene *Clatrina* foi avaliada por qRT-PCR, em macrófagos infectados com Pb18 cultivado em diferentes tensões de oxigênio. Quando Pb18 foi cultivado em aerobiose e com este realizado a infecção de macrófagos, observou-se diminuição significativa ($p < 0.05$) na expressão de *Clatrina* nas células infectadas em relação as não infectadas nos períodos de 2, 6 e 24h de infecção (Figura 11A). No caso de microaerofilia, foi observado aumento na expressão de *Clatrina* ($p < 0.05$) nas células infectadas em relação as não infectadas com 6h de infecção, como demonstra a seta na Figura 11B.

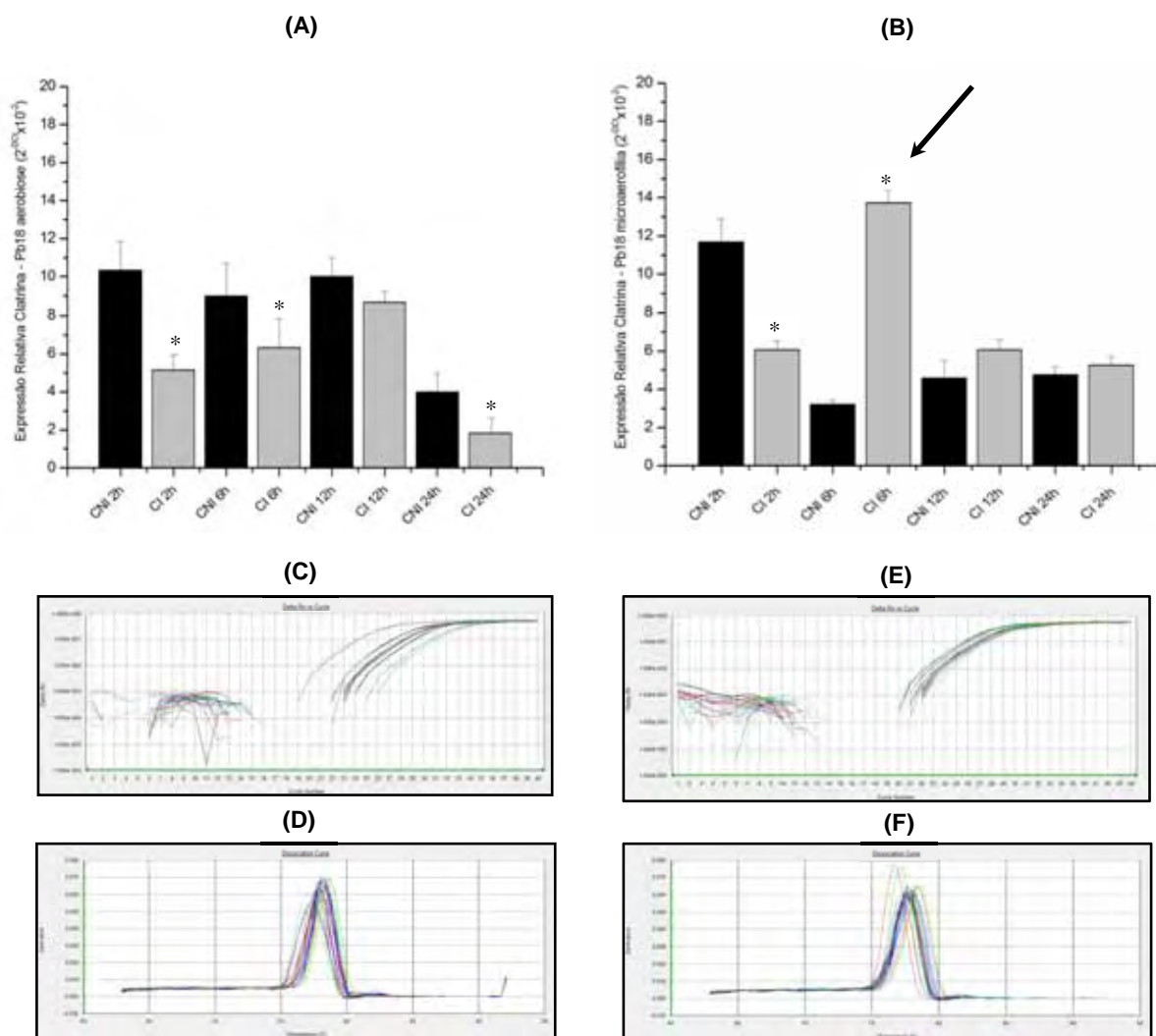


Figura 11: Expressão relativa do gene *Clatrina* por qRT-PCR em macrófagos infectados com Pb18 cultivado em condições de aerobiose (A) e microaerofilia (B), Curva de Amplificação (aerobiose) (C), Curva de Dissociação (aerobiose) (D), Curva de Amplificação (microaerofilia) (E) e Curva de Dissociação (F), Teste t ($p < 0.05$). CNI – Células não infectadas e CI – Células infectadas.

4.4.2 Expressão de *Rab5*

A expressão relativa do gene *Rab5* foi avaliada por qRT-PCR, em macrófagos infectados e não infectados com Pb18 cultivado em diferentes tensões de oxigênio.

Quando Pb18 foi cultivado em aerobiose e com este realizada infecção de macrófagos observou-se que a expressão de *Rab5* nas células infectadas foi

menor em relação as não infectadas nos períodos de 2, 6 e 24h de infecção (Figura 12A). Em macrófagos infectados com Pb18 cultivado em microaerofilia, foi observado que com 6h de infecção, a expressão de Rab5 nas células infectadas aumentou aproximadamente 1x. (Figura 12B).

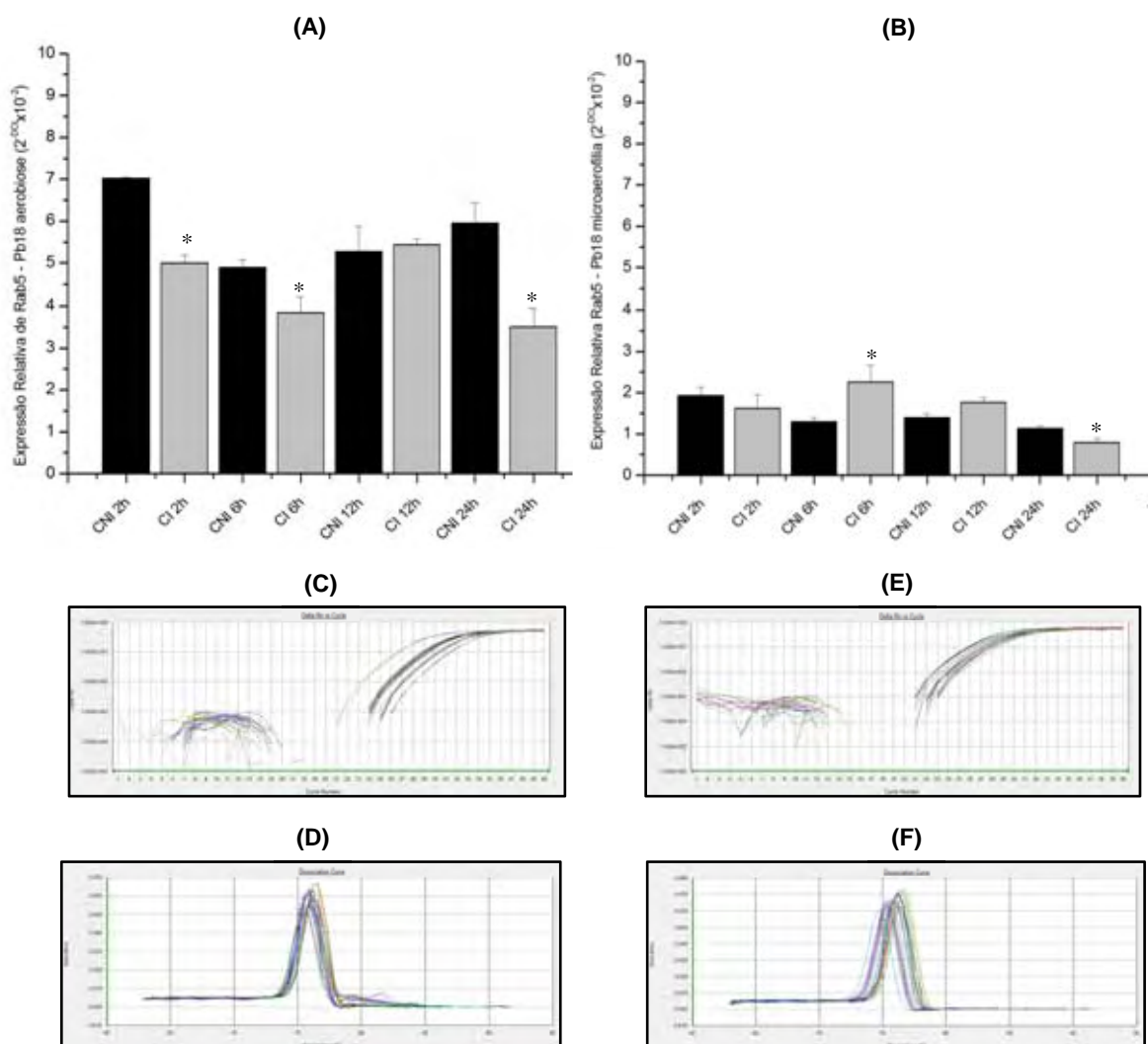


Figura 12: Expressão relativa de *Rab5* por qRT-PCR em macrófagos infectados com Pb18 cultivado em condições de aerobiose (A) e microaerofilia (B), Curva de Amplificação (aerobiose) (C), Curva de Dissociação (aerobiose) (D), Curva de Amplificação (microaerofilia) (E) e Curva de Dissociação (F), Teste t ($p < 0.05$). CNI – Células não infectadas e CI – Células infectadas.

4.4.3 Expressão de *Rab7*

A expressão relativa do gene *Rab7* foi avaliada por qRT-PCR, em macrófagos infectados com Pb18 cultivado em diferentes tensões de oxigênio. Em macrófagos infectados com Pb18 cultivado em aerobiose, foi observado aumento expressivo em 24h de infecção nas células infectadas em relação às não infectadas (Figura 13A). Em macrófagos infectados com Pb18 cultivado em microaerofilia, aparentemente não houve expressão de *Rab7* nas células infectadas em relação às células não infectadas (Figura 13B).

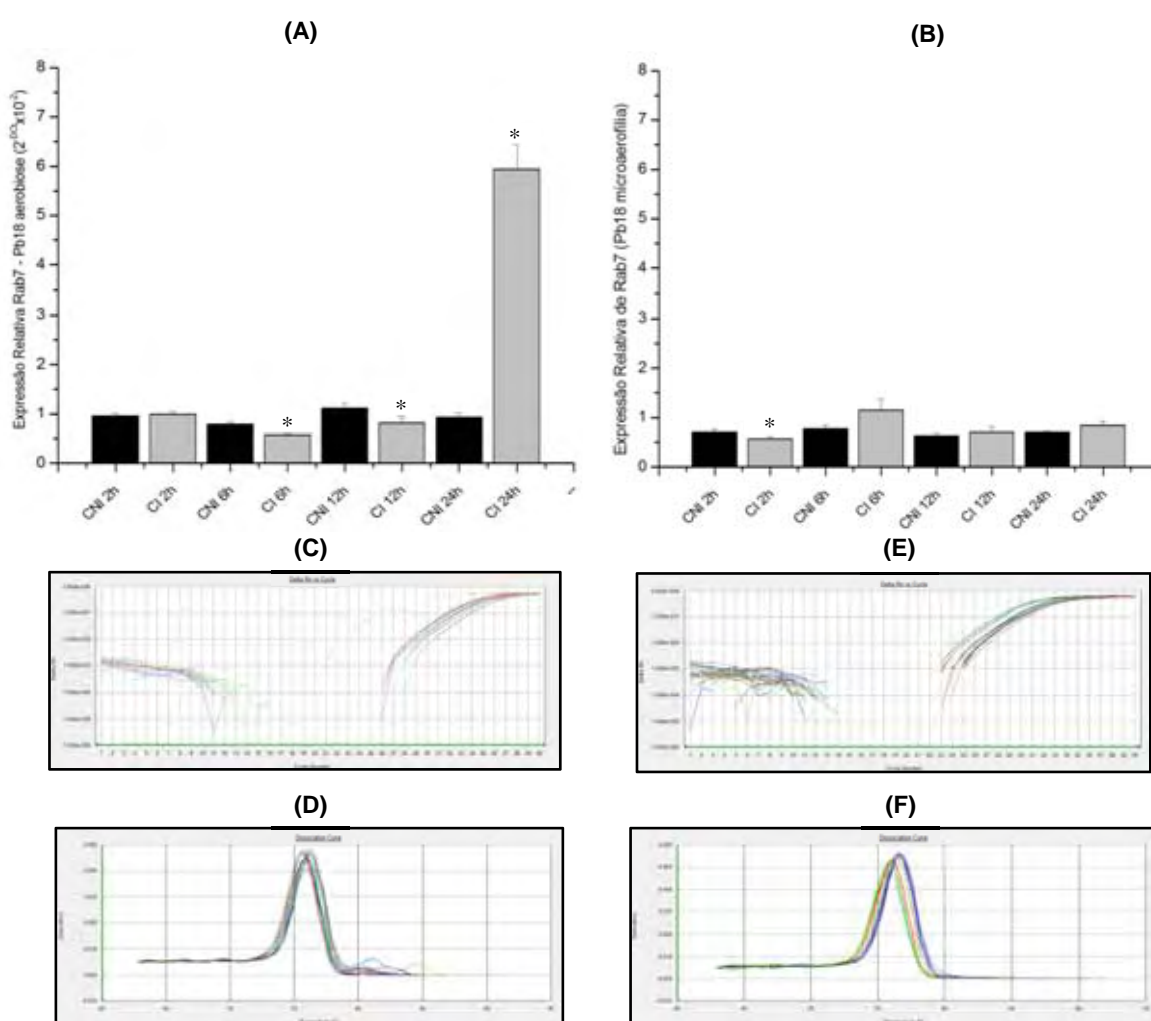


Figura 13: Expressão relativa de *Rab7* por qRT-PCR em macrófagos infectados com Pb18 cultivado em condições de aerobiose (A) e microaerofilia (B), Curva de Amplificação (aerobiose) (C), Curva de Dissociação (aerobiose) (D), Curva de Amplificação (microaerofilia) (E) e Curva de Dissociação(F), Teste t ($p < 0.05$). CNI – Células não infectadas e CI – Células infectadas.

4.4.4 Expressão de *Lamp-1*

A expressão relativa do gene *Lamp-1* foi avaliada por qRT-PCR, em macrófagos infectados com Pb18 cultivado em diferentes tensões de oxigênio. Em macrófagos infectados com Pb18 cultivado em aerobiose, foi observado aumento no período de 24h em relação às células não infectadas (Figura 14A). Em macrófagos infectados com Pb18 cultivado em microaerofilia, aparentemente não houve expressão diferenciada entre as células infectadas em relação às células não infectadas (Figura 14B).

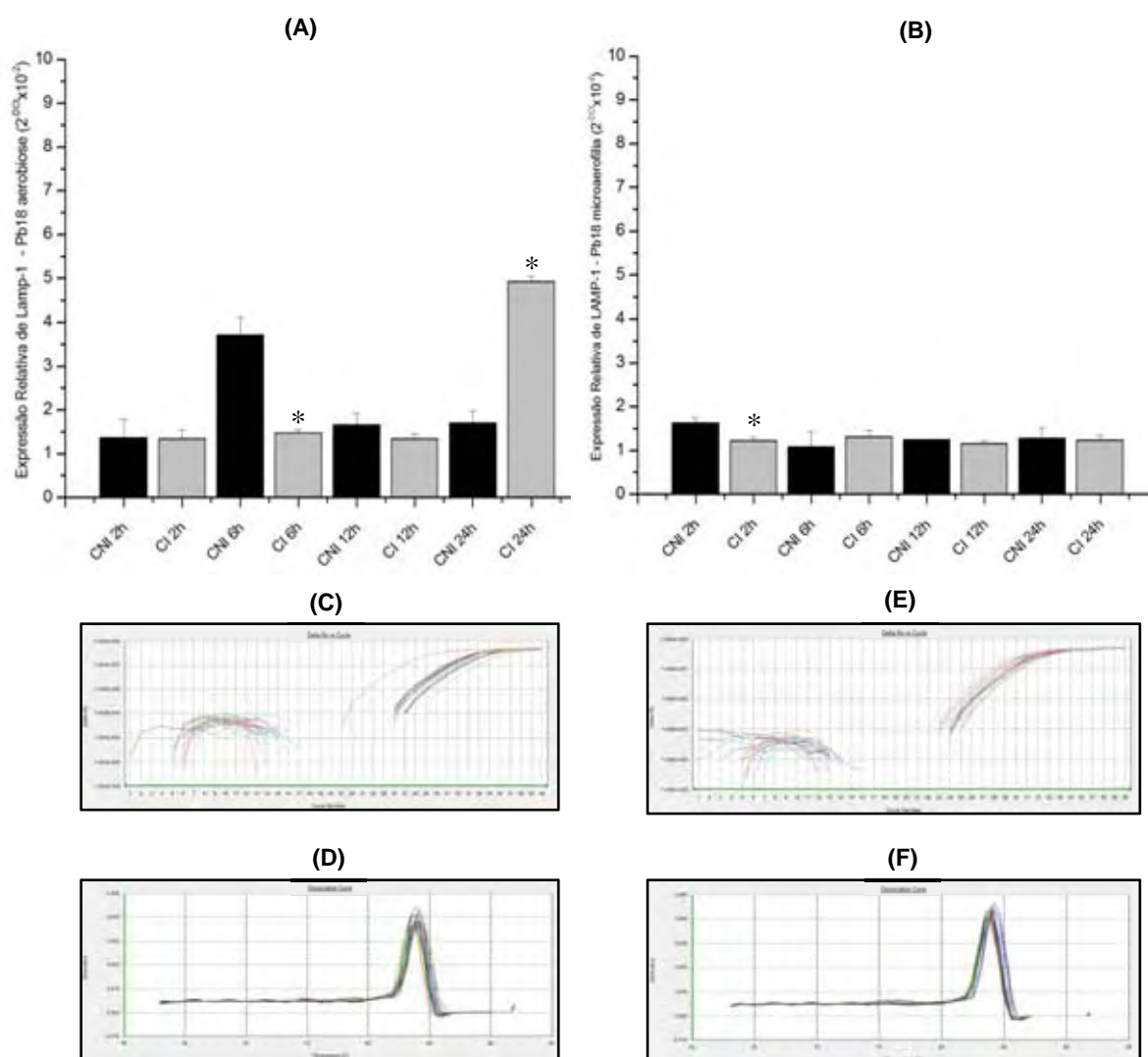


Figura 14: Expressão relativa de *Lamp-1* por qRT-PCR em macrófagos infectados com Pb18 cultivado em condições de aerobiose (A) e microaerofilia (B), Curva de Amplificação (aerobiose) (C), Curva de Dissociação (aerobiose) (D), Curva de

Amplificação (microaerofilia) (E) e Curva de Dissociação (F), Teste t ($p < 0.05$).
CNI – Células não infectadas e CI – Células infectadas.

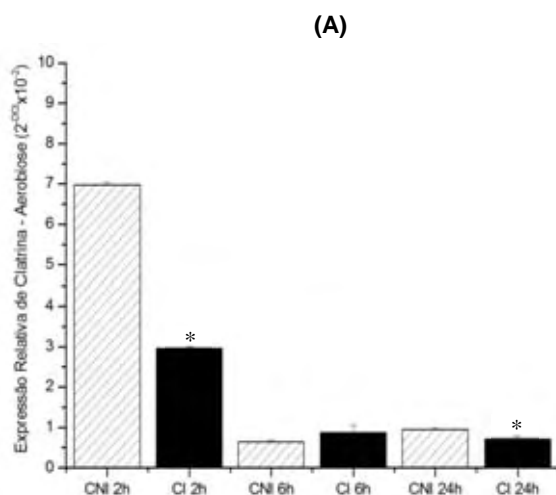
4.5 Expressão de genes de via endocítica em macrófagos infectados com *P. brasiliensis* (Pb18), infecção incubada em diferentes tensões de oxigênio

Foi analisada a expressão de genes de via endocítica em macrófagos infectados com a fase leveduriforme de Pb18, onde o ensaio de infecção foi incubado em diferentes tensões de oxigênio (aerobiose, microaerofilia e anaerobiose).

4.5.1 Expressão de *Clatrina*

A expressão do gene *Clatrina* foi avaliada em macrófagos infectados com Pb18 e o teste foi realizado em diferentes tensões de oxigênio (aerobiose, microaerofilia e anaerobiose).

O período de infecção de 2h foi marcante quanto à redução na expressão de clatrina em relação às células não infectadas na presença de oxigênio, como demonstra a figura 15A. Em tensão de microaerofilia, foi observado um aumento na expressão de clatrina nas células infectadas em relação às não infectadas no período de 6h e 24h, essa diferença foi comprovada estatisticamente pelo teste t de Student ($p < 0.05$) (Figura 15B). Em anaerobiose não foi observada alteração significativa na expressão de clatrina entre células infectadas e não infectadas nos diferentes períodos de infecção (Figura 15C).



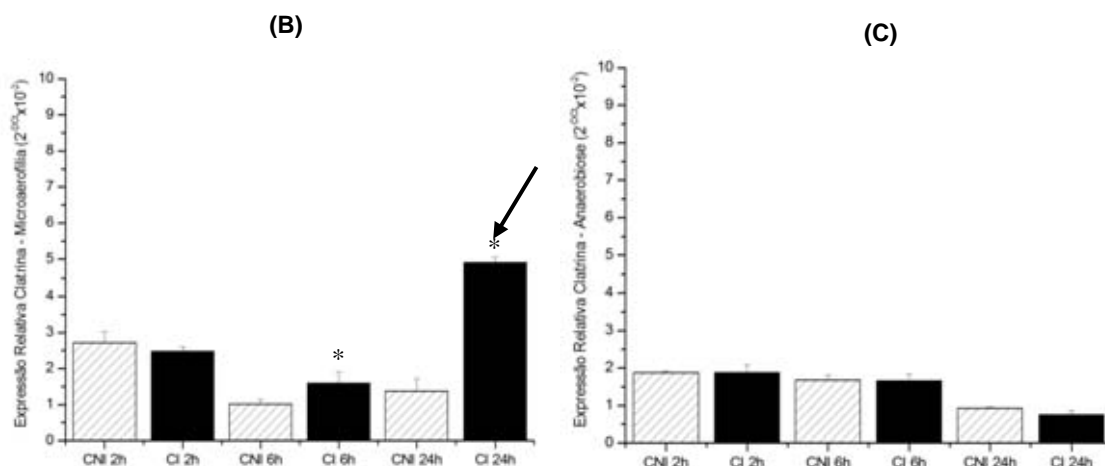


Figura 15: Expressão relativa de *Clatrina* por qRT-PCR em macrófagos infectados com *P. brasiliensis*. Reação realizada em condições de aerobiose (A), microaerofilia (B) e anaerobiose (C), Teste t ($p < 0.05$). CNI – Células não infectadas e CI – Células infectadas. Seta demonstra aumento expressivo no período de 24h.

As condições de tensão de oxigênio influenciaram na expressão de *Clatrina*, sendo que a condição em microaerofilia correspondeu a maior expressão desta molécula em 24 horas.

4.5.2 Expressão de *Eea1*

A expressão do gene *Eea1* foi avaliada em macrófagos infectados e não infectados com Pb18, em diferentes tensões de aerobiose, microaerofilia e anaerobiose.

No período de infecção de 6h, na condição de aerobiose, foi observado aumento na expressão de *Eea1* nas células infectadas quando comparadas com as células não infectadas (Figura 16A). Entre os outros períodos de infecção não houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0.05$). Em microaerofilia (Figura 16B) e anaerobiose (Figura 16C) foi observada alteração significativa na expressão de *Eea1* nas células infectadas com *P. brasiliensis* por 2h em relação às células não infectadas. Em relação aos outros períodos de infecção não foi notada diferença na expressão entre células infectadas e não infectadas.

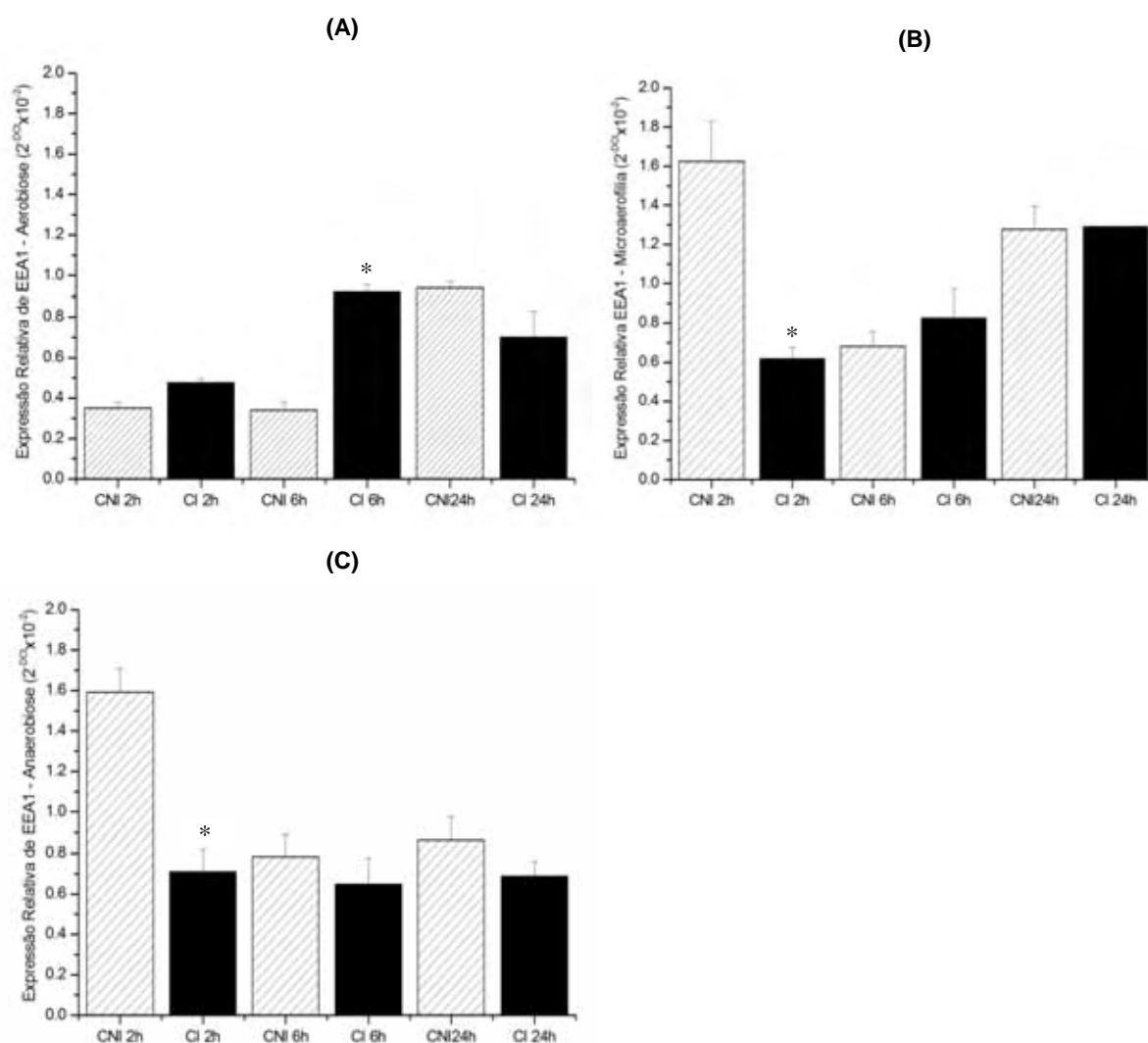


Figura 16: Expressão relativa de *Eea1* por qRT-PCR em macrófagos infectados com *P. brasiliensis*. Reação realizada em condições de aerobiose (A), microaerofilia (B) e anaerobiose (C), Teste t ($p < 0.05$). CNI – Células não infectadas e CI – Células infectadas.

4.5.3 Expressão de *Rab5*

A expressão relativa do gene *Rab5* foi avaliada em macrófagos infectados com Pb18 em diferentes períodos de infecção e incubados em diferentes tensões de oxigênio.

Em condições de aerobiose, nos períodos de infecção de 2, 6 e 24h, não foi observada diferença estatística na expressão de *Rab5* entre macrófagos

infectados e não infectados (Figura 17A). Em tensão de microaerofilia, foi notada uma redução na expressão de *Rab5* nas células infectadas em 2 e 6h (Figura 17B). Em tensão de anaerobiose foi observado aumento da expressão de *Rab5*, apenas no período de 6h de infecção e nas demais houve diminuição (Figura 17C).

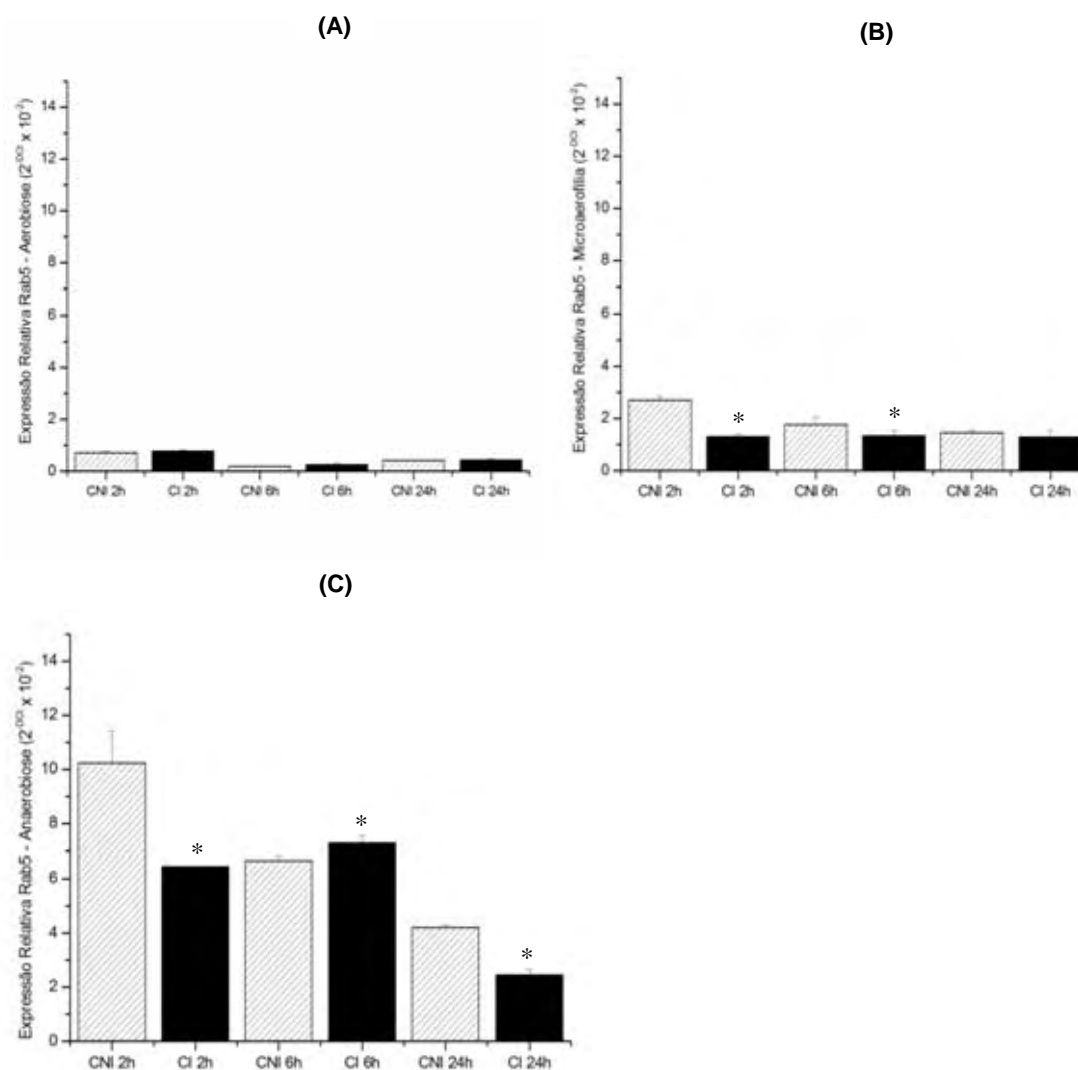


Figura 17: Expressão relativa de *Rab5* por qRT-PCR em macrófagos infectados com *P. brasiliensis*. Reação realizada em condições de aerobiose (A), microaerofilia (C) e anaerobiose (C), Teste t ($p < 0.05$). CNI – Células não infectadas e CI – Células infectadas.

4.5.4 Expressão de *Rab7*

A expressão relativa do gene *Rab7* foi avaliada por qRT-PCR em macrófagos infectados com Pb18 em diferentes períodos de infecção e incubados em diferentes tensões de oxigênio.

Em condições de aerobiose, a expressão de *Rab7* nas células infectadas foi maior em 6h de infecção (Figura 18A). Em tensão de microaerofilia, foi observado um aumento de 15x na expressão de *Rab7* nas células infectadas por 2h em relação às células não infectadas, já com 6h de infecção, a expressão de *Rab7* reduziu 10x em relação às células não infectadas e quando incubadas por 24h não houve alteração na expressão de *Rab7* (Figura 18B). Em anaerobiose, foi notada redução de 25x na expressão de *Rab7* no período de 2h e com 6h a redução foi de 30x. Com 24h de infecção não notamos alterações na expressão de *Rab7* (Figura 18C).

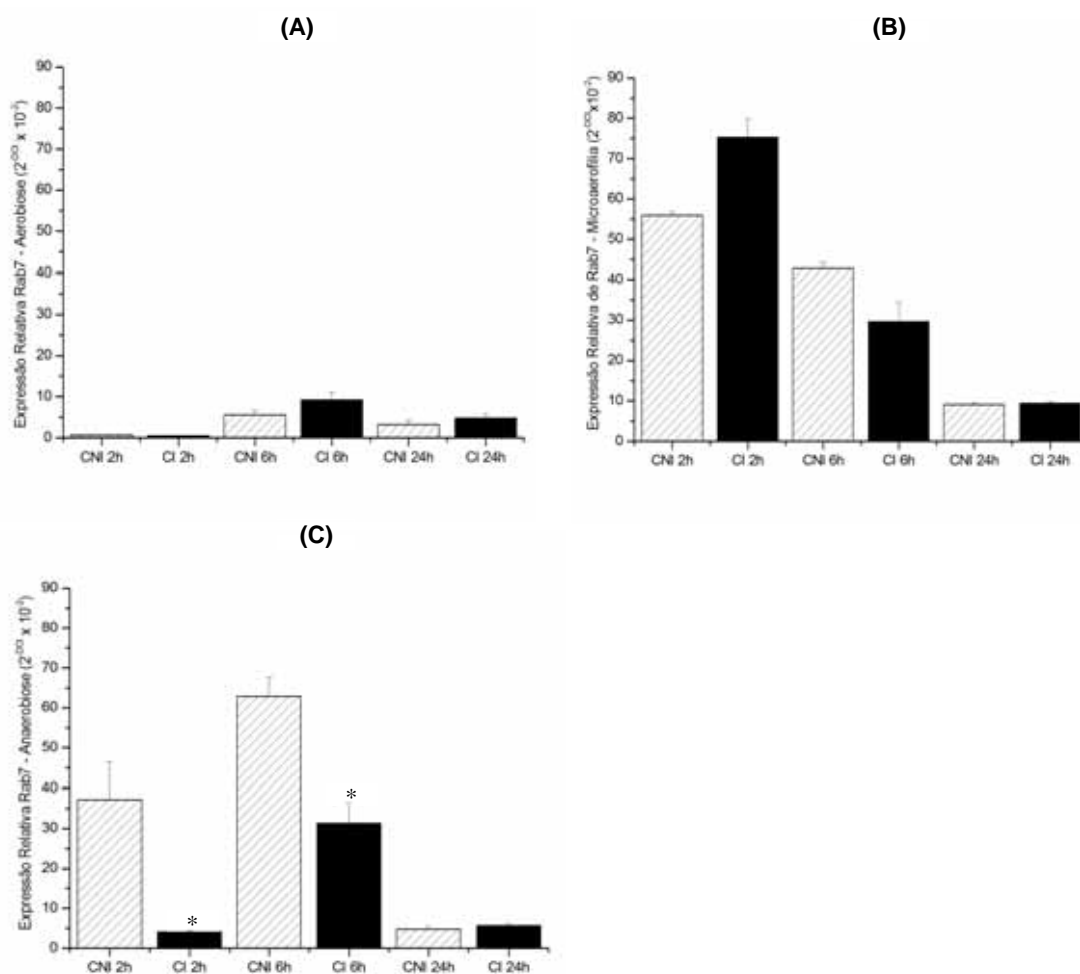


Figura 18: Expressão relativa de *Rab7* por qRT-PCR em macrófagos infectados com *P. brasiliensis*. Reação realizada em condições de aerobiose (A), microaerofilia (B) e anaerobiose (C), Teste t ($p < 0.05$). CNI – Células não infectadas e CI – Células infectadas.

4.5.5 Expressão de *Lamp-1*

A expressão relativa do gene *Lamp-1* foi avaliada por qRT-PCR em macrófagos infectados e não infectados com Pb18 em diferentes períodos de infecção e incubados em diferentes tensões de oxigênio.

Na presença de oxigênio foi observada aumento de a expressão de *Lamp-1* em 6 e 24 h, mas não significativas (Figura 19A). Em tensão de microaerofilia, a expressão de *Lamp-1* foi aumentada significativamente com 24h de infecção (Figura 19B). Houve redução significativa na expressão de *Lamp-1* em tensão de anaerobiose no período de infecção de 2h (Figura 19C).

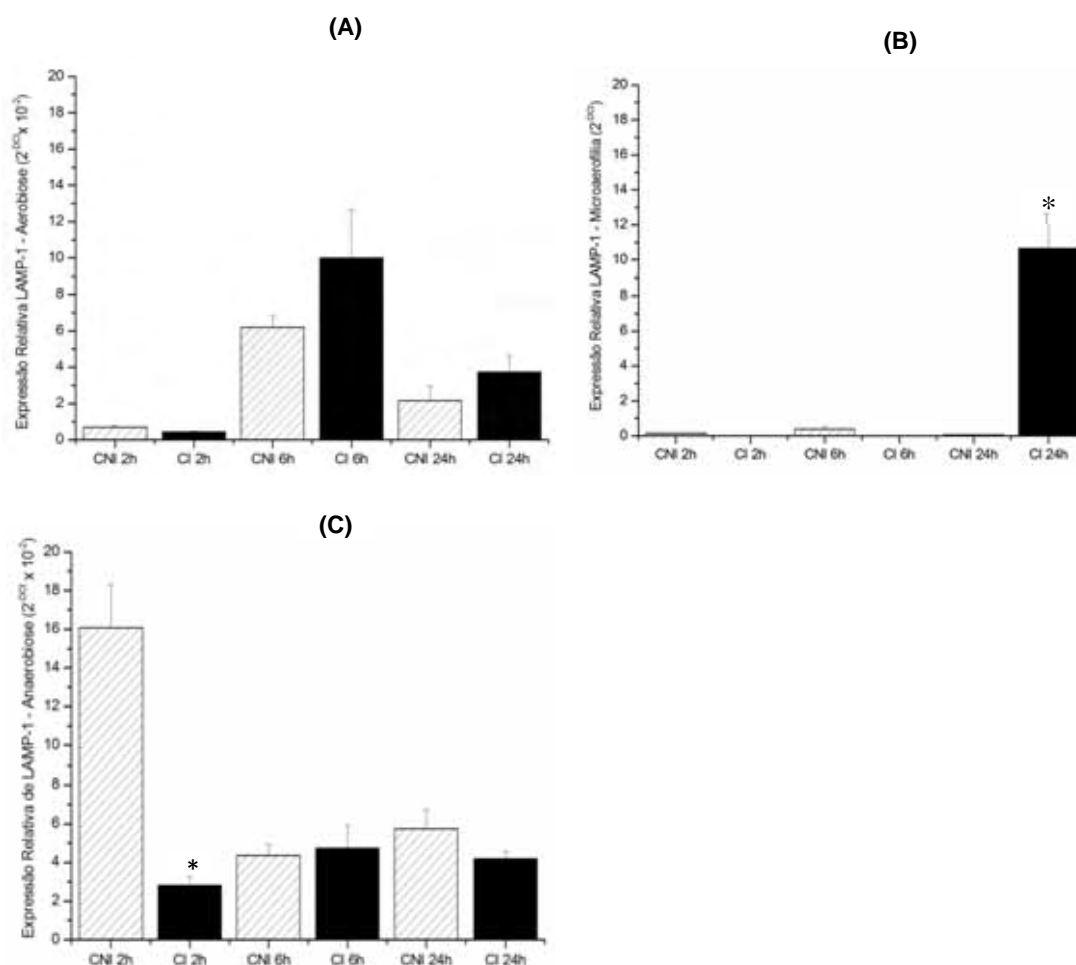


Figura 19: Expressão relativa de *Lamp-1* por qRT-PCR em macrófagos infectados com *P. brasiliensis*. Reação realizada em condições de aerobiose (A), microaerofilia (B) e anaerobiose (C), Teste t ($p < 0.05$). CNI – Células não infectadas e CI – Células infectadas.

4.6 Expressão de proteínas de via endocítica por imunofluorescência em macrófagos infectados com *P. brasiliensis* (Pb18) em diferentes condições de interação

4.6.1 Expressão de clatrina

A expressão de clatrina em macrófagos infectados e não infectados foi detectada pela técnica de imunofluorescência com dupla marcação, onde Pb18 foi marcado com anticorpo policlonal anti-*cell-free* e anticorpo secundário conjugado com Alexa Fluor®594. Os macrófagos foram marcados com anticorpo monoclonal anti-clatrina e anticorpo secundário conjugado com Alexa Fluor®488 e o núcleo com DAPI. Pela técnica de imunofluorescência não foi possível observar alteração na expressão de clatrina nos macrófagos infectados por 6h em condição de microaerofilia em relação aos não infectados. Através da figura 20B, podemos inferir que possivelmente macrófagos realizam a endocitose de Pb18 mediado por clatrina, pois foi observado que aparentemente Pb18 está envolto por um vacúolo revestido por clatrina. O corte ortogonal comprova que o fungo está internalizado, como demonstra a seta na figura 20B e 20D, respectivamente.

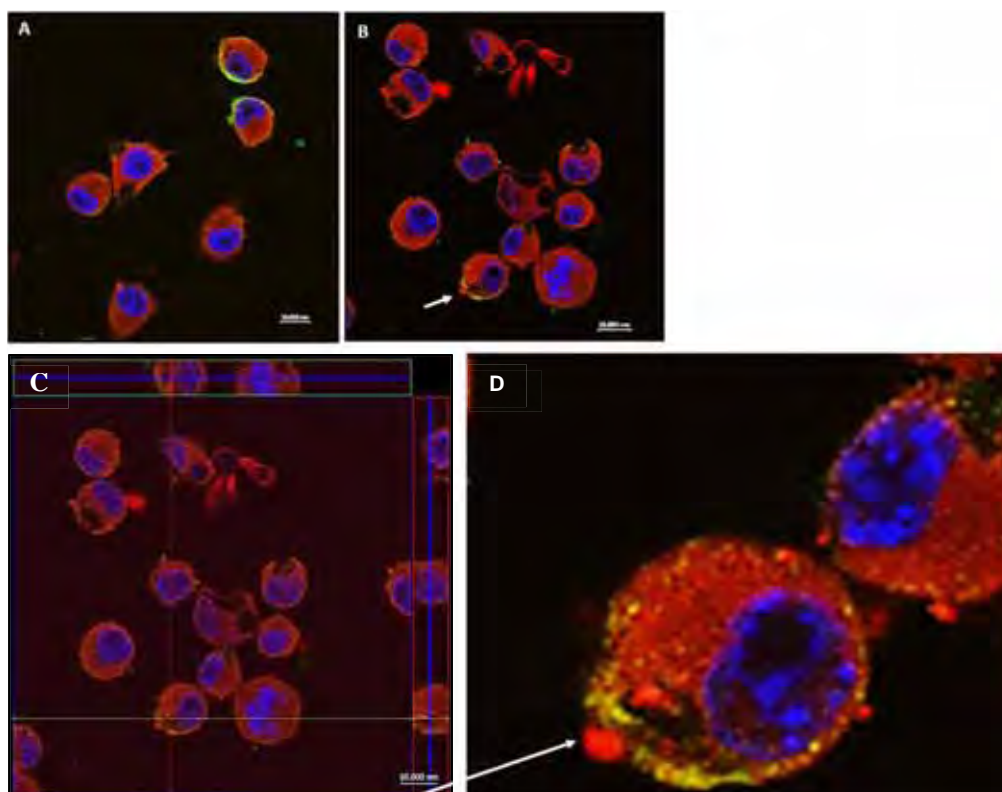


Figura 20: Expressão de clatrina em macrófagos infectados e não infectados com *P. brasiliensis* por 6h. A reação foi realizada em condições de microaerofilia. A – Macrófagos não infectados. B – Macrófagos infectados. C – Corte Ortogonal da imagem B e D – Zoom da imagem B. Macrófagos marcados com anticorpo primário anti-clatrina e anticorpo secundário conjugado com Alexa®Fluor 488(verde). Pb18 marcado com anticorpo primário anti-*cell-free* e anticorpo secundário conjugado com Alexa®Fluor 594 (vermelho) e núcleo marcado com DAPI (azul).

4.6.2 Expressão de EEA1

Foi realizada imunofluorescência com dupla marcação, onde o fungo *P. brasiliensis* foi marcado com anticorpo policlonal anti-*cell-free* e anticorpo secundário conjugado com Alexa Fluor®594, os macrófagos foram marcados com anticorpo monoclonal anti-EEA1 e anticorpo secundário conjugado com Alexa Fluor®488 e o núcleo foi marcado com DAPI. A figura 21 demonstra a fagocitose de Pb18, por macrófagos alveolares após 24h de infecção em microaerofilia. A expressão de EEA1 não demonstrou alteração aparente pela técnica de

imunofluorescência, no entanto foi possível co-localizar o fungo *P. brasiliensis* em fagossomo EEA1 positivo como demonstra a figura 21. A figura 22 demonstra a expressão de EEA1 em anaerobiose em macrófagos infectados e não infectados com Pb18. Foi observado, que pela técnica de imunofluorescência, as células infectadas incubadas em anaerobiose apresentam uma intensidade de fluorescência reduzida em relação as não infectadas, sendo assim ocorre uma possível diminuição na expressão de EEA1 após 24h de incubação em ambiente de anaerobiose.

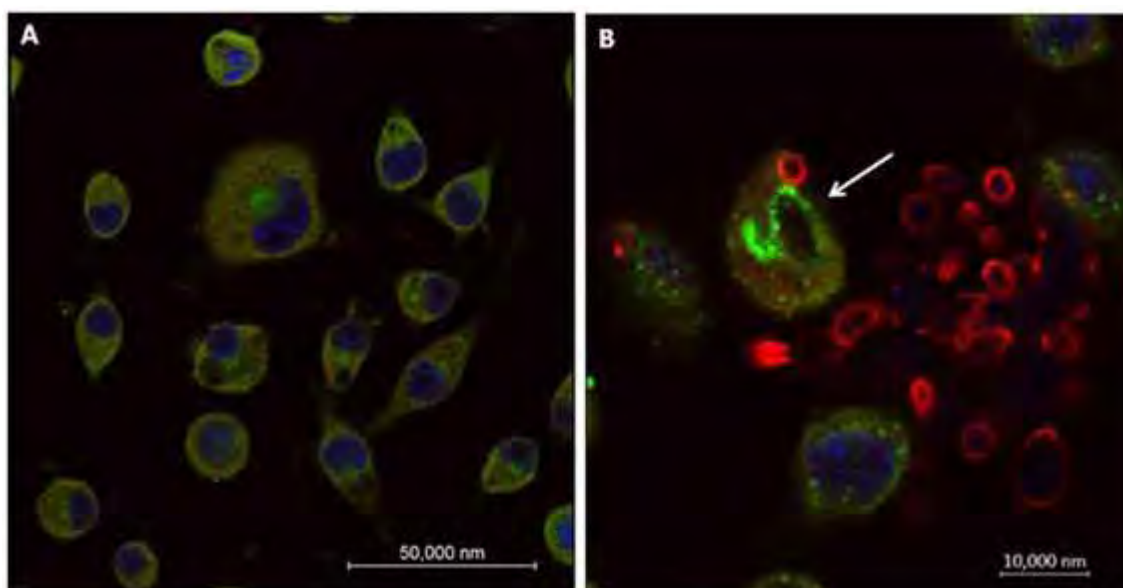


Figura 21: Expressão de EEA1 em condição de microaerofilia e co-localização de *P. brasiliensis* em macrófagos. A – Macrófagos não infectados. B – Macrófagos infectados com *P. brasiliensis*. Macrófagos marcados com anticorpo primário anti-EEA1 e anticorpo secundário conjugado com Alexa®Fluor 488 (verde). Pb18 marcado com anticorpo primário anti-*cell-free* e anticorpo secundário conjugado com Alexa®Fluor 594 (vermelho) e núcleo marcado com DAPI (azul).

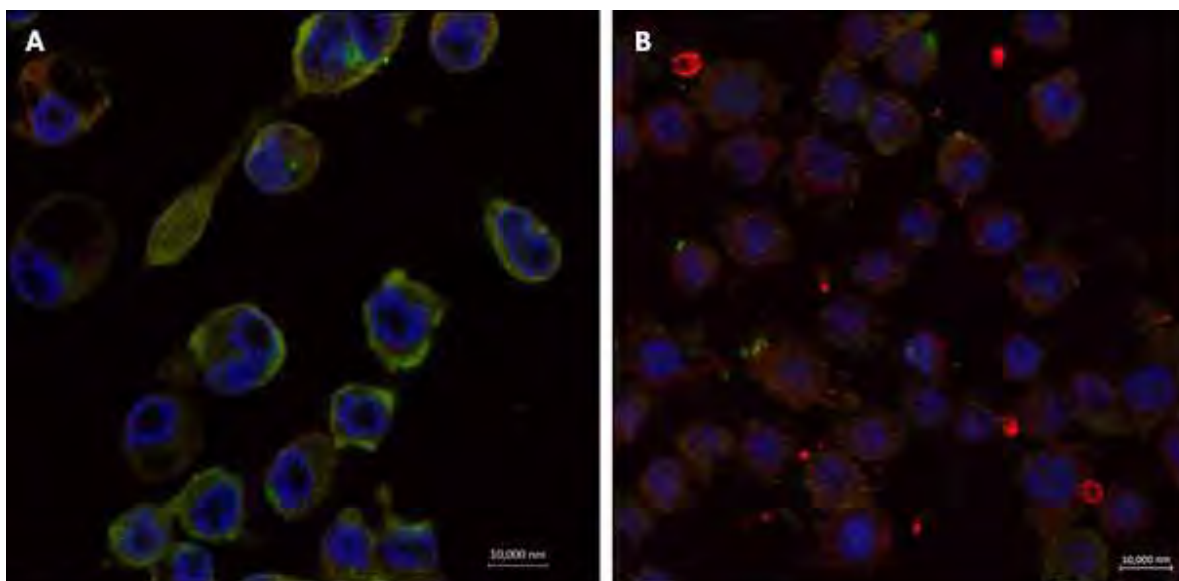


Figura 22: Expressão de EEA1 em condição de anaerobiose. A – Macrófagos não infectados. B – Macrófagos infectados com *P. brasiliensis*. Macrófagos marcados com anticorpo primário anti-EEA1 e anticorpo secundário conjugado com Alexa®Fluor 488 (verde). Pb18 marcado com anticorpo primário anti-*cell-free* e anticorpo secundário conjugado com Alexa®Fluor 594 (vermelho) e núcleo marcado com DAPI (azul).

4.6.3 Expressão de Rab5

Foi realizada imunofluorescência com dupla marcação, onde *P. brasiliensis* foi marcado com anticorpo policlonal anti-*cell-free* e anticorpo secundário conjugado com Alexa Fluor®594, os macrófagos foram marcados com anticorpo monoclonal anti-Rab5 e anticorpo secundário conjugado com Alexa Fluor®488 e o núcleo com DAPI. Através desta técnica não foi possível co-localizar *P. brasiliensis* em fagossomo Rab5 positivo como demonstra a figura 23. A distribuição de Rab5 no citoplasma dos macrófagos aparece possivelmente em forma de “raft” como demonstra a seta na figura A, o mesmo ocorre nos macrófagos infectados. Quanto à expressão de Rab5 entre macrófagos infectados e não infectados por imunofluorescência, não há alteração aparente (Figura 23). A seta na figura B demonstra a interação de Pb18 com macrófago.

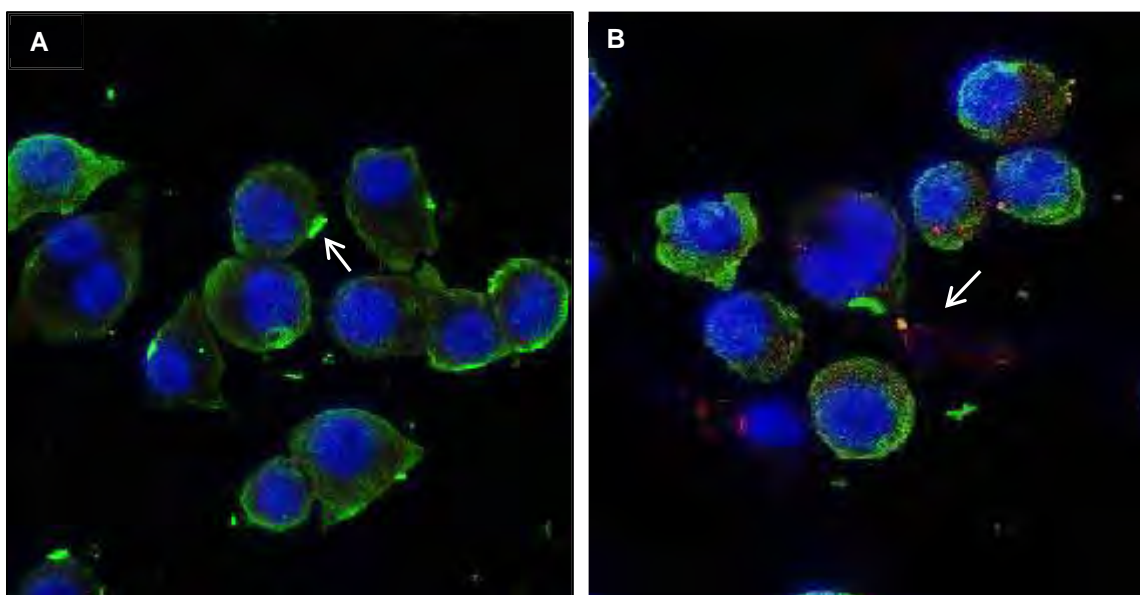


Figura 23: Expressão de Rab5 em macrófagos infectados e não infectados com *P. brasiliensis*. A – Macrófagos não infectados. B – Macrófagos infectados. Macrófagos marcados com anticorpo primário anti-Rab5 e anticorpo secundário conjugado com Alexa®Fluor 488 (verde). Pb18 marcado com anticorpo primário anti-*cell-free* e anticorpo secundário conjugado com Alexa®Fluor 594 (vermelho) e núcleo marcado com DAPI (azul).

4.6.4 Expressão de Rab7

Foi realizada imunofluorescência com dupla marcação, onde o fungo *P. brasiliensis* foi marcado com anticorpo policlonal anti-*cell-free* e anticorpo secundário conjugado com Alexa Fluor®594, os macrófagos foram marcados com anticorpo monoclonal anti-Rab7 e anticorpo secundário conjugado com Alexa Fluor®488. Através da imunofluorescência não foi possível co-localizar *P. brasiliensis* em fagossomo Rab7 positivo, como demonstra a figura 24.

Pela técnica de imunofluorescência notamos um discreto aumento na expressão de Rab7 nas células infectadas relação às não infectadas no período de infecção de 6h (Figura 24). Também podemos destacar que a expressão de Rab7 ocorre possivelmente em forma de “raft”, assim como ocorre com Rab5.

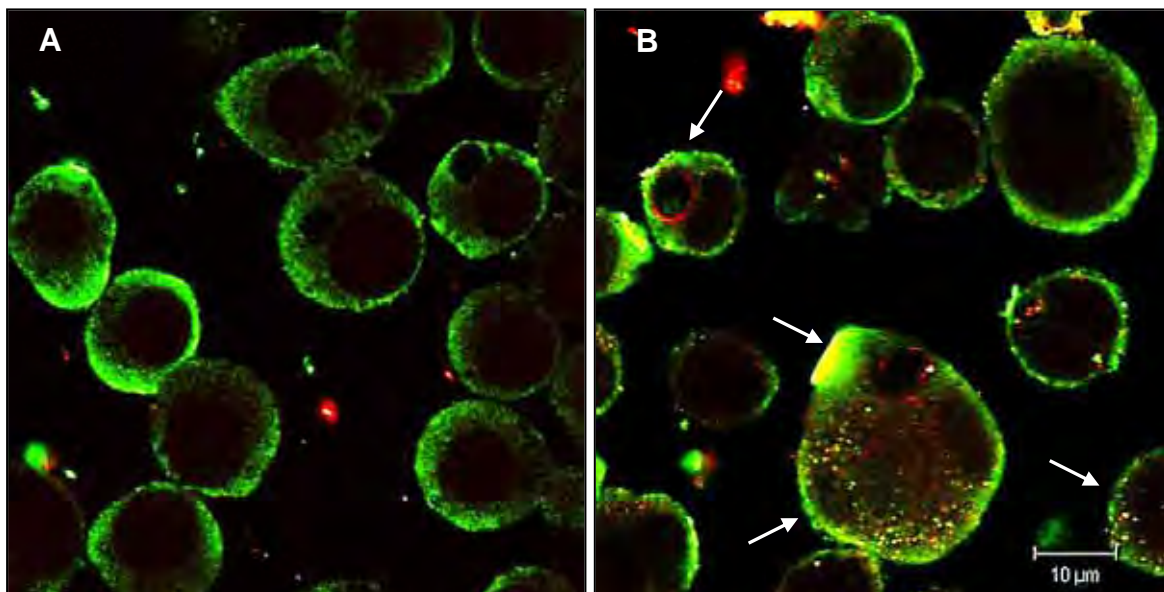


Figura 24: Expressão de Rab7 em macrófagos infectados com *P. brasiliensis* por 6h em aerobiose. A – Macrófagos não infectados marcados com anti-Rab7. B – Macrófagos infectados com *P. brasiliensis*. Macrófagos marcados com anticorpo primário anti-Rab7 e anticorpo secundário conjugado com Alexa®Fluor 488 (verde). Pb18 marcado com anticorpo primário anti-*cell-free* e anticorpo secundário conjugado com Alexa®Fluor 594 (vermelho).

4.6.5 Expressão de LAMP-1

Foi realizada imunofluorescência com dupla marcação, onde o fungo *P. brasiliensis* foi marcado com anticorpo policlonal anti-*cell-free* e anticorpo secundário conjugado com Alexa Fluor®594, os macrófagos foram marcados com anticorpo monoclonal anti-LAMP-1 e anticorpo secundário conjugado com Alexa Fluor®488. Através da imunofluorescência não foi possível co-localizar *P. brasiliensis* em fagossomo LAMP-1 positivo, como demonstra a figura 25.

A expressão de LAMP-1, após 24h de infecção em aerobiose, não demonstrou alteração aparente na expressão entre células infectadas e não infectadas (Figura 25).

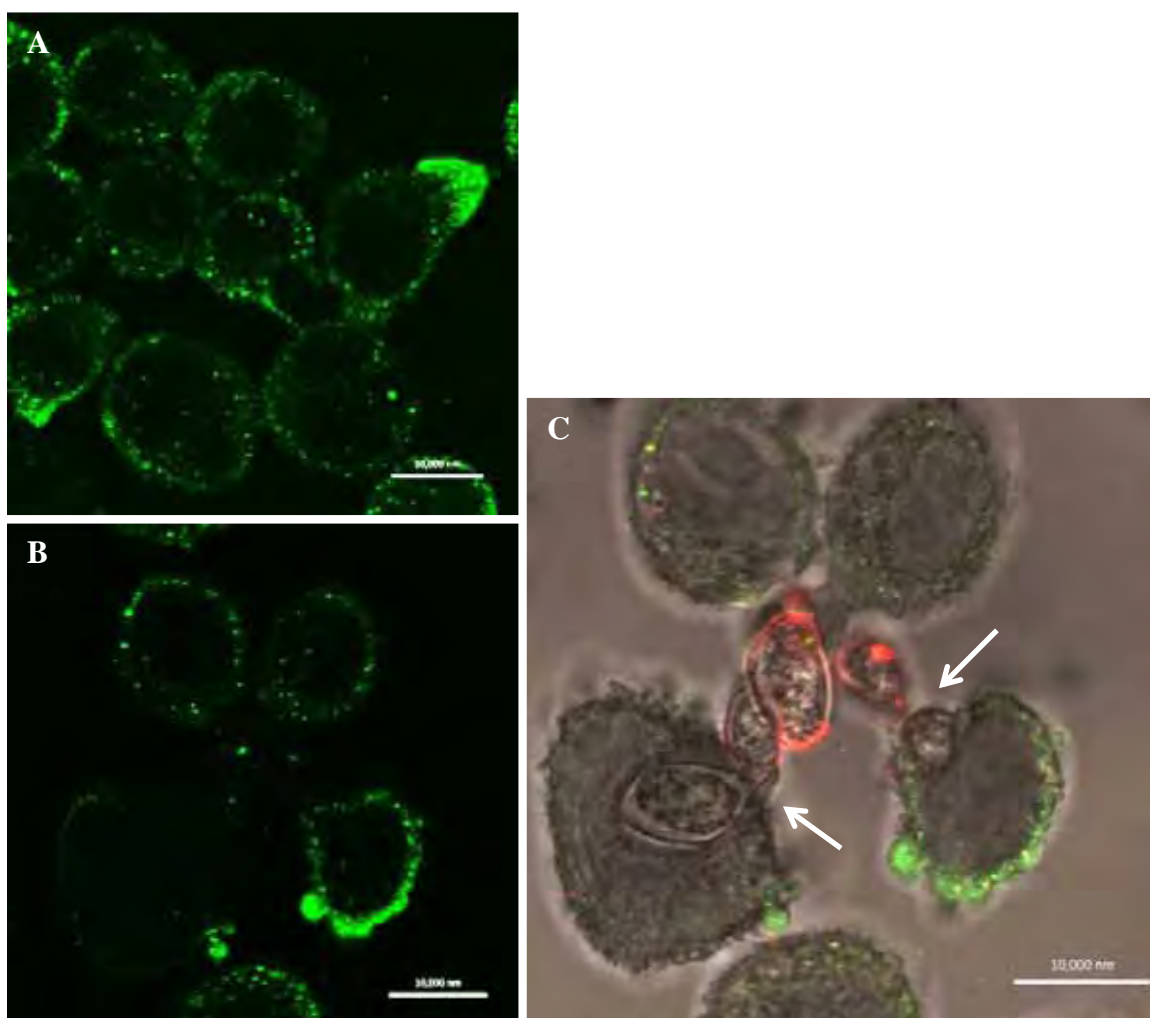


Figura 25: Expressão de LAMP-1 em macrófagos infectados com *P. brasiliensis* em aerobiose em 24h. A – Macrófagos não infectados marcados com anti-LAMP-1. B – Macrófagos infectados com *P. brasiliensis*. C – Macrófagos infectados com *P. brasiliensis* (Normasky). Macrófagos marcados com anticorpo primário anti-LAMP-1 e anticorpo secundário conjugado com Alexa®Fluor 488 (verde). Pb18 marcado com anticorpo primário anti-*cell-free* e anticorpo secundário conjugado com Alexa®Fluor 594 (vermelho). As setas demonstram o fungo internalizado por macrófagos.

Nas tabelas 3 e 4 estão resumidos os resultados da expressão dos genes de via endocítica por qRT-PCR.

Tabela 3: Macrófagos infectados com *P. brasiliensis* (Pb18) cultivado em aerobiose e microaerofilia.

2h (Interação inicial)	Pb18 aerobiose	Pb18 microaerofilia
Clatrina	↓	↓
Rab5	↓	-
Rab7	-	↓
Lamp-1	-	↓
6h (Início da internalização)	Pb18 aerobiose	Pb18 microaerofilia
Clatrina	↓	↑
Rab5	↓	↑
Rab7	↓	-
Lamp-1	↓	-
12h	Pb18 aerobiose	Pb18 microaerofilia
Clatrina	-	-
Rab5	-	-
Rab7	↓	-
Lamp-1	-	-
24h	Pb18 aerobiose	Pb18 microaerofilia
Clatrina	↓	-
Rab5	↓	↓
Rab7	↑	-
Lamp-1	↑	-

Tabela 4: Macrófagos infectados com *P. brasiliensis* (Pb18). Reação incubada em diferentes condições de oxigênio.

2h (Interação inicial)	Aerobiose	Microaerofilia	Anaerobiose
Clatrina	↓	-	-
Eea1	-	↓	↓
Rab5	-	↓	↓
Rab7	↓	↑	↓
Lamp-1	-	-	↓
6h (Início da internalização)	Aerobiose	Microaerofilia	Anaerobiose
Clatrina	-	↑	-
Eea1	↑	-	-
Rab5	-	↑	-
Rab7	↑	↓	↓
Lamp-1	-	-	-
24h	Aerobiose	Microaerofilia	Anaerobiose
Clatrina	↓	↑	-
Eea1	-	-	-
Rab5	-	-	↓
Rab7	-	-	-
Lamp-1	-	↑	-

5. Discussão

P. brasiliensis é um organismo eucarioto que apresenta os mesmos compartimentos celulares que as células de mamíferos. Das 60 proteínas de leveduras envolvidas na endocitose, 85% apresentam homologia com as proteínas de mamíferos. Várias publicações têm enfatizado as diferenças na dinâmica de endocitose em leveduras e mamíferos (TAYLOR et al., 2011; WEINBERG; DRUBIN, 2012). Endocitose é um processo evolutivamente conservado em eucariotos e é crítico para absorção de nutrientes, transporte de membrana e de proteínas, e, em a resposta ao ambiente extracelular. A endocitose mediada por clatrina (CME) é o modo mais bem estudado de internalização a partir da membrana plasmática, e requer o recrutamento ordenado de clatrina, carga e de proteínas adaptadoras ligadas a clatrina e de numerosas proteínas acessórias. Muitas proteínas envolvidas na endocitose com envolvimento de clatrina foram identificados e caracterizados em leveduras, a maior parte dos quais têm ortólogos em células de mamíferos, que executam funções semelhantes (ENGQVIST-GOLDSTEIN; DRUBIN, 2003; KAKSONEN et al, 2005; KAKSONEN et al, 2006; ROBERTSON et al., 2009; PROSSER et al., 2011).

Embora a importância da CME está bem estabelecida, a maioria das células também utilizam vias independentes de clatrina (MAYOR; PAGANO, 2007; HOWES et al., 2010). A variedade de mecanismos em que se tem o não envolvimento de clatrina pode ter surgido para satisfazer as necessidades específicas de diferentes tipos de células, permitindo a internalização de cargas específicas ou através da ativação de endocitose em resposta às condições ambientais ou de estresse. Assim, primeiramente o objetivo deste trabalho foi avaliar a expressão de genes / proteínas envolvidos na via endocítica de *P. brasiliensis*. Assim, foi observada a expressão de clatrina e Ypt7 na fase leveduriforme de *P. brasiliensis* (Pb18). A expressão de clatrina também já foi relatada no fungo *Neurospora crassa* (ROSA; MACCIONI, 1987), bem como em outras células eucarióticas. Mais de 50 proteínas diferentes foram descritas na formação de vesículas endocíticas revestidas por clatrina. Estas proteínas reúnem-se na membrana plasmática, formando os componentes necessários envolvidos no brotamento de vesículas endocíticas. Embora endocitose mediada

por clatrina fosse estudada já há mais de quatro décadas, uma compreensão dos mecanismos moleculares do processo é ainda bastante limitada. A dificuldade de desvendar os mecanismos moleculares não é apenas uma consequência do grande número de proteínas envolvidas, mas também é uma consequência da natureza dinâmica do mecanismo de endocitose. Proteínas endocíticas são recrutadas para o local da formação de vesículas em forma seqüencial, e estas podem sofrer alterações muito rapidamente (KAKSONEN, 2008).

Em análise por imunofluorescência foi observado que a clatrina distribui-se ao redor da membrana da célula fúngica e, principalmente, nas células-filhas (leveduras em brotamento). Os brotamentos são células metabolicamente ativas, que apresentam um crescimento polarizado, o que justificaria a intensa expressão de clatrina nestes locais. A expressão de Ypt7 em *P. brasiliensis* mostrou-se difusa pelo citoplasma de Pb18, principalmente nas regiões de filamentação. A ocorrência deste fenômeno deve-se ao intenso transporte de nutrientes, proteínas, lipídeos, que essa nova formação necessita. Nas células mais “velhas” não foi observada uma expressão tão intensa.

A expressão de proteínas da família Rab GTPases, como Rab7 (Ypt7), já foi descrita em diferentes microrganismos, como em *Saccharomyces cerevisiae* (WICHMANN et al., 1992), no fungo *Aspergillus nidulans* (OSHUMI et al., 2002), no protozoário *Paramecium* sp (SURMACZ et al., 2003), *Schizosaccharomyces pombe* (KASHIWAZAKI et al., 2005) e em *Lentinula edodes* (Shiitake) (LEE et al., 2007). Há opiniões conflitantes sobre o papel exato de Rab7, já que alguns pesquisadores relatam que Rab7 regula o tráfego entre endossomo precoce e tardio, enquanto outros relataram suas funções no tráfego entre endossomos tardios e lisossomos. Não está claro se Rab7 é funcional em ambas as ocorrências (HYTTINEN et al., 2013).

A expressão do gene *Clatrina* e *Ypt7* também foi analisada quando Pb18 foi cultivado na depleção de metais. Nesta análise, a expressão de *Clatrina* apresentou diminuição na depleção de todos os metais, principalmente na depleção de zinco e ferro. Jaiseng et al. (2012) demonstraram que o tráfego de proteínas ancoradas a GPI da membrana pós-Golgi é mediado por clatrina, e que o transportador de zinco, Cis4, regula a homeostase de zinco e apresenta papel importante na fissão de leveduras. Consequentemente a depleção de zinco ocasiona a redução na expressão de *Clatrina*. A expressão diminuída de *Clatrina*

frente à depleção de ferro, provavelmente, se deve ao transporte do receptor de transferrina por vesículas revestidas por clatrina, ou seja, ocorre redução no transporte de ferro e, por conseguinte diminuição na expressão de clatrina (DOHERTY; MCMAHON, 2009; MAYLE et al., 2012). Em 2009, López-Soto et al. relataram que o transporte de transferrina em formas trofozoítas de *Entamoeba histolytica* ocorre por vesículas revestidas por clatrina. Assim, podemos relacionar a deficiência de ferro no cultivo de Pb18 com a expressão de *Clatrina*, inferindo que ocorre redução desta proteína devido à redução no transporte de transferrina, como acontece com o protozoário *E. histolytica*. Em relação à redução na expressão de *Ypt7*, principalmente na depleção de ferro, não foi possível encontrar nada na literatura relacionado a eucariotos. Há dados referentes aos procariotos, onde uma proteína de membrana, a FeoB, é responsável pela importação de ferro na forma ferrosa (Fe^{+2}), e esta proteína apresenta um domínio com atividade de GTPase (ASH et al., 2010). Petermann et al. (2010) descreveram que *Legionella pneumophila* contem essa GTPase transmembranar, FeoB, responsável pela aquisição de (Fe^{+2}) e virulência da mesma. Dessa forma, foi suposto que a redução na expressão de *Ypt7*, que é uma GTPase, pode ser devido à um mecanismo parecido com os procariotos, mas que ainda precisa ser elucidado.

Quando Pb18 foi cultivado na depleção de metais, e com este realizado a infecção de macrófagos, foi observada que na falta de ferro e de cobre, a infecção de macrófagos foi maior e na falta de zinco foi menor. O cultivo de Pb18 em meio deficiente de ferro promove a alteração no metabolismo do fungo, que necessita de ferro para crescimento (ARANGO; RESTREPO, 1988) e sobrevivência intracelular (DIAS-MELÍCIO et al., 2006). Essa modificação no metabolismo do fungo, segundo Parente et al. (2011), é uma maneira do fungo se adaptar ao ambiente do hospedeiro, já que um dos mecanismos de defesa do hospedeiro é limitar a disponibilidade de ferro para o patógeno (RECALCATI et al., 2013). Estudos com *Mycobacterium avium* sugerem que os compostos quelantes de ferro podem ser úteis na terapia adjuvante contra a infecção (GOMES et al., 1999).

A patogênese do fungo *P. brasiliensis* envolve o acometimento de diferentes órgãos, entre eles, pele, mucosas, pulmões, entre outros. Segundo Ernst e Tielker (2009), o crescimento na pele ou nas camadas bucais da mucosa,

expõe esses tecidos a altos níveis de oxigênio (concentração de oxigênio cerca de 20%), enquanto que a sua penetração nas células, tecidos ou órgãos internos conduz a vários graus de hipóxia. Assim, nesse contexto surgiu a idéia de realizar a infecção em diferentes condições de oxigênio com o objetivo de aproximar o ensaio à patogênese fúngica.

A literatura relata que Pb18 é destruído por macrófagos ativados, mas que este também se multiplica e sobrevive no interior de macrófagos (BRUMMER et al., 1989), bem como outros microrganismos como *Mycobacterium avium* e *M. tuberculosis* (APPELBERG; ORME, 1993; ASMSTRONG; HART, 1971; ARMSTRONG; HART, 1975). No entanto, antes desta sobrevivência e multiplicação, ocorre a entrada do microrganismo para o interior da célula. Estes utilizam diferentes vias para infectar as células do hospedeiro. Um exemplo é o protozoário *T. cruzi*, que entra nas células através de endocitose e fagocitose, e agora mais recentemente há relatos da entrada deste através da macropinocitose (NOGUEIRA; COHN, 1976; SCHENKMAN et al., 1991; BARRIAS et al., 2012).

Em relação à entrada de *P. brasiliensis* para o interior celular, cabe ressaltar que de acordo com nossos estudos deve haver uma aparente endocitose mediada por clatrina, sendo uma via de entrada também utilizada por reovírus (SCHULZ et al., 2012), *Acinetobacter baumannii* (SMANI et al., 2012) e *C. albicans* (MORENO-RUIZ et al., 2009). Quando Pb18 foi observado no interior de macrófagos alveolares, foi notado um rearranjo de actina, o que confirmou que uma das formas do fungo entrar nos macrófagos ocorre por fagocitose, assim como ocorre com *Listeria monocytogenes* (PIZARRO-CERDA et al., 2004), *Cryptococcus neoformans* (JOHNSTON; MAY, 2010), entre outros.

Na sequência dos estudos, Pb18 foi cultivado em aerobiose e microaerofilia, e após o cultivo deste, foram realizadas infecções em linhagem de macrófagos alveolares e então avaliada a percentagem de infecção total. Em condições de aerobiose, a infecção de macrófagos foi maior que em condições de microaerofilia. Segundo Lewis et al. (1999), a condição de hipóxia inibe a atividade fagocítica de macrófagos *in vitro* ou *in vivo*. Uma atividade microbicida eficiente dos macrófagos necessita de oxigênio para a reação do *burst* oxidativo, o que leva a formação de espécies reativas do oxigênio e regula o pH no interior do vacúolo para níveis ideais de atividade enzimática. Assim, os dados referentes

a infecção total de Pb18 em macrófagos em condição de aerobiose e microaerofilia estão condizentes com dados da literatura.

Segundo Caldwell et al. (2001), o ambiente de hipóxia pode alterar a expressão gênica e a função das células afetadas por este ambiente. Diante do exposto, foi analisada a expressão de genes relacionados à via endocítica em macrófagos infectados com Pb18 por qRT-PCR. Para avaliar a expressão gênica, foram desenhados iniciadores específicos para macrófagos em relação à via endocítica. Deste modo, observou-se que quando Pb18 foi cultivado em condições de aerobiose, houve redução na expressão de *Clatrina* e inicialmente, ocorreu o mesmo em microaerofilia. No entanto, após 6h de infecção, foi notado um aumento na expressão de *Clatrina*, na condição de hipóxia, por esses macrófagos. A literatura relata que condições de hipóxia leva a um aumento na virulência de *Aspergillus fumigatus* (BARKER et al., 2012) e *Candida albicans* (ERNEST; TIELKER, 2009; SYNNOT et al., 2010). Em relação à virulência de *P. brasiliensis* em condição de hipóxia, não há nada descrito na literatura. O aumento na expressão de *Clatrina* nas células infectadas após 6h poderia ser correlacionado com os eventos precoces da infecção em macrófagos relatado por Silva et al. (2008) associado ao aumento da virulência fúngica nesta condição.

Quando o fungo foi cultivado em aerobiose e a condição de infecção realizada em diferentes tensões de oxigênio, houve redução na expressão de *Clatrina* em aerobiose, aumento em microaerofilia e ausência de alteração em anaerobiose. É possível que o contato inicial do fungo com macrófagos, desencadeie sinais celulares que promova essa diminuição na expressão de *Clatrina*. Wang et al. (2012) demonstraram que a internalização de lipopolissacarídeo (LPS) através do receptor *Toll-like 4* (TLR4) é uma endocitose mediada por clatrina em macrófagos, e a via de transdução de sinal ocorre através de Myd88 e TRAM-TRIF. Em relação à infecção por *P. brasiliensis*, sabe-se que uma das vias de ativação de macrófagos por este fungo ocorre através de receptores TLR2 e TLR4 (LOURES et al., 2009; LOURES et al., 2010). Assim, pode ser que Pb18 penetre nos macrófagos pelo mesmo mecanismo que LPS.

O estudo da via endocítica, tem como objetivo delinear a rota fagocítica que Pb18 percorre no interior de macrófagos, que até o momento ainda foi pouco explorada. Em 1989, Brummer et al. relataram que Pb18 residia em fagossomos de macrófagos, mas em relação a rota fagocítica estabelecida por este patógeno

pouco se sabe. Em 2008, Voltan relatou que Pb18 promovia a diminuição na expressão da proteína EEA1 em macrófagos infectados, proteína esta envolvida com os estágios iniciais do tráfego endocítico. Assim, foi de interesse avaliar a expressão de genes relacionados com o tráfego endocítico realizado por Pb18 em diferentes condições de oxigênio, já que nos diferentes locais de infecção, existem diferentes tensões de oxigênio. A expressão do gene *Eea1* apresentou aumento no período de infecção de 6h em aerobiose e diminuição nas condições iniciais de microaerofilia e anaerobiose. Segundo Lewis et al. (1999) o ambiente de hipóxia reduz a fagocitose, conseqüentemente a expressão do gene *Eea1*, relacionado com o tráfego intracelular do fungo (VOLTAN, 2008). Não há dados na literatura que correlaciona EEA1 com ambiente de baixa tensão de oxigênio. Estudos relatam que redução na expressão de EEA1 também foi observada em cardiomiócitos infectados com *T. cruzi* (BATISTA et al., 2008). A redução na expressão de *Eea1* em macrófagos infectados com Pb18 pode ser decorrente da via de sinalização que recruta essa proteína para a membrana fagossomal. A via que recruta EEA1 é a via de PI3K, mas não há dados na literatura sobre o envolvimento desta via com *P. brasiliensis*, enquanto há relatos para *Mycobacterium tuberculosis* (FRATTI et al., 2001). Além da avaliação da expressão gênica, as proteínas de via endocítica foram avaliadas através da imunofluorescência, onde foi possível demonstrar a presença de *P. brasiliensis* em fagossomos EEA1 positivos. A literatura relata que os microrganismos podem ser destruídos ou sobreviverem no interior de macrófagos. A sobrevivência intracelular se deve as estratégias desenvolvidas por muitos microrganismos no seu processo evolutivo. Um exemplo é o *Mycobacterium tuberculosis*, que inibe a fusão fagolisossomo, assim como Legionella e Salmonella (FINLAY; FALKOW, 1997; AMER; SWANSON, 2002). Alguns fungos, como *Cryptococcus neoformans* sobrevivem em ambiente ácido no interior de células dendríticas (WOSNIAK et al., 2008); *Histoplasma capsulatum* modula o ambiente intrafagossomal (NEWMAN et al., 1992; EISSENBERG et al., 1993) e *Candida albicans* possui diversos mecanismos de sobrevivência (FERNADEZ-ARENAS et al., 2009). Muitos microrganismos já foram co-localizados em fagossomos EEA1 positivo, entre eles *Legionella longbeachaea* (ASARE; KWAIK, 2007), *C. neoformans* (WOZNIAK; LEVITZ, 2008) e *C. albicans* (FERNADEZ-ARENAS et al., 2009), assim como *P. brasiliensis* neste trabalho.

Wang et al. (2009) descreveram que o ambiente de hipóxia, por mecanismos largamente desconhecidos, está associado com o aumento da sinalização mediada por receptores tirosina-quinase (RTK). A condição de hipóxia induz a expressão de fatores de transcrição como, o fator indutor de hipóxia (HIF-1), e este regula a fusão de endossomo precoce. HIF-1 modula a fusão do endossomo precoce em células não transformadas e cancerosas. Assim, a condição de oxigênio influencia na expressão de genes de via endocítica. Então na condição de hipóxia, além do prejuízo da fagocitose, ocorre também um prejuízo na via endocítica.

A expressão do gene *Rab5*, *Rab7* e *Lamp-1* foi avaliada por qRT-PCR em macrófagos infectados com Pb18 cultivado em aerobiose e microaerofilia. Primeiramente, foi observado que a expressão de *Rab5*, *Rab7* e *Lamp-1* inicialmente, apresentou diminuição em aerobiose. Após 24h de infecção, houve um aumento na expressão de *Rab7* e *Lamp-1* nas células infectadas. Bonfim et al. (2009) relatam que a interação inicial, após 30 minutos de contato, de *P. brasiliensis* com receptores TLRs, ocorre diminuição na expressão destes. A diminuição na expressão dos receptores TLRs justifica-se pelo fato do fungo ser internalizado juntamente com o receptor. Se a expressão de *Rab5* está ligada a expressão de TLRs, isso justificaria a diminuição inicial na expressão de *Rab5* (LUND; DELOTTO, 2011), e o mesmo poderia ocorrer com *Rab7* e *Lamp-1* inicialmente, mas não há dados na literatura em relação a isso. Já a expressão aumentada de *Rab7* e *Lamp-1*, após 24h de infecção, se deve ao fato da necessidade de degradação dos receptores internalizados com *P. brasiliensis*, principalmente TLR4 (WANG et al., 2007), que é um dos receptores de interação de *P. brasiliensis*, juntamente com TLR2. Ou mesmo, após 24h de infecção, é possível pensar que o aumento na expressão desses genes pode ser devido à necessidade dos macrófagos de destruição do patógeno.

Além dos receptores TLRs, já foi descrito por Monteiro da Silva et al. (2007), que a adesão e endocitose de *P. brasiliensis* por células epiteliais é mediada por receptores tirosina-quinases. Em relação a estes receptores, a atividade enzimática destes, é necessária para a fusão do endossomo via ativação de *Rab5* (JOZIC et al. 2012). Assim, o mecanismo de redução na expressão desses genes de via endocítica, muito provavelmente está relacionado com a cascata de sinalização, através de receptores TLRs e até mesmo

receptores tirosino-quinases. Inferimos que a diminuição destes genes pode estar relacionada à interação com estes receptores, para tanto, seria necessário avaliar as vias de sinalização envolvidas no tráfego endocítico de *P. brasiliensis* no interior de macrófagos.

A expressão de *Rab5*, *Rab7* e *Lamp-1* foi avaliada em macrófagos infectados, incubados em diferentes tensões de oxigênio. Foi observado que a expressão de *Rab5* apresenta diminuição na expressão quando macrófagos foram incubados em baixa tensão de oxigênio (microaerofilia e anaerobiose). Pode-se assim justificar, que, como o ambiente de hipóxia reduz a capacidade fagocítica dos macrófagos, conseqüentemente a expressão de *Rab5* será menor. Além disso, se a capacidade fagocítica dos macrófagos se torna reduzida, conseqüentemente, a interação do fungo com os receptores de superfície dos macrófagos também, assim a sinalização mediada pelos receptores tirosino-quinases não promove a ativação de *Rab5* (WANG et al., 2009; JOZIC et al., 2012).

Em condições de aerobiose foi observado que houve um aumento na expressão de *Rab7* após 2h e 6h de infecção. Quando ocorre mudança na tensão de oxigênio, percebe-se que o perfil de expressão começa a ser alterado. Após 2h, a expressão de *Rab7* é maior nas células infectadas, mas com 6h diminui e em ambiente de anaerobiose tanto em 2h quanto em 6h, apresentam diminuição na expressão de *Rab7*. Assim, a expressão de *Rab7* é influenciada pela tensão de oxigênio, quanto menor a tensão, menor a expressão, indicando que nestas condições ter-se-ia alteração na maturação do fagossomo.

Um resultado expressivo foi o aumento na expressão de *Lamp-1* em macrófagos incubados em hipóxia após 24h de infecção. O período de 24h é um período onde supomos que muitas leveduras já foram internalizadas, no entanto, ainda não se sabe se *Pb18* é direcionado a lisossomo ou não, até o momento, o que foi delineado é que o mesmo é levado à endossomo precoce. Além disso, considerar que houve fagocitose de um grande número de leveduras é pouco provável, já que em condições de hipóxia a fagocitose é reduzida. Kolenda et al. (2011) relataram que a expressão de LAMP-1 aumenta em condições de hipóxia, estando de acordo com o que foi observado em nosso trabalho.

As proteínas EEA1 e *Rab5* são consideradas imunomarcadores de endossomo precoce, onde EEA1 é uma molécula efetora de *Rab5*, ou seja, a

fusão do endossomo precoce depende de EEA1 para ocorrer. Ao analisar, por imunofluorescência, a expressão de Rab5, com o objetivo de co-localizar Pb18 em fagossomo Rab5 e Rab7, não se observou este fato. No entanto, através da co-localização de EEA1 é possível inferir que a rota utilizada por Pb18 no interior de macrófagos passa pelo fagossomo precoce. Através das imagens de microscopia confocal, foi possível observar que a expressão de Rab5, assim como a expressão de Rab7, ocorre em forma de “raft”. A definição original de “raft” é uma estrutura chamada de jangada lipídica, formada por esfingolípídeos e colesterol em plataformas móveis, sobre o qual estão inseridas proteínas específicas (OWEN et al., 2012). A literatura relata que as proteínas Rab estão envolvidas na interação com a membrana da célula hospedeira, Rab14, uma Rab GTPase, foi co-localizada como domínio basolateral de proteína apical associada ao “raft” (KITT et al., 2008). Assim, concluímos que há envolvimento de proteínas Rab com “raft” lipídico. Igualmente, neste trabalho abre-se uma importante linha referente aos passos envolvidos durante a interação de *P. brasiliensis* e os macrófagos, quanto à via endocítica. Geralmente, a exposição deste fungo que é intracelular facultativo ao conteúdo lisossomal, e os dados deste trabalho podem explicar em parte algumas das características desta doença, pois aparentemente o fungo pode diminuir as moléculas efetoras da via endocítica, por influência das condições do meio quanto à nutrição e a tensão de oxigênio. Quais moléculas do fungo estariam envolvidas na invasão, bem como nas etapas seguintes são o grande desafio para descobrirem-se novos alvos para a terapêutica desta doença.

6. Conclusões

- A depleção de metais altera a via endocítica de *P. brasiliensis*;
- O cultivo de *P. brasiliensis* na depleção de ferro e cobre aumenta a interação deste com macrófagos;
- *P. brasiliensis* é fagocitado por macrófagos alveolares e possivelmente entra nestas células por endocitose mediada por clatrina;
- *P. brasiliensis* foi co-localizado em fagossomo EEA1 positivo;
- As diferentes tensões de oxigênio influenciaram na expressão de genes da via endocítica.

7. Referências Bibliográficas

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Molecular Biology of the Cell**. 4th. ed. New York: Garland Science. 2004 p. 1065– 1089.

AMER, A. O.; SWANSON, M. S. A phagosome of one's own: a microbial guide to life in the macrophage. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 5, n. 1, p. 56–61, 2002.

ANDRADE, L. O.; ANDREWS, N. W. Lysosomal fusion is essential for the retention of *Trypanosoma cruzi* inside host cells. **J. Exp. Med**, v. 200, n. 9, p. 1135 -1143, 2004.

ANDREOTTI, P. F.; MONTEIRO DA SILVA, J. L.; BAILÃO, A. M.; SOARES, C. M. A.; BENARD, G.; SOARES, C. P.; MENDES-GIANNINI, M. J. S. Isolation and partial characterization of a 30 kDa adhesin from *Paracoccidioides brasiliensis*. **Microbes Infect.**, v. 7, p. 875-881, 2005.

APPELBERG, R.; ORME, I. M. Effector mechanisms involved in cytokine-mediated bacteriostasis of *Mycobacterium avium* infections in murine macrophages. **Immunology.**, v. 80, n. 13, p. 352–359, 1993.

ARANGO, R.; RESTREPO, A. Growth and production of iron chelants by *Paracoccidioides brasiliensis* mycelial and yeast forms. **J. Med. Vet. Mycol.**, v. 26, p.113-118, 1988.

ARMSTRONG, J. A.; HART, P. D. Phagosome-lysosome interactions in cultured macrophages infected with virulent tubercle bacilli. Reversal of the usual nonfusion pattern and observations on bacterial survival. **J. Exp. Med.**, v.142, n. 1, p.1-16, 1975.

ARMSTRONG, J. A.; HART, P. D. Response of cultured macrophages to *Mycobacterium tuberculosis*, with observations on fusion of lysosomes with phagosomes. **J. Exp. Med.**, v. 134, n. 3, p. 713-740, 1971.

ASARE, R.; ABU KWAIK, Y. Early trafficking and intracellular replication of *Legionella longbeachaea* within an ER-derived late endosome-like phagosome. **Cell. Microbiol.**, v. 9, n. 6, p. 1571-1587, 2007.

ASH, M. R.; GUILFOYLE, A.; CLARKE, R. J.; GUSS, J. M.; MAHER, M. J.; JORMAKKA, M. Potassium-activated GTPase reaction in the G Protein-coupled ferrous iron transporter B. **J. Biol. Chem.**, v. 285, n. 19, p.14594-14602, 2010.

BAGGETT, J. J.; WENDLAND, B. Clathrin Function in Yeast Endocytosis. **Traffic**, v. 2, p. 297 – 302, 2001.

BARBIERI, M. A.; ROBERTS, R. L.; MUKHOPADHYAY, A.; STAHL, P. D. Rab5 regulates the dynamics of early endosome fusion. **Biocell**, v. 20, p. 331–338, 1996.

BARBOSA, M. S.; BÃIO, S. N.; ANDREOTTI, P. F.; DE FARIA, F. P.; FELIPE, M. S.; DOS SANTOS FEITOSA, L.; MENDES-GIANNINI, M. J.; SOARES, C. M. 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, n. 1, p. 382 – 389, 2006.

BARKER, B. M.; KROLL, K.; VÖDISCH, M.; MAZURIE, A.; KNIEMEYER, O.; CRAMER, R. A. Transcriptomic and proteomic analyses of the *Aspergillus fumigatus* hypoxia response using an oxygen-controlled fermenter. **BMC Genomics**, v. 13, n. 62, 2012.

BARRIAS, E. S.; REIGNAULT, L. C.; W. DE SOUZA, W.; CARVALHO, T.M.U. *Trypanosoma cruzi* uses macropinocytosis as an additional entry pathway into mammalian host cell. **Microb. Infect.**, v.14, p. 1340-1351, 2012.

BATISTA, D. G. J.; SILVA, C. F.; MOTA, R. A.; COSTA, L. C.; MEIRELLES, M. N. L.; MEUSER-BATISTA, M.; SOEIRO, M. N. C. *Trypanosoma cruzi* modulates the expression of Rabs and alters the endocytosis in mouse cardiomyocytes in vitro. J. Histochem. **Cytochemistry**, v. 54, n. 6, p. 605 - 614, 2006.

BELANGER, P. H. ; JOHNSTON, D. ; FRATTI, R. A. ; ZHANG, M. ; FILLER, S. G. Endocytosis of *Candida albicans* by vascular endothelial cells is associated with tyrosine phosphorylation of specific host cell proteins. **Cell. Microbiol.**, v. 4, p. 805–812, 2002.

BENARD, G. An overview of the immunopathology of human paracoccidioidomycosis. **Mycopathol.**, v. 165, p. 209 – 221, 2008.

BEUTLER, B. Innate immunity: an overview. **Mol. Immunol.**, v. 40, p. 845 – 859, 2004.

BIAGIONI, L. M.; ORSI, S.; CHAMMA, L. G.; SADATSUNE, T.; FRANCO, M. Immunoglobulins and C3 in paracoccidioidal granuloma. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**, v. 29, n. 2, p. 97-103, 1987.

BONFIM, C. V.; MAMONI, R. L.; BLOTTA, M. H. TLR-2, TLR-4 and dectin-1 expression in human monocytes and neutrophils stimulated by *Paracoccidioides brasiliensis*. **Med. Mycol.**, v. 47, n. 7, p. 722-733, 2009.

BORGES-WALMSLEY, M. I.; CHEN, D.; SHU, X.; WALMSLEY, A. R. The pathobiology of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Trends Microbiol.**, v.10, n. 2, 80-87, 2002.

BRUMMER, E.; HANSON, L. H.; RESTREPO, A.; STEVENS, D. A. Intracellular multiplication of *Paracoccidioides brasiliensis* in macrophages. **Infect. Immun.**, v. 57, n. 8, p. 2289-2294, 1989.

BRUMMER, E.; HANSON, L. H.; STEVENS, D. A. Gamma-interferon activation of macrophages for killing of *Paracoccidioides brasiliensis* and evidence for nonoxidative mechanisms. **Int. J. Immunopharmacol.**, v. 10, n. 8, 945-952, 1988.

BUCCI, C.; PARTON, R. G.; MATHER, I. H.; STUNNENBERG, H.; SIMONS, K.; HOFLACK, B.; ZERIAL, M. The small GTPase rab5 functions as a regulatory factor in the early endocytic pathway. **Cell**, v.70, p.715–728, 1992.

CALDWELL, C. C.; KOJIMA, H.; LUKASHEV, D.; ARMSTRONG, J.; FARBER, M. APASOV, S. G.; SITKOVSKY, M. V. Differential effects of physiologically relevant hypoxic conditions on T lymphocyte development and effector functions. **J. Immunol.**, v.167, n.11, p. 6140-6149, 2001.

CALICH, V. L. G.; COSTA, T. A.; FELONATO, M. ARRUDA, C.; BERNARDINO, S.; LOURES, F. V.; RIBEIRO, L. R. R.; VALENTE-FERREIRA, R. C.; PINA, A. Innate immunity to *Paracoccidioides brasiliensis* infection. **Mycopathol.**, v. 165, p. 223 – 236, 2008.

CAMARGO, Z. P.; FRANCO, M. F. Current knowledge on pathogenesis and immunodiagnosis of paracoccidioidomycosis. **Rev. Iberoam. Micol.**, v. 17, p. 41-48, 2000.

CAMARGO, Z. P.; TABORDA, C. P.; RODRIGUES, E. G.; TRAVASSOS, L. R. The use of cell free antigens of *Paracoccidioides brasiliensis* in serological tests. **J. Vet. Med. Mycol.**, v. 29, n. 31-38, 1991.

CANO, L. E.; BRUMMER, E.; STEVENS, D. A.; RESTREPO, A. Fate of conidia of *Paracoccidioides brasiliensis* after ingestion by resident macrophages or cytokine-treated macrophages. **Infect. Immun.**, v. 60, n. 5, p. 2096-2100, 1992.

CANO, L. E.; GOMEZ, B.; BRUMMER, E.; RESTREPO, A.; STEVENS, D. A. Inhibitory effect of deferoxamine or macrophage activation on transformation of *Paracoccidioides brasiliensis* conidia ingested by macrophages: reversal by holotransferrin. **Infect. Immun.**, v. 62, n. 4, p.1494-1496, 1994.

CARRERO, L. L.; NINÑO-VEGA, G.; TEIXEIRA, M. M.; CARVALHO, M. J. A.; SOARES, C.M.A.; PEREIRA, M.; JESUÍNO, R. S. A., MCEWEN, J. G.; MENDOZA, L.; JOHN 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, p. 605–612, 2008.

CASADEVALL, A.; PIROFSKI, L. A. Host-pathogen interactions: redefining the basic concepts of virulence and pathogenicity. **Infect. Immun.**, v. 67, n. 8, p. 3703-3713, 1999.

CHRISTOFORIDIS, S.; MIACZYNSKA, M.; ASHMAN, K.; WILM, M.; ZHAO, L.; YIP, S.C.; WATERFIELD, M. D.; BACKER, J. M.; ZERIAL, M. Phosphatidylinositol-3-OH kinases are Rab5 effectors. **Nat Cell Biol**, v. 1, p. 249–252, 1999.

CONNER, S.D.; SCHMID, S.L. Regulated portals of entry into the cell. **Nature**, v. 422, p. 37–44, 2003.

CORREA, J. R.; ATELLA, G. C.; BATISTA, M. M.; SOARES, M. J. Transferrin uptake in *Trypanosoma cruzi* is impaired by interference on cytosome-associated cytoskeleton elements and stability of membrane cholesterol, but not by obstruction of clathrin-dependent endocytosis. **Exp. Parasitol.**, v. 119, p. 58–66, 2008.

COURTNEIDGE, S. A. Protein tyrosine kinases, with emphasis on the Src family. **Semin. Cancer Biol.**, v. 5, p. 239–246, 1994.

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

DANELISHVILI, L.; MCGARVEY, J.; LI, YONG-JUN; BERMUDEZ, L. E. *Mycobacterium tuberculosis* infection causes different levels of apoptosis and necrosis in human macrophages and alveolar epithelial cells. **Cell. Microb.**, v. 5, no. 9, p. 649 – 660, 2003.

DA SILVA, M. B.; MARQUES, A. F.; NOSANCHUK, J. D.; CASADEVALL, A.; TRAVASSOS, L. R.; TABORDA, C. P. Melanin in the dimorphic fungal pathogen *Paracoccidioides brasiliensis*: effects on phagocytosis, intracellular resistance and drug susceptibility. **Microbes Infect.**, v. 8, p. 197 – 205, 2006.

DA SILVA NETO, B. R.; DA SILVA, J. F.; MENDES-GIANNINI, M. J. S.; LENZI, H. L.; SOARES, C. M. A.; PEREIRA, M. The malate synthase of *Paracoccidioides brasiliensis* is a linked surface protein that behaves as an anchorless adhesin. **BMC Microbiol.**, v. 9, n. 272, 2009.

DE BRITO, T.; FURTADO, J. S.; CASTRO, R. M.; MANINI, M. Intraepithelial parasitism as an infection mechanism in human paracoccidioidomycosis. **Virch. Arch. Abt. A. Pat. Anat.**, v. 36, n. 2, p. 129, 1973.

DE FREITAS, J.; WINTZ, H.; KIM, J. H.; POYNTON, H.; FOX, T.; VULPE, C. Yeast, a model organism for iron and copper metabolism studies. **BioMetals**, v. 16, p. 185–197, 2003.

DEL VECCHIO, A.; SILVA, J. F.; MONTEIRO DA SILVA, J. L.; ANDREOTTI, P. A.; PIENNA-SOARES, C.; BENARD, G.; MENDES-GIANNINI, M. J. S. Induction of apoptosis in A549 pulmonary cells by two *Paracoccidioides brasiliensis* samples. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 5, p. 749-754, 2009.

DIAS, M. F. R. G.; MESQUITA, J.; FILQUEIRA, A. L. e SOUZA, W. Human neutrophils susceptibility to *Paracoccidioides brasiliensis*: na ultrastructural and cytochemical assay. **Med. Mycol.**, v. 46, p. 241 – 249, 2008.

DIAS-MELICIO, L. A.; MOREIRA, A. P.; CALVI, S. A.; SOARES, A. M. Chloroquine inhibits *Paracoccidioides brasiliensis* survival within human monocytes by limiting the availability of intracellular iron. **Microbiol. Immunol.**, v. 50, n. 4, p.307-314, 2006.

DICKMAN, M. B.; YARDEN, O. Serine/threonine protein kinases and phosphatases in filamentous fungi. **Fungal Genet. Biol.**, v. 26, p. 99–117, 1999.

DOEDT, T.; KRISHNAMURTHY, S.; BOCKMUHL, D. P.; TEBARTH, B.; STEMPEL, C.; RUSSELL, C. L.; BROWN, A. J.; ERNST, J. F. APSES proteins regulate morphogenesis and metabolism in *Candida albicans*. **Mol. Biol. Cell**, v. 15, p. 3167–3180, 2004.

DOHERTY, G. J.; MCMAHON, H. T. Mechanisms of Endocytosis. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 78, p. 857–902, 2009.

DONALDSON, J.; PORAT-SHLIOM, N.; COHEN, L. A. Clathrin-independent endocytosis: A unique platform for cell signaling and PM remodeling. **Cell. Signal.**, v. 21, n. 1, p.1-6, 2009.

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

EISSENBERG, L. G.; GOLDMAN, W. E.; SCHLESINGER, P. H. *Histoplasma capsulatum* modulates the acidification of phagolysosomes. **J. Exp. Med.**, v. 177, n. 6, p. 1605-1611, 1993.

ENGQVIST-GOLDSTEIN, A. E.; DRUBIN, D. G. Actin assembly and endocytosis: from yeast to mammals. **Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.**, v. 19, p. 287-332, 2003.

ERNST, J. F.; TIELKER, D. Responses to hypoxia in fungal pathogens. **Cell. Microbiol.**, v. 11, n.2, p.183–190, 2009.

FAVA-NETTO, C. Estudos quantitativos sobre a fixação de complemento na blastomicose sul-americana, com antígeno polissacarídico. **Arq. Cir. Clin. Exp. S. P.**, v. 18, p. 197-254, 1955.

FERNANDEZ-ARENAS, E.; BLECK, C. K. E.; NONBELA, C.; GIL, C.; GRIFFITHS, G.; DIEZ-OREJAS, R. *Candida albicans* actively modulates intracellular membrane trafficking in mouse macrophage phagosome. **Cell. Microbiol.**, v. 11, n. 4, p. 560 – 589, 2009.

FERNANDES DA SILVA, M. **Paracoccidioidomicose experimental: ativação de**

macrófagos CD11b+ e CD23+ na reação inflamatória ao *Paracoccidioides brasiliensis*. Tese. (Doutorado) Universidade de São Paulo – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 1998.

FERREIRA, K. S.; ALMEIDA, S. R. Immunization of susceptible mice with go43-pulsed dendritic cells induces an increase of pulmonary paracoccidioidomycosis. **Immunol. Lett.**, v. 103, p. 121 – 126, 2006.

FERREIRA, K. S.; BASTOS, K. R.; RUSSO, M.; ALMEIDA, S. R. Interaction between *Paracoccidioides brasiliensis* and Pulmonary Dendritic Cells Induces Interleukin-10 Production and Toll-Like Receptor–2 Expression: Possible Mechanisms of Susceptibility. **Infect Dis.**, v. 196, n. 7, p.1108-1115, 2007.

FINLAY, B. B.; FALKOW, S. Common themes in microbial pathogenicity revisited. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 61, n. 2, p. 136 - 169, 1997.

FORTES, M. R.; MIOT, H. A.; KUROKAWA, C. S.; MARQUES, M. E.; MARQUES, S. A. Immunology of paracoccidioidomycosis. **An. Bras. Dermatol.**, v. 86, n. 3, p. 516-524, 2011.

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

FRATTI, R.A.; BACKER, J.M.; GRUENBERG, J.; CORVERA, S.; DERETIC, V. Role of phosphatidylinositol 3-kinase and Rab5 effectors in phagosomal biogenesis and mycobacterial phagosome maturation arrest. **J. Cell. Biol.**, v. 154, p. 631–644, 2001.

GITAN, R. S.; LUO, H.; RODGERS, R.; BRODERIUS, M.; EIDE, D. Zinc-induce Inactivation of the Yeast ZRT1 Zinc Transporter Occurs through Endocytosis and Vacuolar Degradation. **J. Biolog. Chem.**, v. 273, n. 44, p. 28617–28624, 1998.

GOMES, M. S.; DOM, G.; PEDROSA, J.; BOELAERT, J. R.; APPELBERG, R. Effects of iron deprivation on *Mycobacterium avium* growth. **Tub. Lung Dis.**, v.79, n.5, p.321–328, 1999.

GONZALEZ, A.; ARISTIZÁBAL, B. H.; GÓMEZ, E. C.; RESTREPO, A.; CANO, L. E. Short report: Inhibition by tumor necrosis factor-alpha-activated macrophages of the transition of *Paracoccidioides brasiliensis* conidia to yeast cells through a mechanism independent of nitric oxide. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 71, n. 6, p. 828-830, 2004.

GONZÁLEZ, A.; CARO, E.; MUÑOZ, C.; RESTREPO, A., HAMILTON, A. J.; CANO, L. E. *Paracoccidioides brasiliensis* conidia recognize fibronectin and fibrinogen which subsequently participate in adherence to human type II alveolar cells: involvement of a specific adhesin. **Microb. Pathog.**, v. 44, n. 5, p. 389-401, 2008.

GONZALEZ, A.; GREGORI, W.; VELEZ, D.; RESTREPO, A.; CANO, L. E. Nitric oxide participation in the fungicidal mechanism of gamma interferon-activated murine macrophages against *Paracoccidioides brasiliensis* conidia. **Infect Immun.**, v. 68, n. 5, p. 2546-2552, 2000.

GONZÁLEZ, A.; GÓMEZ, B. L.; DIEZ, S.; HERNÁNDEZ, O.; RESTREPO, A.; HAMILTON, A. J.; CANO, L. E. Purification and partial characterization of a *Paracoccidioides brasiliensis* protein with capacity to bind to extracellular matrix proteins. **Infect. Immun.**, v. 73, n. 4, p. 2486-2495, 2005.

GONZALEZ, A.; RESTREPO, A.; CANO, L. E. Role of iron in the nitric oxide-mediated fungicidal mechanism of IFN-gamma-activated murine macrophages against *Paracoccidioides brasiliensis* conidia. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**, v. 49, n. 1, p.11-16, 2007.

GONZALEZ, A.; SAHAZA, J. H.; ORTIZ, B. L.; RESTREPO, A.; CANO, L. E. Production of pro-inflammatory cytokines during the early stages of experimental *Paracoccidioides brasiliensis* infection. **Med. Mycol.**, v. 41, n. 5, p. 391-399, 2003.

GORVEL, J. P.; CHAVRIER, P.; ZERIAL, M.; GRUENBERG, J. Rab5 controls early endosome fusion *in vitro*. **Cell**, v. 64, p. 915–925, 1991.

GOTTE, M.; LAZAR, T. The ins and outs of yeast vacuole trafficking. **Protoplasma**, v. 209, p. 9–18, 1999.

GOTTE, M., LAZAR, T., YOO, J.S., SCHEGLMANN, D.; GALLWITZ, D. The full complement of yeast Ypt/Rab-GTPases and their involvement in exo- and endocytic trafficking. **Subcell. Biochem.**, v. 34, p. 133–173, 2000.

GRAHL, N.; SHEPARDSON, K. M.; CHUNG, D.; CRAMER, R. A. Hypoxia and Fungal Pathogenesis: To Air or Not To Air? **Eukaryot. Cell**, v. 11, n. 5, p. 560–570, 2012.

GROSSHANS, B. L.; ORTIZ, D.; NOVICK, P. Rabs and their effectors: achieving specificity in membrane traffic. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 103, p. 1821–11827, 2006.

GRUENBERG, J. Lipids in endocytic membrane transport and sorting. **Curr. Opin. Cell. Biol.**, v. 15, p. 382–388, 2003.

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

HEESEMANN, J.; LAUFS, R. Double ImmunoFluorescence Microscopic Technique for Accurate Differentiation of Extracellularly and Intracellularly Located Bacteria in Cell Culture. **J. Clin. Microbiol.**, v. 22, p. 168–175, 1985.

HERNANDEZ, O.; ALMEIDA, A. J.; TAMAYO, D.; TORRES, I.; GARCIA, A. M.; Lopez, A.; RESTREPO, A.; McEWEN, J. G. The hydrolase PbHAD32 participates in the adherence of *Paracoccidioides brasiliensis* conidia to epithelial lung cells. **Med. Mycol.**, p. 1–5, 2011.

HOSTETLER, J. S.; BRUMMER, E.; COFFMAN, R. L.; STEVENS, D. A. Effect of anti-IL-4, interferon-gamma and an antifungal triazole (SCH 42427) in paracoccidioidomycosis: correlation of IgE levels with outcome. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 94, n. 1, p.11-16, 1993.

HOWES, M. T.; MAYOR, S.; PARTON, R. G. Molecules, mechanisms, and cellular roles of clathrin-independent endocytosis. **Curr. Opin. Cell. Biol.**, v. 22, n. 4, p. 519-527, 2010.

HUNTER, T. Protein kinases and phosphatases: the Yin and Yang of protein phosphorylation and signaling. **Cell**, v. 80, p. 225–236, 1995.

HYTTINEN, J. M.; NIITTYKOSKI, M.; SALMINEN, A.; KAARNIRANTA, K. Maturation of autophagosomes and endosomes: A key role for Rab7. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1833, n. 3, p. 503-510, 2013.

JAISENG, W.; FANG, Y.; MA, Y.; SUGIURA, R.; KUNO, T. Studies on the roles of clathrin-mediated membrane trafficking and zinc transporter Cis4 in the transport of GPI-anchored proteins in fission yeast. **PLoS One**, v. 7, n. 7, 2012.

JANEWAY, C. A. J. R. The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self. **Immunol. Today**, v. 13, p. 11 – 16, 1992.

JANEWAY, C. A. J. R.; MEDZHITOV, R. Innate immune recognition. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 20, p. 197 – 216, 2002.

JARVIS, W. D.; TURNER, A. J.; POVIRK, L. F.; TRAYLOR, R. S.; GRANT, S. Induction of apoptotic DNA fragmentation and cell death in HL-60 human promyelocytic leukemia cells by pharmacological inhibitors of protein kinase C. **Cancer Res.**, v. 54, p. 1707–1714, 1994.

JIMENEZ, M. D. O.; RESTREPO, A.; RADZIOCH, D.; CANO, L. E.; GARCIA, L. F. Importance of complement 3 and mannose receptors in phagocytosis of *Paracoccidioides brasiliensis* conidia by Nramp1 congenic macrophages lines.

FEMS Lett., v. 47, n. 1, p. 56-66, 2006.

JOHNSTON, S. A.; MAY, R. C. The human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans* escapes macrophages by a phagosome emptying mechanism that is inhibited by Arp2/3 complex-mediated actin polymerisation. **PLoS Pathog.**, v. 6, n. 8, 2010.

JOVIC, M.; SHARMA, M.; RAHAJENG, J.; CAPLAN, S. The early endosome: a busy sorting station for proteins at the crossroads. **Histol Histopathol.**, v. 25, n. 1, p. 99-112, 2010.

JOZIC, I.; SALIBA, S. C.; BARBIERI, M. A. Effect of EGF-receptor tyrosine kinase inhibitor on Rab5 function during endocytosis. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 525, n. 1, p.16-24, 2012.

KAKSONEN, M.; TORET, C. P.; DRUBIN, D. G. A modular design for the clathrin- and actin-mediated endocytosis machinery. **Cell**, v. 123, n. 2, p. 305-320, 2005.

KAKSONEN, M.; TORET, C. P.; DRUBIN, D. G. Harnessing actin dynamics for clathrin-mediated endocytosis. **Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.**, v. 7, n. 6, p. 404-414, 2006.

KAKSONEN, M. Taking apart the endocytic machinery. **J. Cell. Biol.**, v. 180, n. 6, p. 1059-1060, 2008.

KAPOSZTA, R.; MARODI, L.; HOLLINSHEAD, M.; GORDON, S.; Da SILVA, R. P. Rapid recruitment of late endosomes and lysosomes in mouse macrophages ingesting *Candida albicans*. **J. Cell. Sci.**, v. 112, p.3237–3248, 1999.

KASHIWAZAKI, J.; NAKAMURA, T.; IWAKI, T.; TAKEGAWA, K.; SHIMODA, C. A role for fission yeast Rab GTPase Ypt7p in sporulation. **Cell. Struct. Funct.**, v. 30, n. 2, p. 43-49, 2005.

KERR, I. B.; ARARIPE, J. R.; OLIVEIRA, P. C.; LENZI, H. L. Paracoccidioidomycosis: a sequential histopathologic study of lesions in experimentally-infected rats. **Rev. Inst. Med. Trop.**, v. 30, n. 5, p. 336 – 350, 1988.

KITT, K. N.; HERNÁNDEZ-DEVIEZ, D.; BALLANTYNE, S. D.; SPILIOTIS, E. T.; CASANOVA, J. E.; WILSON, J. M. Rab14 regulates apical targeting in polarized epithelial cells. **Traffic**, v. 9, n. 7, p.1218-31, 2008.

KOLENDA, J.; JENSEN, S. S.; AABERG-JESSEN, C.; CHRISTENSEN, K.; ANDERSEN, C.; BRÜNNER, N.; KRISTENSEN, B. W. Effects of hypoxia on expression of a panel of stem cell and chemoresistance markers in glioblastoma-derived spheroids. **J. Neurooncol.**, v. 103, n. 1, p. 43-58, 2011.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LAW, D. C.; CHAWLA, A.; MERITHEW, E.; DUMAS, J.; CARRINGTON, W.; FOGARTY, K.; LIFSHITZ, L.; TUFT, R.; LAMBRIGHT, D.; CORVERA, S. Sequential roles for phosphatidylinositol 3-phosphate and Rab5 in tethering and fusion of early endosomes via their interaction with EEA1. **J. Biol. Chem.**, v. 277, p. 8611–8617, 2002.

LAZAR, T., GOTTE, M.; GALLWITZ, D. Vesicular transport: How many Ypt/Rab-GTPases make a eukaryotic cell? **Trends Biochem. Sci.**, v. 22, p. 458 – 472, 1997.

LECLERC, M.C.; PHILIPPEM, H.; GUÉHO, E. Phylogeny of dermatophytes and dimorphic fungi based on large subunit ribosomal RNA sequence comparisons. **J. Med. Vet. Mycol.**, 32, p. 331 – 341, 1994.

LEE, M. T.; SZETO, C. Y. Y.; NG, T. P.; KWAN, H. S. Endocytosis in the Shiitake Mushroom *Lentinula edodes* and Involvement of GTPase LeRAB7. **Eukaryot. Cell.**, v. 6, p. 2406–2418, 2007.

LEMMON, S. K.; JONES, E. W. Clathrin requirement for normal growth of yeast. **Science**, v. 238, n. 4826, p. 504-509, 1987.

LENZI, H.L.; CALICH, V.L.G.; MENDES-GIANNINI, M.J.S.; XIDIEH, C.F.; MIYAJI, M.; MOTA, E.M.; MACHADO, M.P.; RESTREPO, A. Two patterns of extracellular matrix expression in experimental paracoccidioidomycosis. **Med. Mycol.**, v. 38, p. 115-119, 2000.

LENZI, H.L.; LENZI, J.A.; KERR, I.B.; ANTUNES, S.L.; MOTA, E.M.; OLIVEIRA, D.N. Extracellular matrix in parasitic and infectious diseases. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.86, p. 77 - 90, 1991.

LEWIS, J. S.; LEE, J. A.; UNDERWOOD, J. C. E.; HARRIS, A. L.; LEWIS, C. E. Macrophage responses to hypoxia: relevance to disease mechanisms. **J. Leuk. Biol.**, v. 66, 1999.

LIMONGI, C.L.; De SOUZA, W.; ROZENTAL, S. Protein kinase antagonists inhibit invasion of mammalian cells by *Fonsecaea pedrosoi*. **J. Med. Microbiol.**, v. 52, p. 1–9, 2003.

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. 402-8, 2001.

LOPES, J.D., Dos REIS, M.D., BRETANI, R.R. Presence of laminin receptors in in *Staphylococcus aureus*. **Science**, v. 229, p. 275-277, 1985.

LÓPEZ-SOTO, F.; LEÓN-SICAIROS, N.; REYES-LÓPEZ, M.; SERRANO-LUNA, J.; ORDAZ-PICHARDO, C.; PIÑA-VÁZQUEZ, C.; ORTIZ-ESTRADA, G.; DE LA GARZA, M. Use and endocytosis of iron-containing proteins by *Entamoeba histolytica* trophozoites. **Infect. Genet. Evol.**, v. 9, n. 6, p.1038-1050, 2009.

LOURES, F. V.; PINA, A.; FELONATO, M.; ARAUJO, E. F.; CALICH, V. L. G. TLR4 signaling leads to a more severe fungal infection associated with enhanced proinflammatory immunity and impaired expansion of regulatory T cells. **Infect. Immun.**, v.78, p.1078–1088, 2010.

LOURES, F. V.; PINA, A.; FELONATO, M.; CALICH, V. L. G. TLR2 is a negative regulator of Th17 cells and tissue pathology in a pulmonary model of fungal infection. **J. Immunol.**, v. 183, p.1279–1290, 2009.

LOURES, F. V.; STROEDER, H.; ALMEIDA, I.; CALICH, V. L. *Paracoccidioides brasiliensis* lipids modulate macrophage activity via Toll-dependent or independent mechanisms. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v.66, n.1, p. 58-70, 2012.

LOWRY, D. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FAN, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, v. 193, p. 265-275, 1951.

LUND, V. K.; DELOTTO, R. Regulation of Toll and Toll-like receptor signaling by the endocytic pathway. **Small GTPases**, v. 2, n. 2, p. 95-98, 2011.

MARQUES-DA-SILVA, S. H.; RODRIGUES, A. M.; DE HOOG, G. S.; SILVEIRA-GOMES, F.; CAMARGO, Z. P. Occurrence of *Paracoccidioides lutzii* in the Amazon region: description of two cases. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 87, n. 4, p. 710-714, 2012.

MARSH, M.; SCHMID, S.; KERN, H.; HARMS, E.; MALE, P.; MELLMAN, I.; HELENIUS, A. Rapid analytical and preparative isolation of functional endosomes by free flow electrophoresis. **J. Cell. Biol.**, v. 104, p. 875-886, 1987.

MARSH, M.; HELENIUS, A. Virus entry: opensesame. **Cell**, v. 124, p. 729–740, 2006.

MATTOS GROSSO, D.; ALMEIDA, S. R.; MARIANO, M.; LOPES, J. D. Characterization of gp70 and anti-gp70 monoclonal antibodies in *Paracoccidioides brasiliensis* pathogenesis. **Infect. Immun.**, v. 71, n. 11, p. 6534-6542, 2003.

MATUTE, D. R.; McEWEN, J. G.; PUCCIA, R.; MONTES, B. A.; SAN-BLÁS, G.; BAGAGLI, E.; RAUSCHER, J. T.; RESTREPO, A.; MORAIS, F.; NINÑO-VEGA, G.; TAYLOR, J. W. Cryptic speciation and recombination in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* as revealed by gene genealogies. **Mol. Biol. Evol.**, v. 23, n. 1, p. 65-73, 2006a.

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, 2006b.

MAYLE, K. M.; LE, A. M.; KAMEI, D. T. The intracellular trafficking pathway of transferrin. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1820, p. 264–281, 2012.

MAYOR, S.; PAGANO, R. E. Pathways of clathrin-independent endocytosis. **Mol. Cell. Biol.**, v. 8, p. 603–612, 2007.

McBRIDE, H. M.; RYBIN, V.; MURPHY, C.; GINER, A.; TEASDALE, R.; ZERIAL, M. Oligomeric complexes link Rab5 effectors with NSF and drive membrane fusion via interactions between EEA1 and syntaxin-13. **Cell**, v. 98, p. 377–386, 1999.

McEWEN, J. G.; BEDOYA, V.; PATIÑO, M. M.; SALAZAR, M. E.; RESTREPO, A. Experimental paracoccidioidomycosis induced by the inhalation of conidia. **J. Med. Vet. Mycol.**, v. 25, p. 165 – 175, 1987.

McVEIGH, I.; MORTON, K. Nutricional studies of *H. capsulatum*. **Mycopathol.**, v. 25, p. 294-308, 1965.

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, M. J. S.; RICCI, L. C.; UEMURA, M. A.; TOSCANO, E.; ARNS, C. W. Infection and apparent invasion of Vero cells by *Paracoccidioides brasiliensis*. **J. Med. Vet. Mycol.**, v. 32, p. 189-197, 1994.

MENDES-GIANNINI, M. J. S.; ANDREOTTI, P. F.; 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. 8, n. 6, p. 1550-1559, 2006.

MENDES-GIANNINI, M. J. S.; HANNA, S. A.; MONTEIRO DA SILVA, J. L.; ANDREOTTI, P. F.; 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, p. 882-891, 2004.

MENDES-GIANNINI, M. J. S.; TAYLOR, M. L.; BOUCHARA, J. B.; BURGER, E.; CALICH, V. L. G.; 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, G.; TRONCHIN, G.; VICENZI, L. R.; XIDIEH, C. F.; ZENTENO, E. Pathogenesis II: fungal responses to host responses: interaction of host cells with fungi. **Med. Mycol.**, v. 38, p. 113-123, 2000.

MILLS, I. G.; JONES, A. T.; CLAGUE, M. J. Involvement of the endosomal autoantigen EEA1 in homotypic fusion of early endosomes. **Curr. Biol**, v. 8, p. 881-884, 1998.

MILLS, I. G.; JONES, A. T.; CLAGUE, M. J. Regulation of endosome fusion. **Mol. Membr. Biol**, v. 16, p. 73-79, 1999.

MILLS, I. G.; URBE, S.; CLAGUE, M. J. Relationships between EEA1 binding partners and their role in endosome fusion. **J. Cell. Sci.**, v. 114, p. 1959–1965, 2001.

MONTEIRO DA SILVA, J. L. **Adesão e invasão de *Paracoccidioides brasiliensis* em cultura de células: envolvimento do citoesqueleto, evento de sinalização e ocorrência de apoptose.** Tese. (Doutorado) Universidade Estadual Paulista – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, 2004.

MONTEIRO DA SILVA JL, ANDREOTTI PF, BENARD G, SOARES CP, MIRANDA ET, MENDES-GIANNINI MJ. Epithelial cells treated with genistein inhibit adhesion and endocytosis of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 92, n. 1, p.129-135, 2007.

MORENO-RUIZ, E.; GALÁN-DÍEZ, M. ZHU, W.; FERNÁNDEZ-RUIZ, E.; D'ENFERT, C.; FILLER, S. G.; COSSART, P.; VEIGA, E. *Candida albicans* internalization by host cells is mediated by a clathrin-dependent mechanism. **Cell. Microbiol.**, v. 11, n. 8, p. 1179–1189, 2009.

MOSCARDI-BACCHI, M.; BRUMMER, E.; STEVENS, D. A. Support of *Paracoccidioides brasiliensis* multiplication by human monocytes or macrophages: inhibition by activated phagocytes. **J. Med. Microbiol.**, v. 40, n. 3, p. 159-164, 1994.

MUELLER, S. C.; BRANTON, D. Identification of coated vesicles in *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Cell Biol.**, v. 98, p. 341 – 346, 1984.

MULHERN, S. M.; LOGUE, M. E.; BUTLER, G. The *Candida albicans* transcription factor Ace2 regulates metabolism and is required for filamentation in hypoxic conditions. **Eukaryot. Cell**, v. 5, p. 2001–2013, 2006.

MURRAY, J. T.; PANARETOU, C.; STENMARK, H.; MIACZYNSKA, M.; BACKER, J. M. Role of Rab5 in the recruitment of hVps34/p150 to the early endosome. **Traffic**, v. 3, p. 416–427, 2002.

NEGRONI, R. Paracoccidioidomycosis (South American blastomycosis, Lutz's Mycosis). **Int. J. Dermatol.**, v. 32, p. 847-885, 1993.

NEWMAN, S. L.; GOOTEE, L.; MORRIS, R.; BULLOCK, W. E. Digestion of *Histoplasma capsulatum* yeasts by human macrophages. **J. Immunol.**, v. 149, n. 2, p. 574-580, 1992.

NIELSEN, E.; SEVERIN, F.; BACKER, J. M.; HYMAN, A. A.; ZERIAL, M. Rab5 regulates motility of early endosomes on microtubules. **Nat. Cell. Biol.**, v. 1, p. 376–382, 1999.

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

NISHIKAKU, A. S.; MOLINA, R. F.; RIBEIRO, L. C.; SCAVONE, R.; ALBE, B. P.; CUNHA, C. S.; BURGER, E. Nitric oxide participation in granulomatous response induced by *Paracoccidioides brasiliensis* infection in mice. **Med. Microbiol. Immunol.**, v. 198, n. 2, p.123-135, 2009.

NOGUEIRA, N.; COHN, Z. *Trypanosoma cruzi*: mechanism of entry and intracellular fate in mammalian cells. **J. Exp. Med.**, v. 143, p. 1402-1420, 1976.

OHSUMI, K.; ARIOKA, M.; NAKAJIMA, H.; KITAMOTO, K. Cloning and characterization of a gene (*avaA*) from *Aspergillus nidulans* encoding a small GTPase involved in vacuolar biogenesis. **Gene**, v. 291, n. 1-2, p. 77-84, 2002.

OWEN, D. M.; MAGENAU, A.; WILLIAMSON, D.; GAUS, K. The lipid raft hypothesis revisited new insights on raft composition and function from super-resolution fluorescence microscopy. **Bioessays**, v. 34, n. 9, p. 739-747, 2012.

PAL, A.; SEVERIN, F.; LOMMER, B.; SHEVCHENKO, A.; ZERIAL, M. Huntingtin-HAP40 complex is a novel Rab5 effector that regulates early endosome motility

and is up-regulated in Huntington's disease. **J. Cell. Biol.**, v. 172, p. 605–618, 2006.

PARENTE, A. F.; BAILÃO, A. M.; BORGES, C. L.; PARENTE, J. A.; MAGALHÃES, A. D.; RICART, C. A.; SOARES, C. M. Proteomic analysis reveals that iron availability alters the metabolic status of the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **PLoS One**, v. 6, n. 7, p. e22810, 2011.

PATTI, J.M.; ALLEN, B.L.; McGAVIN, M.J.; HOOK, M. MSCRAMM-mediated adherence of microorganisms to host tissues. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 48, p. 585-617, 1994.

PEREIRA, L. A.; BAIO, S. N.; BARBOSA, M. S.; DA SILVA, J. L.; FELIPE, M. S.; DE SANTANA, J. M.; MENDES-GIANNINI, M. J.; DE ALMEIDA SOARES, C. M. Analysis of the *Paracoccidioides brasiliensis* triosephosphate isomerase suggests the potential for adhesin function. **FEMS Yeast Res.**, v. 7, n. 8, p. 1381 – 1388, 2007.

PETERMANN, N.; HANSEN, G.; SCHMIDT, C. L.; HILGENFELD, R. Structure of the GTPase and GDI domains of FeoB, the ferrous iron transporter of *Legionella pneumophila*. **FEBS Lett.**, v. 584, n. 4, p. 733-738, 2010.

PETRIS, M. J.; SMITH, K.; LEE, J.; THIELE, D. J. Copper-stimulated endocytosis and degradation of the human copper transporter, hCtr1. **J Biol Chem.**, v. 278, n. 11, p. 9639-9646, 2003.

PIZARRO-CERDA, J.; SOUSA, S.; COSSART, P. Exploitation of host cell cytoskeleton and signalling during *Listeria monocytogenes* entry into mammalian cells. **C R Biol.**, v. 327, p. 115–123, 2004.

POPI, A. F.; LOPES, J. D.; MARIANO, M. GP43 from *Paracoccidioides brasiliensis* inhibits macrophage functions. An evasion mechanism of the fungus. **Cell. Immunol.**, v. 218, p. 87-94, 2002.

PRADO, M.; DA SILVA, M. B.; LAURENTI, R.; TRAVASSOS, L. R.; TABORDA, C. P. Mortality due to systemic mycoses as a primary cause of death or in association with AIDS in Brazil: a review from 1996 to 2006. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 3, p. 513-521, 2009.

PROSSER, D. C.; DRIVAS, T. G.; MALDONADO-BÁEZ, L.; WENDLAND, B. Existence of a novel clathrin-independent endocytic pathway in yeast that depends on Rho1 and formin. **J. Cell. Biol.**, v. 195, n. 4, p. 657-671, 2011.

RADULOVIC, S.; PRICE, P. W.; BEIER, M. S.; GAYWEE, J.; MACALUSO, J. A.; AZAD, A. *Rickettsia*-Macrophage Interactions: Host Cell Responses to *Rickettsia akari* and *Rickettsia typhi*. **Infect. Immun.**, v. 70, n. 5, p. 2576–2582, 2002.

RAIBORG, C.; BREMNES, B.; MEHLUM, A.; GILLOOLY, D. J.; D'ARRIGO, A.; STANG, E.; STENMARK, H. FYVE and coiledcoil domains determine the specific localisation of Hrs to early endosomes. **J. Cell. Sci.**, v. 114, p. 2255–2263, 2001.

RATLEDGE, C; DOVER, L.G. Iron metabolism in pathogenic bacteria. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 54, p. 881-941, 2000.

RECALCATI, S.; LOCATI, M.; CAIRO, G. Systemic and cellular consequences of macrophage control of iron metabolism. **Semin. Immunol.**, 2013

RESTREPO, A.; JIMÉNEZ, B. E. Growth of *Paracoccidioides brasiliensis* Yeast Phase in a Chemically Defined Culture Medium. **J. Clin. Microbiol.**, p. 279-281, 1980.

RESTREPO, A. The ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*: a puzzle still unsolved. **Sabouraudia**, v. 23, n. 5, p. 323-334, 1985.

RIDDELLE-SPENCER, K. S.; O'HALLORAN, T. J. Purification of clathrin heavy and light chain from *Dictyostelium discoideum*. **Protein Expr Purif.**, v. 11, n.3, p.250-256, 1997.

ROBERTSON, A. S.; SMYTHE, E.; AYSCOUGH, K. R. Functions of actin in endocytosis. **Cell. Mol. Life Sci.**, v. 66, n. 13, p. 2049-2065, 2009.

ROMANI, L. Immunity to fungal infections. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 4, p. 1 – 13, 2004.

ROSA, A. L.; MACCIONI, H. J. Clathrin coated vesicles in *Neurospora crassa*. **Mol Cell. Biochem.**, v. 77, n. 1, p. 63-70, 1987.

SAN-BLAS, G.; NINÓ-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.

SAN-BLAS, G.; PRIETO, A.; BERNABÉ, M.; AHRAZEM, O.; MORENO, B.; LEAL, J.A. α -gal 1? 6-a-mannopyranoside side chains in *Paracoccidioides brasiliensis* cell wall are shared by members of the onygenales, but not by galactomannans of other fungal genera. **Med. Mycol.**, v. 43, p. 153–159, 2005.

SANTO, A. H. Paracoccidioidomycosis-related mortality trend, state of São Paulo, Brazil: a study using multiple causes of death
Tendência da mortalidade relacionada à paracoccidioidomicose, Estado de São Paulo, Brasil, 1985 a 2005: estudo usando causas múltiplas de morte. **Rev. Pan. Salud Publica**, v. 23, n. 5, p. 313–324, 2008.

SCHAIBLE, U. E.; KAUFMANN, S. H. Iron and microbial infection. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 2, p. 946–953, 2004.

SCHEKMAN, R.; PAYNE, G. Clathrin: a matter of life or death? **Science**, v. 239, n. 4842, p. 919, 1988.

SCHENKMAN, S.; ROBBINS, E. S.; NUSSENZWEIG, V. Attachment of *Trypanosoma cruzi* to mammalian cells requires parasite energy, and invasion can be independent of the target cell cytoskeleton. **Infect. Immun.**, v. 59, p. 645-654, 1991.

SCHIMMÖLLER, F.; RIEZMAN, H. Involvement of Ypt7p, a small GTPase, in traffic from late endosome to the vacuole in yeast. **J. Cell. Science**, v. 106, p.823-830, 1993.

SCHULZ, W. L.; HAJ, A. K.; SCHIFF, L. A. Reovirus uses multiple endocytic pathways for cell entry. **J. Virol.**, v. 86, n. 23, p.12665-12675, 2012.

SCHWAKE, M.; SCHRÖDER, B.; SAFTIG, P. Lysosomal Membrane Proteins and their central role in physiology. **Traffic**, 2013

SHEPARDSON, K. M.; NGO, L. Y.; AIMANIANDA, V.; LATGE, J. P.; BARKER, B. M.; BLOSSER, S. J.; IWAKURA, Y.; HOHL, T. M.; CRAMER, R. A. Hypoxia enhances innate immune activation to *Aspergillus fumigatus* through cell wall modulation. **Microb. Infect.**, v. 12, 2012.

SILVA, S.; HENRIQUES, M.; HAYES, A.; OLIVEIRA, R.; AZEREDO, J.; WILLIAMS, D. W. *Candida glabrata* and *Candida albicans* co-infection of an in vitro oral epithelium. **Oral Pathol. Med.**, v. 40, p. 421-427, 2010.

SILVA, M. G.; SCHRANK, A.; BAILÃO, E. F. L. C.; BAILÃO, A. M.; BORGES, C. L.; STAATS, C. C.; PARENTE, J. A.; PEREIRA, M.; SALEM-IZACC1, S. M.; MENDES-GIANNINI, M. J. S.; ROSELY MARIA ZANCOPE-OLIVEIRA, R. M.; ROSA E SILVA, L. K.; NOSANCHUK, J. D.; VAINSTEIN, M. H.; SOARES, C. M. A. The homeostasis of iron, copper, and zinc in *Paracoccidioides brasiliensis*, *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*, and *Cryptococcus gattii*: a comparative analysis. **Frontiers Microb.**, v. 2, 2011.

SILVA, S.S.; TAVARES, A. H. F. P.; PASSOS-SILVA, D.G.; FACHIN, A. L.; TEIXEIRA, S. M. R.; SOARES, C. M. S.; CARVALHO, M. J. A.; BOCCA, A. L.; SILVA-PEREIRA, I.; PASSOS, G.; FELIPE, M. S. S. Transcriptional response of murine macrophages upon infection with opsonized *Paracoccidioides brasiliensis* yeast cells. **Microb. Infect.**, v. 10, p. 12-20, 2008.

SIMONSEN, A.; GAULLIER, J. M.; D'ARRIGO, A.; STENMARK, H. The Rab5 effector EEA1 interacts directly with syntaxin-6. **J. Biol. Chem.**, v. 274, p. 28857–28960, 1999.

SMANI, Y.; DOCOBO-PÉREZ, F.; LÓPEZ-ROJAS, R.; DOMÍNGUEZ-HERRERA, J.; IBÁÑEZ-MARTÍNEZ, J.; PACHÓN, J. Platelet-activating factor receptor initiates contact of *Acinetobacter baumannii* expressing phosphorylcholine with host cells. **J. Biol. Chem.**, v. 287, n. 32, p.26901-26910, 2012.

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.

SOKOLOVSKY, V.; KALDENHOFF, R.; RICCI, M.; RUSSO, V. E. A. Fast and reliable mini-prep RNA extraction from *Neurospora crassa*. **Fungal genet. newslett.**, 1990.

SONNEBORN, A.; BOCKMÜHL, D. P.; ERNST, J. F. Chlamydospore formation in *Candida albicans* requires the Efg1p morphogenetic regulator. **Infect Immun.**, v. 67, p. 5514–5517, 1999.

SYNNOTT, J. M.; GUIDA, A.; MULHERN-HAUGHEY, S.; HIGGINS, D. G.; BUTLER, G. Regulation of the Hypoxic Response in *Candida albicans*. **Eukaryot. Cell.**, v. 9, n. 11, p. 1734-1746, 2010.

STUDIER, F. W. Analysis of bacteriophage T7 early RNAs and proteins on slab gels. **J. Mol. Biol.**, v. 79, p. 237-248, 1973.

SURMACZ, L.; WIEJAK, J.; WYROBA, E. Evolutionary conservancy of the endocytic and trafficking machinery in the unicellular eukaryote *Paramecium*. **Biol. Cell**, v. 95, p. 69–74, 2003.

TABORDA, C. S.; DA SILVA, M. B.; NOSANCHUK, J. D.; TRAVASSOS, L. R. Melanin as a virulence factor of *Paracoccidioides brasiliensis* and other dimorphic pathogenic fungi: a minireview. **Mycopathol.**, v. 165, n. 4-5, p. 331 – 339, 2008.

TAKEI, K; HAUCKE, V. Clathrin mediated endocytosis: membrane factors pull the trigger. **Trends**, v. 11, n. 9, p. 385-391, 2001.

TANAKA, T.; TANAKA, M.; MITSUI, Y. Analysis of expressed sequence tags (ESTs) of the parasitic protozoa, *Entamoeba histolytica*. **Biochem. Biophys. Res. Commun**, v. 236, p. 611-615, 1997.

TAVIAN, E. G.; DIAS-MELICIO, L. A.; ACORCI, M. J.; GRACIANI, A. P.; PERAÇOLI, M. T.; SOARES, A. M. Interleukin-15 increases *Paracoccidioides brasiliensis* killing by human neutrophils. **Cytokine.**, v. 41, n. 1, p. 48-53, 2008.

TAYLOR, M. J.; PERRAIS, D.; MERRIFIELD, C. J. A High Precision Survey of the Molecular Dynamics of Mammalian Clathrin-Mediated Endocytosis. **PLoS Biol.**, v. 9, n. 3, e1000604, 2011.

TEIXEIRA, G. A.; MACHADO FILHO, J.; MIRANDA, J. L. Experimental South American blastomycosis. [Experimental study in rats with considerations concerning the pathogenesis of the lesions]. **Hospital (Rio J)**, v. 68, n. 5, p. 1081-1096, 1965.

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

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.

TEIXEIRA, M. D.; THEODORO, R. C.; DERENGOWSKY, L. D.; NICOLA, A. M.; BAGAGLI, E.; FELIPE, M. S. Molecular and morphological data supports the existence of a sexual cycle in species of the genus *Paracoccidioides*. **Eukaryot. Cell.**, v. 12, n. 3, p. 380-389, 2013.

TEMESVARI, L. A.; HARRIS, E. N.; STANLEY, S. L. JR., CARDELLI, J. A. Early and late endosomal compartments of *Entamoeba histolytica* are enriched in cysteine proteases, acid phosphatase and several Ras-related Rab GTPases. **Mol Biochem. Parasitol.**, v. 103, n. 2, p. 225-241, 1999.

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

TOWBIN, H.; STACHELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets. Procedure and some applications. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 76, p. 4350-4352, 1979.

TRAVASSOS, L. R.; RODRIGUES, E. G.; IWAI, L. K.; TABORDA, C. P. Attempts at a peptide vaccine against paracoccidioidomycosis, adjuvant to chemotherapy. **Mycopathol.**, v.165, n. 4 – 5, p.341-352, 2008.

VEIGA, E.; COSSART, P. The role of clathrin-dependent endocytosis in bacterial internalization. **Trends Cell. Biol.**, v.16, n.10, p. 499 - 504, 2006.

VEIGA, E., GUTTMAN, J.A., BONAZZI, M., BOUCROT, E., TOLEDO-ARANA, A., LIN, A.E., *et al.* Invasive and adherent bacterial pathogens co-Opt host clathrin for infection. **Cell. Host. Microbe.**, v. 2, p. 340–351, 2007.

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. **Avaliação de moléculas de adesão e da via endocítica na interação *Paracoccidioides brasiliensis*-células do hospedeiro.** Dissertação. (Mestrado) Universidade Estadual Paulista – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, 2008.

WANG, Y.; CHEN, T.; HAN, C.; HE, D.; LIU, H.; AN, H.; CAI, Z.; CAO, X. Lysosome-associated small Rab GTPase Rab7b negatively regulates TLR4 signaling in macrophages by promoting lysosomal degradation of TLR4. **Blood**, v. 110, n. 3, p. 962-971, 2007.

WANG, Y.; ROCHE, O.; YAN, M. S.; FINAK, G.; EVANS, A. J.; METCALF, J. L.; HAST, B. E.; HANNA, S. C.; WONDERGEM, B.; FURGE, K. A.; IRWIN, M. S.; KIM, W. Y.; TEH, B. T.; GRINSTEIN, S.; PARK, M.; MARSDEN, P. A.; OHH, M. Regulation of endocytosis via the oxygen-sensing pathway. **Nat. Med.**, v. 15, n. 3, p. 319-24, 2009.

WANG, Y.; YANG, Y.; LIU, X.; WANG, N.; CAO, H.; LU, Y.; ZHOU, H.; ZHENG, J. Inhibition of clathrin/dynamin-dependent internalization interferes with LPS-mediated TRAM-TRIF-dependent signaling pathway. **Cell. Immunol.**, v. 274, n. 1-2, p. 121-129, 2012.

WANKE, B.; LONDERO, A. T. Epidemiology and paracoccidioidomycosis infection. In FRANCO, M.; LACAZ, C. S.; RESTREPO, A. (Eds.): **Paracoccidioidomycosis**. Boca Raton: CRC Press, 1994, p. 109–120.

WEINBERG, J.; DRUBIN, D. G. Clathrin-mediated endocytosis in budding yeast. **Trends Cell. Biol.**, v. 22, n. 1, p.1-13, 2012.

WEZENSKY, S. J.; CRAMER JR, R. A. Implications of Hypoxic Microenvironments During Invasive Aspergillosis. **Med. Mycol.**, v. 49, n. 1, p. 120–124, 2011.

WICHMANN, H., HENGST, L.; GALLWITZ, D. Endocytosis in yeast: Evidence for the involvement of a small GTP-binding protein (Ypt7p). **Cell.**, v. 71, p. 1131-1142, 1992.

WOZNIAK, K. L.; LEVITZ, S. M. *Cryptococcus neoformans* enters the endolysosomal pathway of dendritic cells and is killed by lysosomal components. **Infect. Immun.**, v. 76, n.10, p. 4764-4771, 2008.

XIDIEH, C. F.; LENZI, H. L.; CALICH, V. L.; BURGER, E. Influence of the genetic background on the pattern of lesions developed by resistant and susceptible mice infected with *Paracoccidioides brasiliensis*. **Med. Microbiol. Immunol.**, v. 188, n. 1, p. 41-49, 1999.

ZAAS, A. K.; SHWARTZ, D. A. Innate immunity and the lung: defense at the interface between host and environment. **Trends Cardiovasc. Med.**, v. 15, p. 195 – 202, 2005.

ZERIAL, M.; McBRIDE, H. Rab proteins as membrane organizers. **Nat. Rev. Molec. Cell. Biol.**, v. 2, p. 107-119, 2001.

ZHAO, H.; EIDE, D. J. Zap1p, a metalloregulatory protein involved in zinc responsive transcriptional regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol. Cell. Biol.**, v.17, n. 9, p. 5044–5052, 1997.

Capítulo 2

Early Endosome Antigen 1 (EEA1) decreases in macrophages infected with
Paracoccidioides brasiliensis

Aline Raquel Voltan¹, Janaina de Cassia Orlandi Sardi¹, Christiane Pienna Soares¹, Marcelo Machado Pelajo², Ana Marisa Fusco Almeida¹ and Maria José Soares Mendes Giannini¹

¹Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP – Univ Estadual Paulista, Araraquara, São Paulo, Brasil.

²Laboratório de Patologia Clínica, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil.

Correspondence to:

Dra. Maria José Soares Giannini, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, UNESP - Univ Estadual Paulista, Rua Expedicionários do Brasil, 1621, CEP: 14801-901, Araraquara, São Paulo, Brasil.

Tel: +55 – 16 – 3301 – 5715

Fax: +55 – 16 – 3301 – 5715

e-mail: gianninimj@gmail.com.br

alievoltan@fctar.unesp.br

Abstract

Paracoccidioidomycosis (PCM) is a chronic granulomatous disease caused by the dimorphic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*, endemic in Latin America. *P. brasiliensis* has been observed in epithelial cells *in vivo* and *in vitro*, as well as within the macrophages. The identification of the mechanism by which it survives within the host cell is fertile ground for the discovery of its pathogenesis since this organism has the ability to induce its own endocytosis in epithelial cells and most likely in macrophages. The study of the expression of endocytic proteins pathway and co-localization of microorganisms enable detection of the mechanism by which microorganisms survive within the host cell. The aim of this study was to evaluate the expression of the endocytic protein EEA1 (early endosome antigen 1) in macrophages infected with *P. brasiliensis*. For detection of EEA1, three different techniques were employed: immunofluorescence, Real-time PCR and immunoblotting. In the present study, decreased expression of EEA1 as well as the rearrangement of the actin was observed when the fungus was internalized, confirming that the input mechanism of the fungus in macrophages occurs through phagocytosis.

Keywords: *Paracoccidioides brasiliensis*, macrophages, early endosome and EEA1.

1. Introduction

P. brasiliensis is able to adhere to, invade and disrupt the barriers imposed by the host tissues [1, 2, 3]. *P. brasiliensis* is internalized by epithelial cells *in vivo* and *in vitro* [4, 5, 6], as well as by professional phagocytes, neutrophils, alveolar macrophages and dendritic cells [7, 8, 9].

Several pathogens present strategies for survive and replicate inside host cells. *Candida albicans* invades the oral epithelial cells, inducing its own endocytosis and gains access to epithelial vacuolar compartments [10]. *Cryptococcus neoformans* survives in phagolysosome acid [11], like the conidia of *Aspergillus fumigatus* [12], and others microorganisms.

Endocytosis is highly conserved across cell types and species. The Rab family of small GTP-binding proteins plays crucial roles in regulating these trafficking pathways. The best characterized compartment-specific proteins are the small GTP-binding Rab proteins where Rab5 is localized to early endosome and Rab7 to late endosome [13, 14]. EEA1 is a Rab5 effector that has a critical function as organelle-tethering molecule [15] and it is implicated in cargo selection, vesicle budding, vesicle motility, tethering, docking, fusion membranes, and functional organelle identity [16].

Monocytes and monocyte-derived macrophages support the intracellular replication of ingested *P. brasiliensis* [7], however no studies have been done about exactly how this fungus enters the cells, survives inside the endosome and in what way influences the endosomal pathway. The establishment of its productive infectious cycle depends on *Paracoccidioides* entry into macrophages and their subsequent intraphagosomal survival.

Phagosomal biogenesis is a fundamental biological process of particular significance for the function of phagocytic and antigen-presenting cells. The precise mechanisms governing maturation of phagosomes into phagolysosomes are not studied in paracoccidioidomycosis. Then, the present study was performed to evaluate changes in the expression of the Rab5 effector early endosome

autoantigen (EEA1) and its implication on infected macrophages with *P. brasiliensis*.

2. Materials and Methods

2.1 Microorganisms

Experiments were performed using the yeast form of *P. brasiliensis* (Pb), strain 18. It was grown in Fava-Netto's medium at 35°C, for 3 - 4 days.

2.2 Antisera and reagents

The cell-free antigen, a rich solution of cell-wall-associated antigens, was prepared as described elsewhere [17]. Protein concentration of the extract was quantified by the Bradford method (BioRad) and the samples were analyzed by SDS-PAGE. The polyclonal antibody raised against cell-free antigen of *P. brasiliensis* was prepared as described in Mendes-Giannini et al. [5]. Rabbits were inoculated by intradermal injections of 1.0 ml of antigen mixed with 1.0 ml of complete Freund's adjuvant. Subsequent injections of antigen with incomplete Freund's adjuvant were given weekly for a period of 4 weeks and then monthly for a period of 3 months. The rabbits were bled 7 days after the last dose. The immunoglobulin fractions of the antisera were separated by precipitation with ammonium sulfate and stored at -70°C.

The following antibodies were used in this study: Monoclonal Anti-EEA1 antibody produced in mouse (Sigma-Aldrich; cat. # E7659), anti-Mouse IgG (Fab specific)–Peroxidase antibody produced in goat (Sigma-Aldrich; cat. # A3682), Alexa Fluor 594 goat anti-rabbit IgG (Molecular Probes; cat. # A11032) and Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG (Molecular Probes; Cat. # A11029). Fluorescein isothiocyanate (FITC)-labeled phalloidin (cat. # P5282) and all other reagents were purchased from Sigma-Aldrich.

2.3 Macrophages culture

Macrophages alveolar murine line AMJ2-C11 (ATCC CRL-2456) were seeded overnight in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Sigma-Aldrich, Brazil), supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum (Cultilab, Brazil).

2.4 Infection assay

Macrophages were cultured at 36.5 °C in 24-well plates, with the well-bottoms covered with coverslips, and adjusted to 1.0×10^5 cells per well. Then, 1.0×10^5 yeasts/ ml⁻¹ were added to the cells, reaching a yeast/macrophage ratio of 1:1, and incubated for 6h at 36.5 °C, to observe phagocytosis process and analysis of the endocytic pathway. The assay was analyzed by conventional fluorescence and scanning confocal laser (LSM-510, Carl Zeiss, Jena, Göttingen) microscopy.

2.5 Indirect Immunofluorescence

To study the actin changes and endocytic pathway in infected macrophages with *P. brasiliensis* (Pb18), macrophages monolayers (1×10^5 cells per well) were cultured at 36.5°C in 24-well plates for 6 h. Macrophages were infected with Pb18 suspension (1×10^5 cells ml⁻¹) and after 6 h of infection, the monolayers were fixed and washed in PBS, and permeabilized in 0,5% Triton X-100 for 30 minutes. After, anti-*P. brasiliensis* cell-free antibody were added for 1 h, antibodies unbound were removed by washing in PBS, and then Alexa Fluor 594 goat anti-rabbit IgG were added for 1 h. Following this period, FITC-labeled phalloidin were added for 1 h, and then observed by confocal microscopy. For evaluation of the role of EEA1, after the fungal labeled, anti-EEA1 antibody was added for 1 h, antibodies unbound were removed by washing in PBS, and then Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG were added for 30 minutes. After which the cells were washed three

times with PBS, mounted in PBS-glycerin and analyzed scanning confocal laser (LSM 510 – META, Zeiss) microscopy.

2.6 RNA isolation, cDNA synthesis and Real-time PCR

A suspension of macrophages was adjusted to 1×10^6 ml⁻¹ and cultured at 36.5°C in bottles for 24 h. A suspension of 1×10^6 fungal cells ml⁻¹ was prepared in sterile PBS, added to the cells and incubated for 2, 6, 10 and 24 h at 36.5°C. After incubation, the cells were scraped, centrifuged and the pellet stored -70°C. Isolation of total RNA, from control Pb18 yeast (cultured in Fava-Netto medium) and from infected macrophages (lysed with glass beads), was performed with Trizol reagent (Gibco), following the manufacturer's instructions. First-strand cDNA synthesis was Superscript III reverse transcriptase (Invitrogen). Constitutive GAPDH (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) macrophage gene was used as an internal control (amplified by the primer pair forward - 5'TGCGACTTCAACAGCAACTC3' and reverse - 5'ATGTAGGCCATGAGGTCCAC3') of the expression value (fold-change) of gene of interest in the macrophage infected sample in comparison to the non-infected control. EEA1 gene (amplified by the primer pair forward - 5'CCAAGACCTACAGGCCTCAC3' and reverse - 5'GCTGACGAATCAGTCACCAA3') expression was assessed in infected macrophages compared to non-infected. Reactions were performed with 12,5 µl master mix and 2 µl reverse transcriptase mix from a QuantiTect SYBR Green RT-PCR kit (Qiagen), each primer was added to a concentration of 25 nM / µl. Reverse transcription was carried out at 50°C for 30 minutes, followed by denaturation of the enzyme at 95°C for 15 minutes. The PCR was performed

with 40 cycles of denaturation at 94°C for 30 s, annealing at 60°C for 30 s and extension at 72°C for 45 s, with a final cycle at 72°C for 10 minutes. Two independent RNA sample were prepared for use in experiments. The reactions were performed twice in triplicate, using an Applied Biosystems 7500 thermal cycler. The data were analysed using the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method [18].

2.7 Immunoblotting

A suspension was adjusted to 1×10^6 macrophages ml^{-1} and cultured at 36,5°C in bottles for 24 h. A suspension of 1×10^6 fungal cells ml^{-1} was prepared in sterile PBS, added to the cells and incubated for 2, 10 and 24 h at 36,5°C. After incubation, lysis buffer was added (100 mM Tris-HCl, pH 7,5, 0,1 M NaCl, 2 mM EDTA, 1% of 1 mM PMSF(phenylmethylsulfonyl fluoride) and centrifuged by 10 minutes/ 17500 x g/ 4°C. The dosage of proteins was performed by method Bradford [19], and after, the proteins were separated by SDS-PAGE [20], and transferred to a nitrocellulose membrane. Immunoblot analysis was carried out as previously described by Towbin et al. [21]. The blots were washed briefly and then incubated for 1 h at 4 °C with anti-EEA1 antibody and goat anti-mouse immunoglobulin–rabbit peroxidase conjugate diluted 1:500 in blocking solutions. The blots were washed and then developed with “Enhance chemiluminescence” (ECL™) (TrisHCl 1M pH 8,5/ luminol/ cumaric acid) and then was developed with film of ray-X.

3. Results

Uninfected macrophage showed intense staining of long cellular actin filaments (Fig 1A). Infected macrophage cells presented actin filaments condensed in the margins and projections in the contact areas with *P.brasiliensis*

yeast cells. The recruited actin was situated around the ***P. brasiliensis*** and appeared as aggregates of F-actin that were co-located with the fungus-cell interaction sites. Thereafter, ***P. brasiliensis*** appears internalized without detectable damage to the macrophage cell membranes. The surface of the internalized yeast cell was strongly recognized by actin-specific serum and the integrity of actin microfilaments was maintained in the host cells. Then, the process of phagocytosis of *P. brasiliensis* could be observed by the rearrangement of actin filaments, which forms on input of the fungus in macrophages (Fig. 1).

Early endosome antigen 1 (EEA1) is a peripheral membrane protein present in cytosol and membrane fractions. Immunofluorescence staining of EEA1 in macrophage cells yields punctuate staining pattern consistent with the cytoplasmic distribution of endosomes, but in a different way when compare infected-macrophages (Fig. 2 - B e C) in relationship uninfected-macrophages (Fig. 2 - A). A decrease EEA1 expression was observed in *P. brasiliensis* infected macrophages compared to uninfected ones. The reduce expression was proved by indirect immunofluorescence (Fig. 2 - A, B e C), Real-time PCR and immunoblotting (Fig 2 - D). Real-time PCR confirmed decrease expression of gene EEA1 in different time. Diminished expression was observed in all infection times, mainly with 24 h of infection, probably due to activation of the pathway signals.

4. Discussion

Paracoccidioidomycosis (PCM) is a mycosis very common in Latin America, and *P. brasiliensis* may have several factors that participate of its survival inside host cells. Macrophages provide a front-line defense at the site of infection and,

because of this many pathogens have evolved elaborate mechanisms to subvert macrophage behavior [22, 23, 24]. The aim of this work was verified the actin involvement after the internalization of *P. brasiliensis* by alveolar mouse macrophages. We observed actin filaments rearrangement, confirming the phagocytosis process as well as demonstrated previously in epithelial cells. In this sense, *P. brasiliensis* presented some factors allowed adhesion and invasion of epithelial cells, as A549 cells (type II pneumocytes) and Vero cells (African green monkey kidney), and in consequence rearrangements of the cytoskeleton [6].

The actin cytoskeleton is essential for the phagocytosis of pathogens, but is also commonly hijacked and subverted [25, 26]. Several human pathogens are capable of being expelled from host cells by controlling the actin cytoskeleton [26]. In contrast, expulsion of *Cryptococcus* appears independent of actin polymerization, since treatment of macrophages with the actin depolymerizing drug cytochalasin D enhances, rather than blocks, expulsion [27, 28].

The interaction of *Listeria monocytogenes* with the host actin cytoskeleton has been intensively studied [29]. The actin filaments can be repeatedly assembled and disassembled on phagosomes containing *Listeria monocytogenes* prior to their escape into the cytoplasm and that this assembly may be triggered by mechanical disruption of the membrane [30]. Recently, Liebl and Griffiths [31] described a related phenomenon on phagosomes containing latex beads, suggesting the mature actin prevented the phagosome, thereby blocking the lysosomal vesicle fusion with the phagosome [31]. These results are presented in accordance with data from *Dictyostelium* [32].

Johnston and May [33] showed that actin is repeatedly polymerized and depolymerized on phagosomes containing cryptococci in both macrophage-like

cell lines and human primary macrophages. This process appears to inhibit cryptococcal expulsion in response to phagosome permeabilisation, suggesting that it may have an important function in vivo in restricting cell-to-cell spread of the pathogen. Current understanding of the block in *M. tuberculosis* phagosome maturation also sheds light on fundamental aspects of phagolysosome biogenesis. The maturation block involves interference with the recruitment and function of rabs, rab effectors (phosphatidylinositol 3-kinases and tethering molecules such as EEA1), SNAREs (Syntaxin 6 and cellubrevin) and Ca²⁺/calmodulin signaling [34].

For the first time, we analyzed the *P. brasiliensis* endocytic pathway throughout the EEA1 protein expression. The expression and localization of EEA1 were presently performed through different methodologies, such as scanning laser confocal microscopy, Real time PCR, and Western blotting. This protein is present in early endosome, on the first hours of infection and *P. brasiliensis* promoted intense decrease of EEA1 after a few hours.

EEA1 is a protein responsible for vesicle budding, transporting, tethering, and docking events in the early endosomes, and consequently diminish the normal entry of nutrients and other endocytic ligands. Batista et al. [35] showed that in infected cardiomyocytes with *Trypanosoma cruzi* occurs decrease of the expression EEA1 protein as demonstrated in our work.

The EEA1 exclusion from phagosomes provides strong evidence suggesting that alterations in phagosome maturation caused by the fungus may originate upstream of the EEA1-mediated trafficking. The exclusion of EEA1 leads to a block in trafficking from the trans-Golgi network to phagosomes. The data presented here illustrate the necessity of found out the molecule can intersect with the Rab5/EEA1 pathway of phagosome maturation and with this particular point of

convergence between the signaling and membrane trafficking pathways in the host cell. The survival strategies used by *P. brasiliensis* as well as parasites as *Leishmania donovani* promastigotes during the establishment of infection in macrophages consists in inhibiting phagosome-endosome fusion and by losing the early endosome markers EEA1 [36]. The data presented here indicate a need to discover fungus protein, which can interact with Rab5/EEA1 because it is considered that the decrease of EEA1 can be a survival strategy used by *P. brasiliensis*, as well as parasites such as *Leishmania donovani* promastigotes during the establishment of infection in macrophages consists in melting the endosome and inhibits phagosome-to lose the early endosome marker EEA1 [36].

We presented evidence as showed in *C. albicans* [10] that *P. brasiliensis* is internalized through actin-dependent endocytosis. Both fungus-containing endosomes transiently acquired early endosomal marker EEA1. Defective endolysosomal maturation may partially explain the inability of oral epithelial cells to kill *C. albicans* as well as observed in *P. brasiliensis* [5]. Other fungi have similar behavior and after entry into host cells, *C. neoformans* also resides in early endosomal antigen 1 (EEA1)-positive compartments [37] and they can resist intracellular killing, and eventually escape from the macrophage [38, 33]. *Histoplasma capsulatum*, another facultative intracellular fungus, after phagocytosis, is able to inhibit phagolysosome fusion and actively modulate phagosomal pH to optimize its survival within phagosomes [39].

In conclusion, *P. brasiliensis* alters expression of proteins responsible for traffic endosomal, consequently impairing cellular nutrition, as well as traffic yeast *P. brasiliensis* for final destruction in the lysosome.

Acknowledgments

FAPESP, CNPq, CAPES and Plataforma de Microscopia Confocal (FIOCRUZ-RJ).

5. References

1. Lopes JD, dos Reis MD, Bretani R R. Presence of laminin receptors in in *Staphylococcus aureus*. *Science* 1985; **229**: 275-277.
2. Mendes-Giannini MJS, Ricci LC, Uemura MA, Toscano E, Arns CW. Infection and apparent invasion of Vero cells by *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Med Vet Mycol* 1994; **32**: 189-197.
3. Lenzi HL, Calich VLG, Mendes-Giannini MJS, et al. Two patterns of extracellular matrix expression in experimental paracoccidioidomycosis. *Med Mycol* 2000; **38**: 115-119.
4. De Brito T, Furtado JS, Castro RM, Manini M. Intraepithelial parasitism as an infection mechanism in human paracoccidioidomycosis. *Virch Arch Abt A Pat Anat* 1973; **36**:129-138.
5. Mendes-Giannini MJS, Taylor MI, Bouchara JB, et al. Pathogenesis II: fungal responses to host responses: interaction of host cells with fungi. *Med Mycol* 2000; **38**: 113-123.
6. Mendes-Giannini MJS, Hanna SA, Monteiro Da Silva JL, et al. Invasion of epithelial mammalian cells by *Paracoccidioides brasiliensis* leads to cytoskeletal rearrangement and apoptosis of the host cell. *Microbes Infect* 2004; **6**: 882-891.
7. Brummer E, Hanson IH, Restrepo A, Stevens DA. Intracellular multiplication of *Paracoccidioides brasiliensis* in macrophages. *Infect Immun* 1989; **57**: 2289-2294.

8. Ferreira KS, Lopes JD, Almeida SR. Down-regulation of dendritic cell activation induced by *Paracoccidioides brasiliensis*. *Immunol Lett* 2004; **94**: 107-114.
9. Soares DA, Andrade RV, Silva SS, et al. Extracellular *Paracoccidioides brasiliensis* phospholipase B involvement in alveolar macrophage interaction. *BMC Microbiology* 2010; **10**: 241.
10. Zhao XR, Villar CC. Trafficking of *Candida albicans* through oral epithelial endocytic compartments. *Med Mycol* 2011, *49*: 212-217.
11. Levitz SM, Nong SH, Seetoo KF, Harrison TS, Speizer RA, Simons ER. *Cryptococcus neoformans* resides in an acidic phagolysosome of human macrophages. *Infect Immun* 1999; **67**: 885-890.
12. Wasylnka JA, Moore MM. *Aspergillus fumigatus* conidia survive and germinate in acidic organelles of A549 epithelial cells. *J Cell Science* 2003; **116**: 1579-1587.
13. Chavrier P, Parton RG, Hauri HP, Simons K, Zerial M. Localization of low molecular weight GTP binding proteins to exocytic and endocytic compartments. *Cell* 1990; **62**: 317-329.
14. Gould B. Small GTP-binding proteins as compartmental markers. *Semin Cell Biol* 1992; **5**: 301-307.
15. Christoforidis S, McBride HM, Burgoyne RD, Zerial M. The Rab5 effector EEA1 is a core component of endosome docking. *Nature* 1999; **397**: 621-626.
16. Zerial M, McBride H. Rab proteins as membrane organizers. *Nat Rev Molec Cell Biol* 2001; **2**: 107-119.
17. Camargo ZP, Taborda CP, Rodrigues EG, Travassos LR. The use of cell-free antigens of *Paracoccidioides brasiliensis* in serological tests. *J Vet Med Mycol* 1991; **29**: 31-38.
18. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-

- time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001; **25**: 402-408.
19. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; **72**: 248-254.
20. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; **227**: 680-685.
21. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets. Procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci* 1979; **76**: 4350-4352.
22. Freitag NE, Port GC, Miner MD. *Listeria monocytogenes* – from saprophyte to intracellular pathogen. *Nat Rev Microbiol* 2009; **7**: 623–628.
23. Pieters J. *Mycobacterium tuberculosis* and the macrophage: maintaining a balance. *Cell Host Microbe* 2008; **3**: 399–407.
24. Prost LR, Sanowar S, Miller SI. *Salmonella* sensing of anti-microbial mechanisms to promote survival within macrophages. *Immunol Rev* 2007; **219**: 55–65.
25. Groves E, Dart AE, Covarelli V, Caron E. Molecular mechanisms of phagocytic uptake in mammalian cells. *Cell Mol Life Sci* 2008; **65**: 1957-76.
26. Stevens JM, Galyov EE, Stevens MP. Actin-dependent movement of bacterial pathogens. *Nat Rev Microbiol* 2006; **4**: 91-101.
27. Alvarez M, Casadevall A. Phagosome extrusion and host-cell survival after *Cryptococcus neoformans* phagocytosis by macrophages. *Curr Biol* 2006; **16**: 2161–2165.

28. Ma H, Croudace JE, Lammas DA, May RC. Expulsion of live pathogenic yeast by macrophages. *Curr Biol* 2006; **16**: 2156–2160.
29. Pizarro-Cerda J, Sousa S, Cossart P. Exploitation of host cell cytoskeleton and signalling during *Listeria monocytogenes* entry into mammalian cells. *C R Biol* 2004; **327**: 115–123.
30. Yam PT, Theriot JA. Repeated cycles of rapid actin assembly and disassembly on epithelial cell phagosomes. *Mol Biol Cell* 2004; **15**: 5647–5658.
31. Liebl D, Griffiths G. Transient assembly of F-actin by phagosomes delays phagosome fusion with lysosomes in cargo-overloaded macrophages. *J Cell Sci* 2009; **122**: 2935–2945.
32. Drengk A, Fritsch J, Schmauch C, Ruhling H, Maniak M. A coat of filamentous actin prevents clustering of late-endosomal vacuoles in vivo. *Curr Biol* 2003; **13**: 1814–1819.
33. Johnston SA, May RC. The human fungal Pathogen *Cryptococcus neoformans* escapes macrophages by a phagosome emptying mechanism that is inhibited by Arp2/3 complex-mediated actin polymerisation. *Plos Pathog* 2010; 6: e1001041.
34. Vergne I, Chua J, Deretic V. *Mycobacterium tuberculosis* phagosome maturation arrest: selective targeting of PI3P-dependent membrane trafficking. *Traffic* 2003; 4: 600-606.
35. Batista DGJ, Silva CF, Mota RA. *Trypanosoma cruzi* modulates the expression of Rabs and alters the endocytosis in mouse cardiomyocytes in vitro. *J Histochem Cytochemistry* 2006; **54**: 605-614.
36. Scianimanico S, Desrosiers M, Dermine JF, et al. Impaired recruitment of the small GTPase rab7 correlates with the inhibition of phagosome maturation by *Leishmania donovani* promastigotes. *Cell Microbiol* 1999; **1**: 19-32.

37. Wozniak KL, Levitz SM. *Cryptococcus neoformans* Enters the Endolysosomal Pathway of Dendritic Cells and Is Killed by Lysosomal Components. *Infect Immun* 2008; 76: 4764-4771.

38. Levitz SM, Harrison TS, Tabuni A, Liu X. Chloroquine induces human mononuclear phagocytes to inhibit and kill *Cryptococcus neoformans* by a mechanism independent of iron deprivation. *J Clin Invest* 1997; **100**: 1640–1646.

39. Newman SL, Gootee L, Hilty J, Morris RE. Human macrophages Do Not require phagosome acidification to mediate fungistatic/fungicidal activity against *Histoplasma capsulatum*. *J Immunol* 2006; **176**: 1806-1813.

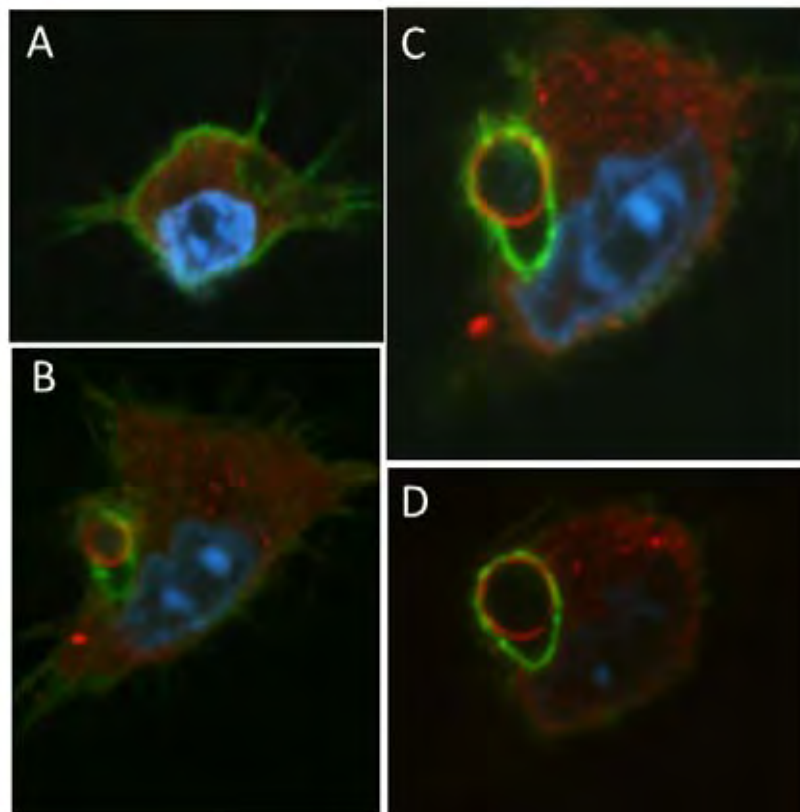


Fig. 1 Rearrangement of actin during internalization by macrophage cells. (A) Actin pattern in uninfected macrophages. (B, C and D) After macrophage infection, cells stained with FITC-phalloidin and intracellular *P. brasiliensis* stained with anti-cell free antibody and Alexa Fluor R 594 conjugate. The microfilament redistribution appeared as the formation of aggregates of F-actin that were co-located with the

fungus adherence and invasion sites. This Figure is reproduced in color in the online version of *Medical Mycology*.

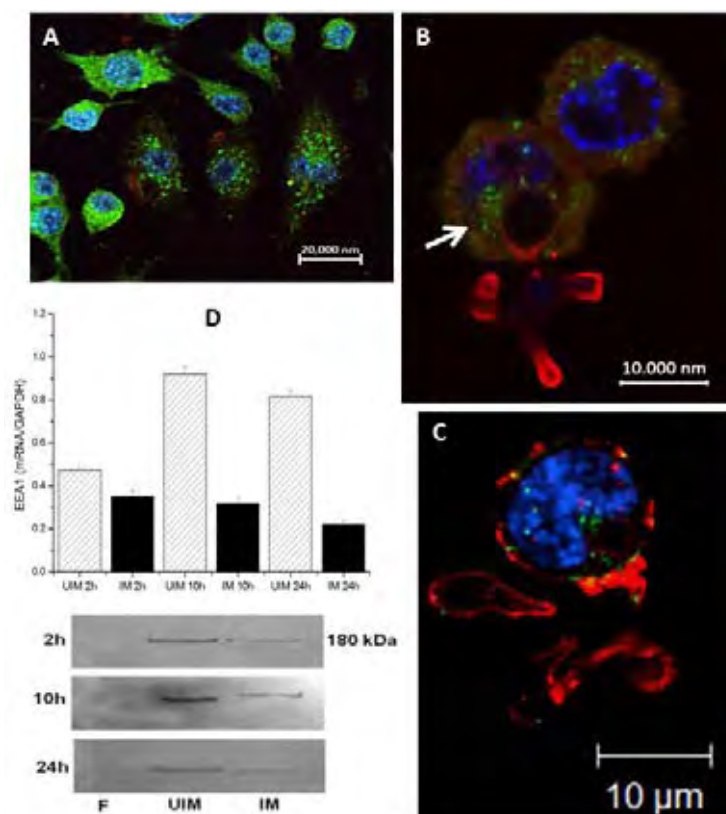


Fig. 2 EEA1 in macrophages infected. (A, B & C) EEA1 expression in macrophages infected (B, C) and non-infected (A) with *P. brasiliensis*, macrophages immunolabeled with primary antibodies anti-EEA1 (green) and secondary conjugated Alexa Fluor R 488, and *P. brasiliensis* immunolabeled with anti-cell-free antibody (red) and secondary conjugated Alexa Fluor R 594, and nucleus was labeled with DAPI (blue) (Zeiss LSM 510 Meta Confocal Microscope). (D) Relative expression of EEA1 in *P. brasiliensis* infected and uninfected-macrophages by real-time PCR and Immunoblot EEA1 protein. F, fungal; UIM, uninfected macrophages; IM, infected macrophages. This Figure is reproduced in color in the online version of *Medical Mycology*.