

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JULIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA

“Clonagem e caracterização da proteína 14-3-3 de *Paracoccidioides brasiliensis* durante sua interação com células epiteliais”

Julhiany de Fátima da Silva

Orientador: Profa Dra Maria José Soares Mendes Giannini

ARARAQUARA - SP

2011

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JULIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA

“Clonagem e caracterização da proteína 14-3-3 de *Paracoccidioides brasiliensis* durante sua interação com células epiteliais”

Julhiany de Fátima da Silva

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor.

Orientador: Profa Dra Maria José Soares Mendes Giannini

ARARAQUARA - SP
2011

Ficha Catalográfica

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

S586c Silva, Julhiany de Fátima da
Clonagem e caracterização da proteína 14-3-3 de *Paracoccidioides brasiliensis* durante sua interação em células epiteliais / Julhiany de Fátima da Silva . – Araraquara, 2011
132 f.

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

1. *Paracoccidioides brasiliensis*. 2. Proteína 14-3-3. 3. Virulência. 4. Adesina. I. Giannini, Maria José Soares Mendes, orient. II. Título.

CAPES: 40300005

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Micologia Clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas-UNESP Araraquara. Recebeu apoio financeiro da Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de nível Superior (CAPES) e do PADC-FCFAR.

”Quando você conseguir superar graves problemas, não se detenha na lembrança dos momentos difíceis, mas na alegria de haver atravessado mais essa prova em sua vida.

Quando sair de um longo tratamento de saúde, não pense no sofrimento que foi necessário enfrentar, mas na bênção de Deus que permitiu a cura.

Leve na sua memória, para o resto da vida, as coisas boas que surgiram nas dificuldades. Elas serão uma prova de sua capacidade, e lhe darão confiança diante de qualquer obstáculo.

Uns queriam um emprego melhor; outros, só um emprego.

Uns queriam uma refeição mais farta; outros, só uma refeição.

Uns queriam uma vida mais amena; outros, apenas viver.

Uns queriam pais mais esclarecidos; outros, ter pais.

Uns queriam ter olhos claros; outros, enxergar.

Uns queriam ter voz bonita; outros, falar.

Uns queriam silêncio; outros, ouvir.

Uns queriam sapato novo; outros, ter pés.

Uns queriam um carro; outros, andar.

Uns queriam o supérfluo; outros, apenas o necessário.

Há dois tipos de sabedoria: a inferior e a superior.

A sabedoria inferior é dada pelo quanto uma pessoa sabe e a superior é dada pelo quanto ela tem consciência de que não sabe.

Tenha a sabedoria superior.

Seja um eterno aprendiz na escola da vida.

A sabedoria superior tolera; a inferior julga;

a superior alivia; a inferior culpa;

a superior perdoa; a inferior condena.

Tem coisas que o coração só fala para quem sabe escutar!”

Chico Xavier

É exatamente disso que a vida é feita, de MOMENTOS. Momentos que TEMOS que passar, sendo bons ou ruins, para o nosso próprio aprendizado. Nunca esquecendo o mais importante: Nada nessa vida é por acaso. Absolutamente NADA. Por isso, temos que nos preocupar em fazer a nossa parte, da melhor forma possível. A vida nem sempre segue a nossa vontade, mas ela é perfeita naquilo que tem que ser. (Chico Xavier)

Bom mesmo é ir a luta com determinação, abraçar a vida com paixão, perder com classe e vencer com ousadia, pois o triunfo pertence a quem se atreve... A vida é muita para ser insignificante. (Charles Chaplin)

De tudo, ficaram três coisas: a certeza de que se estava sempre começando, a certeza de que era preciso continuar e a certeza de que seria interrompido antes de terminar. Fazer da interrupção um caminho novo. Fazer da queda um passo de dança, do medo uma escada, do sono uma ponte, da procura um encontro. (Fernando Sabino).

Aqui, no entanto nós não olhamos para trás por muito tempo, Nós continuamos seguindo em frente, abrindo novas portas e fazendo coisas novas. Porque somos curiosos... e a curiosidade continua nos conduzindo por novos caminhos. (Walt Disney).

DEDICO

Segundo José Saramago a definição de filho seria: "*Filho é um ser que nos foi emprestado para um curso intensivo de como amar alguém além de nós mesmos, de como mudar nossos piores defeitos para darmos os melhores exemplos e de aprendermos a ter coragem. Isto mesmo! Ser pai ou mãe é o maior ato de coragem que alguém pode ter, porque é se expor a todo tipo de dor, principalmente da incerteza de estar agindo corretamente e do medo de perder algo tão amado*". Por isso, dedico este trabalho, em especial, ao meu filho *Giulliano*, que veio para iluminar os meus dias, a força necessária para eu lutar em todos eles. A minha primeira conquista, talvez a mais gratificante de todas elas. VOCÊ É A RAZÃO DA MINHA VIDA E O MOTIVO PELO QUAL EU ME LEVANTO E TENTO SER UMA PESSOA MELHOR TODOS OS DIAS.

À minha família: aos meus pais, *Lourdes* e *Sérgio*, à minha irmã *Daiany*, e ao Caio, à minha *Vó Quinha*, aos meus tios *Samuel* e *Cássia* e aos meus primos *Samuel* e *Leonardo*, pela força, compreensão, paciência, solidariedade e respeito. Por acreditarem e me incentivarem em todos os momentos. Por me auxiliarem a superar todas as dificuldades e chegar até o final. Pelo amor e pelo carinho, mesmo diante de todas as adversidades.

AMO MUITO VOCÊS.

Á LIGAÇÃO COVALENTE, Bia, Carol, Camila, Joyce, Maira e Maisa, que mesmo geograficamente distante, estiveram presentes me apoiando para vencer mais essa etapa. Vocês foram e são fundamentais nas minhas conquistas.

À Profa Dra Maria José Soares Mendes Giannini, Zezé, uma pessoa que sabe envolver a todos aqueles que estão ao seu redor. Uma pessoa exemplar, fantástica em todos os aspectos. Exemplo de liderança, dedicação e superação.

Agradeço do fundo do meu coração a credibilidade depositada em mim, contribuindo para meu crescimento pessoal e científico. Eu sinceramente não consigo encontrar palavras suficientes que expresse o quanto eu devo a você nesse momento tão especial. Espero poder seguir seus passos, pois você é iluminada, guerreira e vencedora.

Você é única, obrigada por todo carinho e confiança, além de todo apoio, amizade demonstrados em todos esses anos de convivência, pela paciência e por lançar desafios todos os dias.

Você me fez crescer muito mais do que eu mesma poderia imaginar.

*“Diz-me, e eu esquecerei;
ensina-me e eu lembrar-me-ei;
envolve-me, e eu aprenderei”*
(Provérbio Chinês)

À profa Dra Ana Marisa por todo apoio e incentivo durante a realização deste trabalho. Posso dizer que sou uma das poucas pessoas que a conheci ainda aluna em nosso laboratório e talvez por isso o nosso relacionamento seja diferente. Tenho que agradecê-la por se preocupar demais com o laboratório e não medir esforços para que tudo sempre esteja em ordem. Má... muito obrigada pela força e pelo carinho.

À profa Dra Christiane Pienna Soares pela oportunidade inicial, pois afinal de contas foi você que me apresentou para a profa Zezé. Desde a graduação, sempre te admirei pelo amor que você demonstrava tanto pela pesquisa, quanto pela docência. Você é um exemplo, para mim. Muito obrigada, por todo auxílio e colaboração que tem nos dado nesses anos.

Ao Professor Henrique Leonel Lenzi, *in memoriam*, que partiu “tão precocemente”, mas deixou seu legado de ciência associada à gentileza. Um verdadeiro cientista, uma pessoa adorável, talvez a inteligência em pessoa que com a maior humildade sempre transmitia seus conhecimentos e a inspiração necessária para seguir o caminho científico. *Você fará muita falta.*

À Rosângela, que é muito mais do que técnica acadêmica em nosso laboratório. Não tenho palavras para demonstrar minha gratidão por essa pessoa. Dedicar esse trabalho à ela seria muito pouco, agradecê-la também não seria suficiente.

Todos que fazem parte da “família Micologia” sabem o vazio que fica no laboratório quando ela não está presente. Ela é muito mais do que uma “MÃE” porque sempre está nos aconselhando e muitas vezes, brigando, no bom sentido é claro, para que tudo fique em ordem e que todos se entendam da melhor maneira possível.

Rô... muito obrigada pelo apoio, pelo incentivo, pela dedicação para com todos os alunos desse laboratório, pelos conselhos, pelos ouvidos, pelo carinho, pela amizade, pela torcida constante.

Você é uma pessoa muito especial e que faz toda a diferença.

AGRADECIMENTOS

A *migo é quem te dá um pedacinho do chão, quando é de terra firme que você precisa, ou um pedacinho do céu, se é o sonho que te faz falta. Amigo é mais que ombro amigo, é mão estendida, mente aberta, coração pulsante, costas largas. É quem tentou e fez, e não tem o egoísmo de não querer compartilhar o que aprendeu. É aquele que cede e não espera retorno, porque sabe que o ato de compartilhar um instante qualquer contigo já o alimenta, satisfaz. É quem já sentiu ou um dia vai sentir o mesmo que você. É a compreensão para o seu cansaço e a insatisfação para a sua reticência. É aquele que entende seu desejo de voar, de sumir devagar, a angústia pela compreensão dos acontecimentos, a sede pelo "por vir". É ao mesmo tempo espelho que te reflete, e óleo derramado sobre suas águas agitadas. É quem fica enfurecido por enxergar seu erro, querer tanto o seu bem e saber que a perfeição é utopia. É o sol que seca suas lágrimas, é a polpa que adocica ainda mais seu sorriso. Amigo é aquele que toca na sua ferida numa mesa de chopp, acompanha suas vitórias, faz piada amenizando problemas. É quem tem medo, dor, náusea, cólica gozo, igualzinho a você. É quem sabe que viver é ter história pra contar. É quem sorri pra você sem motivo aparente, é quem sofre com seu sofrimento, é o padrinho filosófico dos seus filhos. É o achar daquilo que você nem sabia que buscava. Amigo é aquele que te lê em cartas esperadas ou não, pequenos bilhetes em sala de aula, mensagens eletrônicas emocionadas. É aquele que te ouve ao telefone mesmo quando a ligação é caótica, com o mesmo prazer e atenção que teria se tivesse olhando em seus olhos. Amigo é quem fala e ouve com o olhar, o seu e o dele em sintonia telepática. É aquele que percebe em seus olhos seus desejos, seus disfarces, alegria, medo. É aquele que aguarda pacientemente e se entusiasma quando vê surgir aquele tão esperado brilho no seu olhar, e é quem tem uma palavra sob medida quando estes mesmos olhos estão amplificando tristeza interior. É lua nova, é a estrela mais brilhante, é luz que se renova a cada instante com múltiplas e inesperadas cores que cabem todas na sua íris. Amigo é aquele que te diz "eu te amo" sem qualquer medo de má interpretação: Amigo é quem te ama "e ponto". É verdade e razão, sonho e sentimento. Amigo é pra sempre, mesmo que o sempre não exista."*

Aos amigos da micologia: Rosângela, Rosemira, Liliana, Haroldo, Caroline (Panta), Ana Carolina (Carol Tatro), Fer Sangalli, Fer Gullo, Nayla, Thaís, Jana, Suélen e Patrícia (Laranja) porque é difícil querer definir amigo. Muito obrigado por compartilharem todo esse tempo comigo, por ter me ajudado a caminhar de uma forma mais suave, tornando o caminho menos árduo. Sem vocês seria muito difícil. AMO VOCÊS!!!

Aos meus companheiros de pós-graduação e companheiros de laboratório: Aline, Claudete, Dani, Jaqueline, Kaila, Luciana, Natália, Tatiane, Warley e Vanessa pelo convívio e por compartilhar todas as dificuldades e desafios encontrados nessa etapa.

Um agradecimento especial ao Valter e Sr. Torres, por tornarem o ambiente mais alegre e divertido durante as vindas de vocês ao laboratório.

Aos que já concluíram a passagem por esse laboratório, (Ju Monteiro, Pat, Lilian, Marcelo, Rosana, Regina), mas que deixaram muitos ensinamentos e também muitas saudades.

Às minhas amigas da cultura celular, Pat e Ju Monteiro, que muito me ensinaram, me incentivaram e sempre torceram por mim. Vocês foram o começo de tudo e graças ao exemplo de vocês, cheguei até aqui. Também ao Marcelo, pela paciência nipônica em todos os momentos me auxiliando na execução deste trabalho. Obrigada por estarem presentes, mesmo distante daqui.

À Eliana e a Tirene, pela paciência, dedicação, boa vontade e boas risadas durante esse período.

À todos os agregados da Micologia: Bel Cito e Marisa Imuno, pela colaboração e pelo bom convívio.

Aos amigos do laboratório de Biologia Molecular: Tati Watanabe, Danuza e Dani Rosseto pelo auxílio em todos os experimentos que foram aí realizados e também pela grande receptividade e bom humor. Adoro vocês!

Às meninas da pós-graduação, Laura, Sônia e Claudia, e também à Márcia e à Joyce pela paciência e todo o apoio técnico para a realização deste trabalho.

À Profa Célia Maria de Almeida Soares e Juliana Parente pelo auxílio com os experimentos de clonagem. Um agradecimento especial aos amigos da UFG: Ju Parente, Clayton, Alexandre, Ana Flávia, Neto, Wesley, por me auxiliarem durante à minha estada em Goiânia, pela excelente companhia no Congresso de Medellín e pelas inúmeras visitas ao nosso lab aqui em Araraquara.

Aos Prof Sandro Valentini, Prof. Clelei Fernando Zanelli e à Camila Arnaldo Olhê Dias e Tatiana Watanabe pelo auxílio nas etapas de purificação da proteína recombinante.

Ao prof Carlos Alberto Labate e à Fernanda Salvato, da Escola Superior Agrícola Luiz de Queiroz- ESALQ – USP, pelo auxílio com as identificações proteicas através de espectrometria de massas.

Ao Prof Carlos Pelleschi Taborda e à Luciana Thomaz pelo auxílio no desenvolvimento da técnica de imunogold. Aos técnicos do setor de microscopia do ICBI – USP- SP, Gaspar Ferreira de Lima e Edson Rocha de Oliveira pela assistência nas análises por microscopia eletrônica.

À FAPESP, ao CNPq, ao PADC-FCFAR pelo apoio financeiro e a CAPES pela bolsa concedida.

Agradeço todas as dificuldades que enfrentei não fosse por elas, eu não teria saído do lugar. As facilidades nos impedem de caminhar. Enfim...

Sou um pouco de todos que conheci, um pouco dos lugares que fui, um pouco das saudades que deixei, sou muito das coisas que gostei.

Entre umas e outras errei, entre muitas e outras conquistei!

SUMARIO

CAPÍTULO I	Pag 22
RESUMO	Pag 23
ABSTRACT	Pag 24
INTRODUÇÃO	Pag 25
PROPOSIÇÃO	Pag 37
OBJETIVOS	Pag 37
METODOLOGIA	Pag 38
1. Cultura de células	Pag 38
2. Microrganismo	Pag 38
3. Clonagem do cDNA codificante da proteína 14-3-3 em vetor de expressão	Pag 38
4. Expressão heteróloga da proteína 14-3-3 de <i>P. brasiliensis</i>	Pag 39
5. Purificação da proteína 14-3-3 recombinante de <i>P. brasiliensis</i>	Pag 40
6. Confirmação da obtenção da proteína 14-3-3 recombinante de <i>P. brasiliensis</i> por LC-MS/MS	Pag 41
7. Produção de anticorpos	Pag 41
8. Preparo de antígeno filtrado de cultura	Pag 42
9. Preparo de antígeno <i>cell free</i>	Pag 42
10. Análise por <i>western blot</i>	Pag 43
11. Avaliação da viabilidade celular	Pag 43
12. Ensaio de inibição da interação de <i>P. brasiliensis</i> com células epiteliais utilizando a proteína 14-3-3 recombinante.	Pag 44
13. Marcação com faloidina para observação dos filamentos de actina durante a interação da proteína 14-3-3 recombinante com células A549	Pag 45
14. Técnica de imunocitoquímica em nível ultra-estrutural para localização da proteína 14-3-3 em formas leveduriformes de <i>P. brasiliensis</i>	Pag 46
15. Efeito de Rho, Rac e CDC42 na internalização de <i>P. brasiliensis</i> em células A549.	Pag 46
15.1 Ensaio de inibição utilizando toxina B de <i>Clostridium difficile</i>	Pag 46
15.2 Imunofluorescência para verificar expressão de Rac e Cdc42	Pag 47

15.3 Análise da expressão de Rac e Cdc42 por citometria de fluxo	Pag 47
RESULTADOS	Pag 48
1. Clonagem do cDNA codificante da proteína 14-3-3 em vetor de expressão	Pag 48
2. Expressão heteróloga e purificação da proteína 14-3-3 de <i>P. brasiliensis</i>	Pag 52
3. Confirmação da obtenção da proteína 14-3-3 recombinante de <i>P. brasiliensis</i> por LC-MS/MS	Pag 55
4. Produção de anticorpos e análise por <i>Western Blot</i>	Pag 56
5. Ensaio de viabilidade celular	Pag 57
6. Ensaio de inibição da interação de <i>P. brasiliensis</i> com células epiteliais utilizando a proteína 14-3-3 recombinante.	Pag 58
7. Marcação com faloidina para observação dos filamentos de actina durante a interação da proteína 14-3-3 recombinante com células A549	Pag 60
8. Técnica de imunocitoquímica em nível ultra-estrutural para localização da proteína 14-3-3 em formas leveduriformes de <i>P. brasiliensis</i>	Pag 62
9. Efeito de Rho, Rac e Cdc42 na internalização de <i>P. brasiliensis</i> em células A549.	Pag 68
9.1 Ensaio de inibição utilizando toxina B de <i>Clostridium difficile</i>	Pag 68
9.2 Imunofluorescência para a verificação da expressão de Rac durante a interação da proteína 14-3-3 recombinante com células A549	Pag 68
9.3 Análise da expressão de Rac e Cdc42 por citometria de fluxo	Pag 74
DISCUSSÃO	Pag 77
CONCLUSÕES	pag 90
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	Pag 91
CAPÍTULO II	pag 111
Cloning of the <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> 14-3-3 protein and subcellular localization during interaction with pneumocytes	

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Eletroforese em agarose 1% corada com brometo de etídio. A: Extração de RNA do isolado 18 de *P. brasiliensis*. B: cDNA sintetizado e purificado. Pag 48
- Figura 2:** (Direita) Esquema representativo da sequência de cDNA da proteína 14-3-3 de *P. brasiliensis* (acesso no GenBank número AY462124) e dos iniciadores desenhados especificamente para clonagem sítio dirigida para expressão no vetor pCR2.1-TOPO. (Esquerda). Resultado da PCR para amplificação da seqüência de cDNA da proteína 14-3-3 de *P. brasiliensis* utilizando os primers específicos desenhados. 1: marcador molecular 1kb (Invitrogen); 2: produto amplificado de aproximadamente 800pb (inserto). Pag 49
- Figura 3:** PCR para confirmação da presença do inserto nas colônias selecionadas. 1: marcador molecular 1kb (Invitrogen); 2: controle positivo (produto de PCR), 3 a 7: PCR das colônias de 1 a 5, respectivamente, demonstrando a amplificação do inserto como resultado positivo da clonagem. Pag 50
- Figura 4:** Clivagem do plasmideo recombinante com Sal I. 1 e 6: marcador molecular 1kb (Invitrogen); 2: plasmideo recombinante íntegro; 3: plasmideo recombinante clivado com Sal I; 4: vetor de expressão (pET32a) íntegro; 5: vetor de expressão (pET32a) clivado com Sal I. Pag 51
- Figura 5:** PCR para confirmação da presença do inserto nas colônias selecionadas. 1: marcador molecular 1kb (Fermentas); 2: controle positivo (produto de PCR), 3: controle negativo, 4 a 11: PCR das colônias de 1 a 8, respectivamente, demonstrando a presença do inserto nos clone 4 e 7 como resultado positivo da clonagem no vetor de expressão pET 32a. Pag 52
- Figura 6:** SDS-Page para verificar teste de indução e coloração por Comassie Phast Gel R350, 1:PM, 2:0h, 3:1h, 4:2h, 5:3h, 6:4h e 7:5h de indução com 0,4mM de IPTG a 37°C, a seta indica a expressão da proteí na recombinante. Pag 53
- Figura 7:** SDS-Page para verificar purificação da proteína 14-3-3 recombinante através de cromatografia de afinidade com coluna de níquel. Coloração por Comassie Phast Gel R350, 1:PM, 2- 16 frações da purificação, a seta indica a proteína recombinante parcialmente purificada. Pag 53
- Figura 8:** SDS-Page para verificar purificação da proteína 14-3-3 recombinante através de eletroeluição. Coloração por Comassie Phast Gel R350, 1:PM, 2- 8 amostras eletroeluídas, a seta indica a proteína 14-3-3 recombinante purificada. Pag 54
- Figura 9:** Identificação da proteína 14-3-3 recombinante purificada por LC-MS/MS e Mascot software. **A:** Score distribution demonstrando todas as proteínas identificadas com a seqüência encontrada. **B:** Peptídeos seqüenciados que permitiram a identificação da proteína 14-3-3 de *P. brasiliensis*. Pag 55
- Quadro 1:** Proteínas identificadas a partir da banda eletroeluída, digerida e submetida à LC-MS/MS. Pag 56

- Figura 10:** Imunoblot para verificação da reatividade do soro policlonal anti-14-3-3. (1) Filtrado de cultura e (2) antígeno *cell free* obtidos do isolado 18 de *P. brasiliensis*, (3) proteína 14-3-3 nativa obtida através de cromatografia por afinidade (ConA sepharose), (4) proteína 14-3-3 recombinante íntegra e proteína 14-3-3 submetida à clivagem com Thrombin Cleave Kit por (5) 1h e (6) 2h. As setas indicam a reatividade do anticorpo frente à proteína recombinante (43 kDa) e nativa ou recombinante clivada (30 kDa). Pag 57
- Figura 11:** Gráfico representativo da viabilidade celular, pelo ensaio do MTT, das proteínas 14-3-3 nativa e recombinante A549 assim como a infecção pelo isolado 18 de *P. brasiliensis* e o peróxido de hidrogênio, utilizados como controle do ensaio, $p \leq 0,05$ quando se compara proteína nativa com recombinante. Pag 58
- Figura 12:** Ensaio de inibição para verificar a interação de *P. brasiliensis* com células epiteliais nas condições propostas por diferentes períodos de tempo. $*p \leq 0,05$ Pag 59
- Figura 13:** Imunofluorescência de células epiteliais (A549) não tratadas (A), tratadas com a proteína 14-3-3 nativa (B) ou com a proteína recombinante (C) por 5 horas usando faloidina-FITC (verde) e DAPI (azul). Também foi avaliado o padrão de distribuição de actina nas células infectadas por *P. brasiliensis* por 5h (D), 8h (E) e 24h (F). As setas indicam o fungo marcado em vermelho demonstrando a marcação específica da proteína 14-3-3 na parede celular. Pag 61
- Figura 14:** Microscopia Imunoelétrica para localização da proteína 14-3-3 em células leveduriformes de *P. brasiliensis*. (A) Controle negativo com soro pré-imune; (B) e (C) Marcação com anticorpo policlonal anti-14-3-3, as setas indicam as partículas de ouro, demonstrando a localização subcelular desta proteína. Aumento de 25.000x. Pag 63
- Figura 15:** Microscopia Imunoelétrica para localização da proteína 14-3-3 em células leveduriformes de *P. brasiliensis*, durante a interação com células epiteliais por 2h (A), 5h (B) e 8h (C). Controle negativo com soro pré-imune (1) e imunomarcagem utilizando o anticorpo policlonal (2, 3 e 4). Aumento de 25.000x (2) e 50.000x (3 e 4). Pag 64
- Figura 15A:** Detalhe da microscopia Imunoelétrica para localização da proteína 14-3-3 em células leveduriformes de *P. brasiliensis*, durante a interação com células epiteliais por 2h (A3 e A4). Aumento de 50.000x. F: fungo; W: parede celular; V: vacúolo. Pag 65
- Figura 15B:** Detalhe da microscopia Imunoelétrica para localização da proteína 14-3-3 em células leveduriformes de *P. brasiliensis*, durante a interação com células epiteliais por 5h (B3 e B4). Aumento de 50.000x. C: célula epitelial; W: parede celular. Pag 66
- Figura 15C:** Detalhe da microscopia Imunoelétrica para localização da proteína 14-3-3 em células leveduriformes de *P. brasiliensis*, durante a interação Pag 67

com células epiteliais por 8h (C). Aumento de 50.000x. C: célula epitelial; F: fungo; W: parede celular.

Figura 16: Ensaio de inibição pela toxina botulínica para verificar a interação de *P. brasiliensis* com células epiteliais nas condições propostas por diferentes períodos de tempo. * $p \leq 0,01$ Pag 68

Figura 17: Imunofluorescência tripla mostrando o padrão de marcação das células epiteliais (A549) normais (CN), tratadas com a proteína 14-3-recombinante e infectadas com Pb18 por diferentes períodos de tempo, utilizando anti14-3-3 (vermelho), anti-Rac (verde) e DAPI (azul). Pag 69

Figura 17A: Detalhes da imunofluorescência tripla mostrando o padrão de marcação das células epiteliais (A549) normais, tratadas com a proteína 14-3-recombinante por diferentes períodos de tempo, utilizando soro anti14-3-3 (vermelho), anti-Rac (verde) e DAPI (azul). Pag 70

Figura 17B: Detalhes da imunofluorescência tripla mostrando o padrão de marcação das células epiteliais (A549) infectadas com Pb18 por diferentes períodos de tempo, utilizando anti14-3-3 (vermelho), anti-Rac (verde) e DAPI (azul). Pag 71

Figura 18: Imunofluorescência tripla mostrando o padrão de marcação das células epiteliais (A549) normais (CN), tratadas com a proteína 14-3-recombinante e infectadas com Pb18 por diferentes períodos de tempo, utilizando soro anti-14-3-3 (vermelho), anti-Cdc42 (verde) e DAPI (azul). Pag 72

Figura 18A: Detalhes da imunofluorescência tripla mostrando o padrão de marcação das células epiteliais (A549) tratadas com a proteína 14-3-recombinante utilizando soro anti-14-3-3 (vermelho), anti-Cdc42 (verde) e DAPI (azul). Pag 73

Figura 19: Avaliação da expressão de Rac por citometria de fluxo. *Gates* meramente ilustrativos das células A549 não tratadas (A), tratadas com 14-3-3 recombinante 50ug/mL (B) ou infectadas com *P. brasiliensis* (C) demonstrado a distribuição (FSCxSSC) e a intensidade de marcação com ficoeritrina no tempo inicial. Avaliação da %de células positivas (D) e da intensidade de fluorescência (E) nas condições avaliadas. * $p \leq 0,05$, quando comparadas com as células não tratadas. Pag 75

Figura 20: Avaliação da expressão de Cdc42 por citometria de fluxo. *Gates* meramente ilustrativos das células A549 não tratadas (A), tratadas com 14-3-3 recombinante 50ug/mL (B) ou infectadas com *P. brasiliensis* (C) demonstrando a distribuição (FSCxSSC) e a intensidade de marcação com ficoeritrina no tempo inicial. Avaliação da % de células positivas (D) e da intensidade de fluorescência (E) nas condições avaliadas. * $p \leq 0,05$, quando comparadas com as células não tratadas. Pag 76

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E ESTRUTURAS QUÍMICAS

‰: porcentagem

β: letra grega que significa “beta”

ε: letra grega que significa “épsilon”

ζ: letra grega que significa “dzeta”

η: letra grega que significa “eta”

γ: letra grega que significa “gama”

σ: letra grega que significa “sigma”

τ: letra grega que significa “tau”

°C: graus Celsius

A549: células epiteliares pulmonares alveolares tipo I (obtidas do Banco de células do Rio de Janeiro – CR039)

ARI1: *ariadne homolog, ubiquitin-conjugating enzyme E2 binding protein, 1 (Drosophila)*

aRNA: RNA antisense

Art: gene codificador da proteína 14-3-3 em *Aspergillus nidulans*

ATP: adenosina trifosfato

AvrRxx: *avirulence gene from Xanthomonas campestris pv. vesicatoria*

BL21DE3: *E. coli* quimicamente competente adequadas para transformação e expressão de proteínas.

BMH: gene codificador da proteína 14-3-3 em *Saccharomyces cerevisiae*

BSA: soro albumina bovina

Cap-LC: Cromatografia líquida em sistema capilar

Cdc42: *Cell division control protein 42 homolog* (proteína envolvida no controle da divisão celular)

cDNA: *complementary Deoxyribonucleic acid* (DNA complementar)

CFUs: unidades formadoras de colônia

CO₂: dióxido de carbono

conA: concanavalina A

CR₃: receptores para o sistema complemento em diferentes tipos celulares

Da: Dalton (unidade de massa atômica)

DAB: diaminobenzidina

DAPI: 4'-6-Diamidino-2-fenilindol

DEAE: *Diethylaminoethyl* (Dietilaminoetil)

DNA: *Deoxyribonucleic acid* (ácido desoxirribonucléico)

DO: densidade óptica

DTT: ditioneitol

ELISA: *Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay*

EPEC: *Escherichia coli* enteropatogênica

ERK:quinase regulada extracelularmente

ExoS: exoantígeno de *Salmonella typhimurium*
FAK: *focal adhesion kinase* (quinase para adesão focal)
Fase "L": fase leveduriforme de *P. brasiliensis*
FITC: isotiocinato de fluoresceína
FSC: *Forward Scatter* (ângulo de dispersão frontal)
GAPDH: glicose-6-fosfato desidrogenase
gp43: glicoproteína de 43kDa
Grb2/Sos: complexo de dissociação e fosforilação
GTP: guanosina trifosfato
GTPase: enzima que hidrolisa GTP
GXM: glicuronoxilomanana
Ham F12: meio de cultivo para pneumócitos
Hsp: *heat shock protein* (proteína de choque térmico)
ICL: isocitrato liase
ID: identidade
IgG: imunoglobulina do tipo G
IPTG: *Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside*
ITS: *internal transcribed spacers*
JNK: c - Jun NH2-terminal quinase
kDa: kilodalton
LB: meio Luria-Bertanni
LC-MS/MS: Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas
mA; miliampére
MAPK: *Mitogen-activated protein kinase*
MEC: matriz extracelular
MLS: malato sintase
mM: milimolar
MMP: (colagenase)
MTT: 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide)
NiNTA: coluna de níquel utilizada em cromatografia de afinidade
PAI: ativador do plasminogênio tipo-1 inibidor
Pb: *Paracoccidioides brasiliensis*
PbDfg5p: *glycosylated cell wall defective for filamentous growth protein* de *P. brasiliensis*
(proteína glicosilada defectiva da parede celular de crescimento filamentoso de *P. brasiliensis*)
PBS: solução salina tamponada com fosfatos
PCM: paracoccidiomicose
PCR: reação da polimerase em cadeia
PE: *phicoerithrin* (ficoeritrina)
PLAAC: mistura de inibidores de protease composto de pepstatina, leupeptina, aprotinina, antipaina e quimiostatina

PMSF: fenil-metil-sulfonil fluoreto

PTK: proteína tirosina quinase

RGD: tripeptídeo composto de Arginina (Arg), glicina (Gly) e asparagina (Asp).

RNA: *Ribonucleic acid* (ácido ribonucléico)

SDS: dodecil sulfato de sódio

PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida

SPI-1 T3SS: sistema de secreção do tipo III de *Salmonella typhimurium*

SSC: *Side Scatter* (ângulo de dispersão lateral)

TGF: *Transforming growth factor* (fator de transformação de crescimento)

TIMP: inibidor tecidual de metaloproteinase-1

Tir: receptor do tipo tirosina quinase

TLR: *toll like receptor* (receptor do tipo *toll*)

TPI: triose fosfato isomerase

CAPÍTULO I

RESUMO

A paracoccidioidomicose (PCM) é micose sistêmica causada pelos fungos dimórficos *Paracoccidioides brasiliensis* (espécies crípticas S1, PS2, PS3) e *Paracoccidioides lutzii* (Pb01-like espécies), endêmica na América Latina, principalmente no Brasil. A capacidade de causar micose com grande variedade de manifestações clínicas, desde formas localizadas até doença disseminada evoluindo para letalidade, depende da virulência do fungo e de sua habilidade em interagir com as estruturas superficiais do hospedeiro e invadi-las, e a resposta imunológica deste último. *P. brasiliensis* tem a capacidade de aderir e invadir células epiteliais de linhagens humanas e animais e o processo de invasão do fungo afeta a estrutura do citoesqueleto, interferindo em aspectos morfológicos da actina, tubulina e citoqueratina, indicando a participação funcional dos microfilamentos e microtúbulos neste mecanismo. Em estudos prévios foi identificada adesina de *P. brasiliensis* de 30 kDa, ligante de laminina, caracterizada como uma proteína pertencente à família 14-3-3. O objetivo deste trabalho foi produzir a proteína recombinante, verificar o papel desta na interação do fungo com células epiteliais pulmonares de linhagem contínua. Para tanto, com o anticorpo anti-14-3-3 foi verificada a sua localização, tanto nas formas leveduriformes do fungo como no processo de interação. A clonagem foi realizada em vetor de clonagem pCR2.1-TOPO - pET32a, para permitir a expressão da proteína Pb14-3-3r com cauda de histidina no espaço periplasmático de *E. coli*. A fração periplasmática foi purificada por cromatografia de afinidade seguida de eletroeluição. Foi possível verificar alteração do padrão de distribuição de actina quando as células foram tratadas com a proteína recombinante e nativa. A proteína 14-3-3 apresenta distribuição ubíqua na célula leveduriforme de *P. brasiliensis* (cepa 18/S1) com certa predileção citoplasmática e preferencialmente na parede deste fungo no momento da interação com as células epiteliais. Os tratamentos com a toxina botulínica revelaram redução significativa da taxa de infecção, o que indica participação da via de Rho GTPases no processo infectivo de *P. brasiliensis*, contribuindo para o maior conhecimento da patogenicidade deste fungo, vislumbrando assim um possível bloqueio dos alvos iniciais envolvidos na interação parasito-hospedeiro.

ABSTRACT

Paracoccidioidomycosis (PCM) is a systemic mycosis caused by the dimorphic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* (cryptic species S1, PS2, PS3) and *Paracoccidioides lutzii* (Pb01-like species), endemic in Latin America, mainly Brazil. The ability to cause mycosis with a variety of clinical manifestations, from localized forms to disseminated disease progressing to lethality, possibly depends on the relationship between the virulence of these, the ability to interact with the surface structures of the host and invade them, and this immune response. *P. brasiliensis* has the ability to adhere and invade human and animal epithelial cells lineage and the process of invasion of the fungus affects the structure of the cytoskeleton, morphological interfering with actin, tubulin and cytokeratin morphology, indicating the functional participation of microfilaments and microtubules in this mechanism. Previous study identified a 14-3-3 protein (30 kDa) that acts as a *P. brasiliensis* adhesin (laminin ligand) and this protein contributes to the virulence of this important fungal pathogen. The objective of this study was to produce recombinant protein, to verify the role of the interaction of the fungus with lung epithelial cells of continuous lineage. To do so, with the anti-14-3-3 was verified its location, both in the forms of the fungus and yeast in the process of interaction. The cloning was done in cloning vector pCR2.1-TOPO - pET32a to allow expression of protein Pb14-3-3r-tailed histidine periplasmic space of *E. coli*. The periplasmic fraction was purified by affinity chromatography followed by electroelution. It was possible to see change in the pattern of distribution of actin when cells were treated with recombinant and native protein. The 14-3-3 protein has ubiquitous distribution in yeast cells of *P. brasiliensis* (strain 18/S1) have a certain predilection cytoplasmic and preferably on the wall of this fungus at the time of interaction with epithelial cells. Treatment with botulinum toxin showed a significant reduction in infection rate, which indicates the involvement of Rho GTPases pathway in the *P. brasiliensis* infective process, contributing to a better understanding of the pathogenicity of this fungus, thus envisaging a possible blockade of the initial targets involved in parasite-host interaction. Our data may lead to a better understanding of *P. brasiliensis* interactions with host tissues and paracoccidioidomycosis pathogenesis.

INTRODUÇÃO

Os fungos, causadores de micoses sistêmicas utilizam mecanismos de patogenicidade, como capacidade de adesão, colonização, disseminação, sobrevivência em ambientes hostis e escape dos mecanismos de resposta imune para se estabelecer no hospedeiro e causar doença (Franco, 1987; Kurokawa, Sugizaki *et al.*, 1998; Van De Wouw e Howlett, 2011) e para isso, utilizam uma variedade de moléculas de superfície para se ligar a matriz extracelular da célula hospedeira e estabelecer infecção (Lengeler, Davidson *et al.*, 2000). Os mecanismos moleculares envolvidos desde o primeiro contato com o agente infeccioso até os estágios subsequentes da doença ainda são pouco conhecidos. Um passo necessário na colonização e, em última instância, no desenvolvimento de doenças por patógenos, está associado à sua habilidade de aderir às superfícies do hospedeiro. A capacidade de aderência é um fenômeno biológico vastamente distribuído, compartilhado por organismos diversos para capacitá-los a colonizar seus respectivos habitats. Uma colonização bem sucedida geralmente é um evento complexo e deve envolver proteínas da superfície do fungo e receptores celulares (Sohn, Senyürek *et al.*, 2006; Bhavsar, Auweter *et al.*, 2010). Dessa forma, o desenvolvimento da PCM depende de interações entre o fungo e componentes celulares do hospedeiro.

A paracoccidioidomicose é uma micose sistêmica granulomatosa causada pelos fungos dimórficos *Paracoccidioides brasiliensis* e *P. lutzii*, que podem infectar hospedeiros via inalação de propágulos do micélio, como artroconídios (San-Blas, Niño-Vega *et al.*, 2002). *P. brasiliensis* foi inicialmente classificado em três diferentes espécies filogenéticas, S1, PS2 e PS3 sendo a espécie S1, um grupo parafilético encontrado no Brasil, Argentina, Paraguai, Peru e Venezuela e a espécie PS3, um grupo monofilético encontrado apenas na Colômbia (Matute, Mcewen *et al.*, 2006). Mais tarde, 21 isolados (7 novos) de *P. brasiliensis* foram reclassificados com base na comparação de seqüências codificantes e não codificantes de diferentes genes, além de regiões ITS (*internal transcribed spacers*), em duas espécies filogenéticas, S1 e PS2, e Pb01 como uma nova espécie filogenética (Carrero, Niño-Vega *et al.*, 2008). Este achado foi confirmado por (Teixeira, Theodoro *et al.*, 2009), que descreveram então a nova espécie *P. lutzii* (Pb 01-like espécies). A correta taxonomia molecular deste fungo tem aberto novas possibilidades para o

estudo e o entendimento de suas relações ecoepidemiológicas com seus hospedeiros (Bagagli, Bosco *et al.*, 2006; Teixeira, Theodoro *et al.*, 2009).

Este fungo apresenta dimorfismo, pois os propágulos uma vez inalados podem sofrer diferenciação celular, assumindo forma de levedura multinucleada. A PCM se manifesta endemicamente na maioria dos países da América Latina, especialmente Brasil, Argentina, Colômbia e Venezuela. Estima-se que mais de 10 milhões de pessoas estejam infectadas com o fungo, embora apenas 2% desse total desenvolvam a forma aguda fatal ou crônica. O perfil majoritário de pacientes manifestando PCM nesses estágios é adulto do sexo masculino, trabalhador de zonas rurais e imunodeprimidos (Coutinho, Silva *et al.*, 2002; Barrozo, Benard *et al.*, 2010; Miranda, Gonçalves *et al.*, 2011; Teles e Martins, 2011). A PCM afeta o sistema retículo-endotelial sendo que a forma crônica tem alta frequência de envolvimento pulmonar e/ou mucocutâneo. A forma crônica severa multifocal pode causar também lesões granulomatosas no sistema nervoso central do paciente. Independente do órgão afetado, a doença evolui para a formação de sequelas com danos permanentes no indivíduo (Shikanai-Yasuda, Telles Filho *et al.*, 2006; Benard e Mendes Giannini, 2009).

A primeira descrição da PCM foi realizada em São Paulo, em 1908, por Adolpho Lutz, com relatos das características do agente etiológico, previamente denominado *Zymonema brasiliensis* por Splendore em 1912. Almeida (1930), após comparações com *Coccidioides immitis*, caracterizou o fungo como do gênero *Paracoccidioides* e da espécie *brasiliensis*. A classificação de *P. brasiliensis* como pertencente ao Reino: Fungi; Divisão Eumycota; Ordem: Onygenales; Família: Ajjelomycetaceae; Gênero: *Paracoccidioides*; Espécie: *brasiliensis* foi considerada devido ao não conhecimento de sua fase sexuada (Delnegro, Garcia *et al.*, 1991).

Atualmente muito da biologia do fungo já é conhecida. Sabe-se que a transição *in vitro* de micélio para levedura é desencadeada por uma mudança de temperatura do meio onde o fungo se encontra, sendo que a 26°C sua forma é de micélio e a 36°C de levedura, e a transição é reversível para os dois estados (Franco, 1987). Esse dado é importante porque 36°C é a temperatura do corpo humano, e a patogenicidade do fungo é necessariamente dependente

da transição do estado de micélio para levedura (San-Blas, Niño-Vega *et al.*, 2002; Felipe, Andrade *et al.*, 2005; Silva, Paes *et al.*, 2008).

O desenvolvimento de PCM está associado, principalmente, à virulência do fungo e à resistência do hospedeiro (Kashino, Fazioli *et al.*, 2000; Chiarella, Arruda *et al.*, 2007; Benard, 2008; Loures, Pina *et al.*, 2011). O padrão do granuloma formado em resposta aos diferentes isolados de *P. brasiliensis* em modelos experimentais de infecção exemplifica o fator relacionado à virulência do patógeno (Singer-Vermes, Burger *et al.*, 1989; Xidieh, Lenzi *et al.*, 1999; González, Gómez *et al.*, 2008; Pina, Bernardino *et al.*, 2008). Já a resistência do hospedeiro à infecção por *P. brasiliensis* está relacionada à formação de um granuloma epitelióide compacto e à capacidade de desenvolver uma resposta imunológica celular efetiva (Franco, 1987; Franco, Peracoli *et al.*, 1993; Borges-Walmsley, Chen *et al.*, 2002; Da Silva, Svidzinski *et al.*, 2009).

A virulência fúngica é descrita como um evento altamente complexo, resultante da expressão de múltiplos genes em diferentes estágios da infecção e cuja consequência poderia estar fortemente associada ao estabelecimento da patogênese. As etapas de adesão e a sobrevivência do patógeno no interior do hospedeiro mostram-se essenciais no estabelecimento da patogênese. Neste contexto, fatores importantes para o estabelecimento da infecção por fungos patogênicos vêm sendo descritos (Kwon-Chung, 1998; Mendes-Giannini, Taylor *et al.*, 2000; Odds, Gow *et al.*, 2001; Bailão, Schrank *et al.*, 2006; San-Blas e Niño-Vega, 2008; Taborda, Da Silva *et al.*, 2008; Del Vecchio, Silva *et al.*, 2009; Parente, Bailão *et al.*, 2011; Vallejo, Matsuo *et al.*, 2011).

Na PCM, os mecanismos envolvidos, desde o primeiro contato com o agente até os estágios subsequentes da doença são pouco conhecidos. Sabe-se, no entanto, que um amplo espectro de apresentações clínicas pode ocorrer variando desde formas cutâneas e sistêmicas, podendo atingir vários tecidos, com ênfase no pulmão (Franco, Peracoli *et al.*, 1993; Shikanai-Yasuda, Telles Filho *et al.*, 2006). A doença pode afetar diretamente os órgãos e, portanto, *P. brasiliensis* deve ter desenvolvido mecanismos que o capacitam aderir, invadir e extravasar barreiras impostas pelos tecidos do hospedeiro (Mendes-Giannini, Taylor *et al.*, 2000), sintetizando várias substâncias que participam direta ou indiretamente da relação parasito-hospedeiro.

P. brasiliensis é considerado um fungo intracelular facultativo, podendo aderir e invadir células epiteliais *in vivo* e *in vitro* (Mendes-Giannini, Taylor *et al.*, 2000). A capacidade de aderência e invasão do fungo é dependente da virulência do isolado (Hanna, Monteiro Da Silva *et al.*, 2000). A endocitose deste fungo ativa os microfilamentos e microtubulos, além de induzir apoptose (Mendes-Giannini, Hanna *et al.*, 2004). Embora a invasão de células não fagocíticas seja de extrema importância na patogênese da doença, a descrição de algumas adesinas, o conhecimento de genes e moléculas relacionados à adesão e invasão durante o processo infeccioso ainda é restrito.

A habilidade das células em interagir uma com as outras de maneira ordenada, depende de múltiplas interações adesivas, entre as células adjacentes e seu ambiente extracelular, mediada pelas moléculas de adesão celular (Trojanovsky, 1999; Miyoshi e Takai, 2008; Trojanovsky, 2009). Tais moléculas funcionam como receptores de superfície celular, os quais não apenas mantêm as células unidas, mas disparam sinais físicos e bioquímicos que regulam uma variedade de funções, tais como proliferação celular, expressão gênica, diferenciação, apoptose e migração celular. Também, como muitas outras moléculas de superfície celular, elas são utilizadas como porta de entrada para alguns patógenos. Assim, os microrganismos patogênicos subvertem as moléculas de adesão do hospedeiro para entrar e disseminar-se nas células hospedeiras, a fim de promover sua sobrevivência (Finlay e Falkow, 1997; Buckley, Pilling *et al.*, 1999; Merrell e Falkow, 2004; Vogelmann, Amieva *et al.*, 2004; Guttman e Finlay, 2009; Han, Antunes *et al.*, 2010; Han, Zhou *et al.*, 2010).

A adesão do patógeno implica no reconhecimento de carboidratos ou proteínas ligantes na superfície da célula do hospedeiro ou proteínas constituintes da matriz extracelular (MEC) (Patti e Höök, 1994; Latgé, 2010; Frases, Viana *et al.*, 2011). O grande número de tipos de tecidos que os fungos podem colonizar e infectar sugere que eles possuem uma variedade de moléculas de superfície para a adesão (Sullivan, Moran *et al.*, 2004). Os possíveis mecanismos responsáveis por determinar a patogenicidade e virulência de *P. brasiliensis* vêm sendo investigados extensivamente por meio de experimentos de interação *ex vivo* deste patógeno com células em cultura (Flavia Popi, Lopes *et al.*, 2002; De Mattos Grosso, De Almeida *et al.*, 2003;

Andreotti, Monteiro Da Silva *et al.*, 2005; Barbosa, Bão *et al.*, 2006; Mendes-Giannini, Andreotti *et al.*, 2006; Fernandes, Paes *et al.*, 2008; García Blanco, Muñoz *et al.*, 2011; Silva, Napimoga *et al.*, 2011) e de experimentos que utilizam ferramentas moleculares de *high throughput* tais como microarranjos de cDNA, inserção e/ou deleção gênica, interferência de RNA, entre outros (Felipe, Andrade *et al.*, 2003; Goldman, Dos Reis Marques *et al.*, 2003; Hwang, Hocking-Murray *et al.*, 2003; Idnurm, Reedy *et al.*, 2004; Nittler, Hocking-Murray *et al.*, 2005; Bailão, Schrank *et al.*, 2006; Marion, Rappleye *et al.*, 2006; Rappleye e Goldman, 2006; Tavares, Silva *et al.*, 2007).

Estudos caracterizaram componentes da matriz extracelular envolvidos na interação de *P. brasiliensis* com o hospedeiro. A MEC consiste de uma rede tridimensional de proteínas como colágeno, glicoproteínas não-colagênicas principalmente fibronectina e laminina, e proteoglicanas que parece refletir à capacidade proliferativa do fungo (Mendes-Giannini, Taylor *et al.*, 2000). Em geral, os genes envolvidos em adesão não são constitutivamente expressos, mas sim ativados quando influenciados no sítio de infecção no hospedeiro (Cheng, Clancy *et al.*, 2005; Verstrepen e Fink, 2009). O entendimento e identificação de moléculas envolvidas na adesão de microrganismos aos diferentes substratos no hospedeiro são importantes como novos alvos para tratamentos mais eficientes em micoses sistêmicas.

Algumas moléculas de *P. brasiliensis* já foram identificadas como ligantes de componentes da matriz extracelular. A gp43 foi a primeira a ser identificada como ligante de laminina (Vicentini, Gesztes *et al.*, 1994; Hanna, Monteiro Da Silva *et al.*, 2000; André, Lopes *et al.*, 2004). A glicoproteína de 43 kDa tem papel na aderência desde que soro anti-gp 43 inibiu 85% o processo de adesão em células Hella (Hanna, Monteiro Da Silva *et al.*, 2000). Estudos adicionais mostraram que em ensaios de afinidade de ligação, a gp43 foi capaz de se ligar tanto a fibronectina quanto a laminina. Em *P. brasiliensis*, algumas outras adesinas foram também descritas, e acredita-se que tenham papel importante em sua patogênese (Andreotti, Monteiro Da Silva *et al.*, 2005; González, Gómez *et al.*, 2005; Barbosa, Bão *et al.*, 2006; Mendes-Giannini, Andreotti *et al.*, 2006; Pereira, Bão *et al.*, 2007; Da Silva Neto, De Fátima Da Silva *et al.*, 2009; Donofrio, Calil *et al.*, 2009; Hernandez, Garcia *et al.*, 2011; Rezende, Borges *et al.*, 2011). Uma adesina de 30 kDa de *P. brasiliensis*, com

capacidade de ligação a laminina foi isolada sendo mais expressa num isolado de *P. brasiliensis* que apresentava alta capacidade de adesão (Andreotti, Monteiro Da Silva *et al.*, 2005). *P. brasiliensis* também apresentou em sua superfície celular, duas proteínas com massas moleculares de 19 e 32 kDa que interagem com diferentes proteínas da MEC, tais como laminina, fibrinogênio e fibronectina. Ensaio utilizando conídios de *P. brasiliensis*, pré-incubados com anticorpo monoclonal anti-32 kDa inibiram, de maneira dose-dependente, a aderência do fungo as proteínas da MEC (González, Gómez *et al.*, 2005; Hernandez, Garcia *et al.*, 2011). Recentemente análises da seqüência desta proteína a caracterizaram como uma hidrolase, e isolados silenciados por aRNA para esta apresentaram alterações na morfologia das células leveduriformes e redução da capacidade de aderência às células epiteliais humanas *in vitro* e diminuição da virulência em modelos de infecção em camundongos (Hernández, Almeida *et al.*, 2010; Hernández, Almeida *et al.*, 2011).

Moléculas de *P. brasiliensis* também foram estudados quanto a sua capacidade de produzir resposta imunológica em hospedeiros, entre estas proteínas foram descritas as de 57, 48 e 45 kDa (Casotto, 1990; Ferreira-Da-Cruz, Galvão-Castro *et al.*, 1992), uma proteína recombinante de 27 kDa (Ortiz, Garcia *et al.*, 1996; García Blanco, Muñoz *et al.*, 2011) e um antígeno circulante de 87 kDa (Gómez, Figueroa *et al.*, 1998) que revelou homologia com proteínas de choque térmico (Hsp) de vários organismos (Díez, Gómez *et al.*, 2002). Seis componentes protéicos sintetizados preferencialmente na fase leveduriforme de *P. brasiliensis* foram identificados, sendo altamente homólogos à catalase, frutose-1,6-bifosfato, aldolase, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, malato desidrogenase e triose fosfato isomerase de várias origens (Da Fonseca, Jesuino *et al.*, 2001; Carneiro, De Faria *et al.*, 2005; Barbosa, Bão *et al.*, 2006; Pereira, Bão *et al.*, 2007; Da Silva Neto, De Fátima Da Silva *et al.*, 2009). Outra proteína caracterizada foi a Hsp60 de *P. brasiliensis* e sua proteína recombinante foi reconhecida por soros de pacientes com paracoccidiodomicose (Izacc, Gomez *et al.*, 2001; Cunha, Zancopé-Oliveira *et al.*, 2002). Mais recentemente em *P. lutzii* foi identificado e caracterizado o fator de choque térmico (Paes, Mello-De-Sousa *et al.*, 2011). Costa *et al.*, 2002 estudaram as proteínas de 39 e 78 kDa presentes na fase

leveduriforme de *P. brasiliensis* em que o sequenciamento de aminoácidos revelou identidade à manosil e glicosiltransferase de várias origens (Costa, Gómez *et al.*, 2002).

Além dessas adesinas, também foram caracterizadas enzimas de *P. brasiliensis* que interagem com moléculas do hospedeiro, sendo consideradas então adesinas-like, como a GAPDH (glicose-6-fosfato desidrogenase) ligantes de laminina, fibronectina e colágeno tipo I (Barbosa, Bão *et al.*, 2006), TPI (triose fosfato isomerase) que também se liga a componentes da matriz, como laminina e fibronectina (Pereira, Bão *et al.*, 2007) e ICL (isocitrato liase) ligantes de laminina, fibronectina e colágeno tipo I e que tem a fosforilação como principal mecanismo de regulação (Zambuzzi-Carvalho, Cruz *et al.*, 2009; Cruz, Brock *et al.*, 2011). Posteriormente, foi isolada e caracterizada uma proteína de 70 kDa, denominada paracoccina, capaz de se ligar a N-acetil-glucosamina (Coltri, Casabona-Fortunato *et al.*, 2006; Ganiko, Puccia *et al.*, 2007; Dos Reis Almeida, De Oliveira *et al.*, 2010) e também foi demonstrado que glicoesfingolipídeos estariam envolvidos no processo adesivo de *P. brasiliensis* (Ywazaki, Maza *et al.*, 2011). Ainda a malato sintetase (MLS) de *P. brasiliensis*, que atua no ciclo do glioxalato e na via da alantoína, está localizada no citoplasma, além da superfície, principalmente de células em brotamento, é secretada, e atua como adesina, indicando seu papel multifuncional (Da Silva Neto, De Fátima Da Silva *et al.*, 2009; Zambuzzi-Carvalho, Cruz *et al.*, 2009).

Da Silva Castro *et al.* (2008) descreveram outra molécula presente na superfície do fungo que apresenta capacidade de aderir às proteínas da MEC, denominada *PbDfg5p*. Esta proteína foi caracterizada como pertencente à família das glicosil hidrolases e estaria relacionada com a formação e manutenção da parede celular de fungos. Em *P. brasiliensis*, utilizando microscopia eletrônica e a técnica de *imunogold*, foi evidenciada sua presença na parede celular, bem como em extratos protéicos de parede celular, obtidos a partir do tratamento de leveduras com β -1,3 endo glucanase. A *PbDfg5p* recombinante apresentou capacidade de se ligar a laminina, fibronectina, colágeno tipo I e tipo IV, além de apresentar um motivo RGD (Arg-Gly-Asp, motivo de ligação encontrado na fibronectina) em sua sequência predita, característica comum de algumas adesinas (Da Silva Castro, Barbosa *et al.*, 2008).

Em nossos estudos, a adesina de 30 kDa foi caracterizada através de sequenciamento de aminoácidos, mostrando que esta é uma proteína pertencente à família 14-3-3 de *P. brasiliensis* (Andreotti, Monteiro Da Silva *et al.*, 2005). Em geral, as proteínas 14-3-3 formam uma família altamente conservada de proteínas diméricas ácidas e receberam esta denominação em 1867 durante uma classificação sistemática de proteínas cerebrais, sendo que os números presentes no nome são baseados no fracionamento de coluna após cromatografia DEAE- celulose e sua mobilidade eletroforética (Delille, Sehnke *et al.*, 2001). Durante os anos 60-70 se acreditava que a família 14-3-3 estava limitada ao tecido nervoso e presente apenas entre os mamíferos, no entanto, as proteínas 14-3-3 foram encontradas praticamente em todos os eucariotos (Van Heusden, Wenzel *et al.*, 1992; Van Heusden, Griffiths *et al.*, 1995) e em todos os tipos de tecido (Delille, Sehnke *et al.*, 2001). O genoma humano contém vários genes distintos que codificam para proteínas pertencentes à família 14-3-3, denotados β , γ , ϵ , η , σ , τ , e ζ que funcionam como homo ou heterodímeros (Toker, Sellers *et al.*, 1992; Ichimura, Uchiyama *et al.*, 1995; Chaudhri, Scarabel *et al.*, 2003; Aitken, 2006). Essas proteínas 14-3-3 podem interagir com mais de 200 outras proteínas, apresentando assim uma ampla gama de funções.

As proteínas 14-3-3 exibem seqüências bastante conservadas entre as espécies, o que indica um alto grau de conservação funcional (Wang e Shakes, 1996). As proteínas 14-3-3 são um grupo de proteínas ácidas pequenas e altamente conservadas, que foram implicadas numa variedade de processos celulares em eucariotos (Darling, Yingling *et al.*, 2005; Van Heusden, 2009; Obsil e Obsilova, 2011). Contudo, apesar de já observada a função dessas proteínas em apoptose, transdução de sinal, regulação do ciclo celular e transcrição, seu exato papel nesses processos permanece desconhecido (Fu, Subramanian *et al.*, 2000). Esse grupo de proteínas deve funcionar como acessórias em vários processos, atuar como determinantes específicos que alteram a localização celular de outras proteínas, com as quais interagem e devem estar envolvidas na regulação direta de sua atividade enzimática (Van Hemert, Steensma *et al.*, 2001). As proteínas 14-3-3 também participam da regulação e organização do citoesqueleto celular através da ativação de Rho GTPases (Jin, Smith *et al.*, 2004), como mediadora nas mudanças do

citoesqueleto celular via integrinas, com importante papel na ativação de Rac e Cdc42 (Bialkowska, Zaffran *et al.*, 2003). Estudos utilizando queratinócitos demonstraram que proteínas 14-3-3 são capazes de interagir com integrinas e modularem sua capacidade de sinalização do lado extracelular (Santoro, Gaudino *et al.*, 2003; Wilker e Yaffe, 2004; Oh, Jang *et al.*, 2009). Além disso, sugeriram que esta interação induz desarranjos de hemidesmossomos na formação de contato focal, necessário para migração das células. Estes achados sugerem que as proteínas 14-3-3 participam da sinalização mediada por integrinas, tanto intracelular como extracelularmente (Santoro, Gaudino *et al.*, 2003; Wilker e Yaffe, 2004; Oh, Jang *et al.*, 2009).

As leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *Schizosaccharomyces pombe* têm dois genes que codificam para proteínas 14-3-3, *BMH1* e *BMH2* e *rad24* e *rad25*, respectivamente. Estas proteínas são essenciais nestas leveduras, como em eucariotos superiores, em que estas se ligam a numerosas outras envolvidas em uma variedade de processos celulares (Van Heusden e Steensma, 2006; Bruckmann, Hensbergen *et al.*, 2007). Além disso, o fungo filamentoso *Aspergillus nidulans* possui uma proteína com região conservada de alta homologia com 14-3-3 (*artA*) que previne a formação de septo. Entretanto, em vez de bloquear a septação, o aumento da expressão de *artA* causa grande demora na polarização dos conidióforos, sugerindo que essas proteínas tenham um importante papel na morfogênese da hifa (Kraus, Hofmann *et al.*, 2002; Kim, Islam *et al.*, 2011). A proteína 14-3-3 também exerce um papel fundamental na infecção de *Escherichia coli* enteropatogênica, uma vez que este patógeno secreta uma adesina denominada intimina que recruta componentes das células hospedeiras para modificar a arquitetura celular e assim conseguir invadir estas células e se multiplicar dentro delas. Tir é a principal proteína efetora que é recrutada para a membrana plasmática das células eucarióticas onde esta atua como receptor para a adesina bacteriana. Entre as proteínas recrutadas para o local da adesão, também estão proteínas do citoesqueleto que contribuem para a formação de um pedestal. Foi demonstrado que uma proteína 14-3-3 se liga especificamente à Tir de maneira independente de fosforilação, e que a interação ocorre durante o processo de infecção (Patel, Cummings *et al.*, 2006).

Won e colaboradores (2003) identificaram a proteína 14-3-3 como um substrato para a caspase-3. A proteína 14-3-3 foi clivada em resposta ao tratamento de células em cultura com indutores de apoptose, sugerindo que esta clivagem pode contribuir para o processo de morte celular. Em *S. cerevisiae*, a proteína 14-3-3 participa de processos celulares incluindo tráfego de vesículas, exocitose, podendo atuar primariamente no citoesqueleto de actina para regular as vesículas alvo (Roth, Birkenfeld *et al.*, 1999; Won, Kim *et al.*, 2003; Lottersberger, Panza *et al.*, 2006).

A invasão de *P. brasiliensis* afeta a estrutura do citoesqueleto das células epiteliais pulmonares e também de queratinócitos, interferindo em aspectos morfológicos da actina, tubulina e citoqueratina (Mendes-Giannini, Hanna *et al.*, 2004; Peres Da Silva, Matsumoto *et al.*, 2011). Também foi verificado que a proteína de 30 kDa de *P. brasiliensis* (proteína 14-3-3) causa modificação estrutural de microfilamentos polimerizados de actina e citoqueratina, além de induzir apoptose durante o processo de interação às células epiteliais, mas o exato mecanismo de como esse processo acontece permanece desconhecido (Andreotti, Monteiro Da Silva *et al.*, 2005; Mendes-Giannini, Andreotti *et al.*, 2006).

A família das proteínas Rho GTPase é conhecida por regular a dinâmica de organização do citoesqueleto e tráfego de membrana de processos fisiológicos como a proliferação celular, motilidade, polaridade, e crescimento (Sinha e Yang, 2008). Cdc42 foi caracterizado como um ponto de convergência na transdução de sinal e está envolvido em múltiplas vias de sinalização incluindo os receptores tirosina quinase e de citocinas, as proteínas G heterodiméricas e ao *stress* físico e químico. Cada vez mais efetores de Cdc42 são identificados e o maior desafio é o entendimento da especificidade desta via de sinalização (Sinha e Yang, 2008). Cdc42p foi primeiramente descoberto em leveduras sendo essencial para a formação do broto. A sinalização envolvida na polaridade celular, bem como no processo de reprodução é regulada por Cdc42p e isto está bem caracterizado neste modelo (Etienne-Manneville, 2004). Recentemente, o papel de Cdc42p foi descrito em *P. brasiliensis* como uma importante molécula para o controle de crescimento deste fungo na fase leveduriforme. Uma análise detalhada dos mecanismos moleculares ainda não caracterizados de PbCdc42p é de extrema importância

para o entendimento da interação parasita-hospedeiro além de fornecer mais informações sobre a regulação do crescimento celular e patogênese, não só de *P. brasiliensis*, mas também de outros fungos patogênicos humanos (Almeida, Cunha *et al.*, 2009). Além disso, e como demonstrado para outros fungos dimórficos, Cdc42p pode também desempenhar um papel importante durante a transição morfológica (Honing, Van Den Berg *et al.*, 2004; Lin, Grillitsch *et al.*, 2009).

A actina tem um papel importante, pois serve para acumular fisicamente Cdc42 em pontos específicos da membrana (Ayscough e Drubin, 1998). Já nas células de mamíferos, as Rho GTPases também são o centro de uma complexa via de sinalização que tem importante papel na adesão. A ativação dos receptores tirosina quinase estimulam Rho GTPase que por sua vez ativa as vias de Ras e MAPKs, mas ainda não é sabido como o mecanismo específico é determinado (Sinha e Yang, 2008). Em nosso laboratório, significativa inibição na invasão do fungo foi observada após pré-tratamento das células epiteliais com genisteína, que é um inibidor específico de proteínas tirosina-quinase (PTK) localizadas na membrana plasmática das células epiteliais. Esses resultados sugerem que a inibição de PTK é importante na transdução de sinal durante os eventos iniciais nos processos de adesão e invasão de *P. brasiliensis* em células epiteliais de mamíferos, estimulando ainda mais a procura do mecanismo desta via (Monteiro Da Silva, Andreotti *et al.*, 2007).

A invasão celular pode ocorrer, uma vez que muitos microrganismos patogênicos têm a capacidade de induzir sua internalização em células epiteliais, ativando mecanismo de fagocitose forçada, em que sinais extracelulares específicos podem estimular o rearranjo do seu citoesqueleto, no sítio de contato com o microrganismo, passando a se comportar como um fagócito “não profissional” (Swanson e Baer, 1995; Swanson e Watts, 1995; Falcone, Cocucci *et al.*, 2006; Kerr e Teasdale, 2009; Lim e Gleeson, 2011). Células não fagocíticas como as epiteliais e fibroblastos não codificam receptores CR₃ e, normalmente, não fagocitam. Assim, muitos patógenos intracelulares são capazes de entrar nestas células, talvez, por mecanismos envolvendo integrinas e o citoesqueleto (Mendes-Giannini, Hanna *et al.*, 2004; Mendes-Giannini, Soares *et al.*, 2005).

Os mecanismos de sinalização propostos para uma variedade de células demonstram a participação de receptores de superfície, de proteínas associadas à membrana e citosólicas para a resposta destas células frente a estímulos do meio extracelular. Assim, eventos extracelulares podem modular resposta intracelular por sinal propagado a partir da membrana a alvos intracitoplasmáticos específicos. Na dependência do tipo de estímulo, respostas de sinalização diferentes são desencadeadas. Estímulos de proliferação ou diferenciação celular ativam receptores de fatores de crescimento, que por sua vez modulam uma resposta sequencial auto-regulada de proteínas *Raf*, MEK, ERK e resposta nuclear. Por sua vez, processos inflamatórios, de *stress* e/ou morte celular tem resposta sinal diferenciada, ativada por receptores de citocinas na membrana celular e propagadas consecutivamente pela sinalização de MEKKs, MKKs e JNK/p38 (Cooper, 2000).

O modelo atualmente proposto para a interação entre matriz e propagação de sinal intracelular é a ligação entre integrinas associadas à membrana e um receptor denominado FAK (*focal adhesion kinase*). O sinal emitido pela interação integrina/FAK modula novos sinais intracelulares seqüenciais associados ao complexo protéico Grb2/Sos, proteína *Ras* e MAPKs (Cooper, 2000). Ainda, frente a este estímulo, o sinal intracelular ativa proteínas de citoesqueleto, como Rho, Rac e Cdc42 e resulta na modificação conformacional da célula. Complexos focais de adesão e a ativação de Rac/Cdc42 levam ao estímulo de proteínas quinases ativadas por mitógenos e *stress* (MAPK), p38 e c - Jun NH₂-terminal quinase (JNK) (Bagrodia, Dérijard *et al.*, 1995; Zhang, Han *et al.*, 1995; Hall, 2005). Em muitos tipos celulares, Rho, Rac e Cdc42 são partes de uma interconexão nas vias de sinalização para ativar cascatas de vários sinais celulares (Hall, 2005; Flannagan, Jaumouillé *et al.*, 2011; Huang, Satchell *et al.*, 2011).

Pouco é conhecido das vias de sinalização que controlam as mudanças celulares quando da interação de *P. brasiliensis* com células do hospedeiro. Assim, em *P. brasiliensis* ainda são desconhecidas as prováveis vias capazes de ativar sinais citosólicos associados ou não durante o processo de invasão ligado ao receptor tirosina quinase ou outros, ou a via de transdução de sinal envolvendo citoesqueleto.

PROPOSIÇÃO

O principal objetivo deste trabalho foi verificar o papel da proteína recombinante 14-3-3 de *P. brasiliensis* (já descrita como um ligante de laminina) na interação do fungo com células epiteliais de linhagem contínua. Para tanto, foi produzida a proteína recombinante, seu anticorpo e verificada a sua localização, tanto nas formas leveduriformes do fungo como no processo de interação.

OBJETIVOS

- Clonar o cDNA codificante da proteína 14-3-3 de *P. brasiliensis* e sua expressão heteróloga em modelo bacteriano,
- Verificar a localização da proteína 14-3-3 de *P. brasiliensis*, tanto nas formas leveduriformes como na interação com células epiteliais *in vitro* em ensaios imunocitoquímicos em nível ultra-estrutural,
- Verificar a participação da família Rho GTPases na interação de *P. brasiliensis* às células epiteliais, avaliando a despolimerização de actina e a ativação de Rho, Rac e Cdc42,

METODOLOGIA

1. Cultura de células

Neste estudo, foi utilizada a linhagem contínua A549, células epiteliais respiratórias - pneumócitos tipo I, (obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro – CR039). As células foram cultivadas em meio HAM F-12, suplementado com 10% de soro fetal bovino e mantidas a temperatura de 36.5°C e 5% de CO₂. Decorridos 3 a 4 dias, as garrafas de células foram submetidas à tripsinização. Essa linhagem foi utilizada para o reisolamento de *P. brasiliensis*, para a verificação da imunolocalização da proteína 14-3-3 durante a infecção e para elucidar o papel da proteína 14-3-3 como moduladora dos eventos sinalizadores para o processo de invasão de *P. brasiliensis* às células epiteliais.

2. Microrganismo

Foi empregado o isolado 18 de *P. brasiliensis* na fase leveduriforme, advindo de caso de paracoccidioidomicose no Brasil e procedente da micoteca da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FM-USP). Durante a realização deste trabalho, o isolado foi mantido em meio de Fava Netto em estufa a 37°C e repicado a cada 3-4 dias. Após 10 repiques, o isolado foi passado em monocamada de células A549 e reisolado em meio de Fava Netto, para a recuperação da virulência.

3. Clonagem do cDNA codificante da proteína 14-3-3 em vetor de expressão

O clone de cDNA com a região completa da proteína 14-3-3 (acesso no GenBank número AY462124) (Assis, Cunha *et al.*, 2003) foi amplificado por PCR utilizando sequências iniciadoras *sense* e *antisense* desenhadas especificamente para esta sequência. O produto resultante foi subclonado no vetor de clonagem pCR2.1-TOPO. Após a ligação, o plasmídeo contendo a sequência gênica da proteína 14-3-3 (plasmídeo recombinante) foi então utilizado para a transformação de bactérias *E.coli* DH5 α quimiocompetentes. Essas bactérias foram semeadas em meio LB (Luria-Bertanni) suplementado com kanamicina 50 μ g/mL e incubadas a 37°C para a seleção das colônias

resistentes. As bactérias selecionadas foram então avaliadas por PCR para o rastreamento dos clones positivos.

Após a verificação desta PCR, confirmando as colônias que possuíam o plasmídeo recombinante, foi realizada uma miniprep para a extração desses plasmídeos. Para tanto, foi utilizado o kit *Flexi Prep* (GE Healthcare) de acordo com as instruções do fabricante e o DNA obtido foi avaliado em agarose 0,8%. A quantificação foi de 1 µg de DNA por colônia de partida. Com esses dados iniciamos as digestões enzimáticas para colocar o inserto no vetor de expressão (pET32a) e assim iniciar o processo de expressão heteróloga da mesma.

A primeira restrição foi realizada com a enzima Sal I (Fermentas) em tampão O, de acordo com as instruções do fabricante, por 3 horas a 37°C. O vetor de expressão (pET32a) também foi clivado com a mesma enzima para prepará-lo para receber o inserto. Após a incubação, realizou-se eletroforese em agarose 0,8% para verificar a eficiência da clivagem.

A segunda restrição foi realizada com a enzima Xho I (Promega) em tampão D, de acordo com as instruções do fabricante, por 2 horas a 37°C. O vetor de expressão (pET32a), mais uma vez foi clivado com a mesma enzima para prepará-lo para receber o inserto. Após a incubação, realizou-se eletroforese em agarose 0,8%, aplicando todo o material obtido na clivagem do inserto e este foi purificado através do gel, utilizando o kit *GFX purifications DNA bands* (GE Healthcare) de acordo com as instruções do fabricante.

Após a purificação este inserto foi ligado ao vetor de expressão (pET 32a), utilizando a enzima Ligase (Fermentas) por 18h a 16°C.

4. Expressão heteróloga da proteína 14-3-3 de *P. brasiliensis*

Após a clonagem em vetor de expressão pET32a, os plasmídeos contendo a sequência da proteína 14-3-3 foram inseridos através de choque térmico em bactérias quimiocompetentes BL21DE3 para a expressão heteróloga da proteína recombinante. Para tanto, essas bactérias foram crescidas em meio LB suplementado com ampicilina 100µg/mL e glicose 2mM e incubadas a 37°C. Após 16h de crescimento, essas bactérias foram novamente semeadas em meio LB suplementado com ampicilina 100µg/mL e

incubadas a 37°C sob agitação de 200rpm até atingir DO_{600nm} de 0,6. Neste ponto, adicionou-se IPTG 0,4mM e incubou-se por diferentes períodos de tempo para a determinação das condições ótimas para a indução da proteína recombinante. A cada hora, uma alíquota foi recolhida e avaliada por SDS-PAGE.

5. Purificação da proteína 14-3-3 recombinante de *P. brasiliensis*

Após a confirmação da obtenção da proteína recombinante e comprovação de sua solubilidade após sonicação, realizou-se macro indução, utilizando 0,4mM de IPTG, por 5h a 37°C. Após este período, as células foram centrifugadas, lisadas (50mM fosfato de sódio, 20mM de imidazol, 200mM de cloreto de sódio, 1mM DTT, 1xPLAC, 1mM PMSF), sonicadas e novamente centrifugadas. O sobrenadante deste processo de lise foi utilizado para a purificação através de cromatografia de afinidade.

Para o processo de purificação utilizou-se coluna de níquel NiNTA-5mL no AKTA FPLC (GE Healthcare) com os seguintes tampões: lavagem (50mM fosfato de sódio, 20mM Imidazol, 300mM cloreto de sódio), eluição (50mM fosfato de sódio, 250mM Imidazol, 300mM cloreto de sódio) e as frações foram recolhidas e analisadas por SDS-PAGE.

Por não ter obtido a proteína 14-3-3 recombinante completamente purificada, foi também empregada a técnica de eletroeluição para a purificação completa da proteína em questão. Para isso, as frações ricas na proteína 14-3-3 recombinante foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida a 10%. Após corrida, os géis foram corados com Coomassie Azul Brilhante G-250, segundo Neuhoff et al. (1988), e a banda correspondente foi removida e eletroeluída em tampão glicina (192mM Glicina; 25mM Tris base, 0,1%SDS) em membrana de diálise a 10mA, por 4h a 4°C. Para a verificação da proteína purificada eletroeluída foi realizado novamente SDS-PAGE.

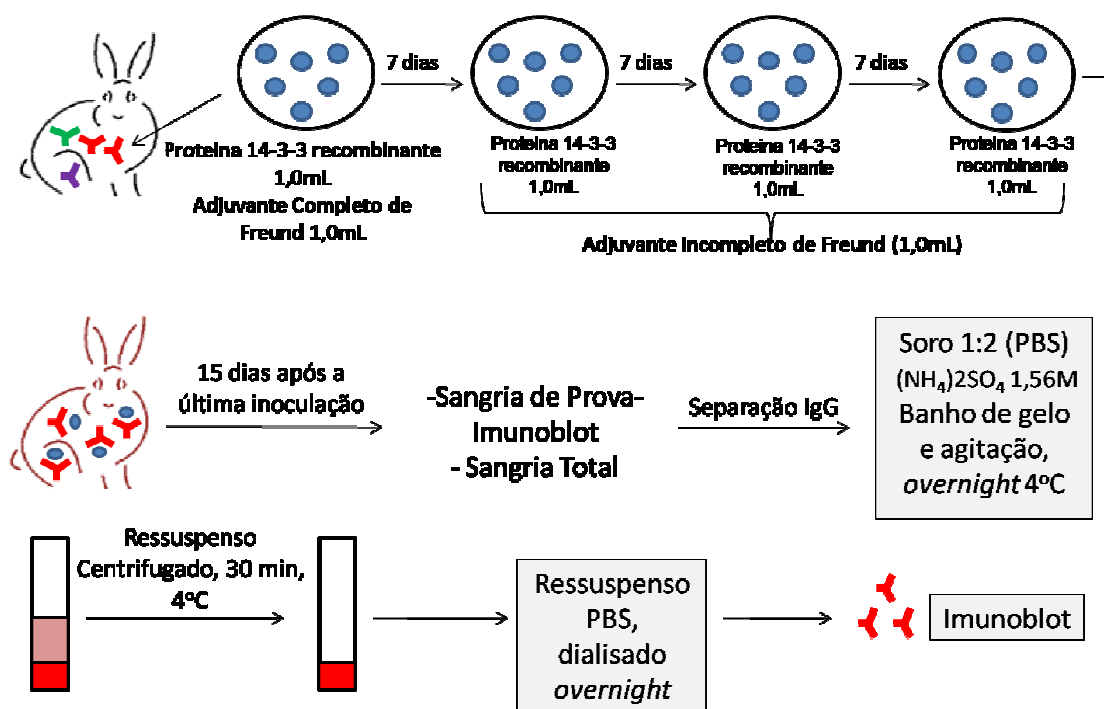
Após a obtenção da proteína purificada, a cauda de histidina foi retirada utilizando Thrombin CleanCleave™ Kit (Sigma Aldrich) segundo as recomendações do fabricante. As frações clivadas foram analisadas por SDS-PAGE.

6. Confirmação da obtenção da proteína 14-3-3 recombinante de *P. brasiliensis* por LC-MS/MS

Para confirmar que a proteína recombinante obtida e purificada tratava-se realmente da proteína 14-3-3 de *P. brasiliensis*, estas bandas obtidas em gel de poliacrilamida 10% após a purificação utilizando eletroeluição, foram recortadas e submetidas à digestão tríplica, utilizando 10ng/mL de Tripsina Gold (Promega). Ao final da digestão, os fragmentos trípticos foram submetidos à LC-MS/MS utilizando Cap-LC acoplado a Q-TOF Ultima API mass spectrometer (Waters, UK) do Laboratório Max Feffer de Genética de Plantas da ESALQ- USP. Os espectros obtidos foram processados utilizando ProteinLynx v4.0 software (Waters) e MASCOT MS/MS Ion Search (www.matrixscience.com), e as sequências encontradas foram pesquisadas no SwissProt databank.

7. Produção de anticorpos

Com a proteína purificada, foi produzido anticorpo policlonal em coelho para o melhor estudo desta proteína durante a interação fungo-hospedeiro. Para isso, 1,0mg/mL da proteína foram inoculados por via intradérmica em coelhos machos albino provenientes do Biotério Central da UNESP-Botucatu, intercalando as inoculações a cada 7 dias, sendo que na primeira inoculação, a proteína foi emulsificada com adjuvante completo de Freund e nas seguintes com o adjuvante incompleto de Freund. Decorridos 15 dias da última inoculação foi realizada uma sangria de prova e a avaliação do título de anticorpos produzidos foi feita através da técnica de imunoblot. Quando foi obtido um bom título de anticorpos (reatividade superior a 1/100), foi realizada a sangria total e o soro obtido foi precipitado com sulfato de amônio 1,56M, pH6.5, novamente titulado, aliquotado e estocado a -70°C. O esquema de imunização encontra-se ilustrado abaixo:



8. Preparo de antígeno filtrado de cultura

Para a obtenção do antígeno filtrado de cultura (componentes exocelulares) foi utilizado o isolado 18 de *P. brasiliensis* fase “L” (com alta capacidade de adesão às células epiteliais). As formas leveduriformes, com cinco dias de crescimento em meio de Fava Netto, foram inoculadas em 500mL de meio de Negroni modificado por (Siqueira, 1982) e incubado a 37°C por 15 dias, em estufa agitadora. Após este período, as células foram tratadas com Timerosal na concentração final de 0,2 g/L e foram incubadas nas mesmas condições durante quatro dias. A partir daí, o filtrado de cultura foi concentrado contra polietilenoglicol 20.000 (Sigma), analisado quanto aos teores protéicos pelo método de Bradford (BioRad) e avaliado por SDS-PAGE. As alíquotas foram armazenadas a -70°C. Este antígeno foi utilizado para verificar a especificidade do anticorpo policlonal anti-14-3-3 recombinante produzido.

9. Preparo de antígeno *cell free*

O extrato *cell-free* foi obtido do isolado 18 de *P. brasiliensis*, na fase leveduriforme “L” (com alta capacidade de adesão às células epiteliais). A concentração protéica do extrato foi quantificada pelo método de Bradford (BioRad) e em seguida as amostras foram avaliadas por SDS-PAGE.

10. Análise por *Western blot*

Os géis, com a proteína 14-3-3 recombinante purificada resolvidos por eletroforese uni e bidimensional, foram transferidos para membranas de nitrocelulose como descrito por (Towbin, Staehelin *et al.*, 1979), onde se realizou a reação com o anticorpo policlonal obtido contra a proteína 14-3-3 recombinante. Como anticorpo secundário foi utilizado anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase. A reação foi revelada com o substrato cromógeno, consistindo de 0,005g de diaminobenzidina (DAB) diluída em 30 mL de PBS acrescido de 150 μ L de água oxigenada. O controle negativo foi realizado com soro de coelho não imunizado (soro pré-imune).

11. Avaliação da viabilidade celular

Para a avaliação da viabilidade celular tanto da proteína 14-3-3 recombinante quanto da proteína 14-3-3 nativa, foram preparadas placas de 96 wells com $2,5 \times 10^3$ cels/mL, que foram incubadas a 36,5°C com 5% de CO₂, por 24 horas (HUSOY *et al.*, 1993). Foi realizado o ensaio do MTT (3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) (Sigma), na concentração de 5mg/mL, conforme MOSSMAN e colaboradores (1983) com algumas modificações.

A avaliação da viabilidade celular pelos métodos colorimétricos com sais tetrazólicos, como a reação com o sal de MTT, é determinada pela redução do sal em derivado azul de formazana, o qual é um precipitado formado pela ação da enzima succinato desidrogenase, produto da respiração mitocondrial; desta forma, este método avalia de forma quantitativa a sobrevivência e proliferação celular, uma vez que a conversão do sal MTT em formazana ocorre somente em células vivas e a quantidade do precipitado é proporcional ao número de células vivas (Denizot e Lang, 1986; Gerlier e Thomasset, 1986; Ferrari, Fornasiero *et al.*, 1990). O precipitado de formazana apresenta coloração azul e com a adição de um solvente orgânico é possível avaliar a cor e intensidade (Denizot e Lang, 1986).

As proteínas 14-3-3, nativa e recombinante, foram avaliadas nas concentrações de 5 e 50 μ g/mL. As placas foram incubadas a 37°C, ao abrigo da luz por diferentes períodos de tempo. Em seguida as soluções foram

retiradas e adicionados 10µL da solução de MTT (5mg/mL) e novamente as placas foram incubadas a 37°C por um período de 4 horas, conforme descrito por (Denizot e Lang, 1986; Gerlier e Thomasset, 1986; Ferrari, Fornasiero *et al.*, 1990). Após o tempo de incubação foi observado formação de precipitado escuro nas concentrações onde as células encontraram-se vivas; a solução reagente foi retirada e foram adicionados 100µL do solvente isoprano para diluir o precipitado e desta forma realizar a leitura pela alteração da cor do meio de amarelo para roxo. Como controle positivo do teste foi utilizado, peróxido de hidrogênio. Foram realizadas as leituras espectrofotométricas das placas em leitor de microplacas ELISA (BioRad modelo 3550) com comprimento de onda de 570nm. A percentagem de células viáveis foi calculada através da fórmula abaixo:

$\text{células viáveis \%} = \text{média do teste} \times 100 / \text{média do controle negativo}$

As análises de citotoxicidade foram realizadas em duplicata com três experimentos independentes. Também foi utilizado um controle negativo com células não tratadas com as proteínas, sendo esta leitura considerada um total de 100% de células vivas neste ensaio.

12. Ensaio de inibição da interação de *P. brasiliensis* com células epiteliais utilizando a proteína 14-3-3 recombinante.

Os ensaios de inibição da infecção foram realizados sobre lamínulas em placas de 24 orifícios. Para isso, monocamadas de pneumócitos (células A549) foram formadas por aproximadamente 24h em meio HAM-F12 (Cultilab). Em seguida, essas monocamadas foram tratadas com 25ug/mL da proteína 14-3-3 recombinante purificada por 1h a 37°C. Como controle foi utilizado 25ug/mL de albumina bovina (BSA). Depois de decorrido o tempo de tratamento, as células foram devidamente lavadas e infectadas com suspensões padronizadas de 10⁶cels/mL de *P. brasiliensis*. Os tempos de incubação foram de 2h, 5h, 8h e 24h. Foram realizadas duplicatas em três experimentos independentes. Após o tempo de infecção, as lamínulas foram lavadas e fixadas com paraformaldeído 4% por 1h a temperatura ambiente. Após a fixação, as lamínulas foram coradas por Giemsa e observadas em microscópio óptico. Contagens do número de

fungos foram realizadas em 5000 células, determinando-se a porcentagem total de infecção para verificar a interferência da proteína 14-3-3 no processo de infecção. Os dados foram confirmados pela contagem de unidades formadoras de colônias (CFUs). O ensaio foi realizado da mesma maneira, mas em placas de 24 orifícios sem lamínulas. Decorrido o tempo de infecção, as células foram lavadas, lisadas com água e plaqueadas em meio de Fava Netto suplementado com 4% de soro fetal bovino. Após 4 dias, as CFUs foram contadas e os dados foram estatisticamente analisados utilizando o software *Origin Pro v7.5*, com o teste de ANOVA *one way*, coeficiente de Tukey e nível de significância $p \leq 0,05$.

13. Marcação com faloidina para observação dos filamentos de actina durante a interação da proteína 14-3-3 recombinante com células A549

Estudos prévios de nosso grupo com a proteína 14-3-3 nativa haviam demonstrado que esta proteína interfere no citoesqueleto de actina. Para confirmar, se a proteína recombinante mantinha essa característica, foram realizados ensaios de imunofluorescência utilizando faloidina. A faloidina é uma toxina que se liga à actina polimérica, estabilizando-a interferindo com o retículo endoplasmático e outras estruturas ricas em actina. Para a reação de imunofluorescência, foram preparadas placas de 96 orifícios contendo as células epiteliais que foram tratadas com a proteína 14-3-3 recombinante ou infectadas com o inóculo de *P. brasiliensis* (10^4 cels/mL) por diferentes períodos de tempo. Após os períodos de incubação, as células foram lavadas e fixadas com paraformaldeído 4%. Após a fixação, as células foram permeabilizadas, bloqueadas e incubadas com soro anti 14-3-3 1:100 por 1h à temperatura ambiente. A seguir foi adicionado soro anti-IgG de coelho conjugado com Alexa Fluor 594 1:400, por 1h a temperatura ambiente. Terminada a marcação com anti 14-3-3, adicionou-se faloidina-FITC 1:50 em Azul de Evans, por 50 minutos a 37°C. Em seguida realizou-se a marcação do núcleo celular com DAPI 1µg/mL e então as placas foram analisadas no *In Cell Analyzer 2000* (GE Healthcare).

14. Técnica de Imunocitoquímica em nível ultra-estrutural para localização da proteína 14-3-3 em *P. brasiliensis* (formas leveduriformes) e durante sua interação com células A549

Com a finalidade de determinar a localização subcelular da proteína 14-3-3 de *P. brasiliensis*, foi realizada a técnica de imunocitoquímica em nível ultraestrutural através de imunogold. Para isso, uma suspensão de células leveduriformes de *P. brasiliensis* e células A549 infectadas com *P. brasiliensis* (10^8 cels/ml) foram fixadas (2,5% v/v glutaraldeído em tampão cacodilato de sódio 0,1M pH7,2) por 24h a 4°C e enviadas para o serviço de microscopia eletrônica do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB-I) da USP-SP para o emblocamento e preparo dos cortes ultrafinos. Uma vez preparados os cortes, estes foram coletados em telas de níquel e submetidos à reação de imunocitoquímica utilizando como anticorpo primário soro anti- 14-3-3 produzido em coelho 1:50 e como anticorpo secundário, soro anti-IgG de coelho produzido em cabra marcado com partículas de ouro coloidal de 10nm de diâmetro (SIGMA G-3779) 1:10, como controle foi utilizado também como anticorpo primário soro pré imune de coelho 1:50. Ao final, para a melhor estabilização da reação de imunocitoquímica, os cortes foram fixados com glutaraldeído a 2,5% em tampão cacodilato 0,1M, pH 7,2 a temperatura ambiente e então as telas foram secas, contrastadas e analisadas em microscópio de transmissão eletrônica, Jeol 1010 (Jeol, Tokyo, Japan) do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB-I) da USP-SP.

15. Efeito de Rho, Rac e Cdc42 na internalização de *P. brasiliensis* em células A549.

15.1 Ensaio de inibição utilizando toxina B de *Clostridium difficile*

Para melhor caracterizar os mecanismos de recrutamento de actina, pneumócitos (A549) foram pré tratados por 30 min a 37°C com toxina B de *Clostridium difficile*, um amplo inibidor dos membros da família Rho GTPase. A seguir foi realizado o ensaio de infecção com monocamadas celulares tratadas e não tratadas com a toxina B. Para isso, as monocamadas foram infectadas com suspensões padronizadas de 10^6 cels/mL de *P. brasiliensis*. Os tempos de infecção foram de 2h, 5h e 24h. Após decorridos os tempos de infecção, as monocamadas foram lavadas e lisadas com água e o lisado foi plaqueado em

meio de Fava Netto suplementado com 4% de soro fetal bovino. Foram realizadas duplicatas em três experimentos independentes. Após 4 dias, as CFUs (Unidades Formadoras de Colônias) foram contadas e os dados foram estatisticamente analisados utilizando o software *Origin Pro v7.5*, com o teste de ANOVA *one way*, coeficiente de Tukey e nível de significância $p \leq 0,05$.

15.2 Imunofluorescência para verificar expressão de Rac e Cdc42

Para a reação de imunofluorescência, foram preparadas placas de 96 orifícios contendo as células epiteliais que foram tratadas com a proteína 14-3-3 recombinante ou infectadas com o inóculo de *P. brasiliensis* (10^4 cels/mL) por diferentes períodos de tempo. Após os períodos de incubação, as células foram lavadas e fixadas com paraformaldeído 4%. Após a fixação, as células foram permeabilizadas, bloqueadas e incubadas com soro anti-14-3-3 1:100 por 1h a temperatura ambiente. A seguir foi adicionado soro anti-IgG de coelho conjugado com Alexa Fluor 594, 1:400, por 1h a temperatura ambiente. Terminada a marcação com o soro anti-14-3-3, adicionou-se anti-Rac ou anti-Cdc42 1:100, por 1h a 37°C. A seguir adicionou-se soro anti-IgG de camundongo conjugado com Alexa Fluor 488 por 1h a 37°C. Por fim, realizou-se a marcação do núcleo celular com DAPI 1µg/mL e então as placas foram analisadas no *In Cell Analyzer 2000* (GE Healthcare).

15.3 Análise da expressão de Rac e Cdc42 por citometria de fluxo

Foram preparadas placas de 6 orifícios contendo as células epiteliais que foram tratadas com a proteína 14-3-3 recombinante ou infectadas com o inóculo de *P. brasiliensis* (10^6 cels/mL) por diferentes períodos de tempo. Para o ensaio de citometria de fluxo, após a incubação, as células foram lavadas, removidas das placas, utilizando tripsina e fixadas com paraformaldeído 4%. A reação foi realizada utilizando um anticorpo monoclonal diluído 1:100 (anti-Rac ou anti-Cdc42) em PBS - saponina 0,5% seguido de adição do soro anti-IgG de camundongo conjugado com ficoeritrina (PE). Ao final, a reação foi fixada com paraformaldeído 1% e analisada em citômetro de fluxo BD FACS Canto (Becton Dickison Company).

RESULTADOS

1. Clonagem do cDNA codificante da proteína 14-3-3 em vetor de expressão

O RNA total do isolado 18 de *P. brasiliensis* (S1) foi extraído por meio da técnica do Trizol, analisado em agarose 1% (Figura 1A) e a concentração foi de 4 μ g/ μ L (260nm) e a pureza de 1,8 (relação 260/280nm), baseado em leitura espectrofotométrica.

O cDNA foi sintetizado através da reação de RT –PCR utilizando os iniciadores de oligoDT e o produto das reações foi purificado a partir do Kit Qiagen segundo recomendações do fabricante (Figura1B)

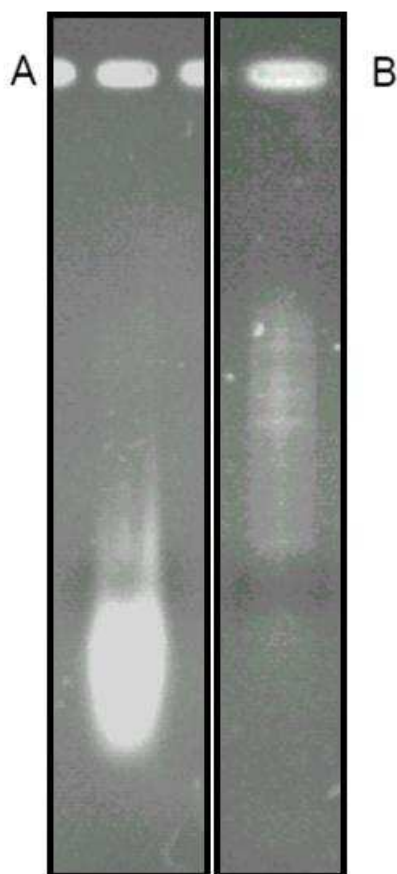


Figura 1: Eletroforese em agarose 1% corada com brometo de etídio. A: Extração de RNA do isolado 18 de *P. brasiliensis*. B: cDNA sintetizado e purificado.

O cDNA obtido foi então utilizado para a obtenção do gene codificante para a região completa da proteína 14-3-3 (acesso no GenBank número AY462124) (Assis et al, 2003). O inserto foi amplificado por PCR utilizando iniciadores *sense* e *antisense* desenhados (Figura 2).

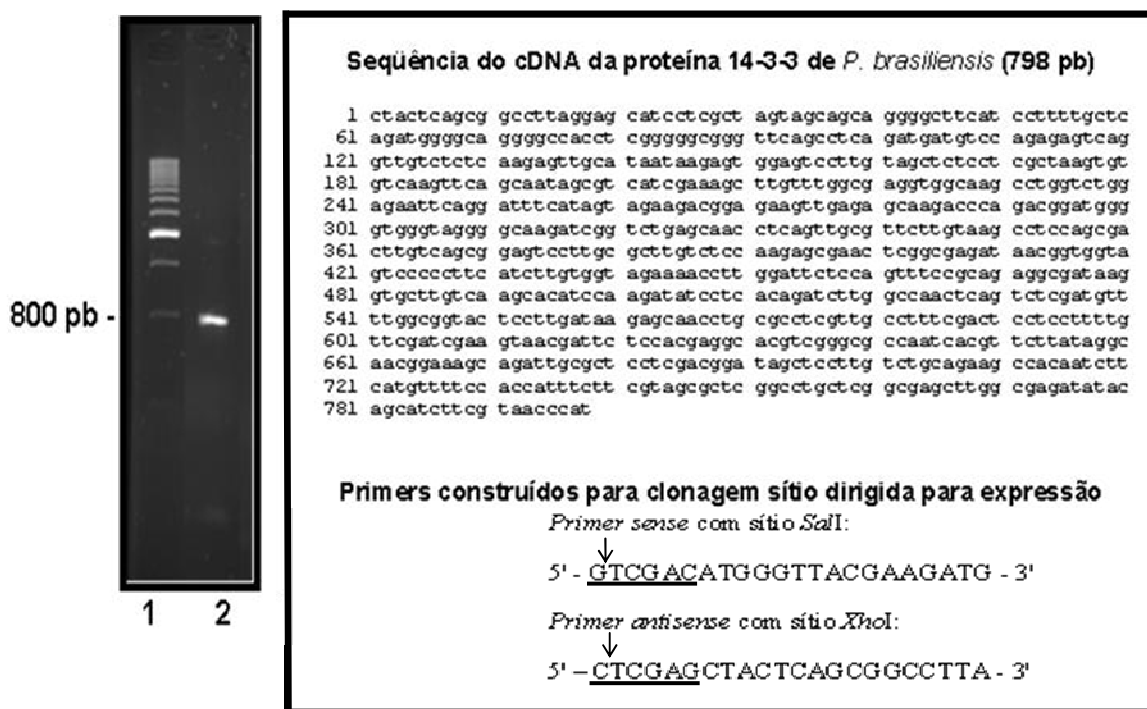


Figura 2: (Direita) Esquema representativo da seqüência de cDNA da proteína 14-3-3 de *P. brasiliensis* (acesso no GenBank número AY462124) e dos iniciadores desenhados especificamente para clonagem sítio dirigida para expressão no vetor pCR2.1-TOPO. (Esquerda) Resultado da PCR para amplificação da seqüência de cDNA da proteína 14-3-3 de *P. brasiliensis* utilizando os iniciadores específicos desenhados. 1-marcaador molecular 1kb (Invitrogen); 2- amplicon de aproximadamente 800pb (inserto).

Em seguida, foi realizada a ligação deste inserto no vetor de clonagem pCR2.1-TOPO e este plasmídeo recombinante foi utilizado para transformar bactérias *E.coli* DH5 α quimiocompetentes. Foram selecionadas cinco colônias e estas foram avaliadas por PCR para selecionar os transformantes positivos (Figura 3).

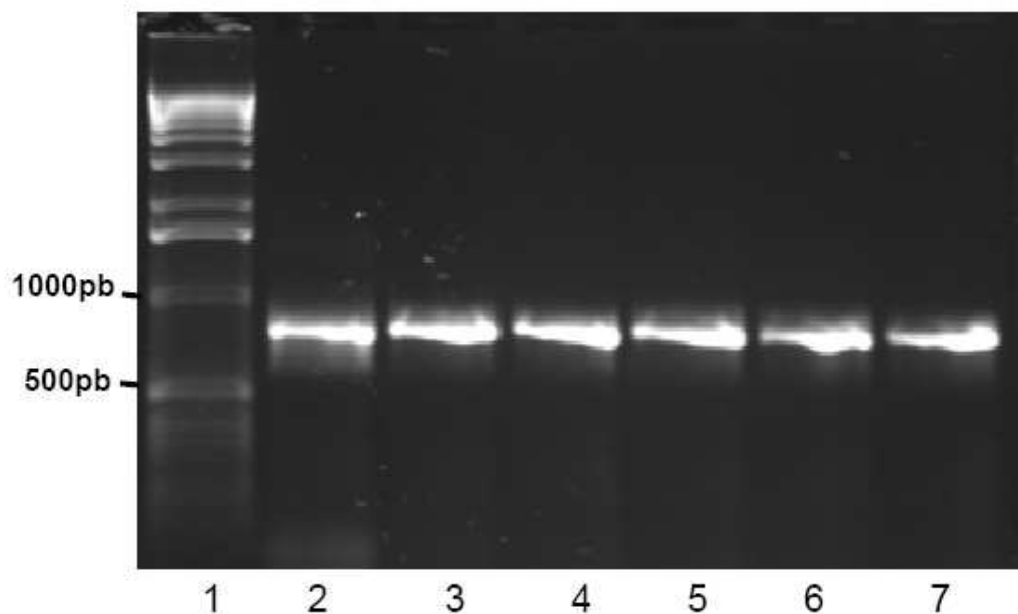


Figura 3: Eletroforese em gel de agarose para verificar a PCR de confirmação da presença do inserto nas colônias selecionadas. 1-marcador molecular 1kb (Invitrogen); 2-controle positivo (produto de PCR), 3 a 7- PCR das colônias de 1 a 5, respectivamente, demonstrando a amplificação do inserto como resultado positivo da clonagem.

Após a confirmação das colônias que possuíam o plasmídeo recombinante, foi realizada uma miniprep utilizando o kit *Flexi Prep* (GE Healthcare) de acordo com as instruções do fabricante e o DNA obtido foi quantificado em gel de agarose 0,8%. A quantificação foi de 1 μ g de DNA por colônia de partida. Em seguida realizaram-se as restrições para a posterior ligação do inserto no vetor de expressão.

Assim, a primeira restrição foi realizada com a enzima *Sal I* (Fermentas), por 3 horas a 37°C. Após a incubação, realizou-se eletroforese em gel de agarose 0,8% para verificar a eficiência da clivagem (Figura 4).

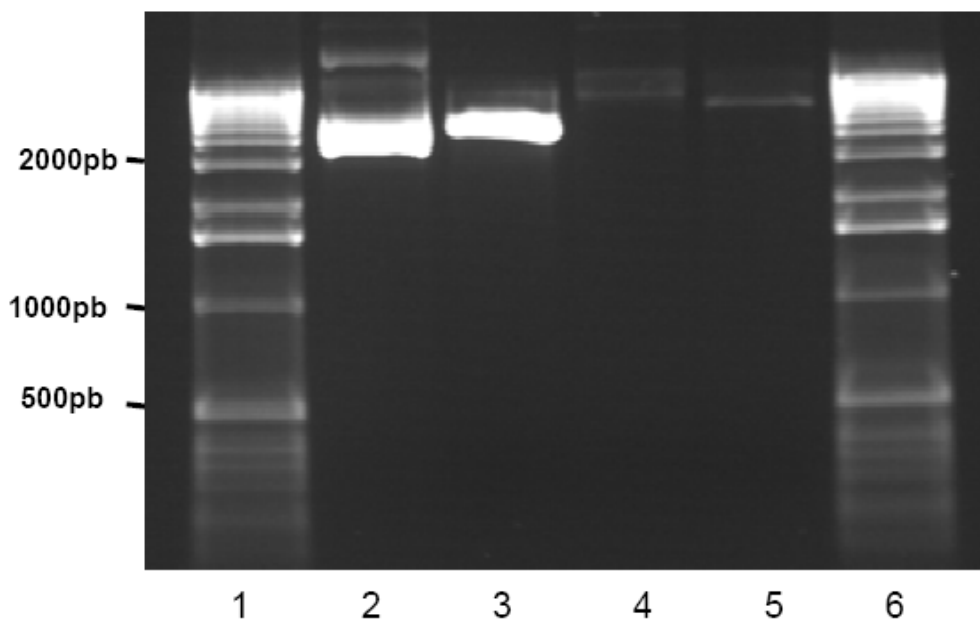


Figura 4: Clivagem do plasmídeo recombinante com Sal I. 1 e 6- marcador molecular 1kb (Invitrogen); 2- plasmídeo recombinante íntegro; 3- plasmídeo recombinante clivado com Sal I; 4- vetor de expressão (pET32a) íntegro; 5- vetor de expressão (pET32a) clivado com Sal I.

A segunda restrição foi realizada com a enzima Xho I (Promega) por 2 horas a 37°C. Após a incubação, realizou-se eletroforese em agarose 0,8%, aplicando todo o material obtido na clivagem do inserto e este foi purificado através do gel, utilizando o kit *GFX purifications DNA bands* (GE Healthcare) de acordo com as instruções do fabricante.

Após a purificação este inserto foi ligado ao vetor de expressão (pET 32a), utilizando a enzima Ligase (Fermentas) por 18h a 16°C. Em seguida, esses plasmídeos foram inseridos através de choque térmico em bactérias quimiocompetentes BL21DE3. Foram selecionadas oito colônias e avaliadas por PCR para verificar a eficiência desses processos e a presença do inserto (Figura 5).

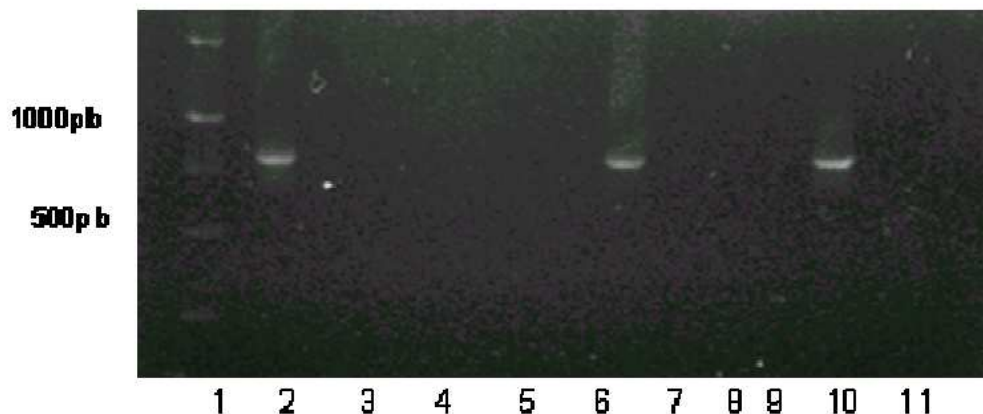


Figura 5: Eletroforese em gel de agarose para verificar a PCR de confirmação da presença do inserto nas colônias selecionadas. 1-marcador molecular 1kb (Fermentas); 2:controle positivo (produto de PCR), 3- controle negativo, 4 a 11- PCR das colônias de 1 a 8, respectivamente, demonstrando a presença do inserto nos clones 4 (canaleta 6) e 7 (canaleta 10) como resultado positivo da clonagem no vetor de expressão pET 32a.

2. Expressão heteróloga e purificação da proteína 14-3-3 de *P. brasiliensis*

Após padronização inicial, testando concentrações de IPTG variando de 0,1mM a 1mM por 5 horas, verificou-se que a melhor concentração para realizar a indução foi de 0,4mM (dados não apresentados). Assim, o teste de indução foi realizado com IPTG 0,4mM por diferentes períodos de tempo para a determinação das condições ótimas para a indução da proteína recombinante. A cada hora, uma alíquota foi recolhida e avaliada por SDS-PAGE (Figura 6).

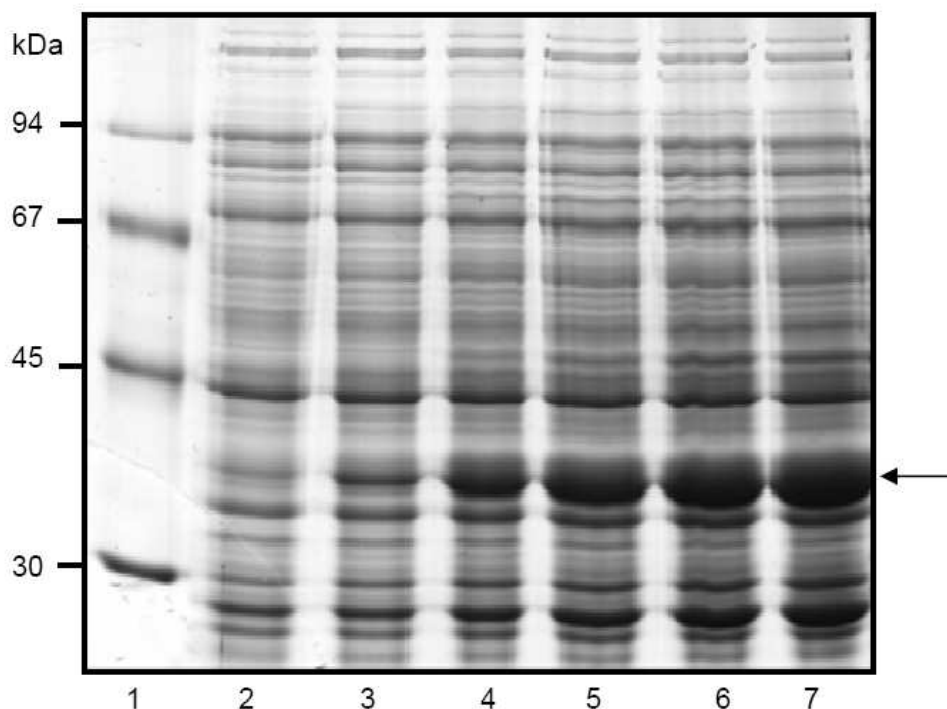


Figura 6: SDS-PAGE para verificar teste de indução e coloração por Coomassie Phast Gel R350, 1:MM, 2:0h, 3:1h, 4:2h, 5:3h, 6:4h e 7:5h de indução com 0,4mM de IPTG a 37°C, a seta indica a expressão da proteína recombinante.

A macro indução foi realizada utilizando 0,4mM de IPTG, por 5h a 37°C e a proteína recombinante foi purificada através de cromatografia de afinidade utilizando coluna de níquel NiNTA-5mL no AKTA FPLC (GE Healthcare), as frações foram recolhidas e novamente analisadas por SDS-PAGE (Figura 7).

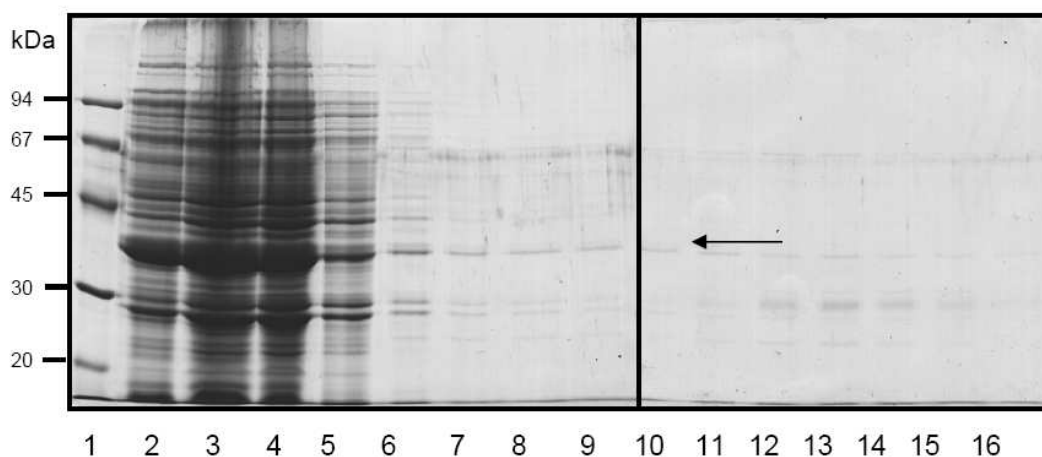


Figura 7: SDS-PAGE para verificar purificação da proteína 14-3-3 recombinante por meio de cromatografia de afinidade com coluna de níquel.

Coloração por Coomassie Phast Gel R350, 1-MM, 2- 16 frações da purificação, a seta indica a proteína recombinante parcialmente purificada.

A técnica de eletroeluição foi empregada para a obtenção da proteína completamente purificada. Para isso, a banda correspondente foi removida e eletroeluída em tampão glicina e em membrana de diálise a 10mA, por 4h a 4°C. Para a verificação da proteína purificada eletroeluída foi realizado novamente SDS-PAGE (Figura 8).

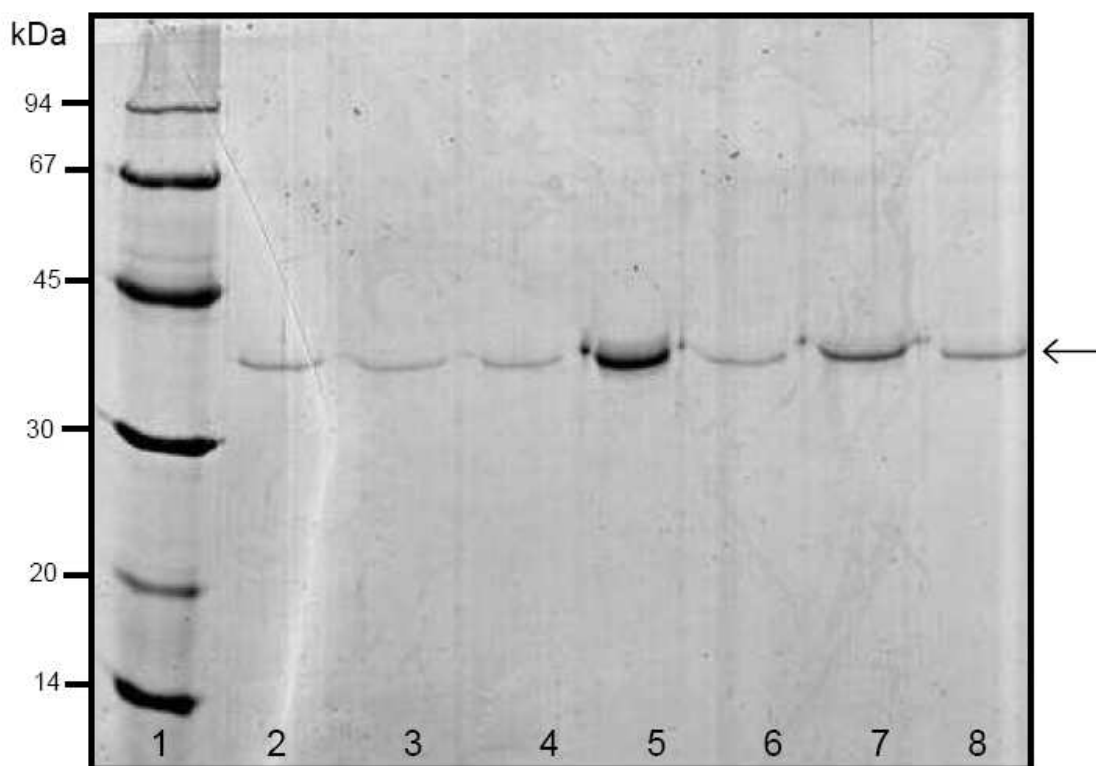


Figura 8: SDS-PAGE para verificar purificação da proteína 14-3-3 recombinante por meio da técnica de eletroeluição. Coloração por Coomassie Phast Gel R350, 1-MM, 2- 8 amostras eletroeluídas, a seta indica a proteína 14-3-3 recombinante purificada.

3. Confirmação da obtenção da proteína 14-3-3 recombinante de *P. brasiliensis* por LC-MS/MS

Para confirmar que a proteína recombinante obtida e purificada tratava-se realmente da proteína 14-3-3 de *P. brasiliensis*, os fragmentos trípticos foram submetidos à LC-MS/MS e os espectros obtidos foram processados utilizando ProteinLynx v4.0 software (Waters) e MASCOT MS/MS Ion Search (www.matrixscience.com), e as sequências encontradas foram pesquisadas no SwissProt databank. Foram encontradas seis possíveis proteínas, com diferentes scores, de acordo com os fragmentos trípticos sequenciados. Para o resultado de maior score (135) foram identificados três fragmentos trípticos que conferiram 15% de cobertura da proteína. Dessa forma, este resultado sugeriu que a proteína sequenciada seria a 14-3-3 de *P. brasiliensis* (Figura 9 e Quadro 1). As demais proteínas sugeridas não apresentaram scores significativos, embora a segunda sugestão de identificação fosse a proteína 14-3-3 Bmh1 de *Yarrowia lipolytica* (*Candida lipolytica*) que apresenta alta homologia com a proteína 14-3-3 de *P. brasiliensis*.

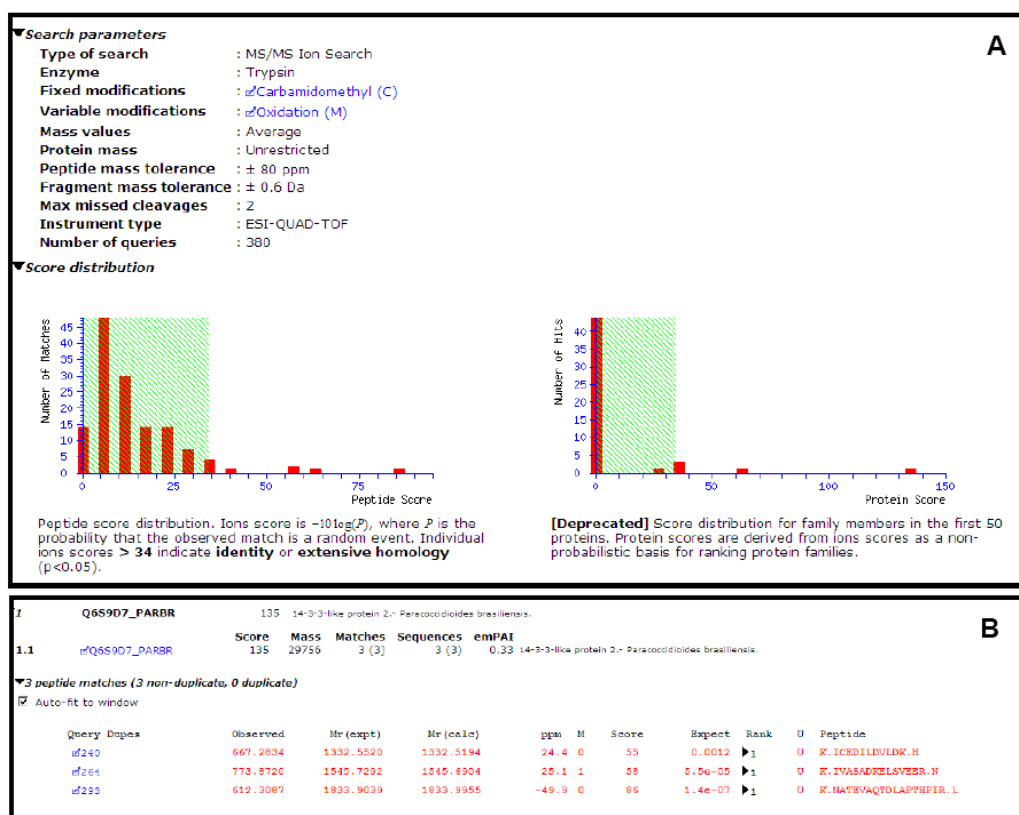


Figura 9: Identificação da proteína 14-3-3 recombinante purificada por LC-MS/MS e Mascot software. **A:** “Score distribution” demonstrando todas as

proteínas identificadas com a seqüência encontrada. **B:** Peptídeos seqüenciados que permitiram a identificação da proteína 14-3-3 de *P. brasiliensis*.

Quadro 1: Proteínas identificadas a partir da banda eletroeluída, digerida e submetida à LC-MS/MS.

ID da proteína identificada	Score	Nº peptídeos	Mm (kDa)	Proteína identificada
Q6S9D7_PARBR	135	3	30	14-3-3 like protein of <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
Q876MO_YARLI	64	1	31	14-3-3 protein Bmh1 <i>Yarrowia lipolytica</i> (<i>Candida lipolytica</i>)
Q2HDA6_CHAGB	40	1	70	Hypothetical protein of <i>Chaetomium globosum</i> CBS 148.51
DEJJGC	36	1	36	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (phosphorylating) EC1.2.1.12 chestnut blight fungus
Q2TXN7_ASPOR	35	2	16	Predicted protein of <i>Aspergillus oryzae</i>
Q4WJ19_ASPFU	26	3	70	Ubiquitin C-terminal hydrolase family protein <i>Aspergillus fumigates</i>

4. Produção de anticorpos e análise por Western Blot

Soro policlonal obtido em coelho foi avaliado pela técnica de imunoblot e observou-se reatividade até o título de 1/1000. Este soro também foi avaliado em relação à sua reatividade com antígeno filtrado de cultura e antígeno *cell free* obtidos do isolado 18 de *P. brasiliensis*, proteína 14-3-3 nativa obtida através de cromatografia por afinidade (ConA sepharose), proteína 14-3-3 recombinante íntegra e proteína 14-3-3 submetida à clivagem com Thrombin cleave kit (Sigma Aldrich). Foi verificada reatividade do anticorpo policlonal frente a todas as condições testadas (Figura 10), mostrando que a proteína 14-3-3 (30 kDa) está presente em antígenos do fungo.

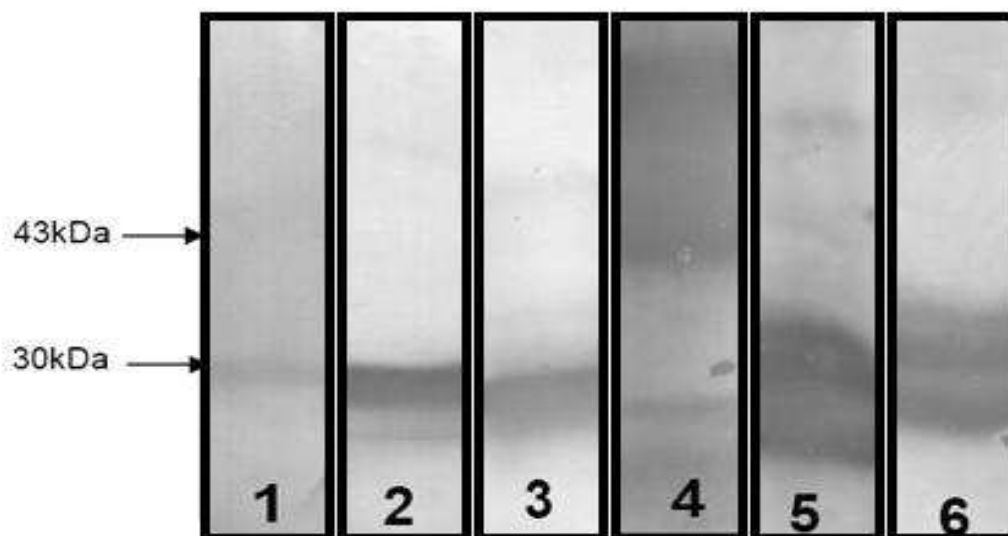


Figura 10: Imunoblot para verificação da reatividade do soro policlonal anti-14-3-3. (1) Filtrado de cultura e (2) antígeno *cell free* obtidos do isolado 18 de *P. brasiliensis*, (3) proteína 14-3-3 nativa obtida através de cromatografia por afinidade (ConA sepharose), (4) proteína 14-3-3 recombinante íntegra e proteína 14-3-3 submetida à clivagem com Thrombin Cleave Kit por (5) 1h e (6) 2h. As setas indicam a reatividade do anticorpo frente à proteína recombinante (43 kDa) e nativa ou recombinante clivada (30 kDa).

5. Ensaio de Viabilidade Celular

As proteínas 14-3-3, nativa e recombinante, foram testadas quanto a sua toxicidade na linhagem celular A549, sendo realizado em triplicata de dois lotes de cultivos da mesma linhagem em experimentos independentes. Em tempos iniciais, 2h, foi verificado que praticamente não houve alteração da viabilidade celular. Como controle, foi utilizado peróxido de hidrogênio 10mM e este promoveu a redução de aproximadamente 50% da viabilidade celular. Em tempos mais tardios, foi possível observar que tanto a proteína nativa quanto a proteína recombinante reduzem aproximadamente 50% da viabilidade celular nas concentrações testadas (5 e 50 μ g/mL). O modelo de infecção (adição de inoculo do isolado 18 de *P. brasiliensis* à monocamada celular) também afeta a viabilidade celular reduzindo-a para 50% também a partir de 5h. É importante ressaltar que há diferenças entre a proteína nativa e recombinante em relação à viabilidade celular em todos os tempos testados ($p \leq 0,05$), com exceção na

concentração de 5ug/ml em 24h de tratamento (Figura 11). Em estudos prévios foi demonstrado que o processo adesivo de *P. brasiliensis* inicia-se a partir de 2h e já o processo invasivo é mais tardio iniciando-se em 5h. Dessa forma, poderíamos associar o fato da invasão de *P. brasiliensis* com a redução da viabilidade celular.

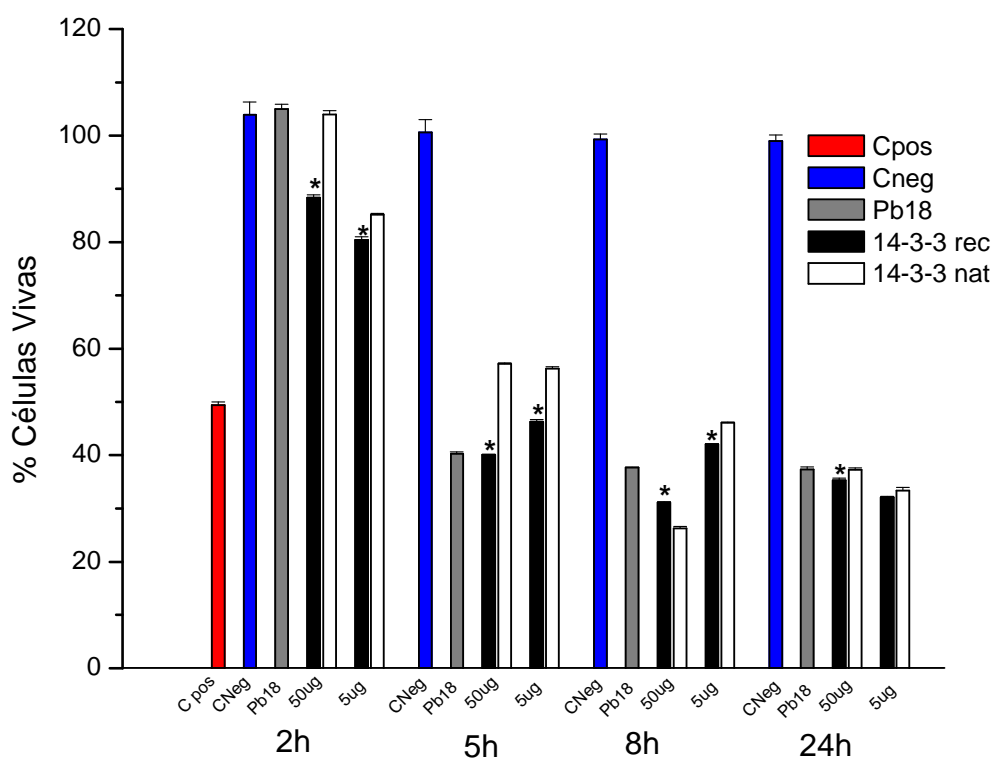


Figura 11: Gráfico representativo da viabilidade celular, pelo ensaio do MTT, das proteínas 14-3-3 nativa e recombinante A549 assim como a infecção pelo isolado 18 de *P. brasiliensis* e o peróxido de hidrogênio, utilizados como controle do ensaio, $p \leq 0,05$ quando se compara proteína nativa com recombinante.

6. Ensaio de inibição da interação de *P. brasiliensis* com células epiteliais utilizando a proteína 14-3-3 recombinante.

Com proteína purificada foi iniciada a caracterização de sua função na interação fungo-hospedeiro por meio de ensaios de inibição. Os dados obtidos por meio de microscopia óptica comum (Figura 12) demonstraram por contagem que o tratamento prévio com a proteína 14-3-3 de *P. brasiliensis* reduziu significativamente ($p \leq 0,05$) a infecção em todos os tempos avaliados

Tais dados foram confirmados através de ensaio de plaqueamento com contagem de CFUs (dados não mostrados). Foi verificado que o tratamento com BSA promoveu uma leve redução da taxa de infecção, porém esses dados não foram estatisticamente significantes quando comparados com os obtidos na ausência de tratamento. Já, quando as células foram previamente tratadas com a proteína 14-3-3 recombinante a 25 μ g/mL, foi observada uma redução de aproximadamente 40% em 2h de infecção, 54% em 5h, 35% em 8h e 28% em 24h, demonstrando assim que esta proteína seria importante no processo infectivo de *P. brasiliensis*. Além disso, também foi observado que em 24h ocorreu proliferação celular, pois quando se compara a taxa de infecção das células que não receberam prévio tratamento entre os tempos iniciais (2, 5 e 8h) não há diferença estatística entre os mesmos. Porém quando se compara com 24h, há essa diferença ($p \leq 0,01$) o que poderia explicar esse aumento da taxa de infecção, mas mesmo assim há uma inibição provocada pela proteína 14-3-3 recombinante.

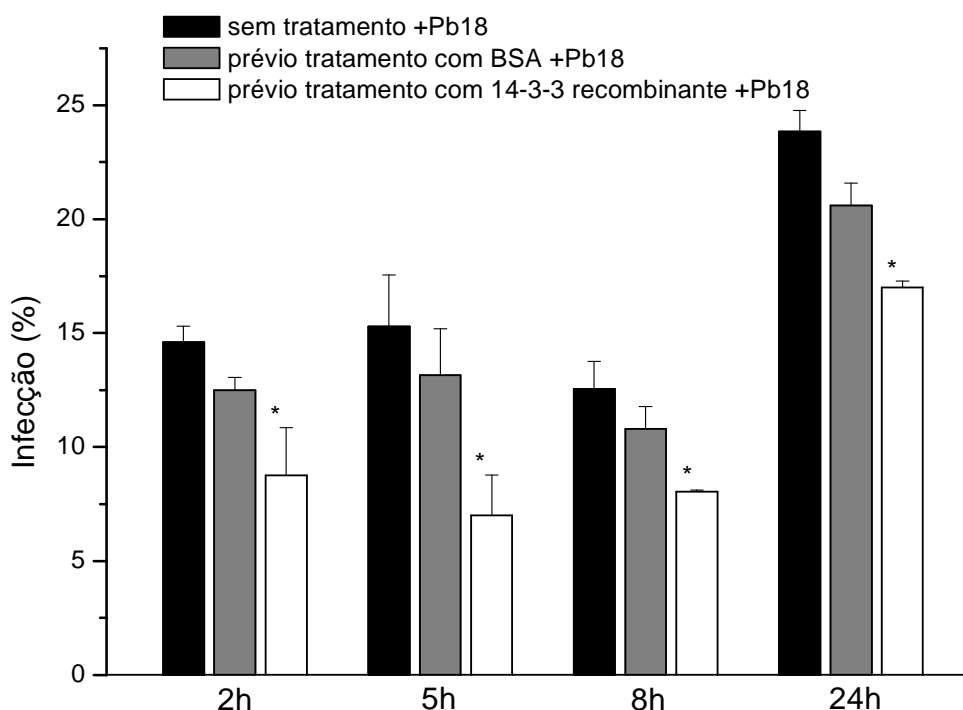


Figura 12: Ensaio de inibição para verificar a interação de *P. brasiliensis* com células epiteliais nas condições propostas por diferentes períodos de tempo. * $p \leq 0,05$ quando comparadas células sem tratamento com as células previamente tratadas com 14-3-3 recombinante

7. Marcação com faloidina para observação dos filamentos de actina durante a interação da proteína 14-3-3 recombinante com células A549

Estudos prévios de nosso grupo com a proteína 14-3-3 nativa haviam demonstrado que esta proteína interferia no citoesqueleto de actina (Figura 13B). Para confirmar, se a proteína recombinante também mantinha essa característica, foram realizados ensaios de imunofluorescência utilizando faloidina que é uma toxina que se liga à actina polimérica, estabilizando-a, interferindo com o retículo endoplasmático e outras estruturas ricas em actina (Figura 13 A). Foi possível detectar alteração do padrão de distribuição da actina das células tratadas com a proteína recombinante (Figura 13C). Além disso, também foi possível verificar marcação específica para a proteína 14-3-3 na parede do fungo quando as células foram infectadas com *P. brasiliensis* por 5h (Figura 13D), 8h (Figura 13E) e 24h (Figura 13F). É interessante ressaltar que a marcação para a proteína 14-3-3 limita-se à parede celular do fungo.

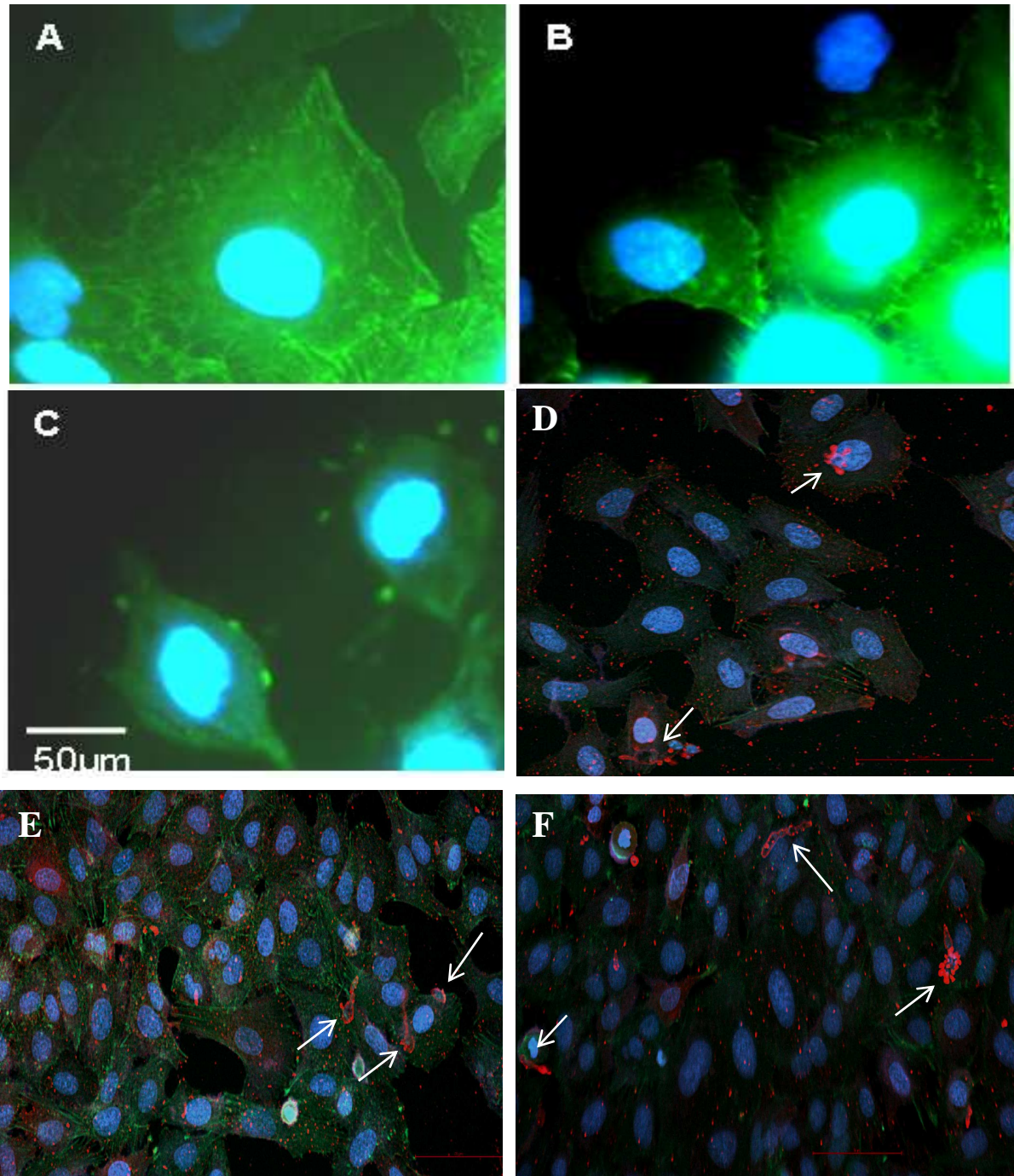


Figura 13: Imunofluorescência de células epiteliais (A549) não tratadas (A), tratadas com a proteína 14-3-3 nativa (B) ou com a proteína recombinante (C) por 5 horas usando faloidina-FITC (verde) e DAPI (azul). Também foi avaliado o padrão de distribuição de actina nas células infectadas por *P. brasiliensis* por 5h (D), 8h (E) e 24h (F). As setas indicam o fungo marcado em vermelho demonstrando a marcação específica da proteína 14-3-3 na parede celular.

8. Técnica de Imunocitoquímica em nível ultra-estrutural para localização da proteína 14-3-3 em *P. brasiliensis* (formas leveduriformes) e durante sua interação com células A549

Com a finalidade de determinar a localização subcelular da proteína 14-3-3 de *P. brasiliensis* em nível ultraestrutural foi realizada a técnica de marcação com ouro coloidal. Foi possível verificar uma distribuição ubíqua da proteína 14-3-3 com certa predileção citoplasmática como demonstra a figura 14.

Surpreendentemente, quando se determinou a localização subcelular da proteína 14-3-3 em células leveduriformes de *P. brasiliensis* durante a interação com células A549, observou-se um grande aumento no número de partículas de ouro na parede celular de fungos no momento da interação das células epiteliais (Figura 15), sugerindo que a proteína 14-3-3 pode desempenhar um papel importante na interação patógeno-hospedeiro. Também foi possível verificar que com aumento do tempo de interação (8h), alguns fragmentos da parede celular contendo essas partículas de ouro foram direcionados para a célula epitelial (Figura 15C). Como controle foi utilizado soro pré-imune de coelho (Figura 15.1A, 15.1B, 15.1C).

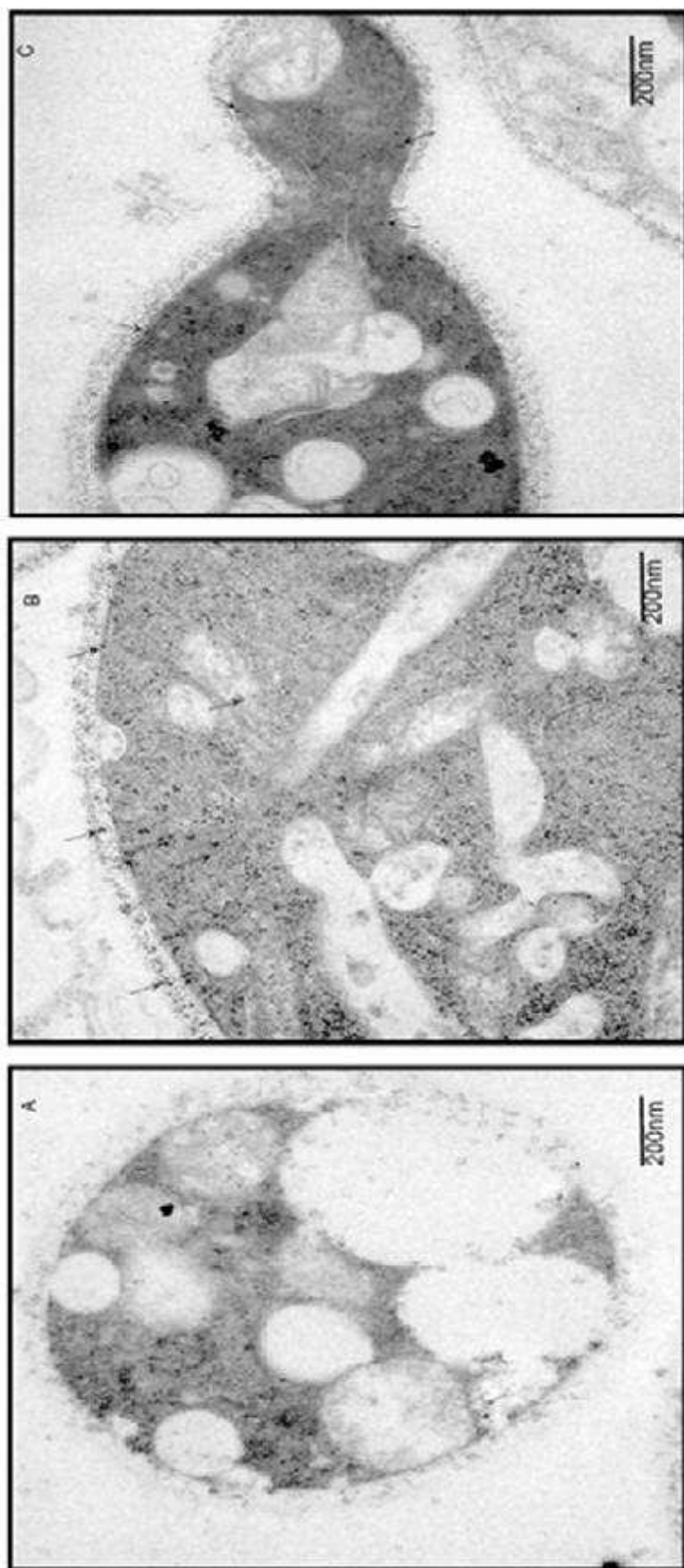


Figura 14: Microscopia Imunoelétrica para localização da proteína 14-3-3 em células leveduriformes de *P. brasiliensis*. (A) Controle negativo com soro pré-imune; (B) e (C) Marcação com anticorpo polidonal anti-14-3-3; as setas indicam as partículas de ouro, demonstrando a localização subcelular desta proteína. Aumento de 25.000x.

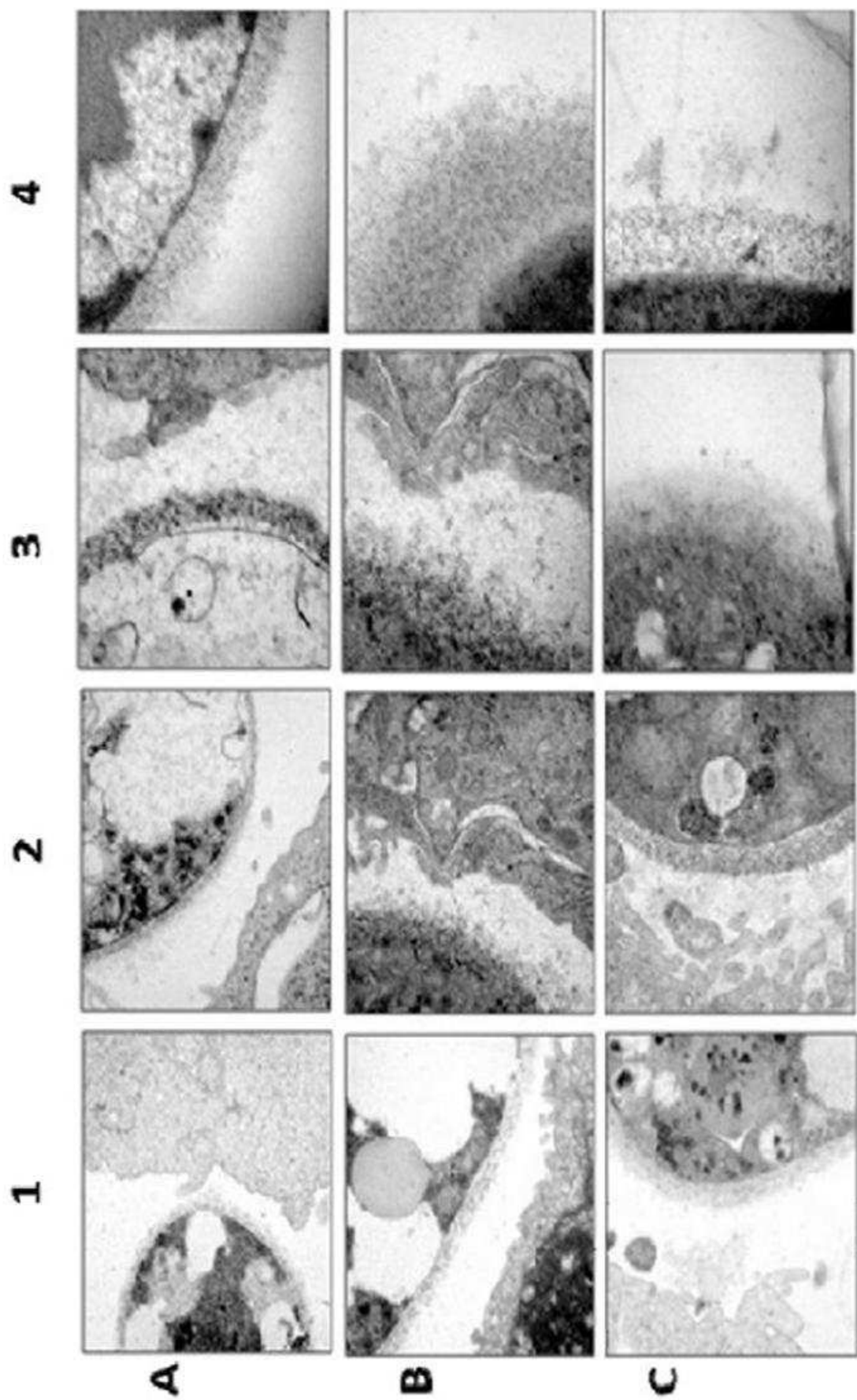


Figura 15: Microscopia Imunoeletrônica para localização da proteína 14-3-3 em células leveduriformes de *P. brasiliensis*, durante a interação com células epiteliais por 2h (A), 5h (B) e 8h (C). Controle negativo com soro pré-imune (1) e imunomarcção utilizando o anticorpo policlonal anti-14-3-3 (2, 3 e 4). Aumento de 25.000x (2) e 50.000x (3 e 4).

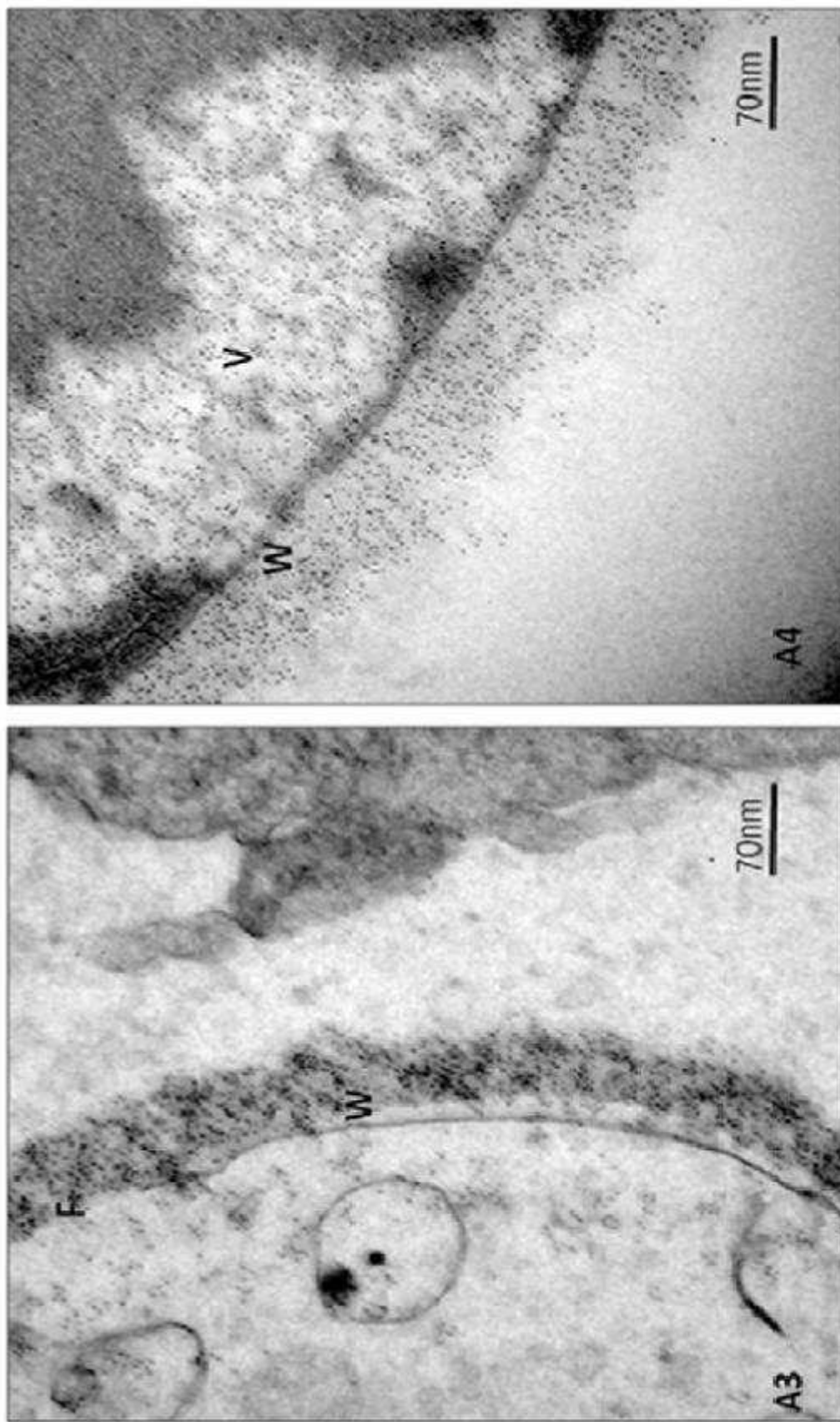


Figura 15A: Detalhe da microscopia imunoeletrônica para localização da proteína 14-3-3 em células leveduriformes de *P. brasiliensis*, durante a interação com células epiteliais por 2h (A). Aumento de 50.000x. F: fungo; W: parede celular do fungo; V: vacúolo.

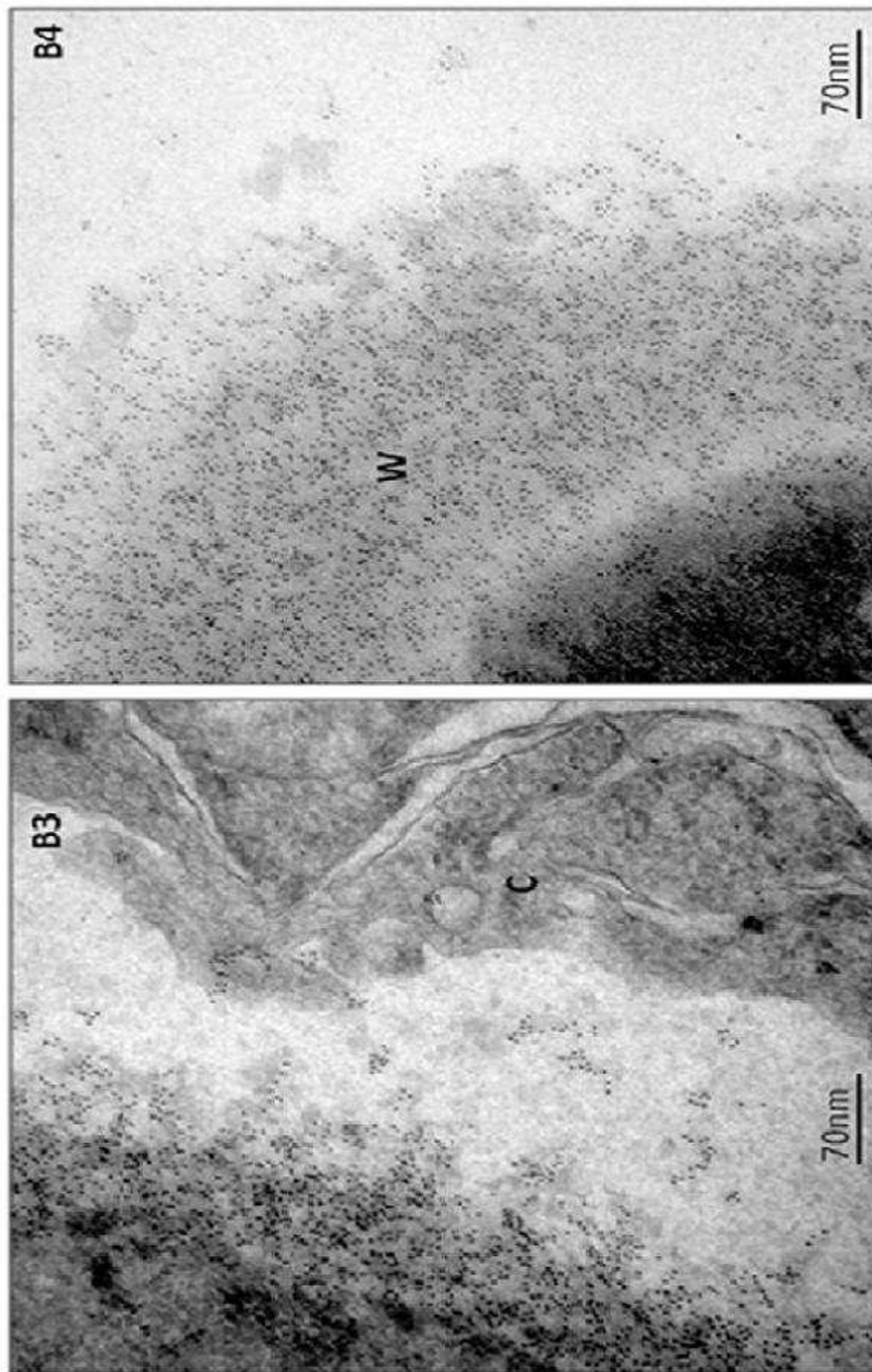


Figura 15B Detalhe da microscopia imunoeletrônica para localização da proteína 14-3-3 em células leveduriformes de *P. brasiliensis*, durante a interação com células epiteliais por 5h (B). Aumento de 50.000x. C: célula epiteliai; W: parede celular do fungo.

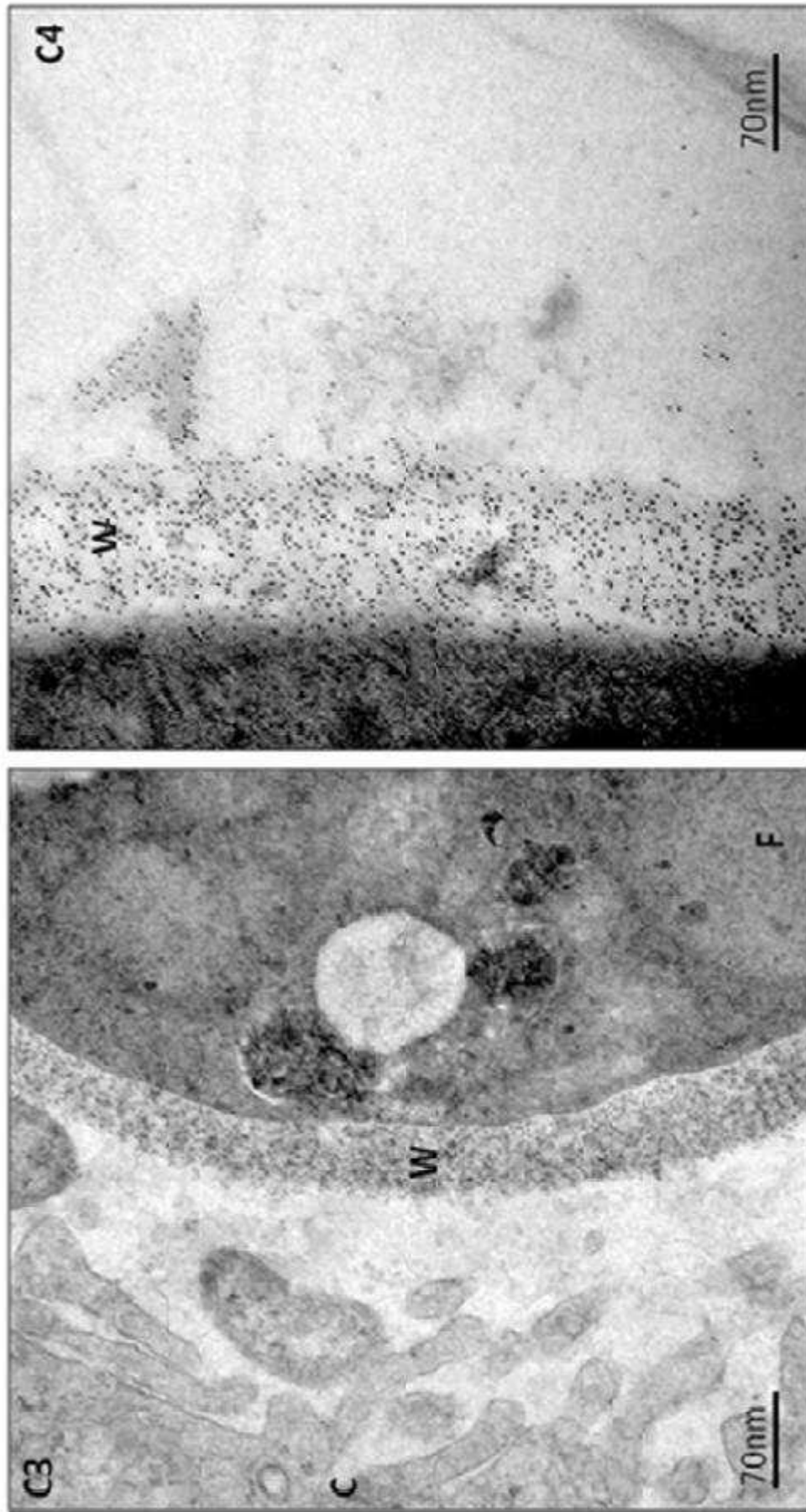


Figura 15C: Detalhe da microscopia imunoeletrônica para localização da proteína 14-3-3 em células leveduriformes de *P. brasiliensis*, durante a interação com células epiteliais por 8h (C). Aumento de 50.000x. C: célula epitelial; F: fungo; W: parede celular do fungo.

9. Efeito de Rho, Rac e Cdc42 na internalização de *P. brasiliensis* em células A549.

9.1 Ensaio de inibição utilizando toxina B de *Clostridium difficile*

Foram realizados também os ensaios para verificar a participação da proteína 14-3-3 na via de ativação das Rho GTPases. Para melhor caracterizar os mecanismos de recrutamento de actina, pneumócitos foram pré tratados por 30 min a 37°C com toxina B de *Clostridium difficile*, um amplo inibidor dos membros da família Rho GTPase. Foi observada uma redução de aproximadamente 45% em 2h de infecção, 77% em 5h e 88% em 24h (Figura 16). A inibição da entrada de *P. brasiliensis* pela toxina B implica na atuação da via de Rho GTPases neste processo.

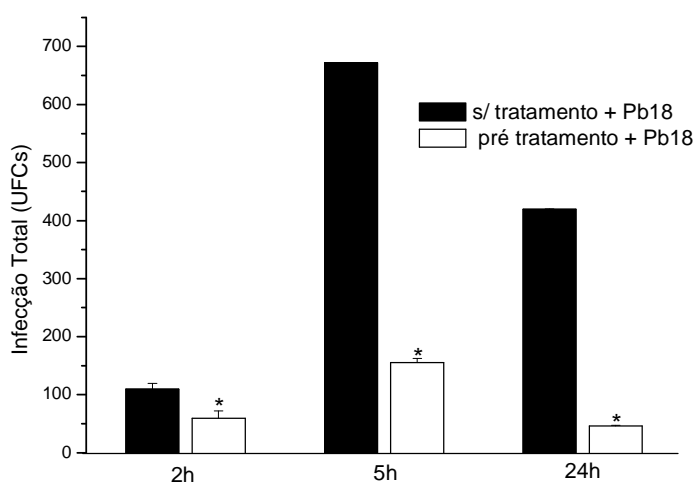


Figura 16: Ensaio de inibição pela toxina botulínica para verificar a interação de *P. brasiliensis* com células epiteliais nas condições propostas por diferentes períodos de tempo. * $p \leq 0,01$

9.2. Imunofluorescência para a verificação da expressão de Rac e Cdc42

Para verificar a expressão de Rac ou Cdc42 durante a interação da proteína 14-3-3 recombinante e do isolado 18 de *P. brasiliensis* com células epiteliais pulmonares (A549), foram realizados ensaios de imunofluorescência utilizando soro anti-14-3-3 recombinante com Alexa 594 (vermelho), anti-Rac com Alexa 488 (verde) e DAPI (marcador nuclear azul). Foi possível detectar alteração do padrão de distribuição de Rac (Figura 17) assim como de Cdc42 (Figura 18) quando as células foram tratadas tanto com a proteína recombinante quanto com Pb18.

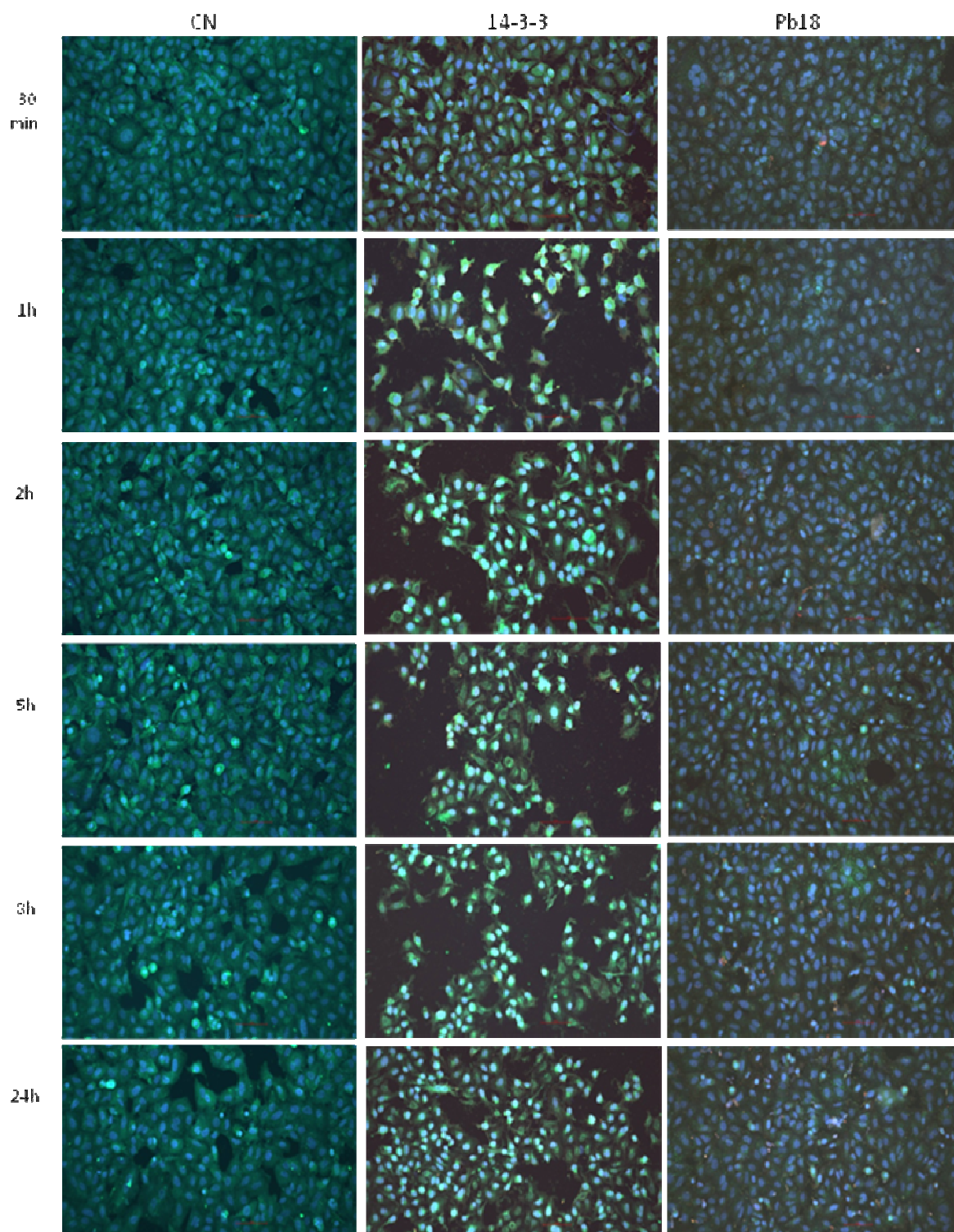
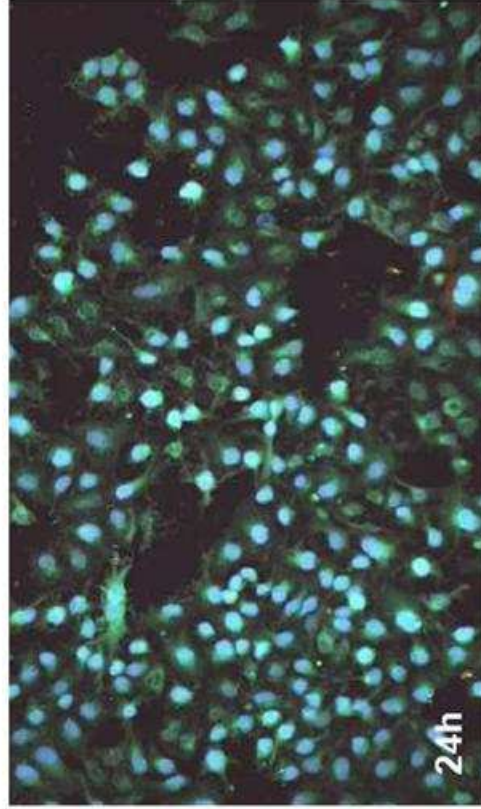
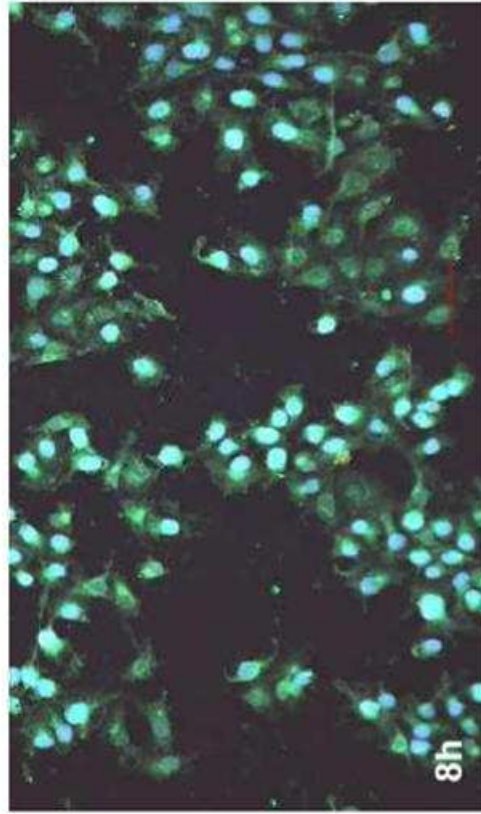
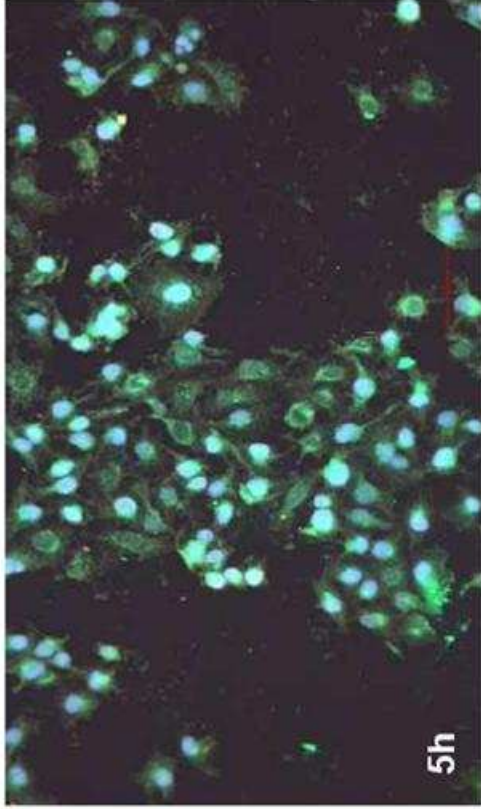
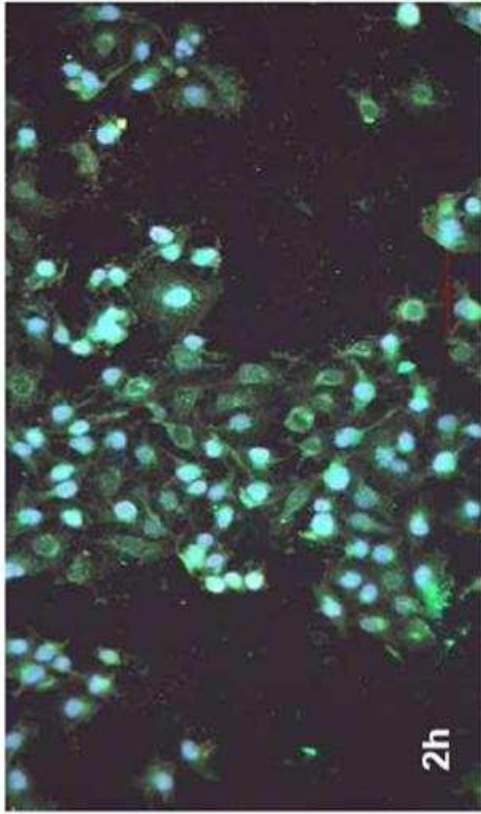


Figura 17: Imunofluorescência tripla mostrando o padrão de marcação das células epiteliais (A549) normais (CN), tratadas com a proteína 14-3-recombinante e infectadas com Pb18 por diferentes períodos de tempo, utilizando soro anti-14-3-3 (vermelho), anti-Rac (verde) e DAPI (azul).



[Figura 17A: Detalhes da imunofluorescência tripla mostrando o padrão de marcação das células epiteliais (A549) tratadas com a proteína 14-3-3 recombinante por diferentes períodos de tempo, utilizando soro anti-14-3-3 (vermelho), anti-Rac (verde) e DAPI (azul).

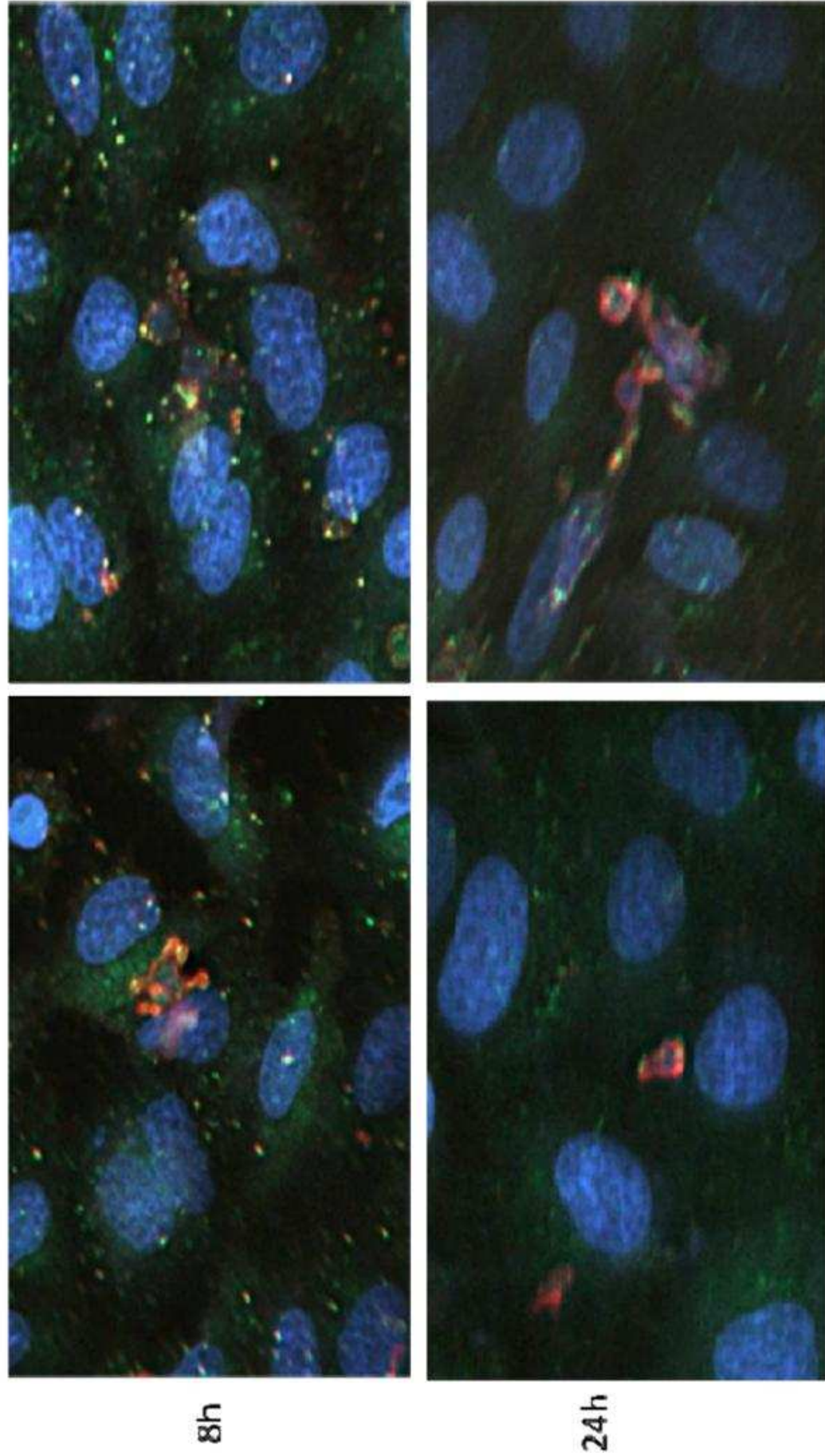


Figura 17B: Detalhes da imunofluorescência tripla mostrando o padrão de marcação das células epiteliais (A549) infectadas com *P. brasiliensis* por diferentes períodos de tempo, utilizando soro anti-14-3-3 (vermelho), anti-Rac (verde) e DAPI (azul).

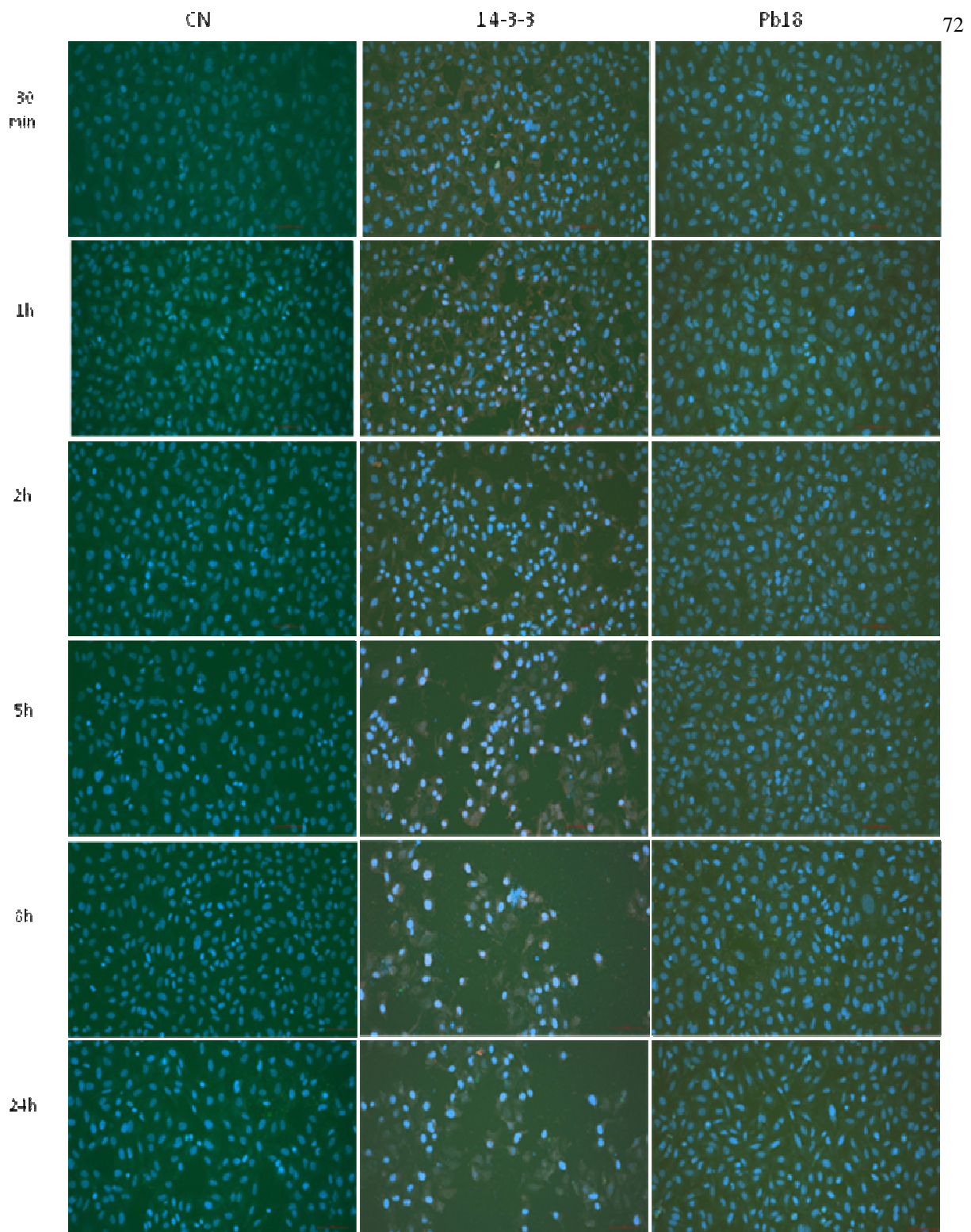


Figura 18: Imunofluorescência tripla mostrando o padrão de marcação das células epiteliais (A549) normais (CN), tratadas com a proteína 14-3-recombinante e infectadas com Pb18 por diferentes períodos de tempo, utilizando soro anti-14-3-3 (vermelho), anti-Cdc42 (verde) e DAPI (azul).

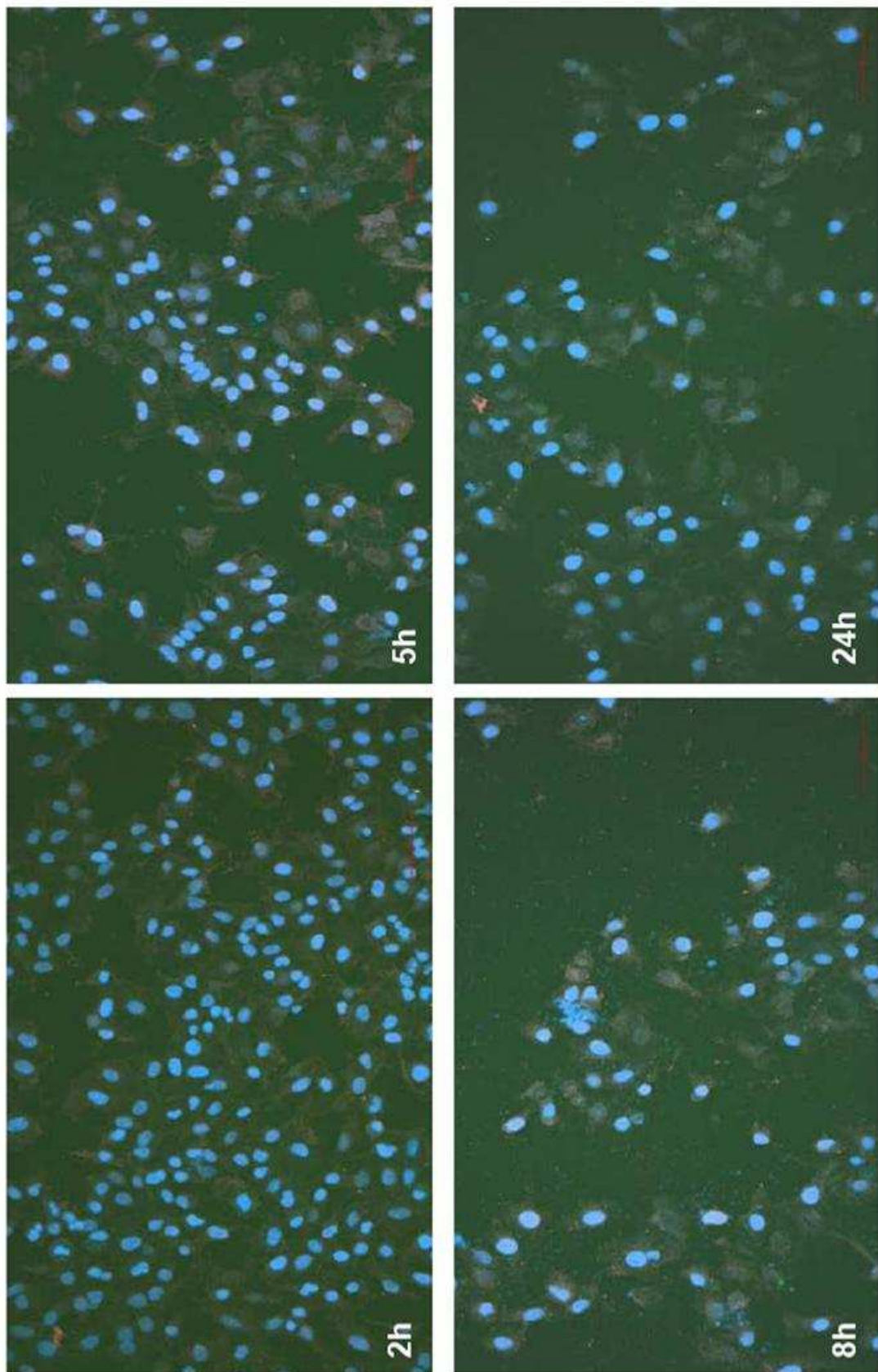


Figura 18A: Detalhes da imunofluorescência tripla mostrando o padrão de marcação das células epiteliais (A549) tratadas com a proteína 14-3-3 recombinante por diferentes períodos de tempo, utilizando soro anti-14-3-3 (vermelho), anti-Cdc42 (verde) e DAPI (azul).

9.3 Análise da expressão de Rac e Cdc42 por citometria de fluxo

Foi utilizada citometria de fluxo para a confirmação e quantificação da expressão de Rac e Cdc42. Para isso, 10 mil células foram analisadas e calculou-se a porcentagem de células positivas, bem como se verificou a média da intensidade de fluorescência. Essas células foram previamente marcadas utilizando anticorpo monoclonal no título 1/100 anti-Rac ou anti-Cdc42, seguido da adição de fração anti IgG de camundongo conjugada com ficoeritrina (PE).

A análise da expressão de Rac quanto à porcentagem de células marcadas mostrou a diminuição da expressão de Rac em células tratadas com a proteína 14-3-3 recombinante quando comparadas com as células não tratadas ou infectadas com *P. brasiliensis* (Figura 19D). Essa diminuição foi mais pronunciada no tempo de 8h. Quando se realizou a verificação da média da intensidade de fluorescência (Figura 19E) foi verificado um aumento significativo da expressão de Rac somente nas células tratadas com a proteína 14-3-3 recombinante, demonstrando assim que o efeito observado pode ser associado às funções já descritas na literatura desta proteína como ativadora desta via. Além disso, o dado é bastante interessante, uma vez que o processo adesivo de *P. brasiliensis* inicia-se em 2h e talvez a proteína 14-3-3 estaria envolvida nesse processo, embora tais resultados não tenham sido encontrados quando se utilizou o fungo (isolado 18 de *P. brasiliensis*).

Já a análise de Cdc42 revelou aumento da expressão principalmente em 5h e 24h de tratamento com a proteína 14-3-3. Esse aumento foi verificado tanto pela porcentagem de células marcadas (Figura 20D) quanto pela análise da média da intensidade de fluorescência (Figura 20E). Além disso, também se observou ativação de Cdc42 pelo próprio fungo. Em 5h foi observado aumento da média da intensidade de fluorescência embora tenha ocorrido diminuição da porcentagem de células marcadas quando comparado com o tempo de 2h. Essa observação se inverte no tempo de 8h, ou seja, neste período se observou aumento de células marcadas e diminuição da média da intensidade de fluorescência quando comparados com o controle de células não tratadas no mesmo período. Mais uma vez, os dados de 5h são bastante interessantes, pois tanto o tratamento com a proteína recombinante como a infecção com *P. brasiliensis* estariam ativando Cdc42, corroborando com os dados já descritos de que neste período, o fungo inicia o processo invasivo.

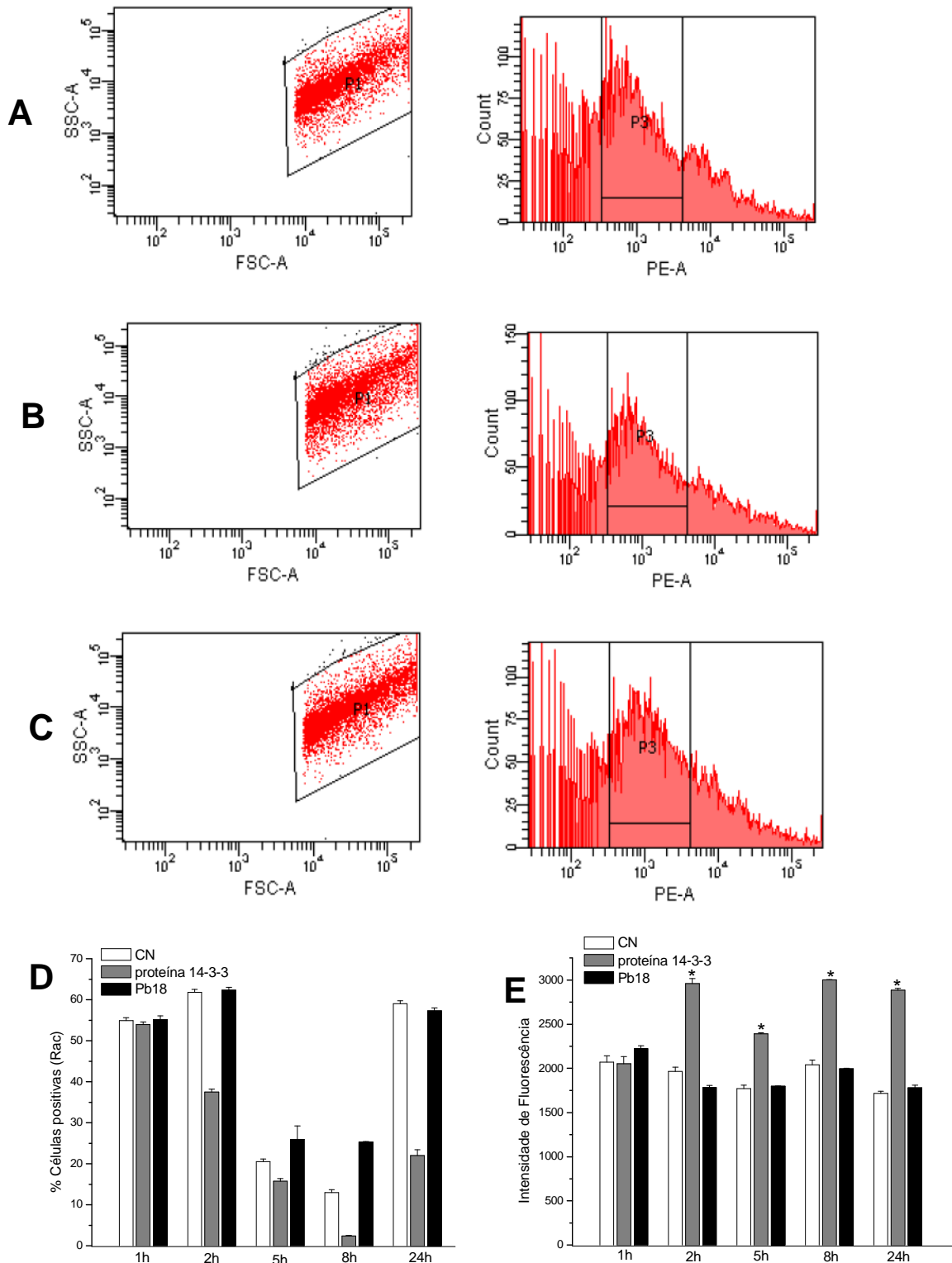


Figura 19: Avaliação da expressão de Rac por citometria de fluxo. *Gates* meramente ilustrativos das células A549 não tratadas (A), tratadas com 14-3-3 recombinante 50ug/mL (B) ou infectadas com *P. brasiliensis* (C) demonstrado a distribuição (FSCxSSC) e a intensidade de marcação com ficoeritrina no tempo inicial. Avaliação da porcentagem de células positivas (D) e da intensidade de fluorescência (E) nas condições avaliadas. * $p \leq 0,05$, quando comparadas com as células não tratadas.

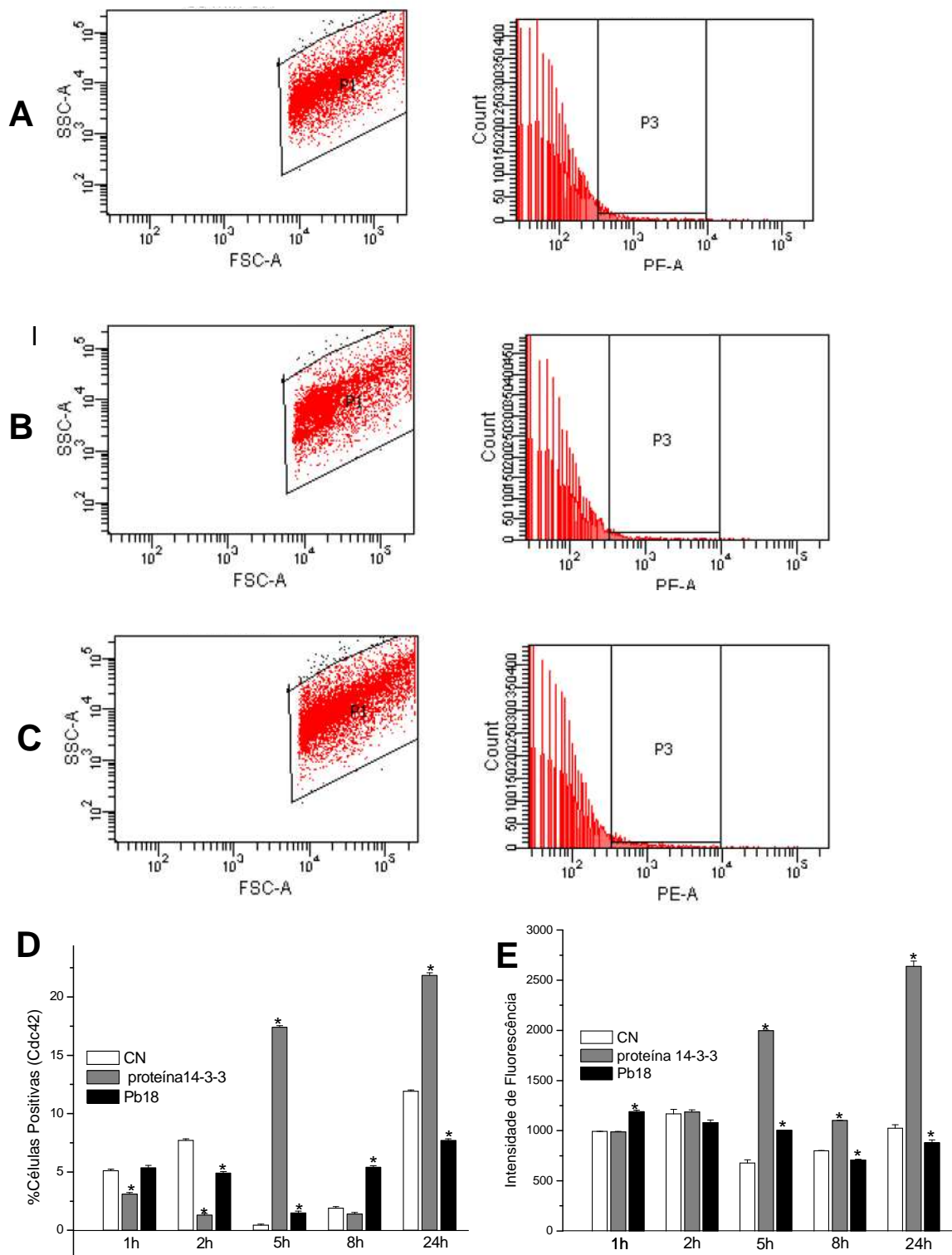


Figura 20: Avaliação da expressão de Cdc42 por citometria de fluxo. *Gates* meramente ilustrativos das células A549 não tratadas (A), tratadas com 14-3-3 recombinante 50ug/mL (B) ou infectadas com *P. brasiliensis* (C) demonstrando a distribuição (FSCxSSC) e a intensidade de marcação com ficoeritrina no tempo inicial. Avaliação da porcentagem de células positivas (D) e da intensidade de fluorescência (E) nas condições avaliadas. * $p \leq 0,05$, quando comparadas com as células não tratadas.

DISCUSSÃO

Os fungos exibem geralmente relações intra-e/ou extracelulares com o hospedeiro e o fenômeno de parasitismo depende de moléculas de superfície (Mendes-Giannini, Taylor *et al.*, 2000). Adesinas foram encontradas em um grande número de diferentes patógenos, que interagem com componentes da matriz extracelular (MEC) do hospedeiro e muitas vezes são de grande importância na modulação da migração, invasão, diferenciação e proliferação microbiana. O estudo de moléculas de ligação às células do hospedeiro e adesinas que podem também atuar como invasinas, pode ser um alvo interessante para o desenvolvimento de vacinas e terapias de bloqueio de receptores.

P. brasiliensis é capaz de aderir e invadir células epiteliais (Mendes-Giannini, Andreotti *et al.*, 2006). Algumas moléculas de *P. brasiliensis* que podem participar na adesão aos tecidos do hospedeiro, ligantes da MEC foram identificadas (gp 43, malato sintase, enolase, fosfato isomerase triose, uma proteína adaptina-like, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, proteína 14-3-3, entre outras), o papel exato destas proteínas permanece não caracterizado (Barbosa, Bão *et al.*, 2006; Andreotti, Monteiro Da Silva *et al.*, 2007; Pereira, Bão *et al.*, 2007; Da Silva Castro, Barbosa *et al.*, 2008; Da Silva Neto, De Fátima Da Silva *et al.*, 2009; Donofrio, Calil *et al.*, 2009); (Vicentini, Gesztesi *et al.*, 1994; Hanna, Monteiro Da Silva *et al.*, 2000; Andreotti, Monteiro Da Silva *et al.*, 2005; Gonzalez, Gomez *et al.*, 2005; Gonzalez, Lenzi *et al.*, 2005; González, Gómez *et al.*, 2005; Barbosa, Bão *et al.*, 2006; Coltri, Casabona-Fortunato *et al.*, 2006; Mendes-Giannini, Andreotti *et al.*, 2006; Ganiko, Puccia *et al.*, 2007; Pereira, Bão *et al.*, 2007; Da Silva Neto, De Fátima Da Silva *et al.*, 2009; Del Vecchio, Silva *et al.*, 2009; Donofrio, Calil *et al.*, 2009; Nogueira, Fonseca *et al.*, 2010).

Em estudos anteriores de nosso grupo, foi caracterizada por sequenciamento de aminoácidos, uma proteína de 30 kDa capaz de se ligar a laminina e foi determinado que esta pertencia à família de proteínas 14-3-3 (Andreotti, Monteiro Da Silva *et al.*, 2005). Semelhante ao nosso achado, da proteína 14-3-3 como adesina, em *E. coli* enteropatogênica (EPEC), a isoforma tau de 14-3-3 pode se ligar especificamente e independente de fosforilação a Tir, uma proteína efetora importante presente na membrana plasmática da

célula eucariótica, onde age como receptor para a adesina bacteriana, intiminina. 14-3-3tau é recrutada para o local do pedestal (3h após a infecção) e pode permanecer na EPEC nas fases posteriores do processo de infecção (5-7 h após a infecção) (Patel, Cummings *et al.*, 2006).

A invasão de *P. brasiliensis* afeta a estrutura do citoesqueleto das células epiteliais, interferindo em aspectos morfológicos da actina, tubulina e citoqueratina (Mendes-Giannini, Hanna *et al.*, 2004). Também foi verificado que a proteína de 30 kDa de *P. brasiliensis* causa modificação estrutural de microfilamentos polimerizados de actina e citoqueratina (Andreotti, 2005), além de induzir apoptose durante o processo de interação às células epiteliais (dados não publicados) mas o exato mecanismo de como esse processo acontece permanece desconhecido. A caracterização de algumas proteínas que influenciam na interação com o hospedeiro, conferindo um fenótipo mais patogênico, por permitir ao fungo aderir com maior facilidade aos tecidos do hospedeiro, invadir novos compartimentos, evadir-se da resposta imune, bem como outras interações hospedeiro-específicas, vem colaborando para o entendimento da instalação do fungo e o desenvolvimento da PCM.

Para a melhor compreensão da relação entre *P. brasiliensis* e células epiteliais pulmonares humanas (A549), foi produzida a proteína Pb14-3-3 recombinante (43 kDa) através de expressão heteróloga em bactérias e esta proteína foi purificada utilizando cromatografia de afinidade com níquel. Várias dificuldades foram encontradas inicialmente para a produção da proteína recombinante, dentre elas a clonagem em pGEM/pGEX levou à produção da proteína recombinante de forma insolúvel, o que exigiu a mudança de vetor de expressão. Adicionalmente também houve a necessidade de padronização das condições ideais de indução. Além disso, a cromatografia de afinidade com níquel levou a purificação incompleta o que exigiu a adição de mais uma etapa de purificação que foi realizada por meio da técnica de eletroeluição. Utilizando a proteína purificada produziu-se anticorpo policlonal em coelho e altos títulos foram observados.

A proteína 14-3-3 foi identificada no genoma de *P. brasiliensis* e há apenas duas sequências depositadas para a mesma proteína (códigos de acesso: AY462124 e AY271748), mas sua função ainda é desconhecida. Já o genoma humano contém vários genes distintos que codificam para proteínas

pertencentes à família 14-3-3. Sete isotipos estão presentes nos mamíferos, β , γ , ξ , η , σ , τ , e ζ , que funcionam como homo ou heterodímeros (Toker, Sellers *et al.*, 1992; Ichimura, Uchiyama *et al.*, 1995; Chaudhri, Scarabel *et al.*, 2003; Aitken, 2006); (Pham e Perlin, 2010) e até quinze diferentes foram descobertos em plantas. Como em *Drosophila melanogaster* e *Caenorhabditis elegans*, fungos tendem a ter dois isotipos, embora em *Candida albicans* e *Ustilago maydis*, cada um tem apenas um gene de codificação de seus respectivos homólogos da 14-3-3. Proteínas 14-3-3 são uma família de proteínas adaptadoras que modulam a função de outras proteínas em todas as células eucarióticas, sendo que essas proteínas podem interagir com mais de 200 outras proteínas, apresentando assim uma ampla gama de funções. Pouco se sabe sobre a função destas em fungos patogênicos. Estes genes distintos têm sido caracterizados em diversos microrganismos, porém em *P. brasiliensis* esta informação ainda é inexistente e estudos adicionais serão necessários para verificar a presença dos mesmos genes bem como analisar o grau de identidade com as formas de 14-3-3 de mamíferos para podermos considerá-la um alvo terapêutico em potencial.

Além de sua localização citoplasmática, a proteína 14-3-3 de *P. brasiliensis* também foi detectada na parede celular e no antígeno filtrado de cultura, sugerindo que esta é ativamente secretada por este fungo. Em soros de paciente com paracoccidiodomicose já foi verificado reatividade destes frente ao soro anti 14-3-3 (dados não mostrados). A análise imunocitoquímica revelou uma distribuição ubíqua da proteína na forma leveduriforme de *P. brasiliensis*, com certa predileção citoplasmática. Surpreendentemente, observou-se um grande aumento na quantidade da proteína Pb14-3-3 na parede da célula fúngica durante a interação com células epiteliais pulmonares (A549), sugerindo que esta proteína pode desempenhar um papel importante na interação patógeno-hospedeiro. A distribuição desta durante a interação com as células epiteliais pulmonares nunca foi demonstrada e a grande quantidade da proteína Pb14-3-3 na parede celular do fungo durante sua interação com as células A549 pode sugerir a importância desta proteína neste contexto. Nossos dados sugerem que o aumento dos níveis de proteína, na superfície da célula, pode levar a uma capacidade aumentada para ligar às proteínas da MEC e uma capacidade aumentada para evitar as defesas do

hospedeiro pela modulação da resposta imune. No entanto, após a adesão inicial de células epiteliais e endocitose, não se descarta a relevância que a fagocitose por macrófagos tem na produção de pro e/ou citocinas anti-inflamatórias e disseminação do fungo. A alteração na capacidade de aderir a células epiteliais e uma possível falta de modulação da resposta imune durante a infecção com *P.brasiliensis* pode ser devido a moléculas como a descrita neste trabalho, assim como a de 32 kDa proposta por Hernández, Almeida *et al.*, 2010. Nossos resultados também sugerem que a presença desta molécula ubiquitária pode representar mecanismo de evasão do fungo para evitar a resposta imune do hospedeiro.

A parede celular por localizar-se na interface entre o microrganismo e o meio ambiente (Firon, Lesage *et al.*, 2004) desempenha importante papel para o crescimento, a morfogênese e as interações dos fungos com o ambiente e com outras células. Embora, a parede celular de fungos varie frequentemente entre as diferentes espécies, ela é uma estrutura complexa, composta basicamente por proteínas, glicoproteínas, lipídeos e principalmente por polissacarídeos como quitina, β -1,3 e β -1,6 glicanas, distribuídos diferencialmente ao longo da superfície (Tomazett, Félix *et al.*, 2010). Além dos componentes já mencionados, estudos têm comprovado que enzimas glicolíticas e outras proteínas abundantes no citosol, tais como a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (G3PD) (Barbosa, Bão *et al.*, 2006), proteínas de choque térmico de 60 kDa (Cunha, Zancopé-Oliveira *et al.*, 2002), formamidase (Borges, Bailão *et al.*, 2011), triose fosfato isomerase (Pereira, Bão *et al.*, 2007), malato desidrogenase (Da Silva Neto, De Fátima Da Silva *et al.*, 2009) se localizam também na parede celular de *P. brasiliensis*.

A presença da proteína Pb14-3-3 na superfície do fungo na fase leveduriforme de *P. brasiliensis* durante a interação com as células epiteliais pulmonares, suscita questões interessantes: por exemplo, como esta proteína seria incorporada na parede da célula fúngica, na ausência de uma sequência de sinais convencionais N-terminal para o direcionamento da proteína para a via de excreção? Estudos adicionais serão necessários para identificar sinais relacionados com o direcionamento da Pb14-3-3 para a parede celular. A localização clássica de algumas moléculas citoplasmáticas faltando um peptídeo sinal N-terminal a outros compartimentos celulares não é incomum

para *P. brasiliensis*, como descrito para gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) (Barbosa, Bao et al., 2006) e isomerase triosefosfato (TPI) (Pereira, Bão et al., 2007). Proteínas com o peptídeo sinal N-terminal ausentes também foram encontradas na parede celular de *S. cerevisiae*, além de sua localização usual do citoplasma (Nombela, Gil et al., 2006). Além disso, as proteínas citoplasmáticas GAPDH, TPI e formamidase foram detectadas em vesículas extracelulares secretadas por *Histoplasma capsulatum* (Albuquerque, Nakayasu et al., 2008) e *Cryptococcus neoformans* (Rodrigues, Nakayasu et al., 2008). Esses dados reforçam nossa constatação de que a proteína 14-3-3 estaria presente tanto no citoplasma quanto na parede celular de *P. brasiliensis*.

Outra questão a ser avaliada seria a forma de transporte da proteína 14-3-3 para a parede celular de *P. brasiliensis*. Através da análise imunocitoquímica em nível ultraestrutural foi verificado além da presença da proteína 14-3-3 na parede do fungo que ela também estaria presente em vesículas. As imagens obtidas no tempo de 2h nos remetem à possibilidade de que embora sem peptídeo sinal, a proteína estaria sim sendo enviada pelo sistema vesicular. Vesículas carregando fatores de virulência, enzimas e antígenos foram recentemente caracterizadas em patógenos, como em *Cryptococcus neoformans* (Rodrigues, Nimrichter et al., 2007), *Histoplasma capsulatum* (Albuquerque, Nakayasu et al., 2008) e mais recentemente em *P. brasiliensis* (Vallejo et al., 2011). Nestes microorganismos, estruturas membranosas vesiculares podem ser vistas cruzando a parede celular. Em *C. neoformans*, vesículas membranosas carregando glicuronoxilomanana (GXM), o principal polissacarídeo capsular deste fungo. Vesículas contendo GXM também foram detectadas durante a infecção de macrófagos, sugerindo um papel na patogênese deste microorganismo (Oliveira, Freire-De-Lima et al., 2010). De fato, análises proteômicas e lipidômicas de vesículas isoladas de sobrenadantes de cultura de *C. neoformans* (Rodrigues, Nakayasu et al., 2008) e *H. capsulatum* (Albuquerque, Nakayasu et al., 2008) têm evidenciado a presença de fatores de virulência e enzimas. A análise microscópica identificou uma população heterogênea de vesículas extracelulares, não só em *C. neoformans* (Rodrigues, Nimrichter et al., 2007; Rodrigues, Nakayasu et al., 2008), mas também em *H. capsulatum*, *S. cerevisiae*, *C. albicans*, *C.*

parapsilosis e *Sporothrix schenckii* (Albuquerque, Nakayasu *et al.*, 2008; Oliveira, Freire-De-Lima *et al.*, 2010) sugerindo a existência de mecanismos sofisticados da biogênese das vesículas em fungos (Casadevall, Nosanchuk *et al.*, 2009). Recentemente, Vallejo *et al.*, 2011 caracterizaram vesículas extracelulares de isolados S1 e PS2 de *P. brasiliensis* capazes de transportar moléculas antigênicas que são reconhecidas por soros de pacientes com PCM e que essas vesículas são ricas em glicoconjugados que são amplamente expressas na parede celular de fungos e são armazenados em vacúolos intracelulares (Vallejo, Matsuo *et al.*, 2011). Dessa forma, o mecanismo de transporte da proteína 14-3-3 de *P. brasiliensis* também deverá ainda ser mais bem estudado.

Em estudo realizado em *Clonorchis sinensis*, causador da fascioliose hepática chinesa, foi também demonstrado por imunolocalização que a proteína 14-3-3 epsilon deste parasita encontrava-se na superfície externa e sem o peptídeo sinal necessário para endereçamento para a via de excreção. Além disso, CS14-3-3 provocou uma resposta imunológica balanceada em ratos imunizados e exibiu efeito protetor contra a infecção causada por *C. sinensis* (Wang, Chen *et al.*, 2011).

Evidências sugerem que as proteínas 14-3-3 em parasitas seriam importantes para o desenvolvimento e sobrevivência dos mesmos no hospedeiro. Por exemplo, proteínas 14-3-3 de *Schistosoma mansoni* foram amplamente encontradas no tegumento dos vermes adultos, tanto machos, quanto fêmeas (Schechtman, Winnen *et al.*, 2001), capazes de se ligar ao receptor TGF- β para agir como uma interface entre parasita e hospedeiro (Mcgonigle, Beall *et al.*, 2001; Mcgonigle, Beall *et al.*, 2002). As estratégias deste parasita para a evasão do sistema imune do hospedeiro, permitindo maior sobrevivência, não são ainda bem compreendidas, assim como em *P. brasiliensis*. Estas estratégias de evasão foram descritas como um sistema de mimetismo capaz de produzir antígenos que são semelhantes aos componentes endógenos do hospedeiro (Salzet, Capron *et al.*, 2000), no intuito de interferir em seu sistema imune. Também, estes componentes podem modular o sistema imune do hospedeiro para estabelecer infecções crônicas (Liu, Cui *et al.*, 2009), assim como observado em *P. brasiliensis* capaz de causar infecções agudas e crônicas (Benard, 2008).

Proteínas 14-3-3 foram necessárias durante o ciclo evolutivo parasitário, atuando como variantes de reciclagem de uma glicoproteína de superfície para *Trypanosoma brucei* (Benz, Engstler *et al.*, 2010), no encistamento de *Giardia duodenalis* (Lalle, Bavassano *et al.*, 2010) e evasão imune para *Eimeria tenella* (Liu, Xu *et al.*, 2009).

Em *Fasciola hepática*, a proteína 14-3-3 também foi especialmente localizada na superfície externa tanto em larvas quanto nas formas adultas deste parasita. Neste caso, a proteína revelou-se multifuncional estando envolvida tanto no crescimento quanto no desenvolvimento do parasita. (Hernández-González, Valero *et al.*, 2010). Em *Fasciola gigantica*, a proteína 14-3-3 demonstrou elevada imunogenicidade e antigenicidade (Chaithirayanon, Grams *et al.*, 2006).

Embora as interações entre o hospedeiro e as proteínas 14-3-3 de patógenos continuem a ser elucidadas, acredita-se que tais proteínas estejam envolvidas na regulação da sobrevivência celular, proliferação e invasão (Hernández-González, Valero *et al.*, 2010). Por outro lado, o papel da proteína 14-3-3 em doença fungica humana tem-se restringido a estudos em *C. albicans* e *C. neoformans*. Utilizando um painel de mutantes isogênicos para a proteína 14-3-3 (Bmh1p), (Kelly, Johnston *et al.*, 2009), descobriram que mutações específicas afetam vias diferentes associadas com a virulência, incluindo aqueles envolvidos com a formação de filamentos, bem como a interação com as células do sistema imune do hospedeiro. No caso de criptococose, verificaram que 14-3-3 gama estava presente em níveis elevados em pacientes HIV-negativos com meningite por esta levedura (Chang, Lu *et al.*, 2008).

A mudança na composição da parede celular durante a infecção, como a que ocorre em *P. brasiliensis*, pode ser considerada como um mecanismo de escape da resposta imune inata, que é essencial para o controle de infecções fúngicas. Imunidade inata é baseada em elementos pré-existentes do sistema imune que interagem diretamente com todos os tipos de microrganismos levando à sua destruição ou inibição do crescimento (Calich, Da Costa *et al.*, 2008). Os mecanismos que regem a interação inicial entre *P. brasiliensis* e as células da imunidade inata precisam ser esclarecidos. Estudos demonstraram que os receptores *Toll-like* (TLR2) e TLR4 regulam a interação inicial de células fúngicas com os macrófagos e o padrão da imunidade adaptativa que

desenvolve. Além disso, foi verificado a participação de MyD88, uma molécula adaptadora utilizado pelo TLRs para ativar genes da resposta inflamatória na paracoccidiodomicose pulmonar, e esta molécula seria essencial para a ativação de mecanismos fungicidas e da indução de proteção inata e adaptativa as respostas imunes contra *P. brasiliensis* (Loures, Pina *et al.*, 2011).

O foco sobre o papel das proteínas 14-3-3 na doença humana, particularmente no câncer tem merecido atenção, com realce sobre o papel dos diferentes isotipos 14-3-3, a interação de proteínas 14-3-3 com Raf, Cdc25, e vários membros da família de integrinas, e a probabilidade de que as proteínas 14-3-3 podem ser marcadores diagnósticos e alvos terapêuticos úteis no tratamento de doenças humanas (Wilker e Yaffe, 2004). 14-3-3ζ foi encontrada em vários tipos de câncer e utilizada como um biomarcador de prognóstico e quimiorresistência em vários tipos de tumores (Neal e Yu, 2010). Já na doença de Creutzfeldt-Jakob, a detecção de 14-3-3τ, associada a outros marcadores, no fluido cérebro-espinhal foi utilizada como marcador diagnóstico há mais de dez anos (Chohan, Pennington *et al.*, 2010).

Evidências acumuladas agora suportam o conceito de que um ou outro estado anormal de expressão da proteína 14-3-3, ou desregulação das interações contribuem para o desenvolvimento de um grande número de doenças humanas. Em particular, investigações clínicas no campo da oncologia têm demonstrado uma correlação entre níveis elevados de 14-3-3 e sobrevida de pacientes com câncer. Estes estudos destacam a rápida emergência de proteínas 14-3-3 como uma nova classe de moléculas como alvo molecular para a intervenção terapêutica em potencial (Zhao, Meyerkord *et al.*, 2011).

Um aspecto essencial no ciclo de vida de muitos patógenos é sua habilidade de entrar e se manter no hospedeiro para facilitar sua contínua infecção. Portanto, vários patógenos dispõem de mecanismos que utilizam a polimerização de actina a seu favor para entrar ou sair das células do hospedeiro. Em circunstâncias normais, a polimerização de actina e a mobilidade celular são reguladas via cascatas de transdução de sinais (Frischknecht e Way, 2001). Patógenos não somente usam o citoesqueleto de actina para facilitar sua entrada, mas desenvolveram também mecanismos

para subverter os sistemas regulatórios normais que controlam a polimerização da actina na célula (Frischknecht e Way, 2001). Na literatura, o papel de Rho está ligado à migração e associado à adesão focal que pode aumentar a adesão e também a invasão, além da motilidade. Os patógenos com capacidade de invasão frequentemente alteram os componentes do citoesqueleto para promover a sua entrada na célula e isto é feito pelo rearranjo da actina e vários fatores de virulência têm como alvo a família Rho que envolvem Rho, Rac, e Cdc42 que são reguladores fundamentais da reorganização de actina (Ishida, Zhang *et al.*, 2004). Pouco é conhecido das vias de sinalização que controlam as mudanças morfológicas em *P. brasiliensis*, assim como os sinais celulares quando da interação com células do hospedeiro. A invasão de *P. brasiliensis* afeta a estrutura do citoesqueleto das células epiteliais, interferindo em aspectos morfológicos da actina, tubulina e citoqueratina. O tratamento com citocalasina D e colchicina reduziu a invasão, indicando a participação funcional dos microfilamentos e microtúbulos neste mecanismo (Mendes-Giannini, Hanna *et al.*, 2004). Em *P. brasiliensis* ainda são pouco conhecidas as prováveis vias capazes de ativar sinais citosólicos associados ou não durante o processo de invasão ligado ao receptor tirosina quinase ou outros, ou a via de transdução de sinal envolvendo citoesqueleto. *P. brasiliensis*, não é formalmente considerado um patógeno intracelular, pode ser internalizado pelas células epiteliais *in vitro* e *in vivo* (Monteiro Da Silva, Andreotti *et al.*, 2007). As redes de transdução do sinal, envolvendo a proteína quinase tirosina (PTK) e atividades de fosfatase podem modular eventos cruciais durante as infecções fúngicas. Nosso grupo verificou o envolvimento de PTK em *P. brasiliensis* na adesão e invasão as células epiteliais. Os resultados sugeriram que a via PTK participa na transdução de sinal durante os eventos iniciais dos processos de adesão e invasão de *P. brasiliensis* às células epiteliais de mamíferos (Monteiro Da Silva, Andreotti *et al.*, 2007).

Assim, neste estudo também determinou-se o efeito da adesina de 30 kDa de *P. brasiliensis* sobre a dinâmica do citoesqueleto da célula hospedeira. Células A549 foram tratadas com a proteína recombinante purificada por diferentes períodos de tempo e também foram infectadas com *P. brasiliensis*. Observou-se uma redistribuição de actina após o tratamento por 1h com a

proteína recombinante, com um aumento na concentração perto da membrana celular com a formação de protuberâncias (filopódios), provavelmente devido à ativação de Cdc42. O desarranjo do citoesqueleto de actina também foi observado quando as células foram infectadas com o fungo íntegro, mas esse desarranjo foi menos pronunciado e mais tardio. Além disso, neste ensaio de interação foi possível verificar a presença da proteína 14-3-3 na parede do fungo, contribuindo de alguma forma para os eventos observados.

Uma característica marcante das proteínas 14-3-3 é a habilidade de se ligar a um grande número de proteínas sinalizadoras funcionalmente diversas, incluindo quinases, fosfatases e receptores transmembrana. Essa abundância de proteínas de interação permite que as 14-3-3 atuem em papéis importantes em diversos processos regulatórios, como transdução de sinais, apoptose, resposta ao *stress*, controle do ciclo celular, organização do citoesqueleto entre outros (Ford, Al-Khodairy *et al.*, 1994; Hunter, 1997; Van Hemert, Steensma *et al.*, 2001).

A família de proteínas 14-3-3 é conhecida por participar na regulação e organização do citoesqueleto por ativação de Rho GTPases (Jin, Smith *et al.*, 2004), atuando como mediadores em alterações do citoesqueleto via integrinas e desempenhando um papel importante na ativação de Cdc42 (Bialkowska, Zaffran *et al.*, 2003). Assim, a hipótese de que *P. brasiliensis* estaria usando essa proteína como um importante fator de virulência durante a patogênese é reforçada e a proteína Pb14-3-3 estaria ativando proteínas do citoesqueleto intracelular, como Rho, Rac e Cdc42 resultando em alterações conformacionais da célula que poderia auxiliar no processo de invasão.

A família Rho GTPases está envolvida no controle da motilidade e morfologia das células em resposta a estímulos extracelulares. A ativação da Rho em fibroblastos, por exemplo, resulta na montagem de fibras de estresse e fibras de adesão focal (Ridley e Hall, 1992), enquanto a ativação de Rac causa extensão de lamelipódios periféricos e montagem de pequenos complexos de adesão focal (Nobes, Baverstock *et al.*, 1992; Ridley, Paterson *et al.*, 1992). Um terceiro membro da família Rho GTPase, Cdc42 regula a formação de extensões periféricas denominadas filopódios (Nobes, Baverstock *et al.*, 1992).

A análise da expressão de Rac quanto à porcentagem de células marcadas mostrou a diminuição da expressão de Rac em células tratadas com

a proteína 14-3-3 recombinante quando comparadas com as células não tratadas ou infectadas com *P. brasiliensis*. Essa diminuição foi mais pronunciada no tempo de 8h. Quando se realizou a verificação da média da intensidade de fluorescência foi verificado um aumento significativo da expressão de Rac somente nas células tratadas com a proteína 14-3-3 recombinante, demonstrando assim que o efeito observado pode ser associado às funções já descritas na literatura desta proteína como ativadora desta via. Além disso, o dado é bastante interessante, uma vez que o processo adesivo de *P. brasiliensis* inicia-se em 2h e talvez a proteína 14-3-3 estaria envolvida nesse processo, embora tais resultados não fossem encontrados quando se utilizou o fungo (isolado 18 de *P. brasiliensis*).

Já a análise de Cdc42 revelou aumento da expressão principalmente em 5h e 24h de tratamento com a proteína 14-3-3. Esse aumento foi verificado tanto pela % de células marcadas quanto pela análise da média da intensidade de fluorescência. Além disso, também se observou ativação de Cdc42 pelo próprio fungo. Em 5h foi observado aumento da média da intensidade de fluorescência embora tenha ocorrido diminuição da % de células marcadas quando comparado com o tempo de 2h. Essa observação se inverte no tempo de 8h, ou seja, neste período se observou aumento da % de células marcadas e diminuição da média da intensidade de fluorescência quando comparados com o controle de células não tratadas no mesmo período. Mais uma vez, os dados de 5h são bastante interessantes, pois tanto o tratamento com a proteína recombinante como a infecção com *P. brasiliensis* estariam ativando Cdc42, corroborando com os dados já descritos de que neste período, o fungo inicia o processo invasivo. Adicionalmente, usando a toxina botulínica, um inibidor de membros da família Rho GTPase, observou-se uma redução de taxa de infecção de cerca de 45% em 2h de infecção, 77% em 5h e 88% em 8h, indicando que a invasão de *P. brasiliensis* envolve a ação de Rho GTPases. Muitas bactérias produzem toxinas (por exemplo, fator de necrose citotóxicos de *E. coli*, toxina dermonecrótica de *Bordetella pertussis*) que seletivamente ativam a família de Rho GTPases. Outras toxinas (exoenzimas C3 de *Clostridium botulinum*, toxinas A e B de *Clostridium difficile* e toxina letal de *Clostridium sordellii*) inativam proteínas nesta família por ribolisação e glicosilação de ATP (Schiavo e Van Der Goot, 2001).

A modulação do citoesqueleto facilita vários processos que são críticos para o sucesso de colonização das células do hospedeiro por patógenos intracelulares. Bactérias intracelulares, tais como *Salmonella typhimurium*, empregam toxinas que promovem o colapso do citoesqueleto de actina durante o processo de infecção, promovendo a internalização da bactéria dentro de vacúolos que permitem que ela se multiplique (Baldwin e Barbieri, 2005). As características dessas toxinas são de grande importância para o entendimento da participação da via de Rho GTPases no processo de infecção, e estas toxinas têm sido utilizadas para elucidar o papel destas Rho GTPases no controle de vários processos celulares (Verma e Ihler, 2002). Estudos recentes sobre as interações entre proteínas ligadas à patogênese (adesinas e toxinas) e vias de sinalização da célula hospedeira têm sido importantes para esclarecer como essas proteínas podem modular a fisiologia celular. Durante o curso da infecção, muitas bactérias patogênicas produzem toxinas que atuam sobre o citoesqueleto e suas proteínas reguladoras (Baldwin e Barbieri, 2005).

Estas toxinas podem atuar como reguladores positivos, promovendo o rearranjo do citoesqueleto de actina ou, alternativamente, como reguladores negativos, promovendo a ruptura dos filamentos do citoesqueleto. Bactérias intracelulares, tais como *Salmonella typhimurium* utilizam toxinas para promover tanto a montagem quanto o desarranjo do citoesqueleto de actina durante o processo de infecção. A internalização de *S. typhimurium* em células epiteliais é direcionada pelo sistema de secreção do tipo III (SPI-1 T3SS) que permite a translocação de proteínas efetoras do citoplasma bacteriano, através da membrana plasmática, para o citoplasma da célula hospedeira. Estes efetores causam, entre outros efeitos, a polimerização de actina, além disso, a regulação temporal dessas toxinas resulta na internalização da bactéria pelas células epiteliais em vacúolos especializados permitindo o crescimento das mesmas. Em contraste, *Yersinia* spp utiliza as toxinas para modular a actina bloqueando a internalização por células apresentadoras de antígenos como macrófagos e células dendríticas (Baldwin e Barbieri, 2005; Guignot e Servin, 2008). Em *Xanthomonas campestris* pv. *Vesicatoria*, a proteína 14-3-3 denominada ARI1 interage diretamente com AvrRxv de forma semelhante à interação do ExoS efetoras de *P. aeruginosa*. (Masters, Pederson *et al.*, 1999; Krall, Zhang *et al.*, 2004). Há evidências de que efetores bacterianos podem

recrutar proteínas 14-3-3 para a sua função dentro de células hospedeiras. A elucidação do papel dessas interações pode permitir o desenvolvimento de moléculas inibidoras que interferem com os mecanismos amplamente conservados de virulência. Desta maneira, à semelhança de bactérias, a 14-3-3 de *P. brasiliensis* pode estar associada à virulência deste fungo.

Estudos anteriores já haviam demonstrado que a expressão de MMP-1 em vários tipos celulares é essencialmente mediada por sinal extracelular regulado por quinase (ERK) 1 / 2 e p38 proteína ativada por vias de sinalização MAPK quinase (Nagase e Woessner, 1999; Ghahary, Marcoux *et al.*, 2005; Lam, Kilani *et al.*, 2005; Ghaffari, Li *et al.*, 2006; Lee, Lee *et al.*, 2009), sendo que a ativação de p38 pela proteína 14-3-3 nativa de *P. brasiliensis* também já havia sido demonstrada (Andreotti, 2005).

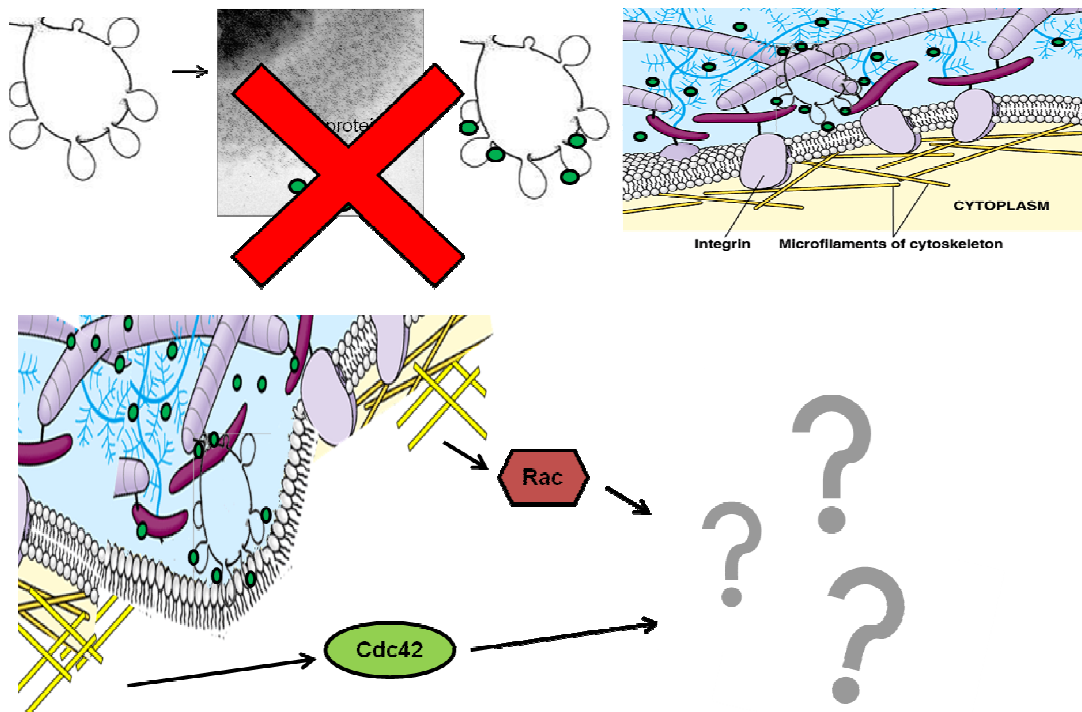
No estudo desenvolvido por Asdaghi, Kilani *et al.*, 2011 foi verificado que a proteína 14-3-3 aumentava a expressão de colagenase no pulmão pela regulação de TGF β 1 durante a inflamação pulmonar. TGF- β é uma família de citocinas multifuncionais designado como TGF- β 1, TGF- β 2 e TGF- β 3. TGF- β 1 é um potente fator pró fibrótico que induz a síntese de diferentes componentes da MEC, incluindo colágeno tipo I e tipo III, fibronectina, tenascina e proteoglicanos (Massagué, 1990). TGF- β 1 diminui ainda mais a síntese de enzimas que degradam a MEC tais como estromelisina e colagenase (MMP-1) e aumenta a produção de inibidores destas enzimas, incluindo ativador do plasminogênio tipo-1 inibidor (PAI-1) e inibidor tecidual de metaloproteinase-1 (TIMP-1). Assim, TGF- β 1 pode ter um profundo impacto sobre remodelamento de vias aéreas (Redington, Madden *et al.*, 1997; Asdaghi, Kilani *et al.*, 2011).

O entendimento mecanicista da regulação das proteínas 14-3-3 permite uma série de estratégias para manipulá-las para potenciais aplicações terapêuticas. As redes de interação proteína-proteína 14-3-3-mediadas exercem papéis fundamentais na regulação de diversas vias de sinalização celular e surgiram como potenciais alvos terapêuticos em contextos de doenças como câncer, doenças neurológicas e doenças infecciosas. Estudos futuros serão necessários para validar alvos 14-3-3 em modelos relevantes com correlações clínicas e também para definir novos compostos que são potentes e moduladores específicos de proteínas 14-3-3 dentro destes contextos de validação.

Em conclusão, no presente estudo, foi mostrado que *P. brasiliensis* possui proteína 14-3-3 com característica de adesina que pode alterar o citoesqueleto das células hospedeiras para auxiliar na internalização do fungo pelos fagócitos não-profissionais. Com base nesses resultados, sugerimos que esta proteína pode ser necessária para o processo de invasão e no processo infeccioso pode exercer papel importante provavelmente como no caso de outras doenças. Assim como outros patógenos, *P. brasiliensis* pode modular o citoesqueleto da célula hospedeira para escapar do sistema imune do hospedeiro e causar infecção.

CONCLUSÕES

Foi avaliada a localização subcelular em nível ultraestrutural da proteína 14-3-3 de *P. brasiliensis* demonstrando distribuição ubíqua na célula leveduriforme de *P. brasiliensis* com certa predileção citoplasmática e preferencialmente na parede deste fungo no momento da interação com as células epiteliais e o envolvimento de moléculas de sinalização e participação da via de Rho GTPases no processo infeccioso de *P. brasiliensis*.



REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

AITKEN, A. 14-3-3 proteins: a historic overview. *Semin Cancer Biol*, v. 16, n. 3, p. 162-72, Jun 2006. ISSN 1044-579X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16678438> >.

ALBUQUERQUE, P. C. et al. Vesicular transport in *Histoplasma capsulatum*: an effective mechanism for trans-cell wall transfer of proteins and lipids in ascomycetes. *Cell Microbiol*, v. 10, n. 8, p. 1695-710, Aug 2008. ISSN 1462-5822. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18419773> >.

ALMEIDA, A. J. et al. Cdc42p controls yeast-cell shape and virulence of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Fungal Genet Biol*, v. 46, n. 12, p. 919-26, Dec 2009. ISSN 1096-0937. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19686860> >.

ANDREOTTI, P. Interação de *Paracoccidioides brasiliensis* com células epiteliais. Caracterização de prováveis fatores de virulência. . 2005. 124 (Doutorado). Análises Clínicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara- UNESP

ANDREOTTI, P. F. et al. Isolation and partial characterization of a 30 kDa adhesin from *Paracoccidioides brasiliensis*. *Microbes Infect*, v. 7, n. 5-6, p. 875-81, May 2005. ISSN 1286-4579. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15862780> >.

ANDREOTTI, P. F. et al. Identification of a gene encoding adaptin-like protein in the *Paracoccidioides brasiliensis* genome by random amplified polymorphic DNA analysis. *J Med Microbiol*, v. 56, n. Pt 7, p. 884-7, Jul 2007. ISSN 0022-2615. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17577051> >.

ANDRÉ, D. C. et al. Binding of laminin to *Paracoccidioides brasiliensis* induces a less severe pulmonary paracoccidioidomycosis caused by virulent and low-virulence isolates. *Microbes Infect*, v. 6, n. 6, p. 549-58, May 2004. ISSN 1286-4579. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15158188> >.

ASDAGHI, N. et al. Extracellular 14-3-3 from human lung epithelial cells enhances MMP-1 expression. *Mol Cell Biochem*, Sep 2011. ISSN 1573-4919. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21948273> >.

ASSIS, B. et al. *Paracoccidioides brasiliensis* 14-3-3-like protein 2 mRNA, complete cds. : GenBank: AY462124.1 2003.

AYSCOUGH, K. R.; DRUBIN, D. G. A role for the yeast actin cytoskeleton in pheromone receptor clustering and signalling. *Curr Biol*, v. 8, n. 16, p. 927-30, 1998 Jul 30-Aug 13 1998. ISSN 0960-9822. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9707405> >.

BAGAGLI, E. et al. Phylogenetic and evolutionary aspects of *Paracoccidioides brasiliensis* reveal a long coexistence with animal hosts that explain several biological features of the pathogen. *Infect Genet Evol*, v. 6, n. 5, p. 344-51, Sep

2006. ISSN 1567-1348. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16473563> >.

BAGRODIA, S. et al. Cdc42 and PAK-mediated signaling leads to Jun kinase and p38 mitogen-activated protein kinase activation. *J Biol Chem*, v. 270, n. 47, p. 27995-8, Nov 1995. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7499279> >.

BAILÃO, A. M. et al. Differential gene expression by *Paracoccidioides brasiliensis* in host interaction conditions: representational difference analysis identifies candidate genes associated with fungal pathogenesis. *Microbes Infect*, v. 8, n. 12-13, p. 2686-97, Oct 2006. ISSN 1286-4579. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16962356> >.

BALDWIN, M. R.; BARBIERI, J. T. The type III cytotoxins of *Yersinia* and *Pseudomonas aeruginosa* that modulate the actin cytoskeleton. *Curr Top Microbiol Immunol*, v. 291, p. 147-66, 2005. ISSN 0070-217X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15984080> >.

BARBOSA, M. S. et al. 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. 382-9, Jan 2006. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16368993> >.

BARROZO, L. V. et al. First description of a cluster of acute/subacute paracoccidioidomycosis cases and its association with a climatic anomaly. *PLoS Negl Trop Dis*, v. 4, n. 3, p. e643, 2010. ISSN 1935-2735. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20361032> >.

BENARD, G. An overview of the immunopathology of human paracoccidioidomycosis. *Mycopathologia*, v. 165, n. 4-5, p. 209-21, 2008 Apr-May 2008. ISSN 0301-486X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18777630> >.

BENARD, G.; MENDES GIANNINI, M. J. Textbook of Pediatric Infections Diseases - Paracoccidioidomycosis. 6. Philadelphia: 2009. 2762-2776

BENZ, C. et al. Depletion of 14-3-3 proteins in bloodstream-form *Trypanosoma brucei* inhibits variant surface glycoprotein recycling. *Int J Parasitol*, v. 40, n. 5, p. 629-34, Apr 2010. ISSN 1879-0135. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19925803> >.

BHAVSAR, A. P.; AUWETER, S. D.; FINLAY, B. B. Proteomics as a probe of microbial pathogenesis and its molecular boundaries. *Future Microbiol*, v. 5, n. 2, p. 253-65, Feb 2010. ISSN 1746-0921. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20143948> >.

BIALKOWSKA, K. et al. 14-3-3 zeta mediates integrin-induced activation of Cdc42 and Rac. Platelet glycoprotein Ib-IX regulates integrin-induced signaling

by sequestering 14-3-3 zeta. J Biol Chem, v. 278, n. 35, p. 33342-50, Aug 2003. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12810725> >.

BORGES, C. L. et al. Genes potentially relevant in the parasitic phase of the fungal pathogen *Paracoccidioides brasiliensis*. Mycopathologia, v. 171, n. 1, p. 1-9, Jan 2011. ISSN 1573-0832. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20669049> >.

BORGES-WALMSLEY, M. I. et al. The pathobiology of *Paracoccidioides brasiliensis*. Trends Microbiol, v. 10, n. 2, p. 80-7, Feb 2002. ISSN 0966-842X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11827809> >.

BRUCKMANN, A. et al. Post-transcriptional control of the *Saccharomyces cerevisiae* proteome by 14-3-3 proteins. J Proteome Res, v. 6, n. 5, p. 1689-99, May 2007. ISSN 1535-3893. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17397208> >.

BUCKLEY, C. D. et al. RGD peptides induce apoptosis by direct caspase-3 activation. Nature, v. 397, n. 6719, p. 534-9, Feb 1999. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10028971> >.

CALICH, V. L. et al. Innate immunity to *Paracoccidioides brasiliensis* infection. Mycopathologia, v. 165, n. 4-5, p. 223-36, 2008 Apr-May 2008. ISSN 0301-486X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18777631> >.

CARNEIRO, L. C. et al. *Paracoccidioides brasiliensis* presents two different cDNAs encoding homologues of the fructose 1,6-biphosphate aldolase: protein isolation, cloning of the cDNAs and genes, structural, phylogenetic, and expression analysis. Fungal Genet Biol, v. 42, n. 1, p. 51-60, Jan 2005. ISSN 1087-1845. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15588996> >.

CARRERO, L. L. et al. New *Paracoccidioides brasiliensis* isolate reveals unexpected genomic variability in this human pathogen. Fungal Genet Biol, v. 45, n. 5, p. 605-12, May 2008. ISSN 1096-0937. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18364259> >.

CASADEVALL, A. et al. Vesicular transport across the fungal cell wall. Trends Microbiol, v. 17, n. 4, p. 158-62, Apr 2009. ISSN 0966-842X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19299133> >.

CASOTTO, M. Characterization of the cellular antigens of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast form. J Clin Microbiol, v. 28, n. 6, p. 1188-93, Jun 1990. ISSN 0095-1137. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2380351> >.

CHAITHIRAYANON, K. et al. Molecular and immunological characterization of encoding gene and 14-3-3 protein 1 in *Fasciola gigantica*. Parasitology, v. 133, n. Pt 6, p. 763-75, Dec 2006. ISSN 0031-1820. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16938151> >.

CHANG, W. N. et al. Cerebrospinal fluid 14-3-3-gamma protein level in eight HIV-negative cryptococcal meningitis adults. *Eur J Neurol*, v. 15, n. 4, p. 428-30, Apr 2008. ISSN 1468-1331. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18284425> >.

CHAUDHRI, M.; SCARABEL, M.; AITKEN, A. Mammalian and yeast 14-3-3 isoforms form distinct patterns of dimers in vivo. *Biochem Biophys Res Commun*, v. 300, n. 3, p. 679-85, Jan 2003. ISSN 0006-291X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12507503> >.

CHENG, S. et al. The role of *Candida albicans* NOT5 in virulence depends upon diverse host factors in vivo. *Infect Immun*, v. 73, n. 11, p. 7190-7, Nov 2005. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16239513> >.

CHIARELLA, A. P. et al. The relative importance of CD4+ and CD8+T cells in immunity to pulmonary paracoccidioidomycosis. *Microbes Infect*, v. 9, n. 9, p. 1078-88, Jul 2007. ISSN 1286-4579. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17692551> >.

CHOHAN, G. et al. The role of cerebrospinal fluid 14-3-3 and other proteins in the diagnosis of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease in the UK: a 10-year review. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, v. 81, n. 11, p. 1243-8, Nov 2010. ISSN 1468-330X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20855493> >.

COLTRI, K. C. et al. Paracoccin, a GlcNAc-binding lectin from *Paracoccidioides brasiliensis*, binds to laminin and induces TNF-alpha production by macrophages. *Microbes Infect*, v. 8, n. 3, p. 704-13, Mar 2006. ISSN 1286-4579. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16476564> >.

COOPER, G. M. *The cell : a molecular approach*. 2nd. Washington, D.C. Sunderland, Mass.: ASM Press ;Sinauer Associates, 2000. xxiv, 689 p. ISBN 0878931198 (cloth alk. paper) 0878931066. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?call=bv.View..ShowTOC&rid=cooper.TOC&depth=2> >.

COSTA, A. A. et al. Characterization of a gene which encodes a mannosyltransferase homolog of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Microbes Infect*, v. 4, n. 10, p. 1027-34, Aug 2002. ISSN 1286-4579. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12191652> >.

COUTINHO, Z. F. et al. Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980-1995). *Cad Saude Publica*, v. 18, n. 5, p. 1441-54, 2002 Sep-Oct 2002. ISSN 0102-311X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12244377> >.

CRUZ, A. H. et al. Phosphorylation is the major mechanism regulating isocitrate lyase activity in *Paracoccidioides brasiliensis* yeast cells. *FEBS J*, v. 278, n. 13, p. 2318-32, Jul 2011. ISSN 1742-4658. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21535474> >.

CUNHA, D. A. et al. Heterologous expression, purification, and immunological reactivity of a recombinant HSP60 from *Paracoccidioides brasiliensis*. Clin Diagn Lab Immunol, v. 9, n. 2, p. 374-7, Mar 2002. ISSN 1071-412X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11874881> >.

DA FONSECA, C. A. et al. Two-dimensional electrophoresis and characterization of antigens from *Paracoccidioides brasiliensis*. Microbes Infect, v. 3, n. 7, p. 535-42, Jun 2001. ISSN 1286-4579. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11418327> >.

DA SILVA CASTRO, N. et al. Characterization of *Paracoccidioides brasiliensis* PbDfg5p, a cell-wall protein implicated in filamentous growth. Yeast, v. 25, n. 2, p. 141-54, Feb 2008. ISSN 0749-503X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18098122> >.

DA SILVA, F. C. et al. Morphologic organization of pulmonary granulomas in mice infected with *Paracoccidioides brasiliensis*. Am J Trop Med Hyg, v. 80, n. 5, p. 798-804, May 2009. ISSN 1476-1645. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19407127> >.

DA SILVA NETO, B. R. et al. The malate synthase of *Paracoccidioides brasiliensis* is a linked surface protein that behaves as an anchorless adhesin. BMC Microbiol, v. 9, p. 272, 2009. ISSN 1471-2180. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20034376> >.

DARLING, D. L.; YINGLING, J.; WYNshaw-BORIS, A. Role of 14-3-3 proteins in eukaryotic signaling and development. Curr Top Dev Biol, v. 68, p. 281-315, 2005. ISSN 0070-2153. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16125003> >.

DE MATTOS GROSSO, D. et al. Characterization of gp70 and anti-gp70 monoclonal antibodies in *Paracoccidioides brasiliensis* pathogenesis. Infect Immun, v. 71, n. 11, p. 6534-42, Nov 2003. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14573675> >.

DEL VECCHIO, A. et al. Induction of apoptosis in A549 pulmonary cells by two *Paracoccidioides brasiliensis* samples. Mem Inst Oswaldo Cruz, v. 104, n. 5, p. 749-54, Aug 2009. ISSN 1678-8060. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19820837> >.

DELILLE, J. M.; SEHNKE, P. C.; FERL, R. J. The arabidopsis 14-3-3 family of signaling regulators. Plant Physiol, v. 126, n. 1, p. 35-8, May 2001. ISSN 0032-0889. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11351068> >.

DELNEGRO, G. et al. The sensitivity, specificity and efficiency values of some serological tests used in the diagnosis of paracoccidioidomycosis. Revista Do Instituto De Medicina Tropical De Sao Paulo, v. 33, n. 4, p. 277-280, JUL-AUG 1991 1991. ISSN 0036-4665.

DENIZOT, F.; LANG, R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J Immunol Methods*, v. 89, n. 2, p. 271-7, May 1986. ISSN 0022-1759. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3486233> >.

DONOFRIO, F. C. et al. Enolase from *Paracoccidioides brasiliensis*: isolation and identification as a fibronectin-binding protein. *J Med Microbiol*, v. 58, n. Pt 6, p. 706-13, Jun 2009. ISSN 0022-2615. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19429745> >.

DOS REIS ALMEIDA, F. B. et al. Paracoccin from *Paracoccidioides brasiliensis*; purification through affinity with chitin and identification of N-acetyl-beta-D-glucosaminidase activity. *Yeast*, v. 27, n. 2, p. 67-76, Feb 2010. ISSN 1097-0061. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19908201> >.

DÍEZ, S. et al. *Paracoccidioides brasiliensis* 87-kilodalton antigen, a heat shock protein useful in diagnosis: characterization, purification, and detection in biopsy material via immunohistochemistry. *J Clin Microbiol*, v. 40, n. 2, p. 359-65, Feb 2002. ISSN 0095-1137. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11825942> >.

ETIENNE-MANNEVILLE, S. Cdc42--the centre of polarity. *J Cell Sci*, v. 117, n. Pt 8, p. 1291-300, Mar 2004. ISSN 0021-9533. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15020669> >.

FALCONE, S. et al. Macropinocytosis: regulated coordination of endocytic and exocytic membrane traffic events. *J Cell Sci*, v. 119, n. Pt 22, p. 4758-69, Nov 2006. ISSN 0021-9533. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17077125> >.

FELIPE, M. S. et al. Transcriptional profiles of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* in mycelium and yeast cells. *J Biol Chem*, v. 280, n. 26, p. 24706-14, Jul 2005. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15849188> >.

FELIPE, M. S. et al. Transcriptome characterization of the dimorphic and pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* by EST analysis. *Yeast*, v. 20, n. 3, p. 263-71, Feb 2003. ISSN 0749-503X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12557278> >.

FERNANDES, L. et al. Transcriptional profile of *ras1* and *ras2* and the potential role of farnesylation in the dimorphism of the human pathogen *Paracoccidioides brasiliensis*. *FEMS Yeast Res*, v. 8, n. 2, p. 300-10, Mar 2008. ISSN 1567-1356. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17927766> >.

FERRARI, M.; FORNASIERO, M. C.; ISETTA, A. M. MTT colorimetric assay for testing macrophage cytotoxic activity in vitro. *J Immunol Methods*, v. 131, n. 2, p. 165-72, Aug 1990. ISSN 0022-1759. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2391427> >.

FERREIRA-DA-CRUZ, M. F.; GALVÃO-CASTRO, B.; DANIEL-RIBEIRO, C. Isolation and antigenicity of a 45-kilodalton *Paracoccidioides brasiliensis* immunodominant antigen. *Infect Immun*, v. 60, n. 7, p. 2667-71, Jul 1992. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1612736> >.

FINLAY, B. B.; FALKOW, S. Common themes in microbial pathogenicity revisited. *Microbiol Mol Biol Rev*, v. 61, n. 2, p. 136-69, Jun 1997. ISSN 1092-2172. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9184008> >.

FIRON, A.; LESAGE, G.; BUSSEY, H. Integrative studies put cell wall synthesis on the yeast functional map. *Curr Opin Microbiol*, v. 7, n. 6, p. 617-23, Dec 2004. ISSN 1369-5274. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15556034> >.

FLANNAGAN, R. S. et al. *Burkholderia cenocepacia* disrupts host cell actin cytoskeleton by inactivating Rac and Cdc42. *Cell Microbiol*, Oct 2011. ISSN 1462-5822. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22023324> >.

FLAVIA 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, n. 1-2, p. 87-94, 2002 Jul-Aug 2002. ISSN 0008-8749. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12470616> >.

FORD, J. C. et al. 14-3-3 protein homologs required for the DNA damage checkpoint in fission yeast. *Science*, v. 265, n. 5171, p. 533-5, Jul 1994. ISSN 0036-8075. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8036497> >.

FRANCO, M. Host-parasite relationships in paracoccidioidomycosis. *J Med Vet Mycol*, v. 25, n. 1, p. 5-18, Feb 1987. ISSN 0268-1218. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3553526> >.

FRANCO, M. et al. Host-parasite relationship in paracoccidioidomycosis. *Curr Top Med Mycol*, v. 5, p. 115-49, 1993. ISSN 0177-4204. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8242798> >.

FRASES, S.; VIANA, N. B.; CASADEVALL, A. Biophysical methods for the study of microbial surfaces. *Front Microbiol*, v. 2, p. 207, 2011. ISSN 1664-302X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22013430> >.

FRISCHKNECHT, F.; WAY, M. Surfing pathogens and the lessons learned for actin polymerization. *Trends Cell Biol*, v. 11, n. 1, p. 30-38, Jan 2001. ISSN 0962-8924. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11146296> >.

FU, H.; SUBRAMANIAN, R. R.; MASTERS, S. C. 14-3-3 proteins: structure, function, and regulation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, v. 40, p. 617-47, 2000. ISSN 0362-1642. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10836149> >.

GANIKO, L. et al. Paracoccin, an N-acetyl-glucosamine-binding lectin of *Paracoccidioides brasiliensis*, is involved in fungal growth. *Microbes Infect*, v. 9,

n. 6, p. 695-703, May 2007. ISSN 1286-4579. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17400504> >.

GARCÍA BLANCO, S. et al. Differential PbP27 expression in the yeast and mycelial forms of the *Paracoccidioides brasiliensis* species complex. Fungal Genet Biol, Sep 2011. ISSN 1096-0937. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21945996> >.

GERLIER, D.; THOMASSET, N. Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation. J Immunol Methods, v. 94, n. 1-2, p. 57-63, Nov 1986. ISSN 0022-1759. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3782817> >.

GHAFFARI, A. et al. Fibroblast extracellular matrix gene expression in response to keratinocyte-releasable stratifin. J Cell Biochem, v. 98, n. 2, p. 383-93, May 2006. ISSN 0730-2312. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16440305> >.

GHAHARY, A. et al. Differentiated keratinocyte-releasable stratifin (14-3-3 sigma) stimulates MMP-1 expression in dermal fibroblasts. J Invest Dermatol, v. 124, n. 1, p. 170-7, Jan 2005. ISSN 0022-202X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15654971> >.

GOLDMAN, G. H. et al. Expressed sequence tag analysis of the human pathogen *Paracoccidioides brasiliensis* yeast phase: identification of putative homologues of *Candida albicans* virulence and pathogenicity genes. Eukaryot Cell, v. 2, n. 1, p. 34-48, Feb 2003. ISSN 1535-9778. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12582121> >.

GONZALEZ, A. et al. Recognition of extracellular matrix proteins by *Paracoccidioides brasiliensis* yeast cells. Med Mycol, v. 43, n. 7, p. 637-45, Nov 2005. ISSN 1369-3786. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16396249> >.

GONZALEZ, A. et al. Expression of adhesion molecules in lungs of mice infected with *Paracoccidioides brasiliensis* conidia. Microbes Infect, v. 7, n. 4, p. 666-73, Apr 2005. ISSN 1286-4579. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15857804> >.

GONZÁLEZ, A. et al. Purification and partial characterization of a *Paracoccidioides brasiliensis* protein with capacity to bind to extracellular matrix proteins. Infect Immun, v. 73, n. 4, p. 2486-95, Apr 2005. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15784595> >.

GONZALEZ, A. et al. Involvement of extracellular matrix proteins in the course of experimental paracoccidioidomycosis. FEMS Immunol Med Microbiol, v. 53, n. 1, p. 114-25, Jun 2008. ISSN 0928-8244. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18400008> >.

GUIGNOT, J.; SERVIN, A. L. Maintenance of the *Salmonella*-containing vacuole in the juxtannuclear area: a role for intermediate filaments. Microb

Pathog, v. 45, n. 5-6, p. 415-22, 2008 Nov-Dec 2008. ISSN 0882-4010. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18977288> >.

GUTTMAN, J. A.; FINLAY, B. B. Tight junctions as targets of infectious agents. Biochim Biophys Acta, v. 1788, n. 4, p. 832-41, Apr 2009. ISSN 0006-3002. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19059200> >.

GÓMEZ, B. L. et al. Antigenemia in patients with paracoccidioidomycosis: detection of the 87-kilodalton determinant during and after antifungal therapy. J Clin Microbiol, v. 36, n. 11, p. 3309-16, Nov 1998. ISSN 0095-1137. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9774584> >.

HALL, A. Rho GTPases and the control of cell behaviour. Biochem Soc Trans, v. 33, n. Pt 5, p. 891-5, Nov 2005. ISSN 0300-5127. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16246005> >.

HAN, J. et al. Metabolomics: towards understanding host-microbe interactions. Future Microbiology, v. 5, n. 2, p. 153-161, FEB 2010 2010. ISSN 1746-0913.

HAN, Y. et al. Expression of beta-1,4-galactosyltransferase-I affects cellular adhesion in human peripheral blood CD4(+) T cells. Cellular Immunology, v. 262, n. 1, p. 11-17, 2010 2010. ISSN 0008-8749.

HANNA, S. A.; MONTEIRO DA SILVA, J. L.; GIANNINI, M. J. Adherence and intracellular parasitism of *Paracoccidioides brasiliensis* in Vero cells. Microbes Infect, v. 2, n. 8, p. 877-84, Jul 2000. ISSN 1286-4579. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10962270> >.

HERNANDEZ, O. et al. Gene expression during activation of *Paracoccidioides brasiliensis* conidia. Yeast, Aug 2011. ISSN 1097-0061. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21960298> >.

HERNÁNDEZ, O. et al. A 32-kilodalton hydrolase plays an important role in *Paracoccidioides brasiliensis* adherence to host cells and influences pathogenicity. Infect Immun, v. 78, n. 12, p. 5280-6, Dec 2010. ISSN 1098-5522. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20876288> >.

HERNÁNDEZ, O. et al. The hydrolase PbHAD32 participates in the adherence of *Paracoccidioides brasiliensis* conidia to epithelial lung cells. Med Mycol, Oct 2011. ISSN 1460-2709. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21988701> >.

HERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, A. et al. Proteomic analysis of in vitro newly excysted juveniles from *Fasciola hepatica*. Mol Biochem Parasitol, v. 172, n. 2, p. 121-8, Aug 2010. ISSN 1872-9428. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20403391> >.

HONING, H. et al. RhoA activation promotes transendothelial migration of monocytes via ROCK. J Leukoc Biol, v. 75, n. 3, p. 523-8, Mar 2004. ISSN 0741-5400. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14634067> >.

HUANG, M. et al. RhoB links PDGF signaling to cell migration by coordinating activation and localization of Cdc42 and Rac. *J Cell Biochem*, v. 112, n. 6, p. 1572-84, Jun 2011. ISSN 1097-4644. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21344485> >.

HUNTER, T. Oncoprotein networks. *Cell*, v. 88, n. 3, p. 333-46, Feb 1997. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9039260> >.

HWANG, L. et al. Identifying phase-specific genes in the fungal pathogen *Histoplasma capsulatum* using a genomic shotgun microarray. *Mol Biol Cell*, v. 14, n. 6, p. 2314-26, Jun 2003. ISSN 1059-1524. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12808032> >.

ICHIMURA, T. et al. Identification of the site of interaction of the 14-3-3 protein with phosphorylated tryptophan hydroxylase. *J Biol Chem*, v. 270, n. 48, p. 28515-8, Dec 1995. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7499362> >.

IDNURM, A. et al. *Cryptococcus neoformans* virulence gene discovery through insertional mutagenesis. *Eukaryot Cell*, v. 3, n. 2, p. 420-9, Apr 2004. ISSN 1535-9778. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15075272> >.

ISHIDA, H. et al. Botulinum toxin type A targets RhoB to inhibit lysophosphatidic acid-stimulated actin reorganization and acetylcholine release in nerve growth factor-treated PC12 cells. *J Pharmacol Exp Ther*, v. 310, n. 3, p. 881-9, Sep 2004. ISSN 0022-3565. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15140914> >.

IZACC, S. M. et al. Molecular cloning, characterization and expression of the heat shock protein 60 gene from the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Med Mycol*, v. 39, n. 5, p. 445-55, Oct 2001. ISSN 1369-3786. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12054056> >.

JIN, J. et al. Proteomic, functional, and domain-based analysis of in vivo 14-3-3 binding proteins involved in cytoskeletal regulation and cellular organization. *Curr Biol*, v. 14, n. 16, p. 1436-50, Aug 2004. ISSN 0960-9822. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15324660> >.

KASHINO, S. S. et al. Resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* infection is linked to a preferential Th1 immune response, whereas susceptibility is associated with absence of IFN-gamma production. *J Interferon Cytokine Res*, v. 20, n. 1, p. 89-97, Jan 2000. ISSN 1079-9907. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10670655> >.

KELLY, M. N. et al. Bmh1p (14-3-3) mediates pathways associated with virulence in *Candida albicans*. *Microbiology*, v. 155, n. Pt 5, p. 1536-46, May 2009. ISSN 1350-0872. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19372164> >.

KERR, M. C.; TEASDALE, R. D. Defining macropinocytosis. *Traffic*, v. 10, n. 4, p. 364-71, Apr 2009. ISSN 1600-0854. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19192253> >.

KIM, Y. et al. Autophagy induced by rapamycin and carbon-starvation have distinct proteome profiles in *Aspergillus nidulans*. *Biotechnol Bioeng*, v. 108, n. 11, p. 2705-15, Nov 2011. ISSN 1097-0290. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21618477> >.

KRALL, R.; ZHANG, Y.; BARBIERI, J. T. Intracellular membrane localization of *Pseudomonas* ExoS and *Yersinia* YopE in mammalian cells. *J Biol Chem*, v. 279, n. 4, p. 2747-53, Jan 2004. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14597627> >.

KRAUS, P. R.; HOFMANN, A. F.; HARRIS, S. D. Characterization of the *Aspergillus nidulans* 14-3-3 homologue, ArtA. *FEMS Microbiol Lett*, v. 210, n. 1, p. 61-6, Apr 2002. ISSN 0378-1097. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12023078> >.

KUROKAWA, C. S.; SUGIZAKI, M. F.; PERAÇOLI, M. T. Virulence factors in fungi of systemic mycoses. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, v. 40, n. 3, p. 125-35, 1998 May-Jun 1998. ISSN 0036-4665. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9830725> >.

KWON-CHUNG, K. Gene disruption to evaluate the role of fungal candidate virulence genes. *Curr Opin Microbiol*, v. 1, n. 4, p. 381-9, Aug 1998. ISSN 1369-5274. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10066511> >.

LALLE, M. et al. Involvement of 14-3-3 protein post-translational modifications in *Giardia duodenalis* encystation. *Int J Parasitol*, v. 40, n. 2, p. 201-13, Feb 2010. ISSN 1879-0135. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19733174> >.

LAM, E. et al. Stratifin-induced matrix metalloproteinase-1 in fibroblast is mediated by c-fos and p38 mitogen-activated protein kinase activation. *J Invest Dermatol*, v. 125, n. 2, p. 230-8, Aug 2005. ISSN 0022-202X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16098031> >.

LATGÉ, J. P. Tasting the fungal cell wall. *Cell Microbiol*, v. 12, n. 7, p. 863-72, Jul 2010. ISSN 1462-5822. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20482553> >.

LEE, E. K. et al. 14-3-3epsilon protein increases matrix metalloproteinase-2 gene expression via p38 MAPK signaling in NIH3T3 fibroblast cells. *Exp Mol Med*, v. 41, n. 7, p. 453-561, Jul 2009. ISSN 1226-3613. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19322035> >.

LENGELER, K. B. et al. Signal transduction cascades regulating fungal development and virulence. *Microbiol Mol Biol Rev*, v. 64, n. 4, p. 746-85, Dec

2000. ISSN 1092-2172. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11104818> >.

LIM, J. P.; GLEESON, P. A. Macropinocytosis: an endocytic pathway for internalising large gulps. *Immunol Cell Biol*, Mar 2011. ISSN 1440-1711. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21423264> >.

LIN, M. et al. Modulation of sterol homeostasis by the Cdc42p effectors Cla4p and Ste20p in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS J*, v. 276, n. 24, p. 7253-64, Dec 2009. ISSN 1742-4658. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20050180> >.

LIU, F. et al. Excretory/secretory proteome of the adult developmental stage of human blood fluke, *Schistosoma japonicum*. *Mol Cell Proteomics*, v. 8, n. 6, p. 1236-51, Jun 2009. ISSN 1535-9484. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19299421> >.

LIU, L. et al. Immunoproteomic analysis of the second-generation merozoite proteins of *Eimeria tenella*. *Vet Parasitol*, v. 164, n. 2-4, p. 173-82, Oct 2009. ISSN 1873-2550. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19581052> >.

LOTTERSBERGER, F. et al. The *Saccharomyces cerevisiae* 14-3-3 proteins are required for the G1/S transition, actin cytoskeleton organization and cell wall integrity. *Genetics*, v. 173, n. 2, p. 661-75, Jun 2006. ISSN 0016-6731. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16648583> >.

LOURES, F. V. et al. MyD88 signaling is required for efficient innate and adaptive immune responses to *Paracoccidioides brasiliensis* infection. *Infect Immun*, v. 79, n. 6, p. 2470-80, Jun 2011. ISSN 1098-5522. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21422180> >.

MARION, C. L. et al. An alpha-(1,4)-amylase is essential for alpha-(1,3)-glucan production and virulence in *Histoplasma capsulatum*. *Mol Microbiol*, v. 62, n. 4, p. 970-83, Nov 2006. ISSN 0950-382X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17038119> >.

MASSAGUÉ, J. The transforming growth factor-beta family. *Annu Rev Cell Biol*, v. 6, p. 597-641, 1990. ISSN 0743-4634. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2177343> >.

MASTERS, S. C. et al. Interaction of 14-3-3 with a nonphosphorylated protein ligand, exoenzyme S of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochemistry*, v. 38, n. 16, p. 5216-21, Apr 1999. ISSN 0006-2960. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10213629> >.

MATUTE, D. R. et al. Cryptic speciation and recombination in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* as revealed by gene genealogies. *Mol Biol Evol*, v. 23, n. 1, p. 65-73, Jan 2006. ISSN 0737-4038. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16151188> >.

MCGONIGLE, S. et al. Conserved role for 14-3-3epsilon downstream of type I TGFbeta receptors. *FEBS Lett*, v. 490, n. 1-2, p. 65-9, Feb 2001. ISSN 0014-5793. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11172812> >.

MCGONIGLE, S.; BEALL, M. J.; PEARCE, E. J. Eukaryotic initiation factor 2 alpha subunit associates with TGF beta receptors and 14-3-3 epsilon and acts as a modulator of the TGF beta response. *Biochemistry*, v. 41, n. 2, p. 579-87, Jan 2002. ISSN 0006-2960. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11781097> >.

MENDES-GIANNINI, M. J. et al. Binding of extracellular matrix proteins to *Paracoccidioides brasiliensis*. *Microbes Infect*, v. 8, n. 6, p. 1550-9, May 2006. ISSN 1286-4579. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16698299> >.

MENDES-GIANNINI, M. J. et al. Invasion of epithelial mammalian cells by *Paracoccidioides brasiliensis* leads to cytoskeletal rearrangement and apoptosis of the host cell. *Microbes Infect*, v. 6, n. 10, p. 882-91, Aug 2004. ISSN 1286-4579. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15310464> >.

MENDES-GIANNINI, M. J. et al. Interaction of pathogenic fungi with host cells: Molecular and cellular approaches. *FEMS Immunol Med Microbiol*, v. 45, n. 3, p. 383-94, Sep 2005. ISSN 0928-8244. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16087326> >.

MENDES-GIANNINI, M. J. et al. Pathogenesis II: fungal responses to host responses: interaction of host cells with fungi. *Med Mycol*, v. 38 Suppl 1, p. 113-23, 2000. ISSN 1369-3786. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11204137> >.

MERRELL, D. S.; FALKOW, S. Frontal and stealth attack strategies in microbial pathogenesis. *Nature*, v. 430, n. 6996, p. 250-6, Jul 2004. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15241423> >.

MIRANDA, E. J.; GONÇALVES, L. G.; FRANÇA, F. O. Chronic pulmonary paracoccidioidomycosis in an AIDS patient and *Mycobacterium gordonae* as confounding factor. *Braz J Infect Dis*, v. 15, n. 1, p. 92-3, 2011 Jan-Feb 2011. ISSN 1678-4391. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21412599> >.

MIYOSHI, J.; TAKAI, Y. Structural and functional associations of apical junctions with cytoskeleton. *Biochim Biophys Acta*, v. 1778, n. 3, p. 670-91, Mar 2008. ISSN 0006-3002. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18201548> >.

MONTEIRO DA SILVA, J. L. et al. Epithelial cells treated with genistein inhibit adhesion and endocytosis of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, v. 92, n. 1, p. 129-35, Jul 2007. ISSN 0003-6072. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17120081> >.

NAGASE, H.; WOESSNER, J. F. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem*, v. 274, n. 31, p. 21491-4, Jul 1999. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10419448> >.

NEAL, C. L.; YU, D. 14-3-3 ζ as a prognostic marker and therapeutic target for cancer. *Expert Opin Ther Targets*, v. 14, n. 12, p. 1343-54, Dec 2010. ISSN 1744-7631. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21058923> >.

NITTLER, M. P. et al. Identification of *Histoplasma capsulatum* transcripts induced in response to reactive nitrogen species. *Mol Biol Cell*, v. 16, n. 10, p. 4792-813, Oct 2005. ISSN 1059-1524. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16030248> >.

NOBES, C.; BAVERSTOCK, J.; SAIBIL, H. Activation of the GTP-binding protein Gq by rhodopsin in squid photoreceptors. *Biochem J*, v. 287 (Pt 2), p. 545-8, Oct 1992. ISSN 0264-6021. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1445212> >.

NOGUEIRA, S. V. et al. *Paracoccidioides brasiliensis* enolase is a surface protein that binds plasminogen and mediates interaction of yeast forms with host cells. *Infect Immun*, v. 78, n. 9, p. 4040-50, Sep 2010. ISSN 1098-5522. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20605975> >.

NOMBELA, C.; GIL, C.; CHAFFIN, W. L. Non-conventional protein secretion in yeast. *Trends Microbiol*, v. 14, n. 1, p. 15-21, Jan 2006. ISSN 0966-842X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16356720> >.

OBSIL, T.; OBSILOVA, V. Structural basis of 14-3-3 protein functions. *Semin Cell Dev Biol*, Sep 2011. ISSN 1096-3634. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21920446> >.

ODDS, F. C.; GOW, N. A.; BROWN, A. J. Fungal virulence studies come of age. *Genome Biol*, v. 2, n. 3, p. REVIEWS1009, 2001. ISSN 1465-6914. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11276429> >.

OH, J. E. et al. α 3 β 1 integrin promotes cell survival via multiple interactions between 14-3-3 isoforms and proapoptotic proteins. *Exp Cell Res*, v. 315, n. 18, p. 3187-200, Nov 2009. ISSN 1090-2422. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19683525> >.

OLIVEIRA, D. L. et al. Extracellular vesicles from *Cryptococcus neoformans* modulate macrophage functions. *Infect Immun*, v. 78, n. 4, p. 1601-9, Apr 2010. ISSN 1098-5522. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20145096> >.

ORTIZ, B. L. et al. Immunological characterization of a recombinant 27-kilodalton antigenic protein from *Paracoccidioides brasiliensis*. *Clin Diagn Lab Immunol*, v. 3, n. 2, p. 239-41, Mar 1996. ISSN 1071-412X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8991645> >.

PAES, H. C. et al. Characterisation of the heat shock factor of the human thermodimorphic pathogen *Paracoccidioides lutzii*. Fungal Genet Biol, v. 48, n. 10, p. 947-55, Oct 2011. ISSN 1096-0937. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21708278> >.

PARENTE, A. F. et al. 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. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21829521> >.

PATEL, A. et al. Host protein interactions with enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC): 14-3-3tau binds Tir and has a role in EPEC-induced actin polymerization. Cell Microbiol, v. 8, n. 1, p. 55-71, Jan 2006. ISSN 1462-5814. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16367866> >.

PATTI, J. M.; HÖÖK, M. Microbial adhesins recognizing extracellular matrix macromolecules. Curr Opin Cell Biol, v. 6, n. 5, p. 752-8, Oct 1994. ISSN 0955-0674. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7833055> >.

PEREIRA, L. A. et al. Analysis of the *Paracoccidioides brasiliensis* triosephosphate isomerase suggests the potential for adhesin function. FEMS Yeast Res, v. 7, n. 8, p. 1381-8, Dec 2007. ISSN 1567-1356. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17714474> >.

PERES DA SILVA, R. et al. Differential gene expression analysis of *Paracoccidioides brasiliensis* during keratinocyte infection. J Med Microbiol, v. 60, n. Pt 3, p. 269-80, Mar 2011. ISSN 1473-5644. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21071542> >.

PHAM, C. D.; PERLIN, M. H. Possible additional roles in mating for *Ustilago maydis* Rho1 and 14-3-3 homologues. Commun Integr Biol, v. 3, n. 1, p. 57-9, Jan 2010. ISSN 1942-0889. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20539785> >.

PINA, A.; BERNARDINO, S.; CALICH, V. L. Alveolar macrophages from susceptible mice are more competent than those of resistant mice to control initial *Paracoccidioides brasiliensis* infection. J Leukoc Biol, v. 83, n. 5, p. 1088-99, May 2008. ISSN 0741-5400. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18281437> >.

RAPPLEYE, C. A.; GOLDMAN, W. E. Defining virulence genes in the dimorphic fungi. Annu Rev Microbiol, v. 60, p. 281-303, 2006. ISSN 0066-4227. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16753032> >.

REDINGTON, A. E. et al. Transforming growth factor-beta 1 in asthma. Measurement in bronchoalveolar lavage fluid. Am J Respir Crit Care Med, v. 156, n. 2 Pt 1, p. 642-7, Aug 1997. ISSN 1073-449X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9279252> >.

REZENDE, T. C. et al. A quantitative view of the morphological phases of *Paracoccidioides brasiliensis* using proteomics. J Proteomics, Sep 2011. ISSN 1876-7737. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21920475> >.

RIDLEY, A. J.; HALL, A. Distinct patterns of actin organization regulated by the small GTP-binding proteins Rac and Rho. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, v. 57, p. 661-71, 1992. ISSN 0091-7451. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1339704> >.

RIDLEY, A. J. et al. The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. Cell, v. 70, n. 3, p. 401-10, Aug 1992. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1643658> >.

RODRIGUES, M. L. et al. Extracellular vesicles produced by *Cryptococcus neoformans* contain protein components associated with virulence. Eukaryot Cell, v. 7, n. 1, p. 58-67, Jan 2008. ISSN 1535-9786. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18039940> >.

RODRIGUES, M. L. et al. Vesicular polysaccharide export in *Cryptococcus neoformans* is a eukaryotic solution to the problem of fungal trans-cell wall transport. Eukaryot Cell, v. 6, n. 1, p. 48-59, Jan 2007. ISSN 1535-9778. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17114598> >.

ROTH, D.; BIRKENFELD, J.; BETZ, H. Dominant-negative alleles of 14-3-3 proteins cause defects in actin organization and vesicle targeting in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. FEBS Lett, v. 460, n. 3, p. 411-6, Nov 1999. ISSN 0014-5793. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10556507> >.

SALZET, M.; CAPRON, A.; STEFANO, G. B. Molecular crosstalk in host-parasite relationships: schistosome- and leech-host interactions. Parasitol Today, v. 16, n. 12, p. 536-40, Dec 2000. ISSN 0169-4758. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11121852> >.

SAN-BLAS, G.; NIÑO-VEGA, G. *Paracoccidioides brasiliensis*: chemical and molecular tools for research on cell walls, antifungals, diagnosis, taxonomy. Mycopathologia, v. 165, n. 4-5, p. 183-95, 2008 Apr-May 2008. ISSN 0301-486X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18777628> >.

SAN-BLAS, G.; NIÑO-VEGA, G.; ITURRIAGA, T. *Paracoccidioides brasiliensis* and paracoccidioidomycosis: molecular approaches to morphogenesis, diagnosis, epidemiology, taxonomy and genetics. Med Mycol, v. 40, n. 3, p. 225-42, Jun 2002. ISSN 1369-3786. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12146752> >.

SANTORO, M. M.; GAUDINO, G.; MARCHISIO, P. C. The MSP receptor regulates alpha6beta4 and alpha3beta1 integrins via 14-3-3 proteins in keratinocyte migration. Dev Cell, v. 5, n. 2, p. 257-71, Aug 2003. ISSN 1534-5807. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12919677> >.

SCHECHTMAN, D. et al. Expression and immunolocalization of the 14-3-3 protein of *Schistosoma mansoni*. Parasitology, v. 123, n. Pt 6, p. 573-82, Dec 2001. ISSN 0031-1820. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11814044> >.

SCHIAVO, G.; VAN DER GOOT, F. G. The bacterial toxin toolkit. Nat Rev Mol Cell Biol, v. 2, n. 7, p. 530-7, Jul 2001. ISSN 1471-0072. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11433367> >.

SHIKANAI-YASUDA, M. A. et al. [Guidelines in paracoccidioidomycosis]. Rev Soc Bras Med Trop, v. 39, n. 3, p. 297-310, 2006 May-Jun 2006. ISSN 0037-8682. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16906260> >.

SILVA, M. F. et al. Phenotypic and functional characterization of pulmonary macrophages subpopulations after intratracheal injection of *Paracoccidioides brasiliensis* cell wall components. Immunobiology, v. 216, n. 7, p. 821-31, Jul 2011. ISSN 1878-3279. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21257226> >.

SILVA, S. S. et al. Insights into the pathobiology of *Paracoccidioides brasiliensis* from transcriptome analysis--advances and perspectives. Mycopathologia, v. 165, n. 4-5, p. 249-58, 2008 Apr-May 2008. ISSN 0301-486X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18777632> >.

SINGER-VERMES, L. M. et al. Evaluation of the pathogenicity and immunogenicity of seven *Paracoccidioides brasiliensis* isolates in susceptible inbred mice. J Med Vet Mycol, v. 27, n. 2, p. 71-82, 1989. ISSN 0268-1218. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2746437> >.

SINHA, S.; YANG, W. Cellular signaling for activation of Rho GTPase Cdc42. Cell Signal, v. 20, n. 11, p. 1927-34, Nov 2008. ISSN 0898-6568. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18558478> >.

SIQUEIRA, A. Avaliação da sensibilidade e especificidade de algumas provas sorológicas no diagnóstico, prognóstico e controle de cura da paracoccidioidomicose. Caracterização imunoquímica do antígeno E2 de *Paracoccidioides brasiliensis*. 1982. 256 (Doutorado). Instituto de Ciências Biomédicas, , Universidade de São Paulo

SOHN, K. et al. An in vitro assay to study the transcriptional response during adherence of *Candida albicans* to different human epithelia. FEMS Yeast Res, v. 6, n. 7, p. 1085-93, Nov 2006. ISSN 1567-1356. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17042758> >.

SULLIVAN, D. J. et al. Comparison of the epidemiology, drug resistance mechanisms, and virulence of *Candida dubliniensis* and *Candida albicans*. FEMS Yeast Res, v. 4, n. 4-5, p. 369-76, Jan 2004. ISSN 1567-1356. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14734017> >.

SWANSON, J. A.; BAER, S. C. Phagocytosis by zippers and triggers. *Trends Cell Biol*, v. 5, n. 3, p. 89-93, Mar 1995. ISSN 0962-8924. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14732161> >.

SWANSON, J. A.; WATTS, C. Macropinocytosis. *Trends Cell Biol*, v. 5, n. 11, p. 424-8, Nov 1995. ISSN 0962-8924. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14732047> >.

TABORDA, C. P. et al. Melanin as a virulence factor of *Paracoccidioides brasiliensis* and other dimorphic pathogenic fungi: a minireview. *Mycopathologia*, v. 165, n. 4-5, p. 331-9, 2008 Apr-May 2008. ISSN 0301-486X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18777637> >.

TAVARES, A. H. et al. Early transcriptional response of *Paracoccidioides brasiliensis* upon internalization by murine macrophages. *Microbes Infect*, v. 9, n. 5, p. 583-90, Apr 2007. ISSN 1286-4579. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17387029> >.

TEIXEIRA, M. M. et al. Phylogenetic analysis reveals a high level of speciation in the *Paracoccidioides* genus. *Mol Phylogenet Evol*, v. 52, n. 2, p. 273-83, Aug 2009. ISSN 1095-9513. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19376249> >.

TELES, F. R.; MARTINS, M. L. Laboratorial diagnosis of paracoccidioidomycosis and new insights for the future of fungal diagnosis. *Talanta*, v. 85, n. 5, p. 2254-64, Oct 2011. ISSN 1873-3573. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21962643> >.

TOKER, A. et al. Multiple isoforms of a protein kinase C inhibitor (KCIP-1/14-3-3) from sheep brain. Amino acid sequence of phosphorylated forms. *Eur J Biochem*, v. 206, n. 2, p. 453-61, Jun 1992. ISSN 0014-2956. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1317796> >.

TOMAZETT, P. K. et al. 1,3- β -D-Glucan synthase of *Paracoccidioides brasiliensis*: recombinant protein, expression and cytolocalization in the yeast and mycelium phases. *Fungal Biol*, v. 114, n. 10, p. 809-16, Oct 2010. ISSN 1878-6146. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20943190> >.

TOWBIN, H.; STAEBELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 76, n. 9, p. 4350-4, Sep 1979. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/388439> >.

TROYANOVSKY, S. M. Mechanism of cell-cell adhesion complex assembly. *Curr Opin Cell Biol*, v. 11, n. 5, p. 561-6, Oct 1999. ISSN 0955-0674. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10508653> >.

TROYANOVSKY, S. M. Regulation of cadherin-based epithelial cell adhesion by endocytosis. *Front Biosci (Schol Ed)*, v. 1, p. 61-7, 2009. ISSN 1945-0524. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19482683> >.

VALLEJO, M. C. et al. The pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* exports extracellular vesicles containing highly immunogenic α -Galactosyl epitopes. *Eukaryot Cell*, v. 10, n. 3, p. 343-51, Mar 2011. ISSN 1535-9786. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21216942> >.

VAN DE WOUW, A. P.; HOWLETT, B. J. Fungal pathogenicity genes in the age of 'omics'. *Mol Plant Pathol*, v. 12, n. 5, p. 507-14, Jun 2011. ISSN 1364-3703. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21535355> >.

VAN HEMERT, M. J.; STEENSMA, H. Y.; VAN HEUSDEN, G. P. 14-3-3 proteins: key regulators of cell division, signalling and apoptosis. *Bioessays*, v. 23, n. 10, p. 936-46, Oct 2001. ISSN 0265-9247. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11598960> >.

VAN HEUSDEN, G. P. 14-3-3 Proteins: insights from genome-wide studies in yeast. *Genomics*, v. 94, n. 5, p. 287-93, Nov 2009. ISSN 1089-8646. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19631734> >.

VAN HEUSDEN, G. P. et al. The 14-3-3 proteins encoded by the BMH1 and BMH2 genes are essential in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and can be replaced by a plant homologue. *Eur J Biochem*, v. 229, n. 1, p. 45-53, Apr 1995. ISSN 0014-2956. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7744048> >.

VAN HEUSDEN, G. P.; STEENSMA, H. Y. Yeast 14-3-3 proteins. *Yeast*, v. 23, n. 3, p. 159-71, Feb 2006. ISSN 0749-503X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16498703> >.

VAN HEUSDEN, G. P. et al. Characterization of the yeast BMH1 gene encoding a putative protein homologous to mammalian protein kinase II activators and protein kinase C inhibitors. *FEBS Lett*, v. 302, n. 2, p. 145-50, May 1992. ISSN 0014-5793. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1378790> >.

VERMA, A.; IHLER, G. M. Activation of Rac, Cdc42 and other downstream signalling molecules by *Bartonella bacilliformis* during entry into human endothelial cells. *Cell Microbiol*, v. 4, n. 9, p. 557-69, Sep 2002. ISSN 1462-5814. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12390349> >.

VERSTREPEN, K. J.; FINK, G. R. Genetic and epigenetic mechanisms underlying cell-surface variability in protozoa and fungi. *Annu Rev Genet*, v. 43, p. 1-24, 2009. ISSN 1545-2948. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19640229> >.

VICENTINI, A. P. et al. Binding of *Paracoccidioides brasiliensis* to laminin through surface glycoprotein gp43 leads to enhancement of fungal pathogenesis. *Infect Immun*, v. 62, n. 4, p. 1465-9, Apr 1994. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8132354> >.

VOGELMANN, R. et al. Breaking into the epithelial apical-junctional complex--news from pathogen hackers. *Curr Opin Cell Biol*, v. 16, n. 1, p. 86-93, Feb 2004. ISSN 0955-0674. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15037310> >.

WANG, W.; SHAKES, D. C. Molecular evolution of the 14-3-3 protein family. *J Mol Evol*, v. 43, n. 4, p. 384-98, Oct 1996. ISSN 0022-2844. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8798343> >.

WANG, X. et al. Identification and molecular characterization of a novel signaling molecule 14-3-3 epsilon in *Clonorchis sinensis* excretory/secretory products. *Parasitol Res*, Sep 2011. ISSN 1432-1955. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21922237> >.

WILKER, E.; YAFFE, M. B. 14-3-3 Proteins--a focus on cancer and human disease. *J Mol Cell Cardiol*, v. 37, n. 3, p. 633-42, Sep 2004. ISSN 0022-2828. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15350836> >.

WON, J. et al. Cleavage of 14-3-3 protein by caspase-3 facilitates bad interaction with Bcl-x(L) during apoptosis. *J Biol Chem*, v. 278, n. 21, p. 19347-51, May 2003. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12657644> >.

XIDIEH, C. F. et al. 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. 41-9, Aug 1999. ISSN 0300-8584. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10691092> >.

YWAZAKI, C. Y. et al. Role of host glycosphingolipids on *Paracoccidioides brasiliensis* adhesion. *Mycopathologia*, v. 171, n. 5, p. 325-32, May 2011. ISSN 1573-0832. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21057877> >.

ZAMBUZZI-CARVALHO, P. F. et al. The malate synthase of *Paracoccidioides brasiliensis* Pb01 is required in the glyoxylate cycle and in the allantoin degradation pathway. *Med Mycol*, v. 47, n. 7, p. 734-44, Nov 2009. ISSN 1460-2709. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19888806> >.

ZHANG, S. et al. Rho family GTPases regulate p38 mitogen-activated protein kinase through the downstream mediator Pak1. *J Biol Chem*, v. 270, n. 41, p. 23934-6, Oct 1995. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7592586> >.

ZHAO, J. et al. 14-3-3 proteins as potential therapeutic targets. *Semin Cell Dev Biol*, Oct 2011. ISSN 1096-3634. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21983031> >.

CAPÍTULO II

Cloning of the *Paracoccidiodes brasiliensis* 14-3-3 protein and subcellular localization during interaction with pneumocytes

Author: Julhiany de Fátima da Silva¹

Co-authors: Haroldo Cesar de Oliveira¹

Caroline Maria Marcos¹

Rosângela Aparecida Moraes da Silva¹

Ana Marisa Fusco-Almeida¹

Maria José Soares Mendes-Giannini^{1*}

¹ Faculty of Pharmaceutical Sciences, UNESP - Univ Estadual Paulista – Araraquara, Department of Clinical Analyses, Clinical Mycology Laboratory, SP, Brazil.

*corresponding author: Maria José Soares Mendes Giannini

Tel.: +55 (16) 33015716

Fax: +55 (16) 33015714

Address: Rua Expedicionários do Brasil, 1621.

Araraquara - São Paulo - Brazil

CEP - 14801-902

E-mail: giannini@fcfar.unesp.br,

julhiany.silva@gmail.com

ABSTRACT

14-3-3 proteins are a conserved group of small acidic proteins involved in a variety of processes in eukaryotic organisms. However, the exactly function of these proteins in some processes remains unknown. In a previous study, we identified a 14-3-3 protein that acts as an adhesin in *Paracoccidioides brasiliensis* (*Pb*), and we proposed that this protein contributes to the virulence of this important fungal pathogen. Thus, the goal of the present study was to characterize the role of this protein during interaction of the fungus with its host. To achieve this goal, we cloned and expressed the 14-3-3 protein in a heterologous system, determined its subcellular localization and tested whether treatment with this protein caused changes in the actin cytoskeleton of the host cell. Changes in the distribution of actin were observed, and immunocytochemical analysis revealed ubiquitous distribution of this protein in the yeast form of *Pb*, with some concentration in the cytoplasm. However, surprisingly, during the interaction of *Pb* with A549 cells, we observed an apparent increase in the levels of the 14-3-3 protein the cell wall of the fungus, suggesting that this protein may be involved in host-parasite interactions. Treatment with botulinum toxin revealed a significant reduction in the infection rate of A549 cells with *Pb*, indicating that host Rho GTPases are required for *Pb* infection. We are the first to examine the distribution of a 14-3-3 protein in *Pb* during its interaction with A549 cells. Our data may lead to a better understanding of *Pb* interactions with host tissues and of paracoccidioidomycosis pathogenesis.

Keywords: *Paracoccidioides brasiliensis*, 14-3-3 protein, subcellular localization, epithelial cell interaction, adhesin.

INTRODUCTION

Paracoccidioides brasiliensis is a dimorphic fungus, etiologic agent of paracoccidioidomycosis (PCM), disease of multiple organic implications and prolonged evolution (16). *Pb* virulence can be attenuated or lost after subsequent cycles of subculture for during long periods (9) and reestablished after by the passage in animals (10) or in the epithelial cells culture (3). The success of colonization is a complex event, generally involving a ligand coded by the pathogen (adhesins) and a cell receptor.

Protein-protein interactions are crucial in the regulation of many cellular processes and may modulate, for example, cellular location, enzymatic activity, and protein conformation. Furthermore, for the development of multicellular organisms, it is necessary that these interactions are strictly controlled and that they depend on the charge and the conformation of the protein complex in the cellular environment. A common way to change the protein conformation or charge or to stimulate a protein interaction is through the phosphorylation of specific amino acids; however, phosphorylation is not always sufficient to generate changes in the biochemical properties of a protein, and additional protein-protein interactions are often required (11).

Rho GTPase proteins are known to regulate the dynamic organization of the cytoskeleton and membrane traffic, as well as physiological processes such as cell proliferation, motility, polarity, and growth (33). Cdc42 has been characterized as a point of convergence in signal transduction and is involved in multiple signaling pathways, including tyrosine kinase receptors and cytokines, heterodimeric G proteins and those initiated by chemical and physical stress. Many effectors of Cdc42 have been identified; however, understanding the specificity of this signaling pathway remains a major challenge in the field (33). In *Pb*, Cdc42p has been found to be an important molecule that controls the growth of this fungus in the yeast phase (2). Detailed analysis of the molecular mechanisms of *Pb*Cdc42p is extremely important for understanding the host-parasite interactions of *Pb* and providing information on the regulation of cell growth and pathogenesis not only in *Pb* but also other pathogenic fungi (2). Actin plays an important role because it facilitates the accumulation of Cdc42 at specific points of the membrane (5). Rho GTPases are also the center of a

complex signaling pathway that plays an important role in the adherence of the fungus to mammalian cells (33).

In a previous study, a 14-3-3 family protein was characterized by our group as a 30-kDa adhesin of *Pb* that can bind to laminin and contribute to the virulence of this important fungal pathogen (3). 14-3-3 proteins are a highly conserved group of small acidic proteins that have been implicated in a variety of cellular processes in eukaryotes. However, although these proteins are known to be involved in apoptosis, signal transduction, cell cycle regulation and transcription, their exact role in these processes remains unknown (17). Members of this group function as accessory proteins in various processes, act as specific determinants that alter the cellular localization of other proteins with which they interact and are involved in the direct regulation of enzyme activity (34). 14-3-3 proteins also participate in the regulation and organization of the cytoskeleton through the activation of Rho GTPases (21) and mediate changes in the cytoskeleton via integrins, which play important roles in the activation of Rac and Cdc42 (8).

Pb invasion affects the structure of the cytoskeleton of epithelial cells, interfering with morphological features of actin, tubulin and cytokeratin (25). Previously, we demonstrated that a 30-kDa adhesin (14-3-3 protein) of *Pb* causes structural modification of polymerized actin microfilaments and cytokeratin, in addition to inducing apoptosis in the process of *Pb*-epithelial cell interaction (3). However, little is known about the signaling pathways that control cellular changes during the interaction of *Pb* with host cells, or about mechanisms capable of activating cytosolic signals associated with this interaction. Thus, in this study we characterized the 14-3-3 protein of *Pb* by determining its localization, both in the yeast form of the fungus and during the process of interaction with epithelial cells, and elucidating the role of this protein in modulating the signaling events that occur during the invasion of epithelial cells by *Pb*.

MATERIALS AND METHODS

***P. brasiliensis* isolate and growth conditions**

Yeast cells of *Pb* strain 18 (Pb18), which was derived from a clinical case of PCM, were used in this study. Cells were grown for 3-4 days at 37°C on Fava-Netto solid medium (15).

Cloning cDNA containing the complete coding region of 14-3-3 protein into an expression vector

The cloned cDNA containing the complete coding region of 14-3-3 protein (GenBank accession number AY462124) (4) was amplified by PCR using oligonucleotide sense (5'-ATGGGTTACGAAGATGCTG-3') and antisense (5'-CTCAGCGGCCTTAGGAGC-3') primers. The amplification parameters were as follows: an initial denaturation step at 94°C for 2 min, followed by 25 cycles of denaturation at 94°C for 30 s, annealing at 58°C for 30 s, and extension at 72°C for 1 min and 10 s. A final elongation step was performed at 72°C for 7 min. The PCR product was subcloned into the *Sall/XhoI* sites of the pET-32a(+) expression vector (Novagen, Inc., Madison, Wis.). The resulting plasmid was transformed into *Escherichia coli* BL21DE3. Bacteria transformed with the pET-32a-14-3-3r were grown in LB medium supplemented with ampicillin (100 µg/mL) at 37°C until reaching the optical density of 0.6 at 600 nm. Synthesis of the recombinant protein was then initiated by adding isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) to a final concentration of 0.4 mM to the growing culture, and the bacterial extract was pelleted and resuspended in phosphate buffered saline (PBS). After induction, the cells were incubated for 5 h at 37°C with shaking at 200 rpm. Cells were harvested by centrifugation at 10,000 × g for 30 min at 4°C. The supernatant was discarded and the cells were resuspended in lysis buffer (50 mM NaH₂PO₄, 20 mM imidazole, 300 mM NaCl, 1 mM PMSF, 1x PLAAC) and lysed by extensive sonication (pulse on 4.4 s; pulse off 9.9 s; 60% extended for 2 min). The sample was centrifuged at 10,000 × g for 30 min at 4°C. His-tagged Pb14-3-3r was purified using the Ni-NTA column (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) equilibrated with 10 column volumes of buffer A (50 mM NaH₂PO₄, 20 mM imidazole, 300 mM NaCl). Clarified lysate was applied to the column at a flow rate of 2–3 ml/min. The resin was washed with buffer A supplemented with 5

column volumes of increasing concentrations of imidazole (10–120 mM in 10-mM increments) followed by 10 column volumes of buffer A + 250 mM imidazole. Ten-milliliter eluted portions were collected from each concentration and analyzed by polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) (23) and gels were washed and the proteins stained with Coomassie blue (26). To confirm that the purified recombinant protein obtained was indeed the 14-3-3 protein of *Pb*, the bands obtained in the 10% polyacrylamide gel were purified and subjected to tryptic digestion using 10 ng/mL Trypsin Gold (Promega). The tryptic fragments were subjected to LC-MS/MS using Cap-LC coupled to a Q-TOF Ultima API mass spectrometer (Waters, UK) The spectra were processed using ProteinLynx v4.0 software (Waters) and MASCOT MS/MS Ion Search (www.matrixscience.com), and the sequences found were identified by searching the SwissProt database.

Antibody production

The purified recombinant 14-3-3 protein was used to generate specific rabbit polyclonal serum. Rabbit preimmune serum was obtained and stored at -20°C. The purified protein (1.5 mg/mL) was injected into one rabbit with Freund's adjuvant three times at 2-week intervals. The obtained serum, containing monospecific anti-14-3-3r polyclonal antibodies, was sampled and stored at -20°C. The immunoglobulin fractions of the antisera were separated by precipitation with ammonium sulfate and stored at -70°C. These antisera reacted with *P. brasiliensis* 14-3-3 recombinant protein at titers of 1:50, 1:100, 1:250, 1:500 and 1:1000 by immunoblotting.

Immunofluorescence assay to determine the effect of the 14-3-3 recombinant protein on actin cytoskeleton assembly

Type II pneumocyte line A549 was obtained from the American Type Culture Collection (Manassas, VA). The cells were seeded overnight in Ham-F12 medium (DMEM) supplemented with 10% (v/v) heat-inactivated fetal calf serum. The cells were washed three times with 10 mM PBS, and Ham-F12 not containing fetal calf serum was added prior to the start of the assay. To study the cytoskeletal changes that occur upon treatment with 25 µg/mL of 14-3-3 recombinant protein for 5 h, cell monolayers were fixed with 4%

paraformaldehyde, washed in PBS, and permeabilized in 0.5% Triton X-100 for 15 min. To stain F-actin, we used FITC-labeled phalloidin. The phalloidin was diluted in Evans blue and used at a concentration of 10 µg/ml at 37°C for 1 h. Cells were washed three times with PBS containing 0.2% Tween-20 (PBS-T), mounted in PBS-glycerin and viewed by fluorescence microscopy (Leica DM RXA, Wetzlar, Germany).

Analysis of Rho, Rac and Cdc42 activity in A549 cells during the internalization of *P. brasiliensis*

To better characterize the mechanisms of actin recruitment, pneumocytes (A549) were pre-treated for 30 min at 37°C with *Clostridium difficile* toxin B, a broad inhibitor of Rho GTPase family members. Treated and untreated monolayers were infected with standardized suspensions 10^6 cells/mL of *Pb* for 2 h, 5 h or 24 h. After infection, the monolayers were washed with water, lysed and plated on Fava Netto medium supplemented with 4% fetal calf serum. All treatments were performed in duplicate, and three independent experiments were performed. After four days of growth, CFU were counted and data were statistically analyzed using Origin Pro v7.5 software (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA).

Subcellular localization of the 14-3-3 recombinant protein in *P. brasiliensis* yeast cells and during interaction with pneumocytes

To determine the subcellular localization of 14-3-3 protein of *Pb*, we performed immunocytochemistry on the ultrastructural level using immunogold labeling. For each experiment, a suspension of *Pb* yeast cells and pneumocytes infected with *Pb* (10^8 cells/ml) were fixed (2.5% v/v glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer, pH 7.2) for 24 hours at 4°C and sent to the electron microscopy service of the Institute of Biomedical Sciences (ICB-I) USP-SP for the preparation of ultrathin sections. After fixation, the cells were rinsed several times using the same buffer, and free aldehyde groups were quenched with 50 mM ammonium chloride for 1 h, followed by block staining in a solution containing 2% (w/v) uranyl acetate in 15% (v/v) acetone for 2 h at 4°C (4). The material was dehydrated in a series of ascending concentrations of acetone (30 to 100% v/v) and embedded in LR Gold resin (Electron Microscopy Sciences,

Washington, Pa.). The ultrathin sections were collected on nickel grids, preincubated in 10 mM PBS containing 1.5% (w/v) bovine serum albumin (BSA) and 0.05% (v/v) Tween 20, (PBS-BSA-T), and subsequently incubated overnight with the polyclonal antibody against the 14-3-3 recombinant protein (diluted 1:50). After washing with PBS-BSA-T, the grids were incubated for overnight with the labeled secondary antibody (rabbit IgG, Au conjugated, 10 nm; diluted 1:10). Controls were incubated with rabbit preimmune serum at 1:50, followed by incubation with the labeled secondary antibody. After the incubations, the grids were washed with the buffer described above, followed by a wash with distilled water, and then stained with 3% uranyl acetate (w/v) and 4% lead citrate (w/v). Finally, the grids were observed with a Jeol 1010 transmission electron microscope (Jeol, Tokyo, Japan).

Statistical analysis

The means and standard deviations of at least three distinct experiments were determined using OriginPro 7.5 software. Statistical analysis was performed using analysis of variance (ANOVA). P values of 0.05 or less were considered statistically significant.

RESULTS

Expression, purification and production of a polyclonal antibody to Pb14-3-3 recombinant protein

The cDNA encoding the Pb14-3-3 recombinant protein was subcloned into the expression vector pET-32a and a recombinant fusion protein was obtained. After induction with IPTG, a 43-kDa recombinant protein was detected in bacterial lysates (Fig. 1A). The 6-histidine residues fused to the N terminus of the recombinant protein were used to purify the protein from bacterial lysates by nickel-chelate affinity. The recombinant protein was eluted and analyzed by SDS-PAGE (Fig. 1B). An aliquot of the purified recombinant protein was used to generate a rabbit polyclonal anti-Pb14-3-3r antibody. Western blotting confirmed the positive reaction of the antibody with the fusion protein (Fig. 1C), identifying a 43-kDa protein from bacterial lysates.

Immunofluorescence assay to determine the effect of the 14-3-3 recombinant protein on actin cytoskeleton assembly

Many microbial pathogens that invade non-professional phagocytic cells with rigid cytoskeletons induce alterations in the underlying host cytoskeletal structure (25). We investigated the effect of the 14-3-3 recombinant protein on the actin cytoskeleton of the host cell. Untreated epithelial cells showed intense fluorescent staining of actin, with the characteristic elongated structure (Fig. 2A). After treatment with the 14-3-3 native (Fig. 2B) and recombinant proteins (Fig. 2C), noticeable changes were observed in the organization of actin filaments. After treatment of epithelial cells with the 14-3-3 recombinant protein (25 mg/ml) for 5 h, we observed a redistribution of actin to the cell membrane and the formation of actin-rich protrusions (Fig. 2B and 2C).

Analysis of Rho, Rac and Cdc42 activity in A549 cells during the internalization of *P. brasiliensis*

To better characterize the mechanisms of actin recruitment, we tested the participation of 14-3-3 protein in the activation pathway of Rho GTPases using *Clostridium difficile* toxin B, a broad inhibitor of Rho GTPase family members. We observed a reduction of infection rate of approximately 45% in 2 h of infection, 77% in 5 h and 88% in 8 h (Fig. 3). This inhibition of *Pb* entry by toxin B suggests that Rho GTPases are involved in the internalization process.

Subcellular localization of the 14-3-3 recombinant protein in *P. brasiliensis* yeast cells and during interaction with pneumocytes

We explored the subcellular localization of the 14-3-3 recombinant protein using an anti-14-3-3 polyclonal antibody in combination with immunoelectron microscopy. *Pb* yeast cells and infected A549 cells were processed by postembedding with gold particles. The immunocytochemistry assays revealed ubiquitous distribution of the gold particles in *Pb* yeast cells, with some concentration in the cytoplasm (Fig. 4). Surprisingly, when we determined the subcellular localization of the 14-3-3 protein in *Pb* yeast cells during interaction with epithelial lung cells (A549), we observed a large increase in the number of gold particles in the fungal cell wall at the time of epithelial cell interaction (Fig. 5), suggesting that the 14-3-3 protein may play an important role in the host-

pathogen interaction. Although it was possible to verify that with increasing interaction time (8 h), some cell wall fragments containing these gold particles are directed to the epithelial cell (Fig 5C). Control samples obtained by incubation with the rabbit preimmune serum were free of gold labeling (Fig. 4A, 5-1A, 5-1B and 5-1C).

DISCUSSION

In our previous study, we characterized a 30-kDa adhesin protein in *Pb* by amino-acid sequencing and determined that this 14-3-3 family member is capable of binding to laminin (3). This study also showed that the 14-3-3 protein of *Pb* may play an important role in the pathogenesis of this fungus by acting as an adhesin during the invasion of epithelial cells. A critical first step in the establishment of infection by pathogens is the attachment to host components. The recognition of host cells by a pathogen requires the presence of complementary molecules on the surface of the host cell. We previously demonstrated that *Pb* is capable of adhering to and invading epithelial cells (24). Adhesins that interact with receptors have been found to exist in a number of different pathogens, and host ECM components are often of great importance in the modulation of migration, invasion, differentiation, and microbial proliferation. In recent years, several proteins in *Pb* with receptor-like characteristics have been found to be ligands of the ECM (3, 7, 12-14, 18-20, 24, 27, 30, 37).

The 14-3-3 protein has been identified in the genome of *Pb* fungus, but its function is still unknown. The pathogen must regulate the expression of its adhesins to survive and cause disease. 14-3-3 proteins are a family of adaptor proteins that modulate protein function in all eukaryotic cells. Little is known about the function of 14-3-3 proteins in pathogenic fungi. In addition to its cytoplasmic localization, Pb14-3-3 was also detected in cell wall and culture filtrate of *Pb*, suggesting that it is actively secreted by *Pb*.

Studies with *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe* have demonstrated that both yeasts contain two genes that encode 14-3-3 proteins, and these, as in higher eukaryotes, bind to numerous proteins involved in a variety of cellular processes (35). The filamentous fungus *Aspergillus nidulans* contains a protein with high homology to 14-3-3 proteins

(called Arta) that prevents the formation of the septum. However, instead of blocking septation, increased expression of Arta causes a delay in the polarization of the conidiophores, suggesting that this protein plays an important role in hyphae morphogenesis (22).

Patel et al. (2006) demonstrated that the tau isoform (also known as theta) of 14-3-3 can bind specifically to Tir, a major effector protein that is delivered to the plasma membrane of the eukaryotic cell, where it acts as the receptor for the bacterial adhesin, intimin. 14-3-3tau is recruited to the site of the pedestal (3 h after infection) and can decorate attached EPEC in the later stages of the infection process (5–7 h after infection) (29).

In the present study, we sought to gain a better understanding of host-parasite relationships between *Pb* and human epithelial cells. Thus, we generated a recombinant 14-3-3 protein in bacteria, and the purified 43-kDa protein was assessed by SDS-PAGE. Using the recombinant purified protein, high titers of rabbit polyclonal antibody were raised. The serum specifically recognized the recombinant purified protein in western blot assays. Expression of the 14-3-3 recombinant protein and the generation of a specific polyclonal antibody allowed us to determine the subcellular localization of this protein by immunoelectron microscopy.

Immunocytochemical analysis revealed a ubiquitous distribution of the protein in the yeast form of *Pb*, with some concentration in the cytoplasm. Surprisingly, we observed a large increase in the amount of Pb14-3-3 protein in the fungal cell wall during interaction with epithelial lung cells (A549), suggesting that this protein could play an important role in the host-pathogen interaction. The protein distribution in *Pb* during the interaction with epithelial lung cells never had been demonstrated and the large amount of 14-3-3 protein in the cell wall of this fungus during their interaction may suggest the importance of this protein in this context. The presence of 14-3-3 protein at the *Pb* cell surface raises interesting questions: for example, how is this protein incorporated into the cell wall in the absence of a conventional N-terminal signal sequence for targeting the protein to the secretory pathway? Additional studies will be necessary to identify putative signals related to *Pb* cell wall targeting. The localization of some classic cytoplasmic molecules lacking an N-terminal signal peptide to other cellular compartments is not uncommon for *Pb*, as

described for glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase (GAPDH) (7) and triosephosphate isomerase (TPI) (30). Proteins that lack an N-terminal signal peptide sequence have also been found in the cell wall of *S. cerevisiae*, in addition to their usual cytoplasmic localization (28). In addition, the cytoplasmic proteins GAPDH, TPI and formamidase have been detected in extracellular vesicles secreted by *Histoplasma capsulatum* (1) and *Cryptococcus neoformans* (31). These data support our finding that the 14-3-3 protein is localized both to the cytoplasm and to the cell wall of *Pb*.

This study also determined the effect of the 30-kDa adhesin of *Pb* on the cytoskeletal dynamics of the host cell. Pneumocytes were treated with the protein for 5 h to allow sufficient time for *Pb* internalization. We observed a redistribution of actin after treatment with the adhesin, with an increase in concentration near the cell membrane and the formation of actin-rich protrusions of the membrane called filopodia (likely due to the activation of Cdc42). The 14-3-3 family of proteins is known to participate in the regulation and organization of the cytoskeleton by activating Rho GTPases (21), acting as mediators in cytoskeletal changes via integrins and playing an important role in the activation of Cdc42 (8). Thus, we hypothesize that *Pb* is using this protein as an important virulence factor during pathogenesis, activating intracellular cytoskeletal proteins such as Rho, Rac and Cdc42 and resulting in conformational changes of the cell that may aid invasion.

Using *Clostridium difficile* toxin B, a broad inhibitor of Rho GTPase family members, we observed a reduction of infection rate of approximately 45% in 2 h of infection, 77% in 5 h and 88% in 8 h, indicating that *Pb* invasion involves the action of Rho GTPases. Many bacteria produce toxins (e.g., *Escherichia coli* cytotoxic necrosis factor and *Bordetella pertussis* dermonecrotic toxin) that selectively activate the family of Rho GTPases. Other toxins (*Clostridium botulinum* C3 exoenzymes, *Clostridium difficile* toxins A and B and *Clostridium sordellii* lethal toxin) inactivate proteins in this family for the ribosylation and glycosylation of ATP (32). The existence of these toxins points to the importance of Rho GTPases in the infection process, and these toxins have been used to elucidate the role of these Rho GTPases in the control of various cellular processes (36). Recent studies of the interactions between pathogenic proteins (adhesins and toxins) and host cell signaling pathways have been

important in clarifying how these proteins can modulate cell physiology. During the course of infection, many pathogenic bacteria produce toxins that act on the cytoskeleton and its regulatory proteins. These toxins can act as positive regulators by promoting the rearrangement of the actin cytoskeleton or, alternatively, as negative regulators by promoting the breakdown of cytoskeletal filaments.

Intracellular bacteria such as *Salmonella typhimurium* utilize toxins to promote both the assembly and disassembly of the actin cytoskeleton during the infection process. Temporal regulation of these toxins results in the internalization of the bacterium by epithelial cells into specialized vacuoles permissive for growth. In contrast, *Yersinia* spp. utilizes actin-modulating toxins to block internalization by professional antigen-presenting cells such as macrophages and dendritic cells. Modulation of the immune response through the production of actin-regulating toxins appears to be a common approach adopted by several extracellular pathogens. Additionally, the repertoire of actin-modifying toxins produced by various species is specifically tailored to facilitate the lifestyle of the pathogen. The presence in *Yersinia* and *P. aeruginosa* of multiple toxins that modulate the activation state of actin demonstrates the importance of interfering with the cytoskeleton and neutralizing the host's innate immune system for the survival and growth of these pathogens.

Modulation of the cytoskeleton facilitates various processes that are critical for successful colonization of host cells by intracellular pathogens. Intracellular bacteria such as *Salmonella typhimurium* employ toxins that promote the breakdown of the actin cytoskeleton during the infection process, promoting internalization of the bacterium within vacuoles that allow it to multiply. In contrast, *Yersinia* utilizes actin-modulating toxins to block internalization by professional antigen-presenting cells such as macrophages and dendritic cells and the presence of multiple proteins that modulate the dynamics of actin filaments demonstrates the importance of interference in the cellular cytoskeleton to minimize the effects of host defenses, thereby promoting the survival and multiplication of pathogens (6).

In conclusion, in the present study, we have shown that *P. brasiliensis* has proteins with characteristics of adhesins that can alter the cytoskeleton of host cells to achieve internalization of the fungus by nonprofessional

phagocytes. Based on these results, we hypothesize that these proteins may be required for the invasion process. Thus, like other pathogens, *P. brasiliensis* may modulate the host cell cytoskeleton to escape the immune system of the host and cause infection.

ACKNOWLEDGMENTS

This investigation was financially supported by the Brazilian organizations FAPESP, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and PADCFCE-UNESP.

Julhiany de Fátima da Silva has a fellowship from CAPES.

We are very grateful to Profa. Célia Maria de Almeida Soares and Juliana Alves Parente for their help with cloning experiments; to Prof. Sandro Roberto Valentini, Prof. Cleslei Fernando Zanelli, Camila Arnaldo Olhê Dias and Tatiana Faria Watanabe for their help with 14-3-3 recombinant protein purification; to Prof. Carlos Pelleschi Taborda and Luciana Thomaz for their help with the immunogold technique; and to Gaspar Ferreira de Lima and Edson Rocha de Oliveira for their technical assistance with electron microscopy.

REFERENCES

1. Albuquerque, P. C., E. S. Nakayasu, M. L. Rodrigues, S. Frases, A. Casadevall, R. M. Zancope-Oliveira, I. C. Almeida, and J. D. Nosanchuk. 2008. Vesicular transport in *Histoplasma capsulatum*: an effective mechanism for trans-cell wall transfer of proteins and lipids in ascomycetes. *Cell Microbiol* 10:1695-710.
2. Almeida, A. J., C. Cunha, J. A. Carmona, B. Sampaio-Marques, A. Carvalho, I. Malavazi, H. Y. Steensma, D. I. Johnson, C. Leão, E. Logarinho, G. H. Goldman, A. G. Castro, P. Ludovico, and F. Rodrigues. 2009. Cdc42p controls yeast-cell shape and virulence of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Fungal Genet Biol* 46:919-26.
3. Andreotti, P. F., J. L. Monteiro da Silva, A. M. Bailão, C. M. Soares, G. Benard, C. P. Soares, and M. J. Mendes-Giannini. 2005. Isolation and partial characterization of a 30 kDa adhesin from *Paracoccidioides brasiliensis*. *Microbes Infect* 7:875-81.
4. ASSIS, B., D. CUNHA, M. PEREIRA, M. FELIPE, N. CASTRO, and C. SOARES. 2003. *Paracoccidioides brasiliensis* 14-3-3-like protein 2 mRNA, complete cds. . GenBank: AY462124.1.
5. Ayscough, K. R., and D. G. Drubin. 1998. A role for the yeast actin cytoskeleton in pheromone receptor clustering and signalling. *Curr Biol* 8:927-30.
6. Baldwin, M. R., and J. T. Barbieri. 2005. The type III cytotoxins of *Yersinia* and *Pseudomonas aeruginosa* that modulate the actin cytoskeleton. *Curr Top Microbiol Immunol* 291:147-66.
7. Barbosa, M. S., S. N. Bão, P. F. Andreotti, F. P. de Faria, M. S. Felipe, L. dos Santos Feitosa, M. J. Mendes-Giannini, and C. M. Soares. 2006. 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* 74:382-9.
8. Bialkowska, K., Y. Zaffran, S. C. Meyer, and J. E. Fox. 2003. 14-3-3 zeta mediates integrin-induced activation of Cdc42 and Rac. Platelet glycoprotein Ib-IX regulates integrin-induced signaling by sequestering 14-3-3 zeta. *J Biol Chem* 278:33342-50.
9. Brummer, E., A. Restrepo, L. H. Hanson, and D. A. Stevens. 1990. Virulence of *Paracoccidioides brasiliensis*: the influence of in vitro passage and storage. *Mycopathologia* 109:13-7.
10. Castaneda, E., E. Brummer, D. Pappagianis, and D. A. Stevens. 1987. Chronic pulmonary and disseminated paracoccidioidomycosis in mice: quantitation of progression and chronicity. *J Med Vet Mycol* 25:377-87.
11. Chevalier, D., E. R. Morris, and J. C. Walker. 2009. 14-3-3 and FHA domains mediate phosphoprotein interactions. *Annu Rev Plant Biol* 60:67-91.
12. Coltri, K. C., A. S. Casabona-Fortunato, M. L. Gennari-Cardoso, C. F. Pinzan, L. P. Ruas, V. S. Mariano, R. Martinez, J. C. Rosa, A. Panunto-Castelo, and M. C. Roque-Barreira. 2006. Paracoccin, a GlcNAc-binding lectin from *Paracoccidioides brasiliensis*, binds to laminin and induces TNF-alpha production by macrophages. *Microbes Infect* 8:704-13.

13. da Silva Neto, B. R., J. de Fátima da Silva, M. J. Mendes-Giannini, H. L. Lenzi, C. M. de Almeida Soares, and M. Pereira. 2009. The malate synthase of *Paracoccidioides brasiliensis* is a linked surface protein that behaves as an anchorless adhesin. *BMC Microbiol* 9:272.
14. Donofrio, F. C., A. C. Calil, E. T. Miranda, A. M. Almeida, G. Benard, C. P. Soares, S. N. Veloso, C. M. Soares, and M. J. Mendes Giannini. 2009. Enolase from *Paracoccidioides brasiliensis*: isolation and identification as a fibronectin-binding protein. *J Med Microbiol* 58:706-13.
15. FAVA NETTO, C. 1961. Contribuição para o estudo imunológico da blastomicose de Lutz (Blastomicosesulamericana), p. 99-194, vol. 21. Rev. Inst. A. Lutz, São Paulo.
16. Franco, M., M. T. Peracoli, A. Soares, R. Montenegro, R. P. Mendes, and D. A. Meira. 1993. Host-parasite relationship in paracoccidioidomycosis. *Curr Top Med Mycol* 5:115-49.
17. Fu, H., R. R. Subramanian, and S. C. Masters. 2000. 14-3-3 proteins: structure, function, and regulation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 40:617-47.
18. Ganiko, L., R. Puccia, V. S. Mariano, O. A. Sant'Anna, E. Freymüller, M. C. Roque-Barreira, and L. R. Travassos. 2007. Paracoccin, an N-acetylglucosamine-binding lectin of *Paracoccidioides brasiliensis*, is involved in fungal growth. *Microbes Infect* 9:695-703.
19. González, A., B. L. Gómez, S. Diez, O. Hernández, A. Restrepo, A. J. Hamilton, and L. E. Cano. 2005. Purification and partial characterization of a *Paracoccidioides brasiliensis* protein with capacity to bind to extracellular matrix proteins. *Infect Immun* 73:2486-95.
20. Hanna, S. A., J. L. Monteiro da Silva, and M. J. Giannini. 2000. Adherence and intracellular parasitism of *Paracoccidioides brasiliensis* in Vero cells. *Microbes Infect* 2:877-84.
21. Jin, J., F. D. Smith, C. Stark, C. D. Wells, J. P. Fawcett, S. Kulkarni, P. Metalnikov, P. O'Donnell, P. Taylor, L. Taylor, A. Zougman, J. R. Woodgett, L. K. Langeberg, J. D. Scott, and T. Pawson. 2004. Proteomic, functional, and domain-based analysis of in vivo 14-3-3 binding proteins involved in cytoskeletal regulation and cellular organization. *Curr Biol* 14:1436-50.
22. Kraus, P. R., A. F. Hofmann, and S. D. Harris. 2002. Characterization of the *Aspergillus nidulans* 14-3-3 homologue, ArtA. *FEMS Microbiol Lett* 210:61-6.
23. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-5.
24. Mendes-Giannini, M. J., P. F. Andreotti, L. R. Vincenzi, J. L. da Silva, H. L. Lenzi, G. Benard, R. Zancopé-Oliveira, H. L. de Matos Guedes, and C. P. Soares. 2006. Binding of extracellular matrix proteins to *Paracoccidioides brasiliensis*. *Microbes Infect* 8:1550-9.
25. Mendes-Giannini, M. J., S. A. Hanna, J. L. da Silva, P. F. Andreotti, L. R. Vincenzi, G. Benard, H. L. Lenzi, and C. P. Soares. 2004. Invasion of epithelial mammalian cells by *Paracoccidioides brasiliensis* leads to cytoskeletal rearrangement and apoptosis of the host cell. *Microbes Infect* 6:882-91.
26. Neuhoff, V., N. Arold, D. Taube, and W. Ehrhardt. 1988. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing

- gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* 9:255-62.
27. Nogueira, S. V., F. L. Fonseca, M. L. Rodrigues, V. Mundodi, E. A. Abi-Chacra, M. S. Winters, J. F. Alderete, and C. M. de Almeida Soares. 2010. *Paracoccidioides brasiliensis* enolase is a surface protein that binds plasminogen and mediates interaction of yeast forms with host cells. *Infect Immun* 78:4040-50.
 28. Nombela, C., C. Gil, and W. L. Chaffin. 2006. Non-conventional protein secretion in yeast. *Trends Microbiol* 14:15-21.
 29. Patel, A., N. Cummings, M. Batchelor, P. J. Hill, T. Dubois, K. H. Mellits, G. Frankel, and I. Connerton. 2006. Host protein interactions with enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC): 14-3-3tau binds Tir and has a role in EPEC-induced actin polymerization. *Cell Microbiol* 8:55-71.
 30. Pereira, L. A., S. N. Bao, M. S. Barbosa, J. L. da Silva, M. S. Felipe, J. M. de Santana, M. J. Mendes-Giannini, and C. M. de Almeida Soares. 2007. Analysis of the *Paracoccidioides brasiliensis* triosephosphate isomerase suggests the potential for adhesin function. *FEMS Yeast Res* 7:1381-8.
 31. Rodrigues, M. L., E. S. Nakayasu, D. L. Oliveira, L. Nimrichter, J. D. Nosanchuk, I. C. Almeida, and A. Casadevall. 2008. Extracellular vesicles produced by *Cryptococcus neoformans* contain protein components associated with virulence. *Eukaryot Cell* 7:58-67.
 32. Schiavo, G., and F. G. van der Goot. 2001. The bacterial toxin toolkit. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:530-7.
 33. Sinha, S., and W. Yang. 2008. Cellular signaling for activation of Rho GTPase Cdc42. *Cell Signal* 20:1927-34.
 34. van Hemert, M. J., H. Y. Steensma, and G. P. van Heusden. 2001. 14-3-3 proteins: key regulators of cell division, signalling and apoptosis. *Bioessays* 23:936-46.
 35. van Heusden, G. P., and H. Y. Steensma. 2006. Yeast 14-3-3 proteins. *Yeast* 23:159-71.
 36. Verma, A., and G. M. Ihler. 2002. Activation of Rac, Cdc42 and other downstream signalling molecules by *Bartonella bacilliformis* during entry into human endothelial cells. *Cell Microbiol* 4:557-69.
 37. Vicentini, A. P., J. L. Gesztes, M. F. Franco, W. de Souza, J. Z. de Moraes, L. R. Travassos, and J. D. Lopes. 1994. Binding of *Paracoccidioides brasiliensis* to laminin through surface glycoprotein gp43 leads to enhancement of fungal pathogenesis. *Infect Immun* 62:1465-9.

FIGURES and LEGENDS

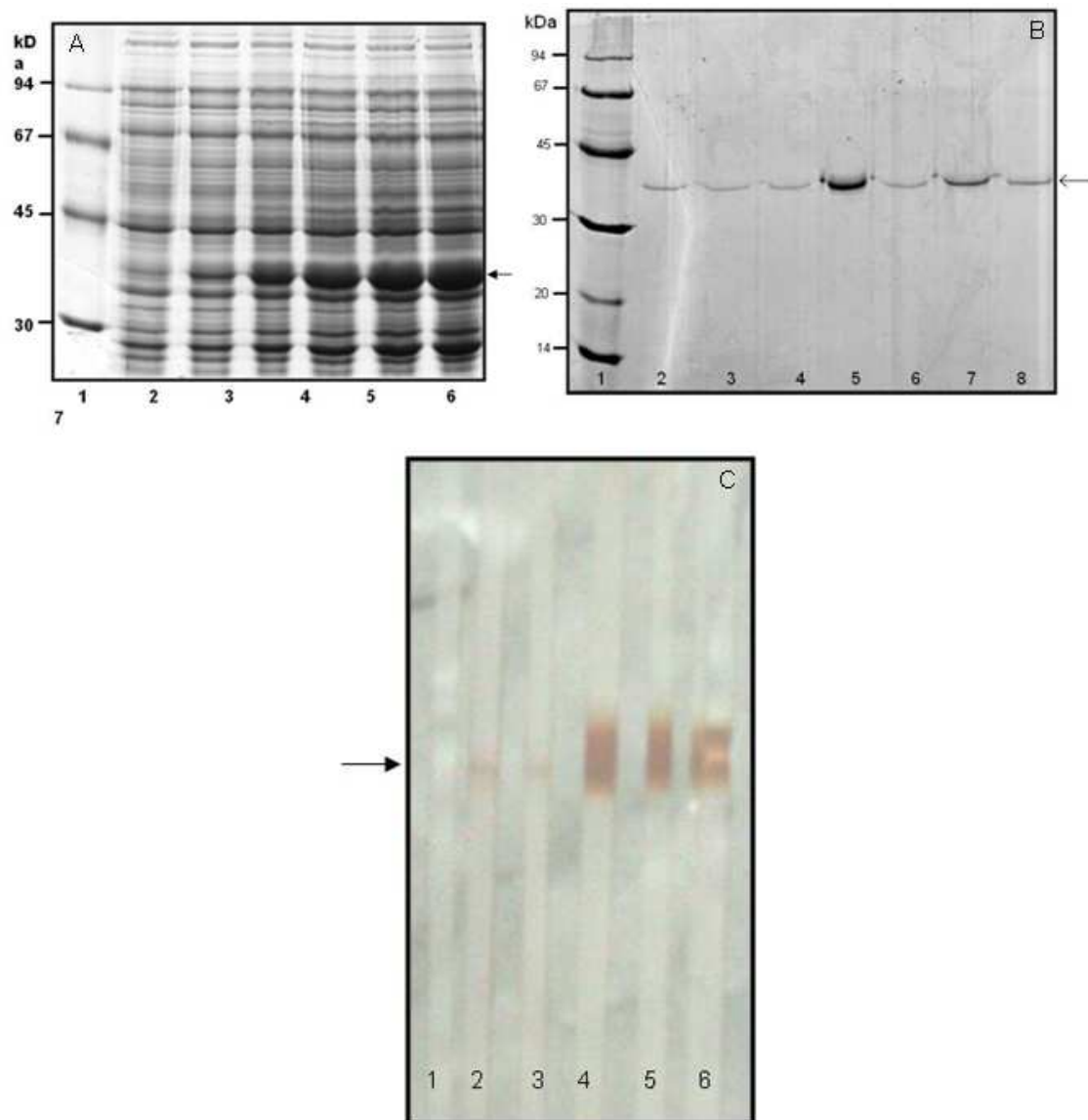


FIGURE 1. SDS-PAGE to verify protein induction (A) and 14-3-3 recombinant protein purification (B). Gels were stained with Phast Gel Comassie R350. (A) 1:LMW (GE Life Science), 2:0 h, 3:1 h, 4:2 h, 5:3 h, 6:4 h and 7:5 h induction with 0.4 mM IPTG at 37°C. (B) 1: LMW, 2-8 samples. The arrow indicates the purified 14-3-3 recombinant protein. (C) Immunoblotting using rabbit polyclonal serum generated against the recombinant *Pb* 14-3-3 protein. (1) Negative control (pre-immune rabbit serum 1:100), (2-6) post-immunization rabbit serum diluted 1:1000, 1:500, 1:250, 1:100 and 1:50, respectively. The arrow indicates reactivity against the recombinant 14-3-3 protein (43 kDa).

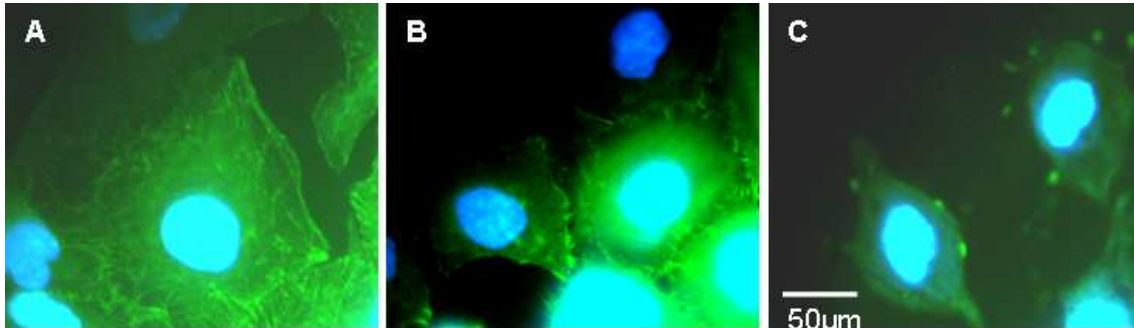


FIGURE 2. Immunofluorescence staining of epithelial cells (A549) not treated (A) and treated with the native (B) and recombinant (C) 14-3-3 protein for 5 hours using phalloidin-FITC (green) and DAPI (blue).

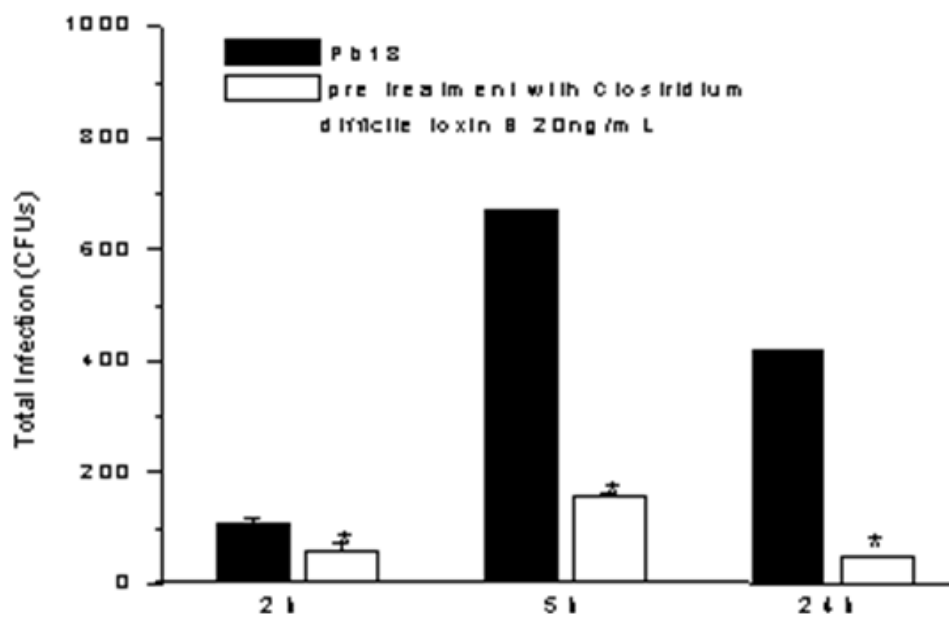


FIGURE 3. Invasion assay using botulinum toxin, a Rho GTPase inhibitor. The interaction of *Pb* with epithelial cells was determined after different times of exposure to the toxin. * $p \leq 0.01$

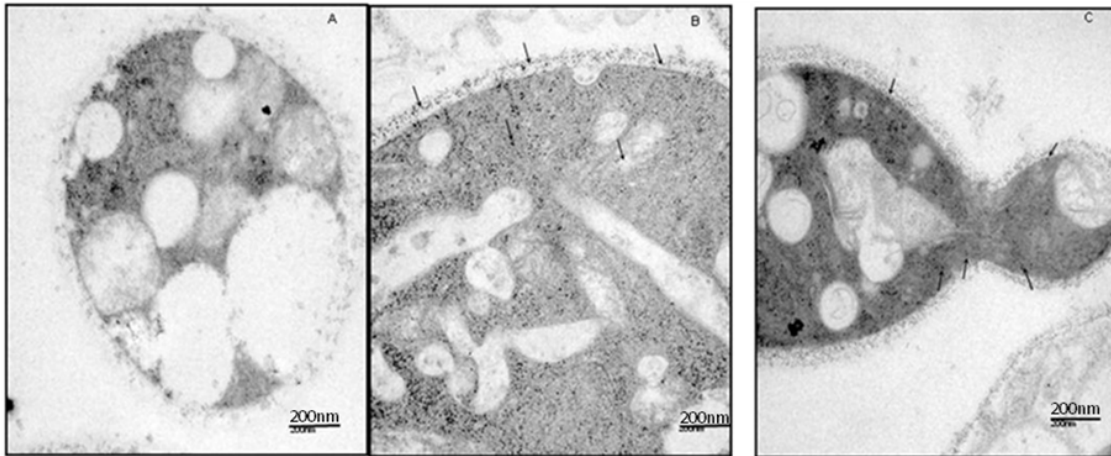
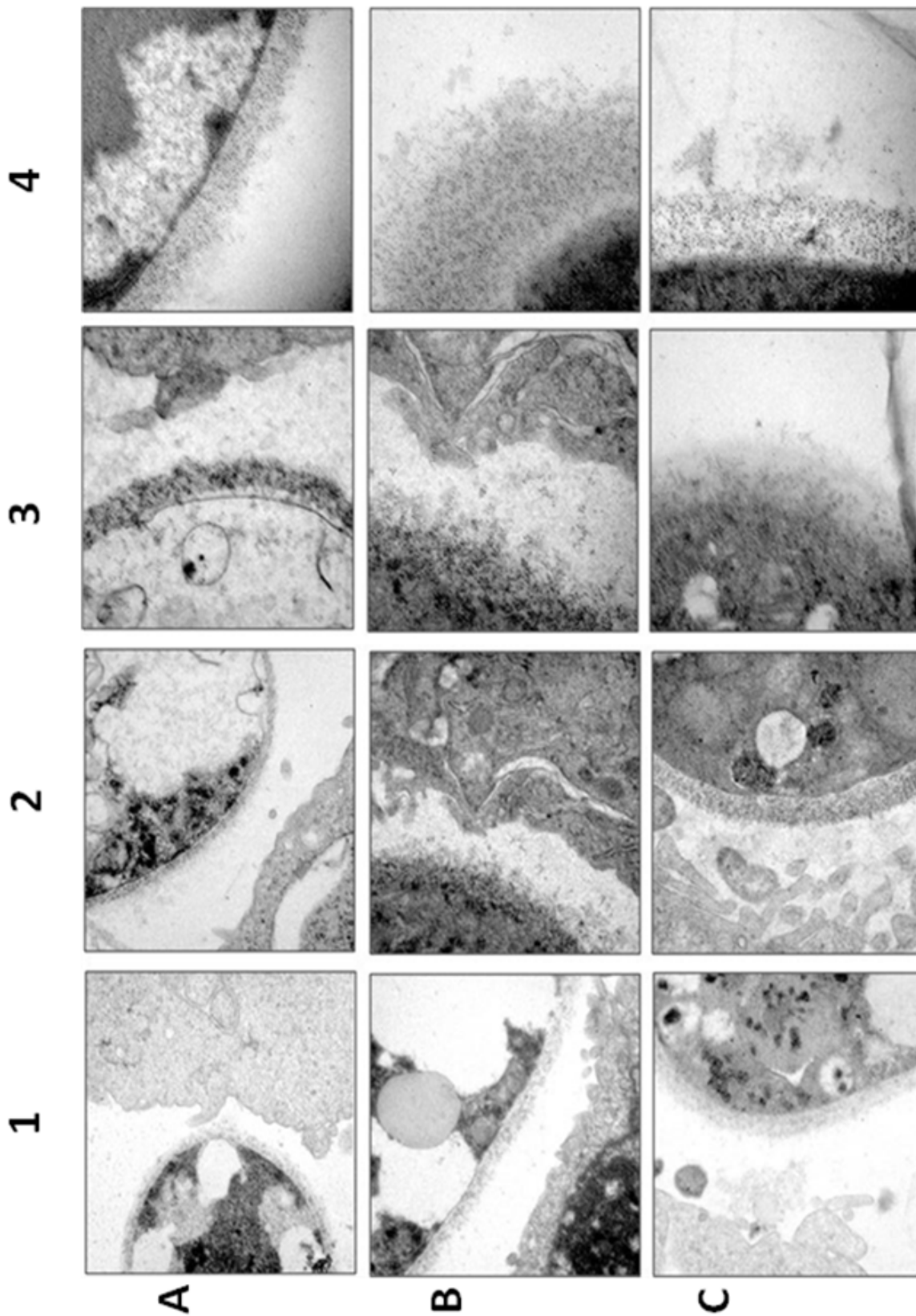


FIGURE 4. Transmission electron microscopy was used to determine the subcellular localization of the 14-3-3 protein in *Pb* yeast cells.



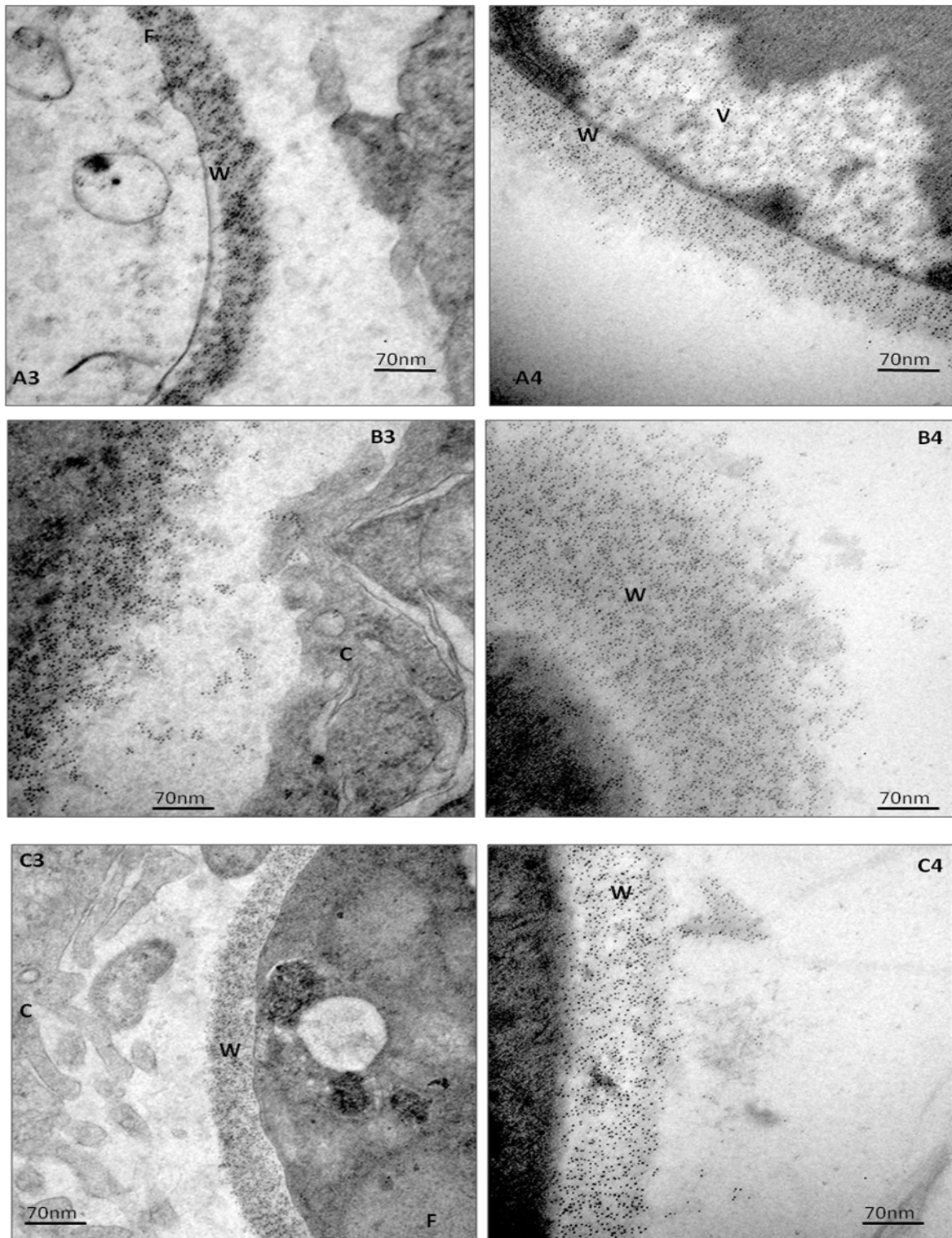


FIGURE 5. Transmission electron microscopy was used to determine the subcellular localization of the 14-3-3 protein in *Pb* yeast cells during interaction with epithelial cells for 2 h (A), 5 h (B) and 8 h (C). (1) Negative control with pre-immune serum and (2, 3 and 4) immunocytochemistry using a polyclonal anti-14-3-3 showing the subcellular localization of this protein. Increases 25000x (2) and 50000x (3 and 4).