

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS

ELAINE TOSCANO MIRANDA

“ESTUDO COMPARATIVO DE ISOLADOS DE
P. brasiliensis **EM ADESÃO CELULAR. SINALIZAÇÃO CELULAR**
MEDIADA PELA GP 43”.

ARARAQUARA-SP

2006



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS

ELAINE TOSCANO MIRANDA

**“ESTUDO COMPARATIVO DE ISOLADOS DE
P. brasiliensis EM ADESÃO CELULAR. SINALIZAÇÃO CELULAR
MEDIADA PELA GP 43”.**

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP – Araraquara como pré-requisito para obtenção do título de doutor.

ORIENTADORA: Profa. Dra. Maria José Soares Mendes-Giannini

ARARAQUARA-SP

2006

Ficha Catalográfica

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

Miranda, Elaine Toscano

M672e Estudo comparativo de isolados de *Paracoccidioides brasiliensis* em adesão celular. Sinalização celular mediada pela GP 43 / Elaine Toscano Miranda. – Araraquara, 2006.
104 f.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Análises Clínicas.

Orientadora: Maria José Soares Mendes Gianinni.

1. *Paracoccidioides brasilienses* (Adesão). 2. *Paracoccidioides brasilienses* (Sinalização celular) . 3. Via Ras/Raf. 4. AKT. 5. Rho-GTP. I. Gianinni, Maria José Soares Mendes, orient. II. Título.

CDD: 616.075

CAPES: 40300005

Dedico:

A Deus

“Você se fez presente em todos os momentos firmes e trêmulos e, passo a passo, pude sentir a sua mão na minha, transmitindo-me a segurança necessária para enfrentar o caminho e seguir. A sua presença é qualquer coisa como a luz e a vida, e sinto que em meu gesto existe o seu gesto e em minha voz, a sua voz.”

(Vinicius de Moraes)

Aos meus pais Laura e Antonio

Amados pais,

estou realizando um sonho, e minha vitória é fruto do incentivo, amor, dedicação, carinho e apoio que vocês sempre me oferecem. Vocês são a peça-chave do meu existir. Através da educação e dos ensinamentos recebidos, aprendi a ser gente, gente que luta pelo que quer, gente que procura fazer a diferença, gente que não deixa um sonho morrer. Sou e serei grata, por toda minha vida, por me encorajar nos momentos de desânimo e por colaborarem para que conseguisse alcançar meu sucesso.

Esta vitória pertence à vocês

Amo Vocês!!!

À Profa. Dra. Maria José Mendes Giannini

“O educador deve ser não um sábio, mas sim um homem diferenciado pela sua educação, pela força de seus costumes, pela maturidade de seus modos, jovial, sócil, acessível, franco, enfim, em quem se encontre muito que imitar e pouco que corrigir”.

(Simon Bolívar)

Obrigada pelos ensinamentos, paciência, confiança e por mais esta oportunidade!

À Rosângela (Rô)

“Um amigo fiel é uma poderosa proteção: quem o achou, descobriu um tesouro”. (Eclo 6,14)

Obrigada pela amizade,coleguismo, e grande contribuição neste trabalho.

Ao Cláudio, Nahieh,Victor e Vinícius

Agradeço pelo momentos de carinho, amizade e paciência.

Paciência que até mesmo quando, sem querer, em vocês descarrego minhas preocupações e angústias. A presença dos que amo, em todas as etapas, é a melhor recompensa. Pois, é sabido, ninguém é feliz sozinho. Ninguém é auto-suficiente. Sem te-los ao meu lado, cada qual com seu jeito particular de nos transmitir amor, talvez não tivesse tido tanta força. Aos que amo, dedico este trabalho. Agradeço pelo seu amor.

Aos que amo, enfim, este mérito também é de vocês.

Vocês são a razão do meu viver

Eu amo vocês

Aos meus padrinhos Ada e Valdemício

Pelo apoio e colaboração nesta caminhada.

Aos meus amigos : **Vani, Bentão, Naly, Bel, Dorcas, Dona Carol, Rosinha, Eva, Iracema, Elza Moraes** pela força e ajuda nos cuidados com meus filhos.

Aos meus irmãos: **Marilda, Clovis, Paulo, Rogério e André** e aos meus
cunhados: **Ladimir, Marli, Mariza e Marcela**

À vocês que muito amo e que compartilharam dos meus ideais, compreenderam-me, incentivaram-me, mesmo que no silêncio e na distância.

Aos meus sobrinhos

Pela alegria que vocês trouxeram.

À Marcela

Pela grande ajuda nas traduções para o inglês

Aos queridos amigos “da Micologia” **Ana Marisa , Fabiana, Lílian, Julhiany, Marcelo, , Liliana, Aline, Susana, Adriana, Paula, Ana Carolina (Pi), Natália, Tatiana, José Nelson, Marisa Polezi, Danielli, Fábio, Eliana, Tirene, Márcia, Luzia, Rita, Angélica, Rosemira, Isabel (cito) e Maxi (Hemato)!**

Conviver é uma arte. Arte de saber respeitar e de aceitar os limites e defeitos do outro. Durante estes anos, aprendemos uns com os outros e isso fez com que aprendêssemos também sobre nós mesmos.

À **Profa. Dra. Christiane Pienna Soares e a Profa. Dra. Márcia Melhem** pela grande colaboração e sugestões valiosas como membros da banca do exame de qualificação.

À **Dra. Patrícia Ferrari Andreotti e a Dra Juliana Leal Monteiro da Silva** pelo apoio durante o trabalho.

À **Julhiany e a Pati** pelo repique das células e a **Ana Carolina (Pi)** pelo apoio técnico.

À **Cláudia, Laura, Sônia, Tirene e Eliana** pela paciência e trabalho para que no final de tudo desse certo!

À FAPESP

pelo financiamento deste trabalho.

Esse trabalho foi realizado no laboratório de Micologia Clínica
do Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de
Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho” (UNESP) – Campus de Araraquara,
São Paulo, Brasil.

LISTA DE ABREVIATURAS

%	Porcentagem
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µm	Micrômetro
ATV	Solução de tripsina-EDTA-versene (Adolfo Lutz)
BM	Banho maria
cm	Centímetro
CN	Célula normal
D.O.	Densidade ótica
fase L	Fase leveduriforme de <i>P. brasiliensis</i>
fase M	Fase miceliana de <i>P. brasiliensis</i>
g	Gramma
GAPDH	<i>Glyseraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>
h	Hora
H₂O₂	Peróxido de hidrogênio
FPLC	Fast Performance Liquid Chromatography
IgG	Imunoglobulina G
kDa	Kilodalton
M	Molaridade
MEC	Matriz extracelular
mg	Miligrama
min	Minuto
mL	Mililitro

mM	Milimolar
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
nm	Nanômetro
n°	Número
°C	Graus Célsius
Pb	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
PBS	Tampão salina fosfato
PBS-T	Tampão salina fosfato com 0,1% de tween-20
PCM	Paracoccidioidomicose
rpm	Rotações por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sódio
PMSF	Fenil metil sulfonil fluoride
NP 40	Nonidet P 40 (detergente)
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
TEMED	Tetra metil etileno diamino
SFB	Soro fetal bovino
TUNEL	<i>Terminal deoxy-transferase mediated X-dUTP Nick End Labeling</i>
X g	Gravidade
GEF	Guanine nucleotide exchange factor
GAP	GTPase-activating protein
GDI	GDP dissociation inhibitor
PH	Pleckstrin homology
PI3K	Phosphatidyinositol 3- Kinase
PIP3	Phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate

GSK	Glycogen synthase Kinase
FAK	Focal Adhesion Kinase
MAPK	Mitogen-activated protein Kinase
IP3	1,4,5-triphosphato Inositol
MEK	MAPK quinase quinase
ERK	Extracellular-signal-regulated quinase
PKB/AKT	Proteína quinase B

RESUMO

A capacidade de *Paracoccidioides brasiliensis*, agente etiológico da paracoccidioidomicose (PCM), de causar doenças com manifestações clínicas variadas, depende de seus fatores de virulência, em particular daqueles envolvidos na interação e invasão celular. Estudos sobre o papel dos componentes do fungo como, por exemplo, a glicoproteína de 43 kDa (gp 43), estão entre os assuntos abordados na paracoccidioidomicose. A gp 43 atua como ligante de laminina, e por isso é importante na adesão celular. Neste trabalho foi realizado um estudo comparativo entre isolados de Pb18 e Pb265, que têm capacidades distintas de adesão às células Hela e Vero, sob influência da temperatura e diversos fatores químicos. Foram também avaliados eventos em células de epitélio pulmonar expostas à gp 43 e células de Pb18, antes e após inoculação animal, representando, respectivamente, isolados menos e mais virulentos. Os resultados mostram que as adesinas fúngicas são termo-lábeis, sugerindo sua natureza protéica. Os açúcares aminados glucosamina e galactosamina foram os mais eficientes para inibir a adesão celular, em relação à manose, glicose e galactose, indicando (ou levantando a hipótese) que esta atividade envolve mecanismos específicos tipo lectina. O estudo com componente da matriz extracelular mostrou que a laminina, assim como seus derivados sintéticos, inibiu a adesão do isolado Pb18, fato não verificado com Pb265, tanto com células Hela, quanto com a linhagem Vero, mas variável sob influência de fatores químicos. As distintas vias de sinalização foram demonstradas pelos eventos Ras-Raf, Rho e AKT verificados, sendo que o isolado menos virulento causou menos estresse citotóxico, comprovado por menor sinal Ras- Raf e AKT de proliferação. Os sinais intensos de proliferação observados nos experimentos com o isolado mais virulento e exposição à gp 43 poderiam ser associados à maior sobrevivência do fungo que se internaliza mais facilmente nas células do hospedeiro, dificultando o seu reconhecimento por células do sistema monocítico-fagocitário, antes de

causar apoptose, evadir e disseminar-se. As vias Ras-Raf e AKT agiram de modo sinérgico nos efeitos de sobrevivência celular. A diminuição do evento AKT implicou perda parcial de sinal de sobrevivência que se intensificou, a seguir e de modo contrário, com a diminuição de Ras-Raf. A ativação das vias de sobrevivência, associada a sinais citosólicos quando o Pb entra na célula epitelial, foi demonstrada de modo inédito neste trabalho.

Palavras-chave: *Paracoccidioides brasiliensis*; Adesão; Sinalização celular; Via Ras/Raf; AKT; Rho-GTP.

ABSTRACT

The capacity of the *Paracoccidioides brasiliensis*, the etiological agent of paracoccidioidomycosis (PCM), to provoke illnesses with great variety of clinical manifestations depends on its virulence factors, particularly on those involved in the cellular interaction and invasion. Studies about the role of the fungus components such as the 43 kDa glycoprotein (gp 43) are among the subjects broached in the paracoccidioidomycosis. The gp 43 acts as laminin ligand e for this reason it is important in the cellular adhesion. In this work it was accomplished a comparative study between isolates Pb18 and Pb265, which have distinct capacities of adhesion to the cells Hela and Vero under influence of temperature and several chemical factors. Events in pulmonary epithelial cells exposed to gp 43 and in Pb18 cells, before and after animal inoculation, representing, respectively, isolates less and more virulent were evaluated as well. The results show that the fungal adhesins are term-labels, suggesting its proteical nature. The aminated sugars glucosamine and galactosamine were the most efficient, in comparison with manose, glyucose and galactose, in inhibiting the cellular adhesion, indicating (or putting forward the hypothesis) that this activity involves specific mechanisms lectin-type. The study with extracellular matrix component indicated that the laminin, as well as its synthetic derivatives, inhibited the adhesion of the isolate Pb18 to the cells Vero and Hela, what did not occur with Pb265, but it was variable under influence of chemical factors. The distinct signaling pathways were demonstrated by the Ras-Raf, Rho and AKT events, considering that the less virulent isolate caused minor cytotoxic stress, proved by minor Ras-Raf and AKT proliferation signals. The intense proliferation signals observed in the experiments with more virulent isolate and exposition to gp 43 could be associated to larger time of survival of the fungus that more easily goes inside the host cells, making it difficult to the monocyte-macrophage system cells to recognize it before the apoptosis, the

evasion and the dissemination. The Ras-Raf and AKT pathways acted synergetically with the effects of the cell survival. The decrease of the AKT event implied partial loss of the survival signal that intensified, following and in a opposite way, with Ras-Raf decrease. The activation of the survival pathways, associated to cytosolic signals when Pb goes inside the epithelial cell, was for the first time demonstrated in this work.

Palavras-chave: *Paracoccidiodes brasiliensis*; Adhesion; Cellular signalling; Ras/Raf pathway; AKT; Rho-GTP.

SUMÁRIO

1.Introdução	01
2. Objetivos	25
3. Material e métodos	26
3.1.Isolados estudados	26
3.2. Componentes antigênicos de <i>P. brasiliensis</i>	26
3.2.1. Filtrado de cultura.....	26
3.2.2. Fracionamento e purificação do antígeno de 43 kDa.....	27
3.2.3. Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS- PAGE).....	27
3.2.4 Coloração dos géis pelo nitrato de prata.....	28
3.2.5.Análise protéica por eletroforese bidimensional.....	29
3.3. Cultura celular	29
3.3.1.Cultura de células de linhagem contínua.....	29
3.3.2. Desenvolvimento do teste de adesão.....	30
3.3.2.1.Preparo das células para o teste.....	30
3.3.2.2.Preparo e padronização do inóculo de <i>P. brasiliensis</i>	31
3.3.2.3.Infecção das células Vero e Hela com <i>P.brasiliensis</i>	31
3.3.2.4. Tratamento da suspensão de células leveduriformes de <i>P.</i> <i>brasiliensis</i>	32
3.3.2.5.Tratamento térmico.....	32
3.3.2.6. Tratamento com tripsina a 0,2%.....	33
3.3.2.7.Tratamento com formalina a 4%.....	33
3.3.2.8.Tratamento com periodato de sódio 10mM.....	33

3.3.2.9. Tratamento com azida.....	34
3.3.2.10. Tratamento com Concanavalina A.....	34
3.3.2.11. Tratamento com açúcares.....	34
3.3.2.12. Tratamento com quitina a 2,5 %.....	35
3.3.2.13. Tratamento com diferentes pHs.....	35
3.3.2.14. Tratamento com soro humano normal.....	35
3.3.2.15. Tratamento com soro humano normal inativado.....	35
3.3.2.16. Tratamento com heparina.....	36
3.3.2.17. Tratamento com laminina.....	36
3.3.2.18. Tratamento com peptídeos	36
3.4. Coloração das lamínulas.....	37
3.4.1. Coloração de May-Grunwald-Giemsa.....	37
3.4.2. Coloração por ácido periódico de Schiff (PAS).....	37
3.4.3. Contagem das células e dos fungos aderidos.....	38
3.5. Ensaio de Sinalização.	38
3.6. Análise estatística.....	40
4. Resultados.....	41
4.1. Análise protéica por eletroforese bidimensional.....	41
4.2. Resultados da adesão dos isolados de Pb18 e Pb265 às células Vero e HeLa	43
4.3- Influência de tratamentos físicos, químicos e de algumas substâncias na adesão de <i>P. brasiliensis</i>	44
a) Tratamento térmico.....	44
b) Tratamento com agentes químicos e lectinas.....	45
c) Ação do pH.....	47

d) Ação dos tratamentos com soro, tripsina e heparina.....	48
4.4- Papel dos açúcares na aderência de <i>P.brasiliensis</i> às células epiteliais.....	49
a) Teste por inibição.....	49
b) Teste competitivo.....	51
4.5-Interações proteína-proteína na adesão de <i>P.brasiliensis</i>	53
4.6-Imunoblot – Evento de Sinalização Celular.....	56
5. Discussão.....	60
6. Conclusões.....	76
7. Referências bibliográficas.....	77
8. Anexo	96

1-INTRODUÇÃO e REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.2. *P. brasiliensis* e Paracoccidioidomicose

O agente etiológico da paracoccidioidomicose (PCM) é um fungo dimórfico denominado *Paracoccidioides brasiliensis*, classificado taxonomicamente no Reino Fungi, Divisão Eumycota, Subdivisão Ascomycota, gênero *Paracoccidioides* e espécie *brasiliensis* (UNTEREINER et al., 2004). Recentemente, foi sugerida a existência de três diferentes espécies filogenéticas (S1, PS2, and PS3) de *P. brasiliensis* (MATUTE et al., 2006).

P. brasiliensis é fungo dimórfico, termo-dependente, apresentando a fase miceliana (M), saprobiótica, em temperaturas de 25 a 27⁰C. O aspecto das culturas nesta fase é cotonoso, esbranquiçado e microscopicamente observa-se a presença de filamentos hialinos, finos e septados. A fase leveduriforme (L) constitui a forma parasitária do fungo, sendo reproduzida em cultivos de 35 a 37⁰C. Apresenta-se com células arredondadas, de parede dupla e brotamentos múltiplos característicos, formando a denominada “roda-de-leme” (LACAZ,1994).

Muito pouco se sabe a respeito do habitat do fungo. Achados de *P. brasiliensis* foram relatados em solos de áreas endêmicas (Brasil, Colômbia e Venezuela), mais recentemente em tatus, mas nenhum desses estudos, até o momento, pôde estabelecer definitivamente seu nicho ecológico (FRANCO et al., 2000; BAGAGLI et al., 2006).

A maioria dos pesquisadores considera a via inalatória como principal meio de infecção, em que propágulos da fase miceliana (artroconídidos e aleuroconídidos) são inalados, invadindo vias aéreas terminais (alvéolos e bronquíolos terminais) transformando-se em formas leveduriformes (RESTREPO, 1985). A doença afeta, principalmente, agricultores do sexo masculino em idade produtiva. Como

consequência, pode-se estabelecer a condição de paracoccidioidomicose-infecção, em que o indivíduo permanece assintomático ou, alternativamente, a paracoccidioidomicose-doença. O desenvolvimento de doença pode se dar de duas formas: aguda ou subaguda e crônica. A forma aguda compromete, preferencialmente, o sistema monocítico-fagocitário, levando a linfadenomegalia e hepatoesplenomegalia, enquanto que a crônica, acomete preferencialmente mucosas de via respiratória baixa até cavidade oral, sendo considerada resultante da reativação do fungo a partir de focos que permaneceram, provavelmente, quiescentes durante anos (FRANCO, 1986). Sabe-se ainda que a paracoccidioidomicose-doença pode deixar seqüelas nos órgãos comprometidos, mesmo após tratamento, como: má absorção intestinal, estenose de laringe, Doença de Addison, fibrose pulmonar, etc.

A capacidade de *P. brasiliensis* de provocar doença humana, e causar micose com grande variedade de manifestações clínicas, desde formas localizadas até doença disseminada evoluindo para óbito, depende provavelmente da relação entre a patogenicidade do fungo, e a habilidade deste em interagir com as estruturas superficiais do hospedeiro, e invasão celular e a resposta imunológica. O conhecimento dos eventos que ocorrem no processo de interação do fungo com as células do hospedeiro e, ou, matriz extracelular é essencial para se desenvolver, no futuro, terapias que possibilitem a inibição do patógeno em sua capacidade de colonizar e estabelecer a infecção; para isto, o bloqueio da interação é o local ideal. O uso de peptídeos sintéticos ou anticorpos dirigidos contra as moléculas de adesão ou as que interferem com os mecanismos usados para internalizar parasitas intracelulares é possibilidade que surge dos conhecimentos advindos dos estudos de interação celular. Por outro lado, a participação do sistema imunológico na PCM é evidenciada pelo extenso envolvimento do sistema monocítico-fagocitário, em casos graves, e pela presença de altos títulos de anticorpos

específicos; o que mas que parecem não apresentar proteção contra o fungo (FRANCO et al., 1989). Sabe-se, no entanto, da importância da imunidade celular em promover resistência à infecção por este fungo e por isso, esta se tornou o principal alvo das investigações imunológicas.

Variações nos diferentes isolados de *P.brasiliensis* são evidenciadas em relação a componentes da parede celular (SAN-BLAS & SAN-BLAS, 1977), em determinações de curvas de crescimento (KASHINO et al., 1985) e patogenicidade e antigenicidade (KASHINO et al., 1985; BIAGIONI et al., 1986; SINGER-VERMES et al., 1989; SINGER-VERMES et al., 1994). Em 1989, Singer-Vermes et al., estudando sete diferentes isolados de *P.brasiliensis*, Pb265, IVICPb267, Pb192, IVICPb9, PbSN, Pb2052 e Pb18, quanto aos aspectos de patogenicidade e imunogenicidade, verificaram que, estes poderiam se comportar como de virulência alta, média e baixa. Os isolados de virulência baixa apresentavam também capacidade menor de induzir a produção de anticorpos específicos e que os marcadores de virulência poderiam estar associados a fatores relacionados à antigenicidade. O isolado Pb18 se mostrou mais virulento que o isolado Pb265, em relação à sua DL_{50} em camundongos da linhagem B10A. Com exceção do isolado Pb265, todos os outros induziram uma peritonite granulomatosa epitelióide que variou em intensidade. O isolado Pb18 disseminou-se em órgãos, como fígado, baço, pulmões, nódulos linfáticos e coração, enquanto que o isolado Pb265 atingiu fracamente os nódulos linfáticos.

Os isolados de *P. brasiliensis* variam quanto à virulência, fato este que pode auxiliar na explicação quanto à existência de diferentes manifestações clínicas da doença (FRANCO et al., 1989). Os resultados experimentais demonstraram variações entre os isolados deste fungo quanto à virulência e que esta é também influenciada pela estocagem e passagem *in-vitro* dos isolados (ZACHARIAS et al., 1986; BRUMMER et

al., 1990; KASHINO et al., 1990; PERAÇOLI et al., 1992; ANDREOTTI, 2002). Vários grupos estudam a obtenção e purificação de uma vasta gama de antígenos de *P. brasiliensis* (MENDES-GIANNINI et al., 1990; CAMARGO et al., 1991; PUCCIA et al., 1991; BLOTTA & CAMARGO, 1993). Um dos antígenos mais estudados, a gp43, foi inicialmente identificada como fração E por Yarzabal et al. (1977) e, posteriormente, caracterizada por Puccia et al. (1986). A gp43 é o antígeno mais utilizado para o estudo da resposta imune humoral na PCM, por ser considerado o antígeno imunodominante de *P. brasiliensis*, como demonstrado nos primeiros estudos sorológicos realizados pelo grupo da Micologia da FCF-UNESP Araraquara (MENDES-GIANNINI et al. 1990) e por Camargo et al. (1991). Esta fração foi majoritariamente reconhecida por praticamente 100% dos soros de pacientes com PCM (MENDES-GIANNINI et al. 1990; CAMARGO et al., 1991). Por outro lado, tem sido demonstrado que diferentes isolados deste fungo podem produzir diferentes isotipos de gp43, variando de pI (ponto isoelétrico) 5,8 a 8,5 (SOUZA et al., 1997) e que estes são diferentemente expressos entre os isolados.

Com intuito de estudar os passos envolvidos no contato inicial de *P. brasiliensis* com a superfície celular até os eventos que culminam em sua entrada na célula, o grupo da Micologia da FCF-UNESP de Araraquara utilizou o modelo de culturas celulares. *P. brasiliensis* pode desenvolver vários fenótipos (crescimento, invasão e metástase) dependendo do isolado fúngico, hospedeiro e outros fatores (LENZI et al., 2000).

A capacidade de aderência às moléculas específicas da superfície celular, confere ao patógeno a habilidade para selecionar com qual componente do hospedeiro vai interagir e, a partir daí, colonizar os tecidos. A interação de adesinas (constituintes do microrganismo) com receptores celulares, que estão normalmente envolvidos no

contato célula-célula ou célula-matriz (especialmente integrinas), podem ser usados pelo patógeno para invadir e se manter como parasita intracelular.

No estudo da virulência de *P. brasiliensis*, Mendes-Giannini et al., (1994) utilizando culturas de células epiteliais da linhagem Vero (rim de macaco verde da África), demonstraram que este agente apresenta mecanismos de adesão e de invasão. Em estudo posterior, foi demonstrado que diferentes isolados do fungo apresentam grau de adesão diferente a essas células. Correlação entre aderência e virulência para animais foi mostrada, sendo que o isolado mais patogênico (Pb 18) fosse também mais aderente em comparação com o menos virulento (Pb 265). Portanto, Hanna et al., 2000 confirmaram estes dados e estabeleceram a correlação entre aderência e virulência.

Perda da capacidade de aderência de isolados altamente aderentes indicou-se tratar da influência dos (GIANNINI et al. não publicado), fato observado também por outros autores em modelos animais pela passagem sucessiva (KASHINO et al., 1985; BRUMER et al., 1990). A capacidade de adesão e de virulência para animais é restaurada quando se obtém retro-cultivos após inoculação ou a partir de culturas de células infectadas (MENDES-GIANNINI et al., 2006).

O agente da paracoccidiodomicose, como muitos outros microrganismos, sintetiza várias substâncias que participam direta ou indiretamente da relação fungo-hospedeiro. A estrutura antigênica de *P. brasiliensis* é bastante complexa; cerca de 60 componentes solúveis foram descritos incluindo glicoproteínas e proteínas, com e sem atividade enzimática (YAZÁRBAL, 1982). Estudos de correlação entre alguns destes componentes e a patogenicidade estão entre os assuntos abordados de grande importância na paracoccidiodomicose. A glicoproteína de 43 kDa, ligante de laminina, tem papel na adesão (VICENTINI et al., 1994); fato este confirmado pela inibição de 85% do processo de adesão, pelo soro anti-gp43 (HANNA et al., 2000).

Provavelmente, outros componentes do fungo tenham papel no processo de adesão (MENDES-GIANNINI et al., 2000). Recentemente, uma adesina de 30 kDa de *P. brasiliensis* foi isolada e demonstrou capacidade de ligação à laminina, mas não a outros componentes da matriz extracelular (MEC). Esta proteína foi mais expressa num isolado de *P. brasiliensis* que apresentava alta capacidade de adesão. O papel destas adesinas foi investigado e a adesão de *P. brasiliensis* foi intensamente inibida pelo pré-tratamento das células epiteliais com as moléculas de 30 e de 43 kDa (ANDREOTTI et al., 2005). Além disso, *P. brasiliensis* apresenta, em sua superfície celular, duas proteínas com massas moleculares de 19 e 32 kDa que interagem com diferentes proteínas da MEC, tais como laminina, fibronectina e fibrinogênio (GONZALEZ et al., 2005). A enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), recombinante, que é um componente de *P. brasiliensis*, foi capaz de se ligar à laminina, colágeno tipo I e fibronectina. O tratamento de formas leveduriformes de *P. brasiliensis* com anti-GAPDH e de pneumócitos com GAPDH recombinante promoveu a inibição da infecção do fungo às células epiteliais (BARBOSA et al., 2006). Coltri et al., 2006 estudaram uma proteína de 70 kDa, que foi designada como “paracoccin”, ligante de n-acetilglucosamina (GlcNAc) que se liga à laminina e induz a produção de TNF- α por macrófagos, com aumento de NO (óxido nítrico), suprimindo as células do sistema imunológico e, conseqüentemente, favorecendo a adesão e invasão das células do hospedeiro, sugerindo ser um fator importante na patogênese da PCM.

A maioria das moléculas com funções de ligantes são proteínas-glicomananas, presentes na parte externa da parede celular. Estas podem ter homologia com receptores tipo integrina, iC3b, e receptores para fibronectina, laminina e fibrinogênio ou então tipo lectina reconhecendo resíduos de fucose ou n-acetilglucosamina e em alguns casos interações ainda não definidas como a secreção de aspartil proteinase e do fator 6

(CALDERONE & FONZI, 2001). Mudanças nas condições e no meio de cultivo influenciam nas características de superfície celular de *P. brasiliensis* e conseqüentemente na adesão a tecidos (BOUCHARA et al., 1990; VESPA et al., 1995). Assim, polissacarídeos, proteínas e lipídeos da parede celular têm sido implicados como tendo alguma função adesiva, principalmente, em *Candida albicans* (MENDES-GIANNINI et al., 2005).

Há fortes evidências de que a ligação entre a forma de levedura de *P. brasiliensis* e células epiteliais é mediada por adesinas da camada externa da parede celular, denominada de fibrilar-flocular (HOWLET & SQUIER, 1980). Outras experiências têm sugerido que o grau de desenvolvimento desta camada depende de nutrientes como galactose ou sacarose (POULAIN et al., 1978). Células de *C. albicans* cultivadas em meio suplementado com altas concentrações destes dois açúcares tiveram um incremento na adesão às células epiteliais. Quando estas leveduras foram inoculadas em animais houve um aumento na virulência de 5 a 24 vezes, comparados aos isolados inoculados sem o acréscimo destes açúcares (SAMARANAYAKE & MCFARLANE, 1981). As leveduras cultivadas em meio suplementado com galactose ou sacarose passaram a apresentar um material polimérico extracelular, composto principalmente por manose, além de glucosamina e proteínas, que lhes proporcionaram um aumento do número de sítios adesivos e um aumento do número de determinantes antigênicos (CALDERONE & BRAUN, 1991).

A parede celular de ambas as formas de *P. brasiliensis* é composta principalmente de polissacarídeos (quitinas e hexoses), proteínas e lipídios (KANETSUNA, 1972). A forma de levedura apresenta hexoses constituídas de longas cadeias de alfa-1,3 glucana mais externamente e quitina e beta glucana na sua parte mais interna. A forma miceliar apresenta parede celular constituída de uma única

camada, em que a quitina e beta glucana estão entrelaçadas. (SAN-BLAS & SAN-BLAS, 2000). Em ambas as formas, uma galactomanana está presente, a qual reage cruzadamente com estruturas similares de outros fungos dimórficos (AZUMA et al., 1974).

A parede celular de *P.brasiliensis* tem sido separada em três frações: a) uma fração alcali insolúvel, b) outra fração ácido insolúvel e, c) fração alcali e ácido solúvel (KANETSUNA et al., 1969; KANETSUNA et al., 1972).

A quitina é comum nas duas formas em que *P. brasiliensis* se apresenta. A parede celular da forma leveduriforme contém glicose como uma cadeia de açúcar neutro na fração 1 e 2, como alcali solúvel alfa 1,3 glucana (95%) e uma pequena quantidade (5%) de um alcali insolúvel beta-1,3glucana (KANETSUNA et al., 1969; KANETSUNA et al., 1970). Pequenas quantidades (pouco mais de 2%) de galactose e manose foram encontradas na fração 3. A glicose é a principal hexose na forma miceliana, ocorrendo quase exclusivamente como beta 1,3 glucana.

1.2. Estudos da interação de *P.brasiliensis* com células epiteliais *in vitro*

A aderência aos tecidos do hospedeiro é considerada uma etapa crucial para o estabelecimento da doença e parece ser mediada pelo reconhecimento de alguns componentes da matriz extracelular. Várias proteínas da matriz podem ser receptores potenciais para os microrganismos. A laminina foi a primeira destes componentes a ser implicada na patogênese da paracoccidiodomicose (VICENTINI et al., 1994).

Nosso grupo vem trabalhando nesta abordagem e outros componentes da matriz como colágeno tipo I e IV, fibronectina e entactina estão envolvidos na adesão aos tecidos do hospedeiro. Pela primeira vez, foi demonstrado padrão de reconhecimento diferencial ao se compararem estes componentes da matriz extracelular (MEC) frente

aos componentes antigênicos das cepas Pb18 e Pb265 (VINCENZI, 2000; MENDES-GIANNINI et al., 2000). Os ensaios usando Pb18 demonstraram a saturabilidade das ligações, conferindo características de receptores aos sítios de ligação para as diferentes proteínas da matriz extracelular analisadas. Também se verificou que há seqüências da gp43 que mais contribuem para a ligação às células Vero (VINCENZI, 2000; MENDES-GIANNINI et al., 2006). Por outro lado, os peptídeos RGDS (arginina-glicina-ácido aspártico-serina) e RGD (arginina-glicina-ácido aspártico), que são parte da molécula de fibronectina, e as seqüências CDPGYIGSR-NH₂ e YIGSR, partes da molécula de laminina, reduziram a aderência da gp43 as células Vero. Estes resultados reforçam a contribuição do processo de adesão às diferentes proteínas da matriz extracelular na patogênese de *P. brasiliensis*. Por outro lado, moléculas de adesão de células eucarióticas são utilizadas por várias células e moléculas extracelulares na defesa do hospedeiro contra infecção (KERR et al., 1999). Recentemente, o envolvimento de ICAM-1 foi demonstrado na migração celular e na organização de lesões granulomatosas causadas por *P. brasiliensis* (MOREIRA et al., 2006).

Estas proteínas são freqüentemente utilizadas por um grande número de microrganismos para facilitar a aderência e/ou invasão. Assim, a interação com receptores celulares, que estão normalmente envolvidos no contato célula-célula ou célula-matriz (integrinas) são usados pelos patógenos para invadir e coexistir como parasita intracelular. Desta forma, os microrganismos patogênicos podem ligar-se as moléculas de adesão do hospedeiro visando sua entrada, promovendo sua própria sobrevivência e disseminação.

Na disseminação de *Candida albicans* estão envolvidos componentes da matriz extracelular como laminina, fibronectina e colágeno tipo IV e as adesinas até agora identificadas incluem receptores para os fragmentos do complemento iC_{3b} e C_{3d}

(CALDERONE et al., 1988; ALAEI et al., 1993), laminina (BOUCHARA et al., 1990; LOPEZ-RIBOT et al., 1994), fibrinogênio (BOUALI et al., 1987; CASANOVA et al., 1992), fibronectina (SKERL et al., 1983; KALO et al., 1988; KLOTZ & SMITH, 1991) e diferentes componentes da matriz extracelular incluindo colágeno tipo IV (KLOTZ, 1990; KLOTZ et al., 1993) e mais recentemente entactina (LOPEZ-RIBOT & CHAFFIN, 1994). A maioria destas adesinas são glico(mano)proteínas presentes na parte externa da parede celular e possuem propriedades similares às lectinas ou integrinas, reconhecendo nas células hospedeiras glicosídeos com resíduos fucosil ou peptídeos contendo a seqüência RGD (CALDERONE, 1993).

O parasitismo intraepitelial como mecanismo de infecção em paracoccidiodomicose humana é um aspecto pouco explorado. Os trabalhos de BRITO et al., (1972 e 1973) apontaram para a presença de células fúngicas sem parede nas porções intracelulares dos constituintes ectodermis de embriões de galinha, bem como a presença de células típicas de *P. brasiliensis* sobre células epiteliais e dentro delas. Os autores sugeriram que o fungo se apresenta na forma de protoplasto para penetrar nas células do hospedeiro e a parede fúngica regenera-se posteriormente, adquirindo sua morfologia característica.

O P. brasiliensis não é um parasita essencialmente intracelular, contudo pode ser observado no citoplasma de células epiteliais *in vivo* (BRITO et al., 1973) e *in vitro* (MENDES-GIANNINI et al., 2000). Esta interação pode também ser considerada importante como mecanismo de escape do sistema imune do hospedeiro, fato este que tem sido explorado e que pode oferecer outra perspectiva ao estudo da patogênese deste fungo (MENDES-GIANNINI et al., 1994; HANNA, 1996; MONTEIRO DA SILVA, 2000; HANNA et al., 2000). Um isolado de *P. brasiliensis* sem qualquer tratamento prévio foi capaz de aderir e invadir células epiteliais de linhagem contínua (MENDES-

GIANNINI et al., 1992). Inicialmente, pequenos brotos apareceram aderidos às células, mudando aparentemente sua morfologia e, decorrido algum tempo, estruturas esféricas foram observadas no citoplasma, com aparente migração para o núcleo (MENDES-GIANNINI et al., 1994). Estudos posteriores mostraram que a adesão de *P. brasiliensis* às células foi feita aparentemente por um pequeno túbulo, semelhante a um tubo germinativo (HANNA, 1995; UEMURA, 1996) e ao redor da área de adesão do fungo à célula epitelial puderam observar alterações nas membranas celulares, com presença de cavitações circunscritas ao redor do elemento fúngico e também vacúolos (MONTEIRO DA SILVA, 2000; HANNA et al., 2000); provavelmente resultantes dos produtos extracelulares do fungo ou através de um processo fagocitário da célula hospedeira. Formas variadas de *P. brasiliensis* foram observadas, interagindo com as células epiteliais e formas características do fungo e na forma de protoplasto foram observadas no interior da célula após 24 horas de incubação. Estas observações apontam que provavelmente o fungo invade estas células na forma de protoplasto e no citoplasma celular ocorreria a regeneração da parede celular. Os fungos, que invadiram as células Vero, foram observados numa forma circunscrita dentro de um vacúolo, sugerindo processo de fagocitose (MONTEIRO DA SILVA, 2000; HANNA et al., 2000). O *P. brasiliensis* não é um parasita essencialmente intracelular, contudo pode ser observado no citoplasma de células epiteliais *in vivo* (BRITO et al., 1973) e *in vitro* (MENDES-GIANNINI et al., 2000). Esta interação pode também ser considerada importante como mecanismo de escape do sistema imune do hospedeiro, fato este que tem sido explorado e que pode oferecer outra perspectiva ao estudo da patogênese deste fungo (MENDES-GIANNINI et al., 1994; HANNA, 1996; MONTEIRO DA SILVA, 2000; HANNA et al., 2000).

A habilidade do *P. brasiliensis* sobreviver intracelularmente pode explicar vários aspectos da relação parasita-hospedeiro. A invasão de *P. brasiliensis* às diferentes linhagens de células epiteliais pode ocorrer pela ativação de um processo fagocitário da própria célula hospedeira, à semelhança do ocorrido com a invasão de células pelas enterobactérias (KADURUGAMUWA et al., 1991). Essa invasão ocorre porque as células epiteliais estudadas apresentam mecanismo de fagocitose forçada e os metabólitos do fungo podem estimular o rearranjo do citoesqueleto da célula hospedeira, que passa a se comportar como célula fagocitária.

1.3. Citoesqueleto celular

O citoesqueleto é ligado à superfície da célula por membros da família das integrinas, por exemplo, receptores para fibronectina, colágeno, laminina, vitronectina, molécula do complemento C_{3bi} e entactina. Há evidências que integrinas estão ligadas ao sistema de microfilamentos da actina através de várias moléculas incluindo: talina, vinculina e α -actinina. Estas ligações formam estruturas semelhantes a âncoras, permitindo à célula eucariótica aderir às outras células ou à matriz extracelular. Assim, parasitas intracelulares são capazes de utilizar estes sistemas e usar tais receptores para entrar na célula hospedeira (ALAEI et al., 1993).

Todas as espécies eucarióticas possuem filamentos de actina. Esta proteína é a mais abundante do citoesqueleto, constituindo, freqüentemente, 5% ou mais do total das proteínas celulares. A invasão de microrganismos em células epiteliais evidencia-se pela alteração da membrana da célula hospedeira que fica deformada parecendo enrugada ou encrespada. A internalização e o efeito de enrugamento são acompanhados por extenso rearranjo de actina. Durante este processo há um aumento dos níveis de cálcio intracelular, um sinal que ativa as enzimas para a despolimerização da actina. Após a

entrada da bactéria, a polimerização do filamento da actina retorna ao normal (FINLAY et al., 1992; SALYERS & WHITT, 1994).

Outros constituintes do citoesqueleto, além dos microfilamentos de actina, têm sido estudados como os filamentos de citoqueratina, envolvidos na adesão de bactérias às células epiteliais. Os trabalhos têm sugerido que a aderência a citoqueratina pode ser importante na manutenção dos sítios de colonização em epitélios queratinizados e mesmo causar injúrias celulares em outros sítios (TAMURA & NITTAYAJARN, 2000). Por outro lado, foi sugerido que o envolvimento da citoqueratina facilitaria a translocação de algumas bactérias através das barreiras epiteliais, evadindo-se das defesas do hospedeiro (SAJJAN et al., 2000).

Algumas evidências têm sugerido que para a ocorrência da internalização de patógenos em fagócitos não profissionais, são requeridas proteínas ligantes de fibronectina (FnBPs). Assim, trabalhando-se com mutantes incapazes de expressar as FnBPs, foi verificada redução significativa de sua entrada em células epiteliais *in vitro* (ISBERG & TRAN VAN NHIEU, 1994). Porém, outros trabalhos demonstraram também que pode haver uma compensação por outras moléculas de superfície, pela ausência de FnBPs, permitindo ao microrganismo ligar-se às células. A fibronectina atuaria como molécula bifuncional, que formaria uma "ponte" entre a FnBP e o receptor celular (provavelmente as integrinas) que se liga a fibronectina ou outros componentes da matriz extracelular e interagem com o citoesqueleto de actina.

Os mecanismos moleculares de internalização de fungos em células epiteliais estão sendo explorados. Este aspecto está bem desenvolvido em bactérias como *Salmonella*, *Shigella* e *Yersinias* em que já se estudaram e caracterizaram as invasinas e o mecanismo de invasão que envolve alterações do citoesqueleto. As células epiteliais podem ligar-se a invasina e esta interação envolve várias integrinas (ISBERG &

LEONG, 1990; ISBERG, 1991). Como anteriormente mencionado, integrinas estão ligadas ao citoesqueleto e, por sua vez, os inibidores do filamento de actina bloqueiam a entrada da maioria das bactérias patogênicas em células não fagocíticas (FINLAY & FALKOW, 1989; TRAN VAN NHIEU & SANSONETTI, 1999).

As bactérias *Salmonella* ou *Shigella* ao entrarem nas células epiteliais, promovem grande condensação de actina ao seu redor (SANSONETTI, 1991; FINLAY et al., 1992), à semelhança do que ocorre na fagocitose. Há também uma grande condensação de α -actinina, tropomiosina, talina e integrinas, envolvendo a bactéria (WATARI et al., 1996).

Assim, é provável que os organismos invasores liguem-se diretamente ou via matriz extracelular às integrinas, ou suas assemelhadas na superfície do hospedeiro. Após esta ligação, é disparado um sinal na célula hospedeira para que os filamentos da actina liguem-se ao receptor da membrana, possivelmente, via talina e outras proteínas e assim possibilitem a entrada do parasito na célula. Uma vez dentro da célula, alguns microrganismos são capazes de causar significativo rearranjo no citoesqueleto (WELLS et al., 1998; MENDES-GIANNINI et al., 2004).

Estudos realizados com cultura de células endoteliais, incubadas com *C. albicans* demonstraram a presença de leveduras intracitoplasmáticas incluídas em vacúolos e injúria celular concomitantemente à formação de hifas. Este microrganismo pode induzir fagocitose em células endoteliais através da polimerização dos microfilamentos e microtúbulos do citoesqueleto (FILLER et al., 1995, ZINK et al., 1996). Foi sugerido que substâncias citotóxicas secretadas pelas hifas causariam tais danos. A migração de *C. albicans* pelo endotélio é considerada etapa crucial para a invasão do parênquima e estabelecimento da infecção sistêmica (ZINK et al., 1996).

P. brasiliensis é capaz de invadir e induzir rearranjo do citoesqueleto em células epiteliais (Vero) e na linhagem A₅₄₉ de pneumócitos tipo I. Componentes do citoesqueleto, tais como actina, tubulina e citoqueratina, estão envolvidas no processo de invasão de *P. brasiliensis*. Os resultados também mostraram que a interação de *P. brasiliensis* com estas células afetou a citoqueratina celular, apontando para a presença de queratinases. Citocalasina D e colchicina reduziram substancialmente a invasão, indicando a participação de microfilamentos e microtúbulos neste mecanismo. Gp43 foi também reconhecida por soro anti-actina e anti-citoqueratina, mas não por anti-tubulina, sugerindo que esta molécula pode ser um ligante para alguns componentes e pode ser provável candidata à invasina (MENDES-GIANNINI et al., 2004). Os componentes do citoesqueleto são partes importantes do sistema celular para transporte citoplasmático de vesículas e outras organelas. *P. brasiliensis* pode tirar vantagem deste sistema aderindo a estes componentes e subvertendo-os. Assim, *P. brasiliensis* pode induzir a fagocitose em células epiteliais através da polimerização de microfilamentos e microtúbulos (HANNA, et al., 2000; MENDES-GIANNINI et al., 2000; MENDES-GIANNINI et al., 2004).

Células não fagocíticas como as epiteliais e fibroblastos não codificam receptores CR₃ e, normalmente, não fagocitam. No entanto, muitos patógenos intracelulares são capazes de entrar nestas células, talvez, por mecanismos envolvendo integrinas e o citoesqueleto. Assim, a internalização de conídios de fungos oportunistas como *Aspergillus fumigatus* em cultura de células endoteliais estaria também associada com o mecanismo de escape de fagócitos assim como uma possibilidade para a disseminação (PARIS et al., 1997). A participação de células epiteliais na paracoccidiodomicose pode, por outro lado, ser um ponto de transição do fungo para sua colonização e invasão tecidual. Os efeitos que *P. brasiliensis* pode induzir nas

várias vias de sinalização entre as células e o genoma através do citoesqueleto são atualmente desconhecidas.

As integrinas são os principais receptores utilizados pelas células animais para ligação à MEC. Essas proteínas são heterodímeros e atuam como ligantes transmembrana que medeiam as interações bidirecionais entre a matriz e o citoesqueleto de actina (HYNES, 1987).

1.4. Sinalização celular

Coxon et al., (1998) investigaram a hipótese de que a invasão da *Legionella pneumophila* à monócitos ativa sinais de fosforilação necessários para induzir o rearranjo do citoesqueleto requerido no processo de entrada da bactéria e a possibilidade que esses sinais sejam diferentes entre isolados avirulentos e virulentos durante o evento de invasão. Quando células infectadas com a bactéria foram observadas por imunofluorescência utilizando anticorpo anti-fosfotirosina 4G10, houve um aumento da fluorescência, mostrando a presença dessa proteína durante a infecção.

No processo de invasão celular de *Trypanosoma cruzi*, a função dos receptores de superfície celular é disparar a cascata de sinalização que mobiliza vários mensageiros secundários. A mobilização do íon cálcio promove na célula hospedeira o rearranjo dos microfilamentos, o recrutamento de lisossomos para o sítio de entrada de *T. cruzi* e a internalização do parasito. O resultado da informação da superfície celular para os componentes intracelulares leva a um aumento da concentração de cálcio livre no citosol da célula. Esta resposta de cálcio que é requerida na invasão do parasito, não é provocada em formas não infectantes de *T. cruzi* (YOSHIDA et al., 2000).

Favoreto et al., (1998) examinaram a necessidade da fosforilação da proteína tirosina de *Trypanosoma cruzi* para sua entrada em células de mamífero, e observaram

que o tratamento do parasito com genisteína, um inibidor da atividade tirosina quinase, inibiu significativamente a invasão às células Hela.

Como uma das conseqüências da internalização de patógenos em células epiteliais, a modulação do fenômeno de apoptose, tem sido investigada (JACOBSON & RALF, 1997; VAUX & KORSMEYER, 1999; MENDES-GIANNINI et al., 2004). Este fenômeno é essencial na regulação da população de células, homeostase e também em certas condições patológicas, como câncer.

A indução de apoptose por patógenos foi bem caracterizada para certas infecções virais (THOMPSON, 1995), bacterianas (McORIST et al., 1996; MONACK et al., 1997; GUEIRARD et al., 1998) e por protozoários (KHAN et al., 1996). Como conseqüência, os patógenos podem alcançar o meio extracelular, evadir-se da resposta imune ou estimular a resposta inflamatória (MONACK et al., 1996; MULLER et al., 1996; ZYCHLINSKY et al., 1996).

Staphylococcus aureus, além da persistência em hospedeiros saudáveis, pode induzir infecções crônicas e resistentes à terapia convencional (MOULDING et al., 1999). Embora também não seja um patógeno intracelular, foi extensivamente documentada a entrada em células epiteliais, endoteliais e osteoblastos. Estes mecanismos foram sugeridos como uma possibilidade de manutenção de um nicho intracelular, podendo promover a colonização em longo prazo no hospedeiro, determinando assim, o caráter da infecção crônica. Durante seu ciclo de invasão celular, esta bactéria induz sua interiorização, através do rearranjo dos microfilamentos de actina; internalizada, ela escapa da vesícula endossomal; multiplica-se no citoplasma celular e alcança o meio extracelular, induzindo apoptose na célula hospedeira, através de toxinas (MENZIES & KOURTEVA, 1998).

A técnica de TUNEL (técnica capaz de detectar DNA apoptótico) foi empregada e verificou-se a indução de apoptose em células epiteliais por *P. brasiliensis* (MENDES-GIANNINI et al., 2004). As mudanças morfológicas nucleares e o número de células apoptóticas foram dependentes do tempo de exposição à *P. brasiliensis*. Os mecanismos de indução de apoptose em células não fagocíticas, que internalizaram *P. brasiliensis*, devem ser exploradas para se correlacionar com prováveis achados *in vivo*. O papel de células apoptóticas na infecção por *P. brasiliensis* é desconhecido, entretanto, ativação nas células ou fagócitos pode favorecer o patógeno, favorecendo conseqüentemente sua disseminação.

Fungos e outros organismos vivos são capazes de perceber mudanças no meio e ajustar suas atividades intracelulares. O crescimento e diferentes respostas dos fungos a estímulos exógenos estão relacionados com eventos de sinalização celular. O crescimento de fungos filamentosos e os processos de divisão celular das leveduras patogênicas, *C. albicans* e *C. neoformans*, são regulados por uma cascata de sinais de transdução (LENGELER et al., 2000). Apesar das diferenças evolucionárias entre células de mamíferos e fungos, ambos compartilham padrões semelhantes de sinalização intracelular (LENGELER et al., 2000). 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.

A ativação de proteínas ou fosfolipídios de membrana gera a resposta de um segundo mensageiro que pode interagir com proteínas quinases de sinalização ou modular a liberação de cálcio para outros eventos intracelulares.

A flutuação da concentração de cálcio intracitoplasmático é resultante dos sinais emitidos do fosfolipídio denominado fosfatidilinositol (PI). Sinais de membrana por PI

geram os segundos mensageiros diacilglicerol (DAG) e 1,4,5-trifosfato inositol (IP3). Assim, IP3 mobiliza cálcio do retículo endoplasmático como resposta ao estímulo dos fosfolípidios de membrana. O influxo citoplasmático de cálcio pode ser regulado por eventos extracelulares (LODISH & KONG, 1990).

Há uma notável homologia bioquímica e genética em leveduras, nematóides e células de mamíferos, quanto à cascata de sinalização celular composta de várias proteínas com ação sequencial. Estas proteínas são denominadas de MAP quinase (MAPK) e são ativadas por um complexo de proteínas *ras* associadas existente na membrana celular (LODISH & KONG, 1990). 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 autoregulada 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). A resposta das células frente ao “stress” vai estimular eventos nucleares para síntese de mediadores de inflamação ou direcioná-la para morte. Além da ativação nuclear, a sinalização pode ativar alvos do citoesqueleto celular modulando a interação célula-célula ou célula à matriz. O modelo atualmente proposto para a interação entre matriz e propagação de sinal intracelular é a ligação entre integrinas associadas a membrana e um receptor não tirosina quinase, denominado FAK (*focal adhesion kinase*). O sinal emitido pela interação integrina/FAK modula novos sinais intracelulares sequenciais associados ao complexo protéico Grb2/Sos, proteína *Ras* e MAPKs (COOPER, 2000).

Ainda, frente ao estímulo de fatores de crescimento, o sinal intracelular ativa proteínas de citoesqueleto, como Rho, Rac e Cdc42 e resulta na modificação conformacional da célula. Rho, Rac e Cdc42 são da família de pequenas proteínas ligadas a GTP que atua na regulação do citoesqueleto de actina, controlando uma variedade de processos celulares como motilidade, adesão e citocinese (COOPER, 2000).

Estudos em diferentes fungos, incluindo Ascomicetos e Basidiomicetos, têm convergido para definir dois sinais de transdução bem conservados que regulam o desenvolvimento e virulência. Um diz respeito à cascata da MAP quinase que medeia resposta a feromonas e a segunda sensível a nutrientes (GPCR), cascata G-CAMP-PKA. As funções dessas vias coordenadamente regulam cruzamentos, filamentação e virulência.

As diferenças das vias entre os diferentes organismos são poucas, e os mecanismos de sinalização são bem conservados. Como exemplo, temos a proteína G_{∞} (nutriente sensível) que regula a produção de cAMP durante o crescimento pseudohifal de *Schizosaccharomyces pombe*, cruzamento e virulência de *Cryptococcus neoformans* e do patógeno de plantas *Ustilago maydis* (ARELLANO, et al., 1999; LENGELER, et al, 2000; MAHLERT et al, 2006).

Lengeler et al., 2000 observaram que as redes regulatórias são flexíveis e podem ser adaptadas por organismos bem divergentes às respostas ambientais. MAP quinases tem sido identificadas em fungos patogênicos e são importantes na formação do apressório, crescimento hifal invasivo e na patogênese fúngica, assim como nos processos de crescimento e diferenciação.

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.

Assim em *P. brasiliensis* ainda são totalmente desconhecidas as prováveis vias capazes de ativar sinais citosólicos associados ou não durante o processo de invasão ligada aos receptores tirosina quinase ou outros ou a via de transdução de sinal envolvendo fosfolipídios de membrana ou sinalização celular envolvendo citoesqueleto com os receptores *Ras/Raf*.

Os mecanismos e fatores de virulência dos microrganismos são objetos de estudo de muitos pesquisadores e no caso de infecções sistêmicas fúngicas, o conhecimento da interação fungo-célula hospedeira, poderá servir para a melhor compreensão dos mecanismos de patogenicidade e futuramente no desenvolvimento de novas estratégias para circunscrever esta infecção fúngica.

É possível que fungos patogênicos induzam modulação de diferentes vias na célula do hospedeiro para escapar de suas defesas e disseminar. Para um número de patógenos, a habilidade de se ligar às glicoproteínas da matriz extracelular (MEC), facilitando a internalização e a indução de apoptose é considerada como fatores importantes na virulência. Além disso, reação específica dos fungos com as células alvos do hospedeiro deve ser mediada pela interação carboidratos ligados às proteínas, que combinem com açúcares da superfície da célula do hospedeiro. Estas interações necessitam de modelos de estudo para investigar quais moléculas estão envolvidas entre adesinas presentes nos fungos e receptores na célula do hospedeiro (MENDES-GIANNINI et al., 2000). Assim, neste trabalho empregando o modelo de culturas celulares foram investigados os prováveis componentes envolvidos na adesão de *P.brasiliensis* às células, procurando encontrar diferenças neste processo entre os isolados Pb18 e Pb265, classicamente mais e menos virulentos, respectivamente. Assim como, o papel dos isotipos da glicoproteína de 43 nos eventos durante adesão e invasão de *P.brasiliensis* às culturas celulares.

1.4.1. Proteínas envolvidas em vias de sinalização celular

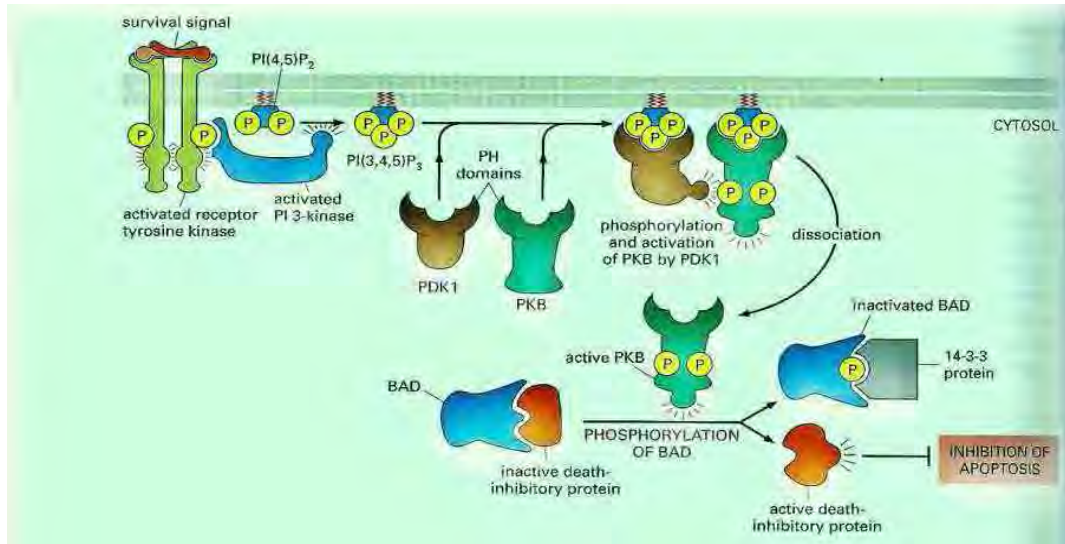
1.4.1.1. Proteína Raf Serina/treonina quinase

Raf são importantes nos sinais de transdução. Raf 1 é um membro desta família, e é uma proteína citoplásmica de massa molecular de 72-76 kDa com atividade intrínseca de serina/treonina quinase, é expressa em muitos tipos de células e é o homólogo celular da Raf relacionada com a oncogene viral. v-Raf . Outros membros desta família incluem A-Raf e Raf-B. Raf-1 fosforila e conseqüentemente ativa MEK(MAP quinase). Proteínas Ras ligam-se a Raf-1, somente quando Ras está na sua forma ativa (ligada a GTP). Estes resultados de interação em Raf medeiam a ativação de MEK. Recentemente duas proteínas relacionadas à Raf foram descritas: Ksr-1 e Tak1 (TGF β - quinase ativada), com função regulatória na cascata de sinalização de Ras (TRAVERSE et al., 1993; MARAIS & MARSHAL, 1996; MARAIS et al., 1997; MASON et al 1999).

1.4.1.2. Proteína Akt/PKB (Proteína quinase B)

As Akt são da família “AGC” das proteínas quinases, que incluem proteínas quinases A, G, e C, que são ativadas em resposta a muitos sinais extracelulares e participam de diversos processos celulares. Membros da família AGC são ativados pela fosforilação do ponto T de seu domínio quinase por PDK1 e por fosforilação de um resíduo localizado no C-terminal do seu domínio quinase na parte hidrofóbica. AKT-1 também conhecida como proteína quinase B ou PKB e a AKT2 relacionada à quinase, ambas são rapidamente e especificamente ativadas por diversos ligantes como PDGF, EGF e FGF básico. AKT3 é o terceiro membro da família, também designada como proteína B gama ou “thyoma viral proto oncogene”, envolvida em adipócitos e

diferenciação muscular, síntese de glicogênio, aumento de glicose, apoptose e proliferação celular, e ativação de insulina. Um membro da quarta família, é a SGK, que tem um sítio catalítico similar ao da AKT1 (CHAN et al., 1999; SONG et al., 2005).



Alberts, 4. ed

Figura Ilustrativa da via de sinalização PIP3/PKB(proteína AKT- proteína quinase

B)

1.4.1.3. Proteína Rho

As Rho GTPases, semelhantes à família Src (as quinases da família Src) são enzimas associadas à membrana que podem reconhecer e ligar-se à seus substratos específicos e transferir um grupo fosfato no resíduo tirosina da proteína alvo, retransmite informações durante o estabelecimento e manutenção da morfologia, polaridade, migração, e divisão celular. Ambas as vias de sinalização podem influenciar de forma independente ou agir em paralelo. Entretanto Rho atua numa via muito diferente da família Src quinase. Rho GTPases são moléculas que variam entre o estado inativo GDP (guanosina difosfato) e o estado ativo GTP(guanosina trifosfato). Existem 20 diferentes Rho GTPases, que podem ser divididas em cinco classes, regulando

muitos aspectos diferentes de dinâmica do citoesqueleto. O ciclo entre a forma ativa e inativa é regulado por GEFs (guanina nucleotídeo troca de fatores), GTPase ativando proteínas (GAPs), e guanina nucleotídeo dissociação de inibidores. Ativação da expressão dos membros Rho, Rac, e Cdc 42 da família Rho GTPases induz rearranjo na actina do citoesqueleto que resulta na formação de fibras de stress, lamelopódios e filopodia, respectivamente. O local de indução ou modulação destas mudanças morfológicas durante a entrada do patógeno nas células do hospedeiro pode trazer vantagens para a invasão do patógeno e também não é surpreendente que muitos patógenos tenham desenvolvido mecanismos para interagir com estas e outras vias de sinalização (MÜNTER . et al., 2006).

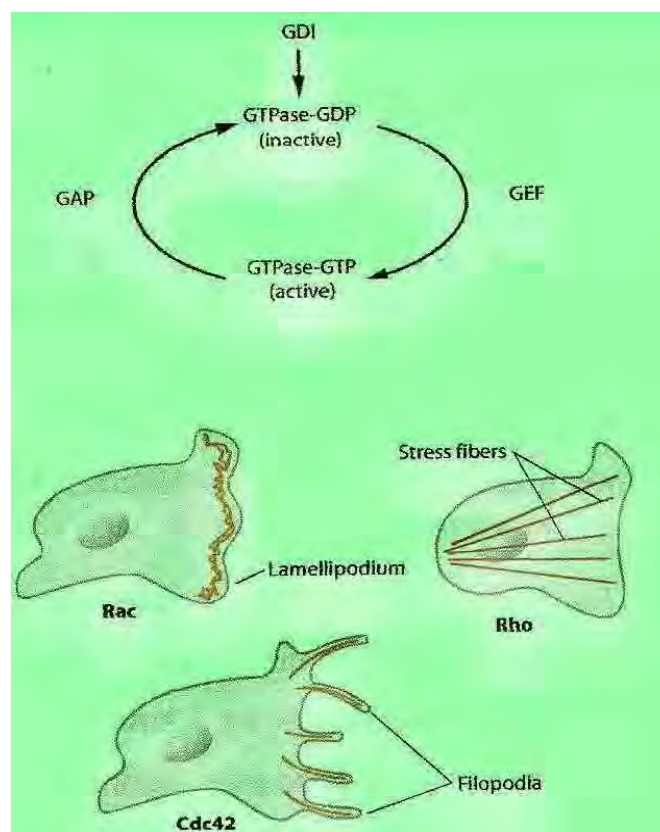


Figura ilustrativa da Regulação das Rho GTPases (MÜNTER, et al. 2006).

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVOS GERAIS

- Verificar se existe diferença intra-espécie e os possíveis fatores envolvidos na adesão celular às duas linhagens de células epiteliais quando se comparam os isolados de *P.brasiliensis* Pb18a e Pb265.
- Verificar os eventos de sinalização ocorridos durante invasão de *P. brasiliensis* às células epiteliais.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estudar comparativamente duas linhagens celulares quanto à adesão de dois isolados de *P.brasiliensis* (Pb18a e Pb265).
- Avaliar a influência de diferentes tratamentos (térmicos, químicos e de componente da matriz (laminina) e seus peptídeos sintéticos) no processo de adesão desses isolados a células epiteliais.
- Avaliar eventos de sinalização relacionados ao citoesqueleto ocorridos durante invasão de *P. brasiliensis* às células epiteliais.
- Avaliar eventos de sinalização ocorridos durante o tratamento da gp 43 às células epiteliais.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Isolados estudados

Os isolados de *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb-18 fungo recentemente recuperado de inoculação animal , com propriedades adesivas aumentadas (Pb18a) e o subcultivado (Pb18b), Pb-265, Pb-339), diferentes em seu grau de patogenicidade para camundongos, foram utilizados no presente trabalho. Estes foram gentilmente cedidas pela Dra. Vera L. Calich do Instituto de Ciências Biomédicas - USP. Os isolados foram reisolados de animais e para isso suspensões padronizadas de 10^6 céls/mL da fase leveduriforme, de cada isolado, foram inoculadas, via intratesticular em hamster. Após 7 dias, foi feita a retirada dos pulmões, baço e testículos. Os órgãos foram macerados, semeados em ágar Fava Netto e após o crescimento das colônias, os isolados foram mantidas em ágar Fava Netto a 35-37⁰C.

3.2. Obtenção da gp 43

3.2.1. Filtrado de cultura

Os componentes exocelulares foram obtidos a partir do isolado 339 de *P.brasiliensis* fase “L”. As leveduras, com 5 dias de crescimento em meio de Fava Netto, foram inoculadas em 500ml de caldo Sabouraud ,asparagina e tiamina, e incubado a 35^oC por 10 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, foi obtido o filtrado de cultura e os extratos

foram analisados quanto aos teores protéicos pelo método de Lowry et al. (1951) e avaliados por SDS-PAGE. Finalmente, foram aliquotados e congelados a -70°C .

3.2.2. Fracionamento e purificação do antígeno de 43kDa

O filtrado de cultura do isolado 339 foi utilizado para a obtenção do antígeno de 43kDa. Para tanto, foi empregada a técnica de cromatografia de troca iônica, utilizando a coluna HitrapTM QFF (Q Sepharose Fast Flow – catalogo nº 17-5053-01- Amersham Biosciences - GE Healthcare) no aparelho ÄKTA FPLC System da Amersham Biosciences- GE Healthcare. Uma alíquota de 100 μL do filtrado de cultura foi aplicada e a avaliação dos eluatos foi efetuada por SDS-PAGE.

3.2.3. Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)

Os componentes protéicos dos antígenos foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio, SDS-PAGE, sob condições redutoras, usando sistema tampão descontínuo de Laemmli, (1970) e Studier, (1973).

A separação dos componentes foi efetuada em gel a 10%, e em gel de empilhamento a 5% de acrilamida. O gel foi preparado a partir de uma solução estoque contendo 30% por peso de acrilamida e 0,8% por peso de bis-acrilamida. No gel de separação a polimerização foi feita em solução contendo 1,5 M de Tris-HCl, pH 8,8 e 0,4% de SDS, em presença de 0,1% v/v de N,N,N',N'-tetrametil-etilenodiamina (TEMED) e 0,1% de persulfato de amônio. O gel de empilhamento foi polimerizado em

presença de 0,5 M de Tris-HCl pH 6,8 e 0,4% de SDS, além de 0,1% de persulfato de amônio e 0,05% v/v de TEMED. Para o preparo da amostra foram utilizados 64µL de antígeno diluído em tampão de amostra (1:4), consistindo de 62,5 mM de Tris-HCl [tris (hidroxi-metil) aminometano] pH 6,8, 2% de SDS, 10% de glicerol, 0,5 M de ditiotreitol e 0,002% de azul de bromofenol.

As proteínas foram dissociadas pelo aquecimento da amostra em banho-maria com água fervente por 3 minutos. Paralelamente à amostra, em cada corrida eletroforética, uma mistura de proteínas de peso molecular conhecido foi utilizada, a saber, fosforilase b (94 kDa), albumina bovina (67 kDa), ovoalbumina (43 kDa), anidrase carbônica (30kDa), inibidor de tripsina (20 kDa) e lactoalbumina (14 kDa). A partir da análise da migração destes padrões, os pesos moleculares das proteínas antigênicas foram calculados.

A corrida eletroforética foi realizada a 10 mA (80 V) até que o corante penetrasse no gel de separação e a 20 mA (120 V) até que atingisse o fim do gel. O tampão de corrida é constituído de Tris 0,075 M, glicina 0,57 M e SDS 0,1%, pH 8,3.

3.2.4. Coloração dos géis pelo nitrato de prata

Esta coloração foi utilizada segundo o método descrito por Nielsen & Brown (1984) para o gel de poliacrilamida acrescido de dodecil sulfato de sódio. Para tanto, após a corrida eletroforética, a fixação do gel foi realizada com solução de ácido tricloroacético a 10% por 30 minutos a 4°C. Em seguida, foram feitas 3 lavagens de 10 minutos cada, com solução de 10% de etanol mais 5% de ácido acético. Solução oxidante foi adicionada a seguir, consistindo de 0,0034M de dicromato de potássio e 0,0032 N de ácido cítrico e o gel assim mantido por 5 minutos. Esta solução foi retirada

e após, o gel foi lavado com água milli-Q e a seguir foi adicionada uma solução de nitrato de prata 0,012 M por 20 minutos no escuro e nova lavagem com água por 1 minuto. Foi então adicionada solução redutora consistindo de 0,28 M de carbonato de sódio e 0,0185% de formaldeído. Após o desenvolvimento da cor, a coloração foi bloqueada com solução de ácido acético a 5%, e o gel mantido nessa solução até a documentação.

3.2.5. Análise protéica por eletroforese bidimensional.

A proteína de 43 kDa foi primeiramente submetida à focalização isoelétrica, como descrito por O'Farrel, (1975). A segunda dimensão, realizada para a separação de proteínas de acordo com a massa molecular, foi realizada em gel de poliacrilamida num gradiente de 5 –15% de acordo com Laemmli, (1970). O gel foi corado com Coomassie Azul Brilhante G-250, segundo Neuhoff et al. (1988).

3.3. Cultura celular

3.3.1. Cultura de células de linhagem contínua

Neste estudo, foram utilizadas três linhagens de células contínuas:

- células Vero : células epiteliais de rim normal de macaco verde da África
- célula HeLa : adenocarcinoma cervical humano
- células A₅₄₉ : células epiteliais respiratórias-pneumócitos

Ambas as linhagens foram obtidas de coleções de cultura. As células foram cultivadas em garrafas de vidro tipo xarope, em meio 199 (células Vero e Hela) e em

meio HAM F12 (células A₅₄₉) suplementados com 10% de soro fetal bovino, e mantidas a temperatura de 36,5°C.

Decorridos 3 a 4 dias, as garrafas de células foram submetidas a tripsinização. Para isso, a monocamada celular formada foi lavada com 1 ml de ATV-solução de tripsina 0,2% e EDTA 0,02% (Adolfo Lutz) e, após lavagem, esta foi desprezada e acrescentado mais 1 ml de ATV. Seguidos 1-2 minutos, as células foram homogeneizadas com volumes variados do meio correspondente acrescido de 10% de soro fetal bovino (SFB). Nesta etapa, a tripsina (ATV) foi neutralizada pelo soro fetal bovino presente no meio de cultura. O volume total da suspensão celular obtida foi transferida para outras garrafas, de modo a se obter uma concentração celular de 10⁶ células/ml.

3.3.2. Desenvolvimento do teste de adesão

3.3.2.1. Preparo das células para o teste

Os ensaios de adesão foram realizados em tubos especiais denominados tubos de Leighton, que apresentam uma depressão achatada na qual se encaixa uma lamínula. Para os testes realizados nestes tubos, a suspensão celular foi padronizada para 10⁶ células/mL. Assim, após a tripsinização e homogeneização da suspensão celular, 0,2mL desta foi retirada da garrafa e diluída em 1,8mL de meio 199 com 10% soro fetal bovino (SFB) e feita a contagem em hemocítômetro para que através de diluições adequadas, fosse ajustada a concentração desejada. Ao término dessa etapa, 1,0mL da suspensão padronizada de células foi inoculada nos tubos de Leighton e incubadas a

36,5⁰C por 24 horas, para que a monocamada celular se formasse sobre a lamínula, sendo a partir daí, utilizada para os testes de adesão.

3.3.2.2. Preparo e padronização do inóculo de *P.brasiliensis*

P.brasiliensis foi cultivado em meio de Fava Netto por 4 a 5 dias, seguindo-se a remoção das células e feita suspensão em solução fisiológica tamponada com fosfatos (PBS) 0,05M, pH 7,2. A suspensão foi ajustada em 10⁶ células/mL através de leitura em espectrofotômetro (DO=0,5 a 550nm) e na escala 3,0 de MacFarland.

3.3.2.3. Infecção das células Vero e HeLa com *P.brasiliensis*

Após a formação do tapete celular confluyente sobre a lamínula, o sobrenadante da cultura foi desprezado e as células lavadas por três vezes com 1,0 mL de PBS 0,05M pH 7,2 estéril. Em seguida cada tubo de Leighton recebeu 1,0 mL de novo meio de 199 com 10% SFB e 1,0 mL da suspensão padronizada de *P.brasiliensis*.

As células infectadas foram então incubadas a 37⁰C. A cinética de infecção foi avaliada e o período de 2 horas foi adotado para todos os testes. Decorrido esse tempo, as células foram então lavadas 5 vezes com PBS 0,05M pH 7,2 para remover os fungos não aderidos e o tapete infectado foi então fixado com paraformaldeído a 4%. As lamínulas foram coradas e após foram feitas as contagens das células leveduriformes aderidas às células epiteliais.

3.3.2.4. Tratamentos da suspensão de células leveduriformes de *P.brasiliensis*

Após padronização em PBS 0,05 M pH 7,2, alíquotas de 1,0mL da suspensão de *P.brasiliensis* foram colocadas em condições assépticas em “ependorfs”, realizando os seguintes procedimentos:

3.3.2.5. Tratamento térmico

As triplicatas de cada suspensão dos isolados de *P.brasiliensis* (Pb-18a e Pb-265) foram submetidas aos seguintes tratamentos térmicos: a) 121⁰C/10’ em autoclave, b) 100⁰C/10’ em banho-maria e c) 56⁰C/30’ em banho-maria.

Após o tempo de tratamento, foram realizadas três lavagens com PBS 0,05 M, pH 7,2 estéril com centrifugações a 1.000 x g à 4⁰C.

Paralelamente os tubos de Leighton foram lavados com PBS 0,05 M, pH 7,2 por três vezes para remover células mortas ou não aderidas, adicionado novo meio de MEM com 10% SFB e 1,0mL de suspensão de *P.brasiliensis* previamente tratado.

Estes tubos foram então levados à estufa de 37⁰C por 2 horas para que ocorresse a interação fungo-célula. Após esse prazo, os tubos foram lavados por cerca de 5 vezes com PBS 0,05M, pH 7,2, para remover as leveduras não aderidas às células. A fixação foi então feita com paraformaldeído a 4% por no mínimo 2 horas. Decorrido esse tempo, a lamínula foi retirada do tubo de Leighton, lavada com água destilada, seca e submetida à coloração. O controle de infecção foi feito com suspensão de *P.brasiliensis* livre de tratamento e mantida nas mesmas condições.

3.3.2.6. Tratamento com tripsina a 0,2%

Como descrito anteriormente, a suspensão de *P. brasiliensis* após padronização foi centrifugada a 1.000 x g à 4°C e ao sedimento foi adicionado 1,0 mL de tripsina 0,2% (Adolfo Lutz). A suspensão foi homogeneizada e mantida a 37°C em estufa por 60 minutos.

Após esse tempo foi removida a tripsina por centrifugação e as células leveduriformes foram lavadas e centrifugadas à 1000 x g à 4°C por três vezes com PBS 0,05 M, pH 7,2 estéril, para remoção de qualquer resíduo.

3.3.2.7. Tratamento com formalina a 4%

O mesmo procedimento descrito para o tratamento da tripsina foi feito para a formalina, sempre mantendo a suspensão de *P. brasiliensis* por 60 minutos de contato com o agente químico e removido da mesma forma como descrito no item 3.3.2.6.

3.3.2.8. Tratamento com periodato de sódio 10 mM

Foi utilizado periodato de sódio na concentração de 10 mM em PBS 0,05 M, pH 7,2, sendo este filtrado em membrana de 0,22 µm.

As suspensões de *P. brasiliensis*, após padronização como descrito no ítem 4, foram mantidas em contato com o periodato de sódio por 60 minutos a 37°C, no mesmo procedimento que o item 3.3.2.6.

3.3.2.9. Tratamento com azida sódica 10 mM

Foi também utilizada a azida sódica na concentração de 10 mM/mL em PBS 0,05 M, pH 7,2 e filtrada em membrana de 0,22 µm. O mesmo procedimento do item 3.3.2.6 foi feito.

3.3.2.10. Tratamento com Concanavalina A

Foi utilizada concanavalina A na concentração de 10 µg/mL diluída em PBS 0,05 M, pH 7,2 e filtrada em membrana de 0,22 µm. Repetiu-se o procedimento do item 3.3.2.6.

3.3.2.11. Tratamento com açúcares

Neste teste foram utilizados os seguintes açúcares: D(+) glucosamina, D(+) galactosamina, alfa-lactose, D(+) manose, mio-inositol, D(+) galactose, D(+)glicose e maltose. Foram preparadas soluções a 2,5% em PBS 0,05 M, pH 7,2 seguindo-se esterilização por filtração em membrana 0,22 µm. Para cada isolado de *P. brasiliensis* e cada linhagem celular (Vero e HeLa) foi feito o mesmo procedimento descrito no item 3.3.2.6.

Foi também realizado o ensaio do tipo competitivo para alguns açúcares, tais como: glicose, manose, galactosamina, galactose e glucosamina. Neste caso, os açúcares e o *P.brasiliensis* foram adicionados concomitantemente ao tapete celular.

3.3.2.12. Tratamento com quitina a 2,5%

A quitina (Sigma C-9752) foi também preparada na concentração de 2,5%, mas antes foi tratada com ácido clorídrico por 2 horas a 0⁰C e por 3 horas a 40⁰C, sendo posteriormente neutralizada com NaOH (RUPLEY, 1964; SEGAL et al., 1982). Seguiu-se esterilização por filtração em membrana filtrante 0,22µm. Após sua esterilização, utilizou-se no ensaio como descrito no ítem 3.3.2.6.

3.3.2.13. Tratamento em diferentes pHs

As alíquotas de *P.brasiliensis* acondicionadas em *eppendorfs*, sofreram a ação de diferentes pHs e após seguiu-se o mesmo procedimento que o ítem 3.3.2.6.

3.3.2.14. Tratamento com soro humano normal

Soros de doadores voluntários, com sorologia negativa para a paracoccidiodomicose foram usados no teste. Estes soros foram diluídos assepticamente na proporção 1:10 em PBS 0,05 M, pH 7,2 e testados.

3.3.2.15. Tratamento com soro humano normal inativado

Os soros obtidos de doadores voluntários, com sorologia negativa para paracoccidiodomicose foram inativados, por 30 minutos em banho-maria a 56⁰C. Depois foram diluídos na proporção de 1:10 e utilizado conforme o descrito no ítem 3.3.2.6.

3.3.2.16. Tratamento com heparina

Foi utilizada heparina na concentração de 0,25 mg/mL, preparada de forma asséptica e diluída em PBS 0,05 M, pH 7,2 e utilizado conforme o descrito no item 3.3.2.6.

3.3.2.17. Tratamento com laminina

A laminina (Sigma L-8263) foi empregada na concentração de 20 µg/mL em PBS 0,05M, pH 7,2 estéril. A suspensão de *P. brasiliensis* após padronização no espectrofotômetro, foi centrifugada a 1.000 x g à 4°C e ressuspensa em um volume de 250 µL junto com a laminina. Em seguida a suspensão foi inoculada no tubo de Leighton com a cultura de células de escolha, sendo mantida por 2 horas a 37°C para a realização do teste de infecção. Após esse período, o tubo foi lavado 5 vezes em PBS 0,05M pH 7,2 e a lamínula fixada com paraformaldeído a 4%, lavada em água destilada e seca para ser posteriormente corada.

3.3.2.18. Tratamento com peptídeos sintéticos

Foram utilizados os seguintes peptídeos: a) Tyr-Ile-Gly-Ser- Arg (YIGSR) Sigma (T-7154), b) Cys-Asp-Pro-Gly-Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg-NH₂ Sigma (C-1668).

Todos foram preparados na concentração de 100 µg/mL em PBS 0,05 M, pH 7,2 estéril, sendo filtrado em membrana de 0,22 µm. O mesmo procedimento foi feito conforme descrito no item 3.3.2.17.

3.4. Coloração das lamínulas

3.4.1. Coloração de May-Grunwald/Giemsa

Após fixadas, as lamínulas foram lavadas 5 vezes com tampão PBS, retiradas do interior dos tubos de Leighton e lavadas em água destilada e secas à temperatura ambiente. A seguir, as lamínulas foram coradas com solução de May-Grunwald (eosina e azul de metilo) a 2%, diluído a 1:2 em tampão Sorensen, permanecendo na mesma por 10 a 20 minutos. Após serem lavadas, as lamínulas foram coradas pelo Giemsa por cerca de 3 minutos. Na sequência, as lamínulas foram lavadas em água destilada, secas, colocadas em lâminas de vidro com o tapete para cima, e fixadas com esmalte incolor. A seguir, as lamínulas foram observadas ao microscópio ótico.

3.4.2. Coloração por ácido periódico de Schiff (PAS)

A coloração pelo método de PAS foi feita após a fixação das células infectadas com solução de paraformaldeído a 4%. O material foi imerso em ácido periódico a 1%, por 5 minutos, à temperatura ambiente e lavado em água destilada. Em seguida, as lamínulas permaneceram no reativo de Schiff por 45 minutos, à temperatura ambiente em câmara escura. A reação foi interrompida com ácido sulfuroso, preparado no momento de uso, colocando-se as lamínulas em três banhos de imersão de 2 minutos cada. Para retirar o excesso de corante, as células foram lavadas em água destilada e coradas no final com verde brilhante por 10 minutos. Após, foram lavadas em água destilada, secas à temperatura ambiente e montadas em lâmina para observação ao microscópio.

3.4.3. Contagem das células e dos fungos aderidos

Todos experimentos foram realizados em triplicatas. As lâminulas, após coloração foram montadas em lâmina e observadas em microscópio ótico em objetiva de imersão.

As lamínulas foram percorridas em toda a sua extensão, procurando-se anotar o número de células associadas com o fungo. Estas foram consideradas como contagem de infecção. A lamínula foi percorrida em “zigue-zague” e observados todos os campos para a avaliação.

3.5. Ensaio de sinalização

Foram realizados ensaios para testar as diferentes vias de sinalização ativada durante a interação de *P. brasiliensis* com células epiteliais. Foram testadas as prováveis vias capazes de ativar sinais citosólicos associados ou não ao citoesqueleto durante o processo de invasão: Ras/Raf e Rho.

Para os ensaios, 1×10^6 células foram cultivadas em garrafas de cultura contendo meio HAM F-12 acrescido de 10% de soro fetal bovino. Após a confluência do tapete celular, o sobrenadante foi removido e as células lavadas com 1ml de PBS 0,05 M pH 7,2 estéril. Em seguida, as garrafas foram inoculadas com suspensão padronizada (3×10^8 cél/mL) de *P. brasiliensis* isolado com o fungo recentemente recuperado de inoculação animal, com propriedades adesivas aumentadas (Pb18a) e o subcultivado (Pb18b), bem como o tratamento com a gp43 purificada do isolado 339, apresentando 6 isotipos, na concentração final de 25µg/mL (concentração escolhida após padronização), diluída em PBS e meio de cultivo da célula (v/v). Foram testados vários

períodos de tempo: 10 min, 30 min, 1h, 5h, 8h, 24h, 48h e 72h. Como controle do experimento foram utilizadas células não infectadas ou não tratadas (células normais).

Para as proteínas Raf e Akt após os períodos de infecção, as células foram lavadas com PBS 0,05 M pH 7,2 gelado para eliminação das células fúngicas não aderentes às culturas celulares ou remoção da proteína gp43. As células foram removidas da garrafa com tampão de lise gelado (100 µg/mL fenilmetilsufonil fluoreto (PMSF) dissolvido em etanol absoluto, NP-40 1%, SDS 0,1 % e aprotinina na concentração final de 1,0 µg/mL dissolvido em PBS) e em seguida foram centrifugadas a 8.000 x g à 4°C. Após, foi estimada a quantidade de proteína da amostra através do método de LOWRY et al., (1951). A detecção da proteína Rho fosforilada foi feita com *Rho Activation Assay kit* (USBiological), de acordo com as instruções do fabricante.

Os sobrenadantes dos lisados celulares (100 µg de proteína) foram submetidos ao SDS-PAGE e transferidos para papel de nitrocelulose (TOWBIN et al., 1979) para a realização da técnica de imunotransferência. Para tanto as membranas foram bloqueadas com 5% de leite de leite mólico em PBS-Tween 20 0,1% por 1 h, lavadas brevemente com PBS-T e incubadas por 18h com os anticorpos primários: anti-Raf (1/1000) e anti-Rho (1/200), procedência USBiological, em 2% de leite em PBS-T e o anticorpo Anti-AKT1/2/3 (1/250), procedência Santa Cruz. Os anticorpos foram diluídos de acordo com as descrições do fabricante. Após 3 lavagens com PBS-T foi adicionado o anticorpo secundário marcado com peroxidase, foi utilizado anti-IgG de coelho (Sigma) à 1/500 para a detecção dos anticorpos anti-Raf e anti-AKT 1/2/3 e para o anticorpo anti-Rho foi utilizado anti-IgG de camundongo (Sigma) à 1/50. A revelação foi feita utilizando o *Kit ECL – Western Blotting Analysis System* (GE Healthcare) ou pelo reagente preparado no laboratório (10% de Tris 1M pH 8,5, 0,22% de ácido p-cumárico (Sigma) a 1,47% e 0,5% de solução de luminol (Sigma) a 4,4%. Ao reagente

de detecção preparado no laboratório foi adicionado 0,03% de H₂O₂ a 30% no momento do uso. As membranas foram colocadas no cassete em contato com o filme, em seguida os filmes foram autorradiografados e fotografados. A participação das proteínas fosforiladas Raf, AKT e Rho durante a interação de *P. brasiliensis*-célula epitelial foi observada através da presença de bandas na membrana correspondente a massa molecular de cada proteína fosforilada investigada.

3.6. Análise estatística

Em cada experimento foram considerados 2 fatores: fator A-fungo e fator B-tratamento, variável de acordo com o experimento. Foram utilizadas triplicatas para cada variável analisada.

Foi utilizada a análise de variância para fatorial, inteiramente aleatorizado com os testes das hipóteses: interação entre os 2 fatores, efeito do fator A e efeito do fator B. Em cada hipótese testada foi calculada a estatística F que foi considerada significativa quando $p < 0,05$ (probabilidade de erroneamente admitir a significância). Os contrastes entre pares de médias foram verificados pelo método de Tukey considerando $\alpha = 0,05$ (ZAR, 1984).

4- RESULTADOS

4.1. Análise protéica por eletroforese bidimensional.

Os filtrados de cultura dos isolados 18a e 339 de *P. brasiliensis* foram submetidos à eletroforese bidimensional para verificar a diferença de expressão da gp 43 e seus respectivos pontos isoelétricos (pIs). Os resultados demonstraram que a gp 43 do filtrado de cultura do isolado 18 apresentava três pontos isoelétricos (8,0, 7,73, 7,45) enquanto que a gp 43 do filtrado do isolado 339 apresentava seis pontos isoelétricos (7,90, 7,59, 7,30, 7,07, 6,85, 6,63).

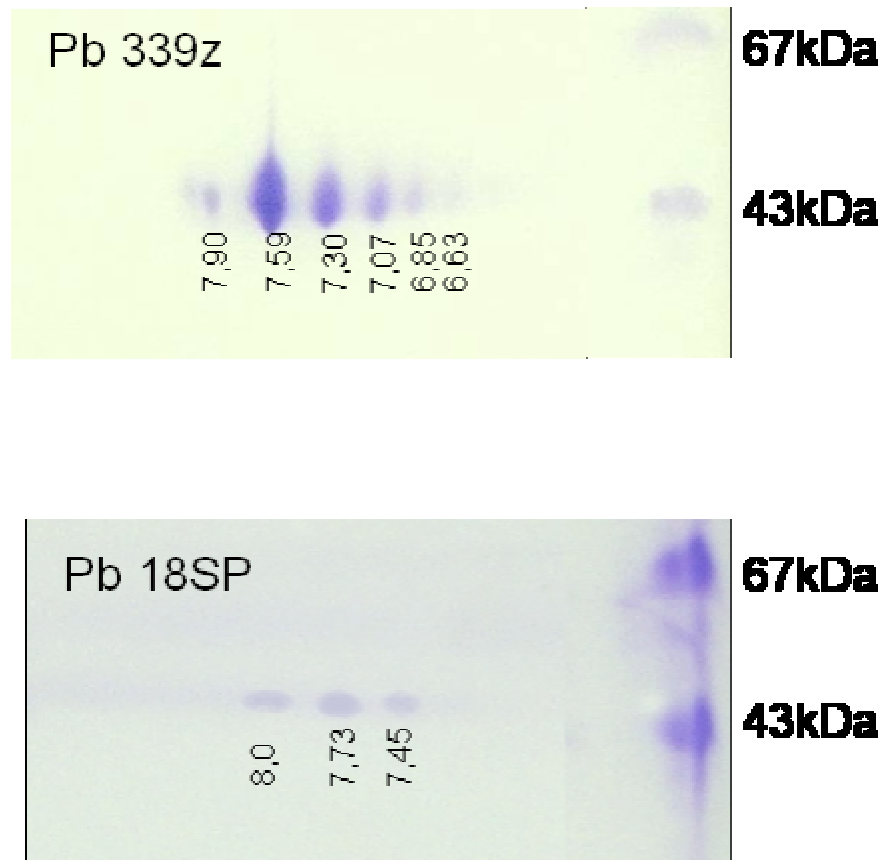


Figura 1: Eletroforese bidimensional de antígenos filtrado de culturas dos isolados 339 e 18de *P. brasiliensis*. Géis corados pelo Coomassie Brilliant Blue. À direita está indicado a massa molecular correspondente à gp 43 (MM).

4.2. Resultados da adesão dos isolados de Pb18 e Pb265 às células Vero e HeLa

O processo de adesão dos isolados de *P. brasiliensis* Pb18 e Pb265 às linhagens celulares Vero e HeLa foi avaliado inicialmente corando-se as lâminulas pelo método de May-Grunwald-Giemsa e posteriormente substituído pela coloração de PAS modificada, pois esta última se mostrou muito mais eficiente na identificação do fungo aderido às células tanto de linhagem Vero como HeLa .

Os resultados dos testes de aderência dos isolados de *P. brasiliensis* Pb18 e Pb265 às células Vero e HeLa estão representados na tabela 1. O isolado de Pb18 é significativamente ($p < 0,05$) mais adesiva que o isolado de Pb265, independente da linhagem celular empregada. Por outro lado, quando as duas linhagens celulares, foram comparadas não há diferença estatisticamente significativa na aderência.

Tabela 1: Resultados dos testes de aderência dos isolados de *P. brasiliensis* Pb18 e Pb265 às células Vero e HeLa.

Isolados	n ^o médio ± DP de <i>P. brasiliensis</i> aderidos por células	
	Vero ^a	HeLa ^b
Pb18	33,2±2,7	34, 9±3,0
Pb265	25,2±2,4	25,7±2,6

Dados apresentam as médias mais desvio padrão de 3 experimentos.

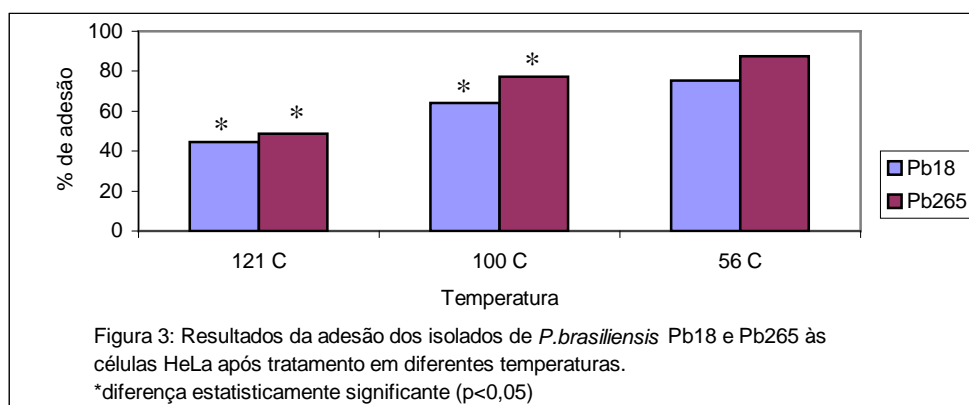
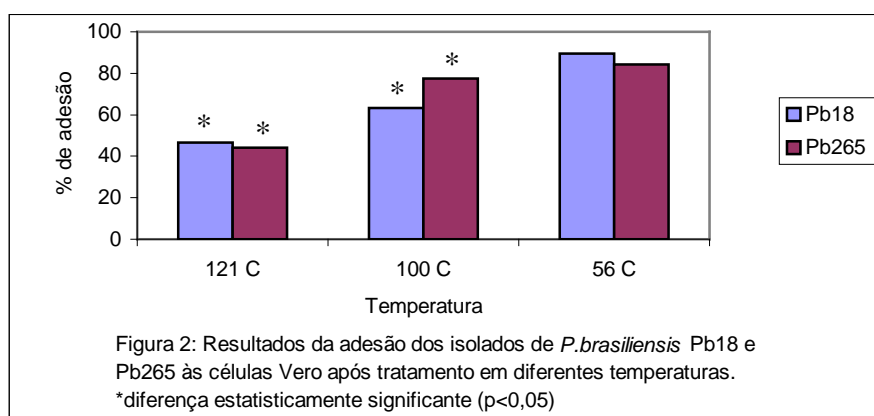
a: diferença estatisticamente significante ($p < 0,05$) pela análise de variância da adesão dos isolados Pb18 e Pb265, em culturas de células Vero.

b: diferença estatisticamente significante ($p < 0,05$) pela análise de variância da adesão dos isolados de Pb18 e Pb265 em culturas de células HeLa.

4.3. Influência de tratamentos térmicos, químicos e de algumas substâncias na adesão de *P. brasiliensis*

a) Tratamento térmico

O tratamento das células leveduriformes de *P. brasiliensis* de Pb18 e Pb265 frente a diferentes temperaturas, principalmente as mais drásticas, reduziu a aderência às células Vero e HeLa (Figuras 2 e 3). O efeito mais pronunciado ocorreu com as temperaturas de 121°C e 100°C e em menor extensão e sem significado estatístico a de 56°C (Tabelas 2 e 3 - em anexo).



Os isolados de Pb18 e Pb265 sofreram redução na aderência de aproximadamente 50% quando tratadas a 121°C, mostrando que este fungo tem estruturas da parede sensíveis a esse tratamento envolvidas no processo de adesão.

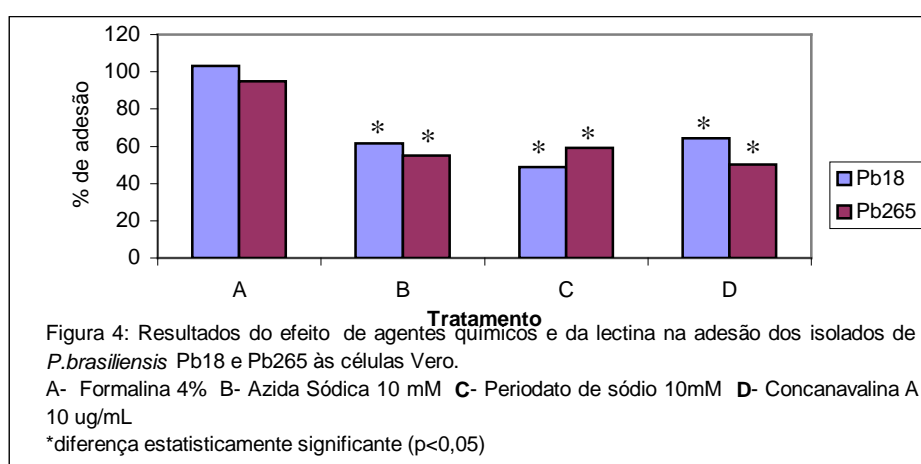
O tratamento dos isolados Pb18 e Pb265 a temperatura de 100°C alterou também adesão em 36,6% e em 22,5%, respectivamente.

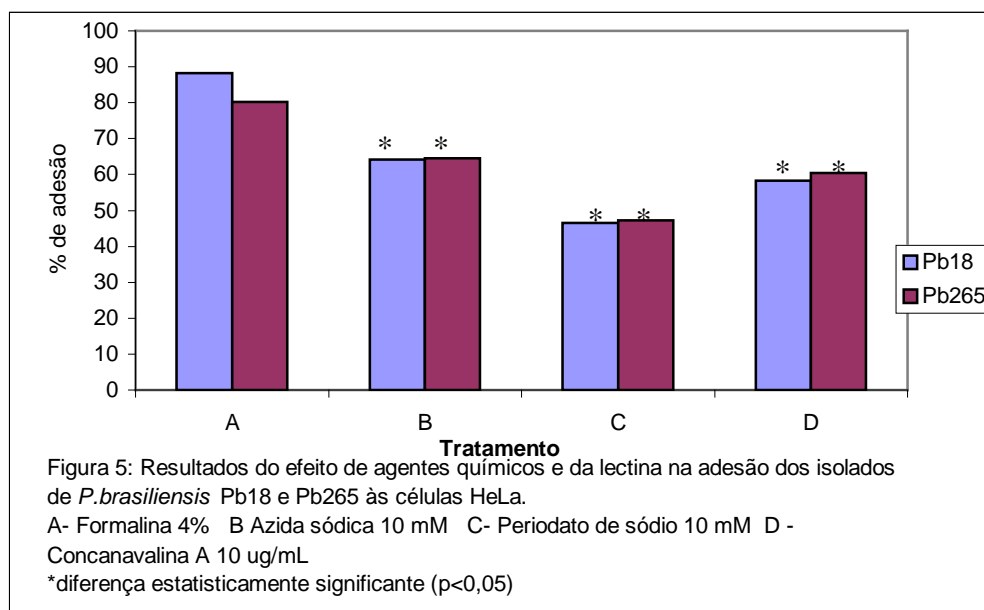
O tratamento a 56°C não alterou os resultados da adesão significativamente ($p < 0,05$); discreta redução na adesão foi observada em torno de 10% e 16% das amostras Pb18 e Pb265 as células Vero e 24% e 13% às células HeLa, respectivamente.

b) Tratamento com agentes químicos e lectinas

A ação de várias substâncias foi estudada no processo de adesão: formalina, azida sódica, periodato de sódio e concanavalina A (Figuras 4 e 5).

Os tratamentos com azida sódica, periodato de sódio e concanavalina A alteraram significativamente a adesão dos isolados de *P.brasiliensis* às células Vero e HeLa (Tabelas 4 e 5- em anexo).





O tratamento com formalina por uma hora não alterou significativamente a adesão dos isolados de *P. brasiliensis* às linhagens Vero e HeLa.

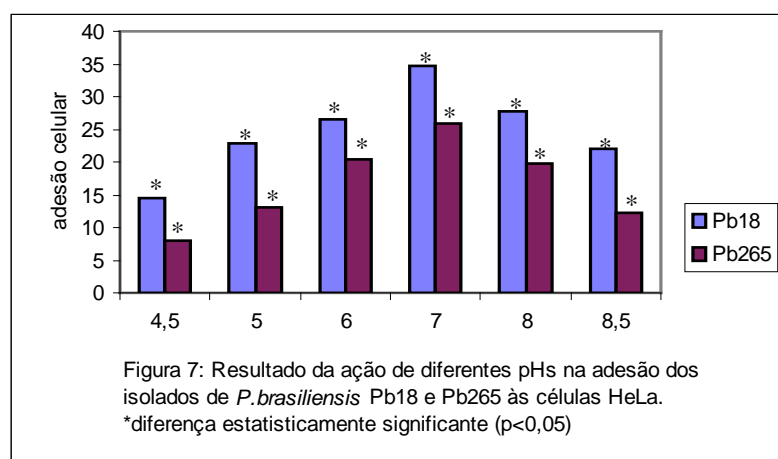
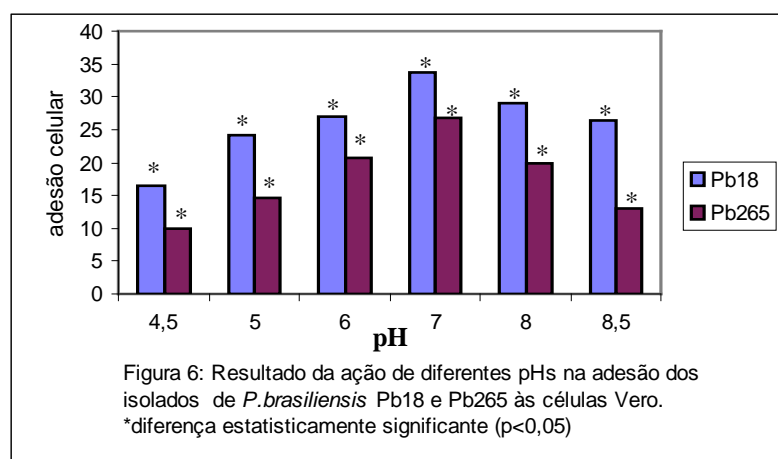
A oxidação dos carboidratos por periodato de sódio reduziu a aderência dos isolados Pb18 e Pb265 às células Vero em 51,1% e 41,1%, respectivamente. Em relação a linhagem HeLa a redução foi de 53,5% para o isolado Pb18 e 52,8% para Pb265. O tratamento com periodato de sódio reduziu em aproximadamente 50% a adesão deste fungo às linhagens celulares.

A azida sódica que é inibidor metabólico, reduziu a adesão dos isolados Pb18 e Pb265 às células Vero em 38,6 e 44,5%, respectivamente e às células HeLa em 35,8% e 35,5%.

Concanavalina A inibiu significativamente a aderência dos isolados Pb18 e Pb265 às células Vero e HeLa. A maior inibição ocorreu com o isolado Pb265 em relação às células Vero (50%).

c) Ação do pH

A variação do pH do meio interfere no padrão de aderência. A maior adesão foi observada em pH próximo de 7,3, enquanto que em pHs ácidos ou alcalinos ocorreu diminuição da adesão independente da linhagem celular e do isolado (Figuras 6 e 7).

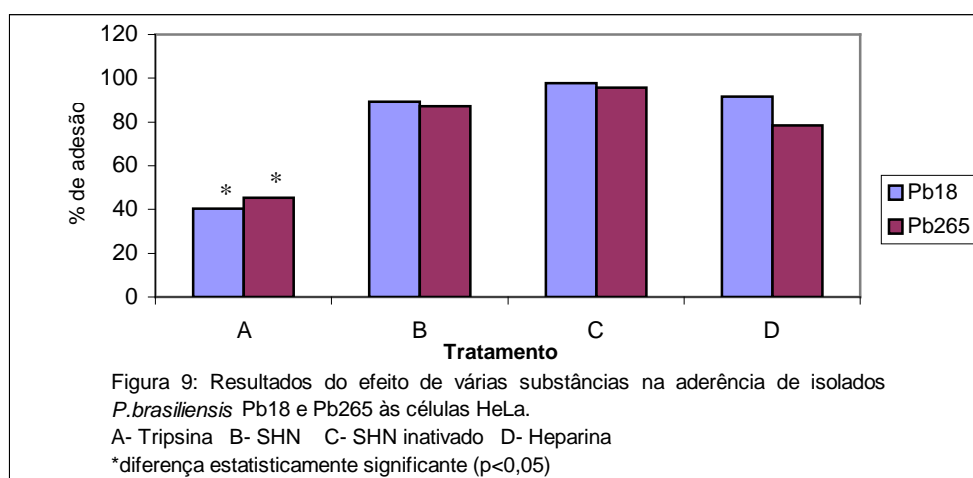
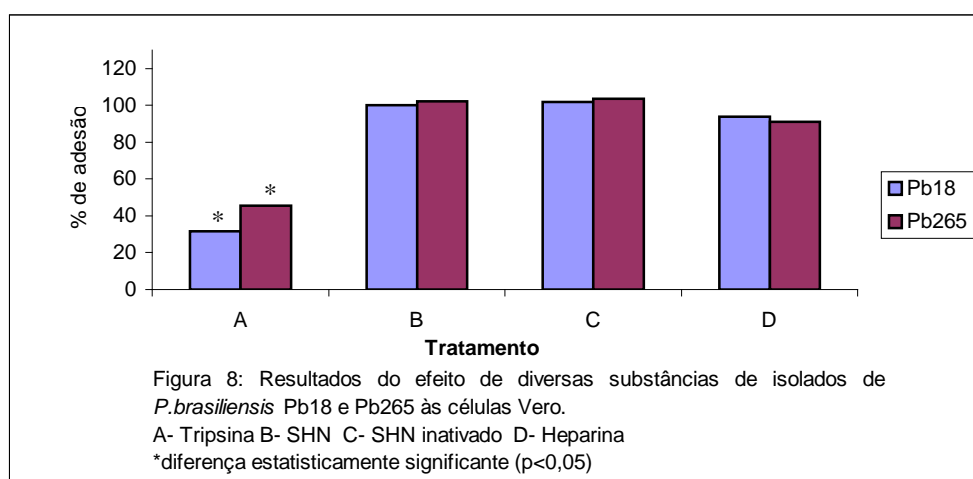


d) Ação dos tratamentos com soro, tripsina e heparina

As figuras 8 e 9 e as tabelas 6 e 7 (em anexo) representam os resultados de adesão às células Vero e HeLa, respectivamente, quando os isolados de *P. brasiliensis* foram tratados com tripsina, com soro humano normal e inativado e com heparina.

O tratamento de *P. brasiliensis* com tripsina reduziu significativamente a adesão às células Vero e HeLa. Os isolados Pb18 e Pb265 apresentaram redução em relação às células HeLa de 59,0% e 54,5%, respectivamente.

Com relação aos outros tratamentos, como soro humano normal e inativado e o uso da heparina, as diferenças encontradas não foram estatisticamente significantes.



4.4. Papel dos açúcares na aderência de *P.brasiliensis* às células epiteliais

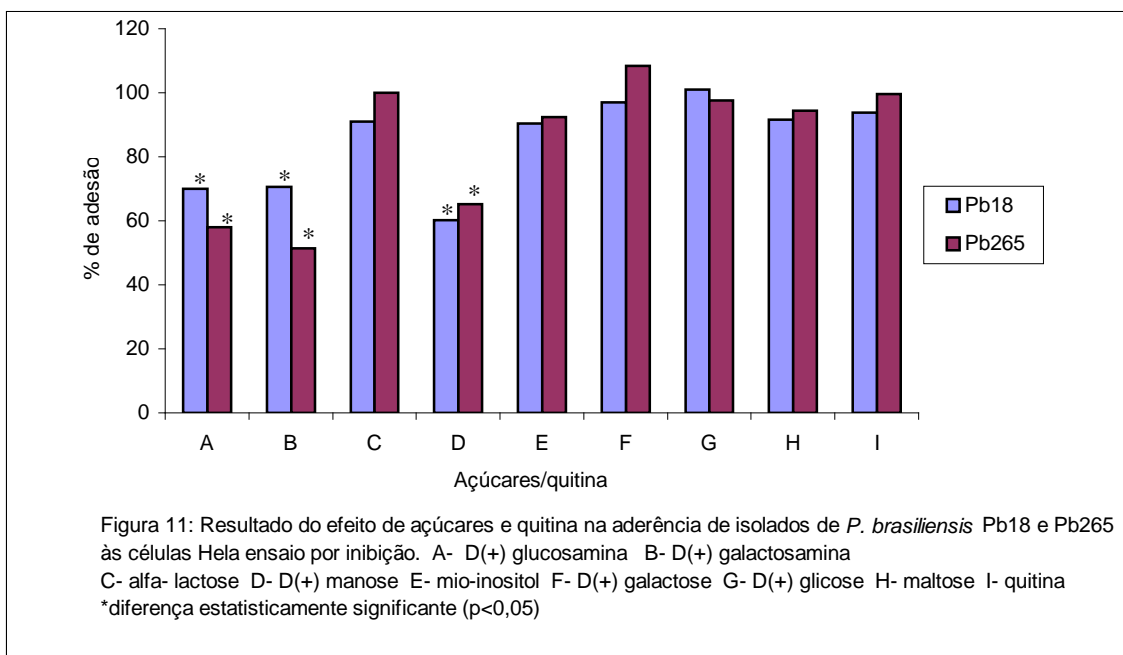
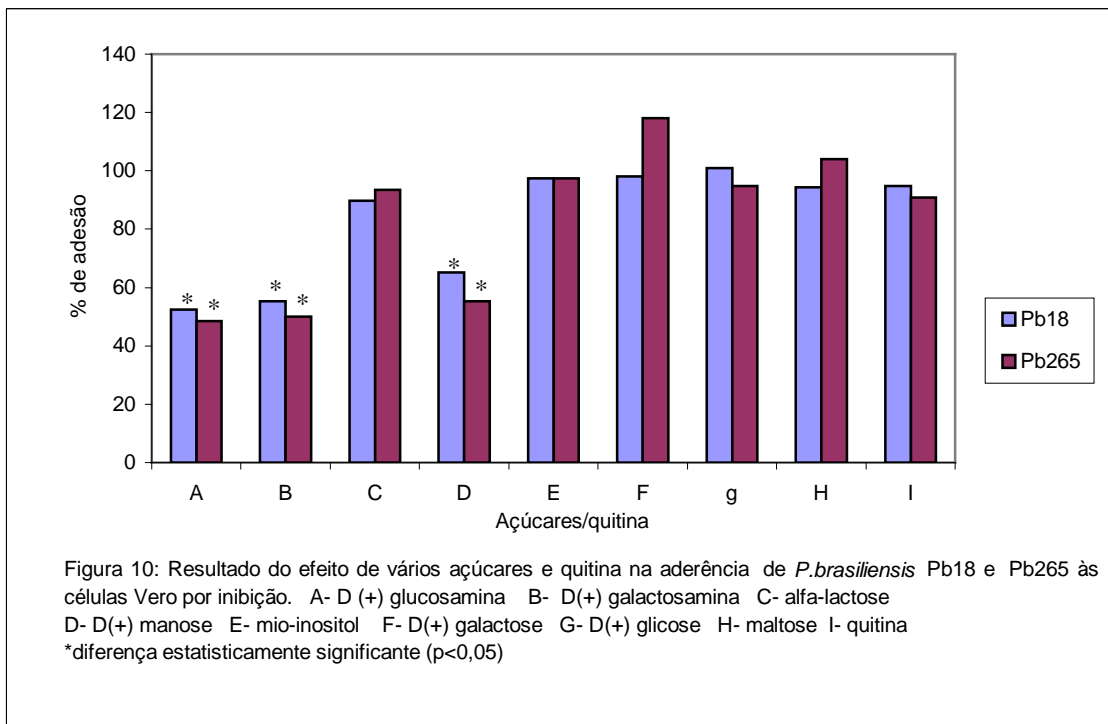
a) Teste por inibição

Nas figuras 10 e 11 estão representados os resultados de adesão dos isolados Pb18 e Pb265 às células Vero e HeLa, quando tratados por diferentes açúcares.

Os açúcares aminados glucosamina e galactosamina, seguido de manose inibiram significativamente a adesão às células Vero (Tabela 8- em anexo). O grau de inibição com os dois primeiros açúcares foi semelhante, oscilando em torno de 50%. A glucosamina inibiu em 47,6% e 51,5%; a galactosamina inibiu em 44,7% e 49,9% e a manose em 34,9% e 44,6%, respectivamente para os isolados Pb18 e Pb265.

Em relação às células HeLa o padrão de inibição foi semelhante (Tabela 9-em anexo). Assim, foi observado que glucosamina reduziu a aderência dos isolados Pb18 e Pb265 em 29,9 e 41,9%; respectivamente; enquanto que galactosamina reduziu em 29,3% e 48,6% e manose em 39,7% e 34,8%.

Os outros açúcares não alteraram significativamente o padrão de adesão de *P.brasiliensis* às linhagens celulares e a quitina comercial não diminuiu significativamente a aderência dos isolados às células epiteliais.



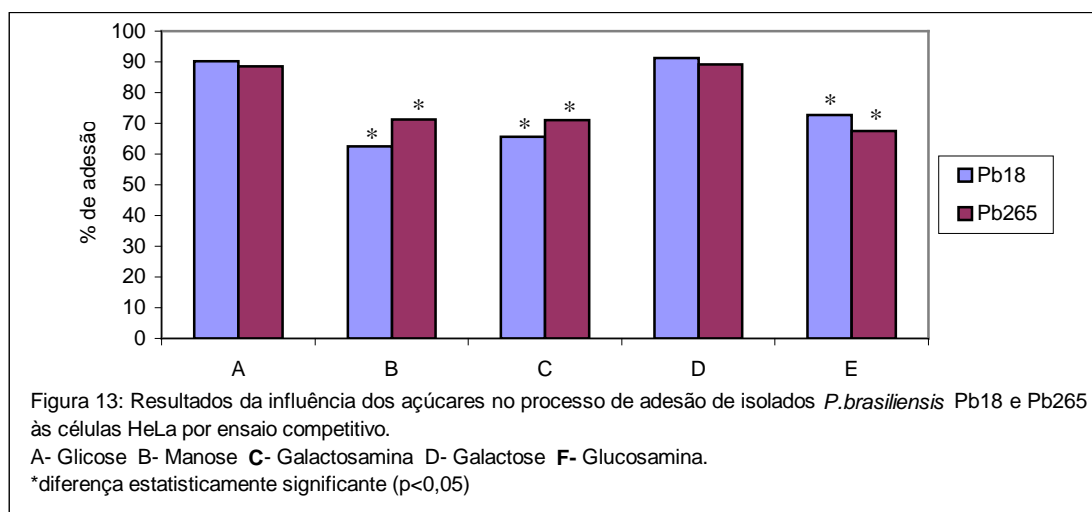
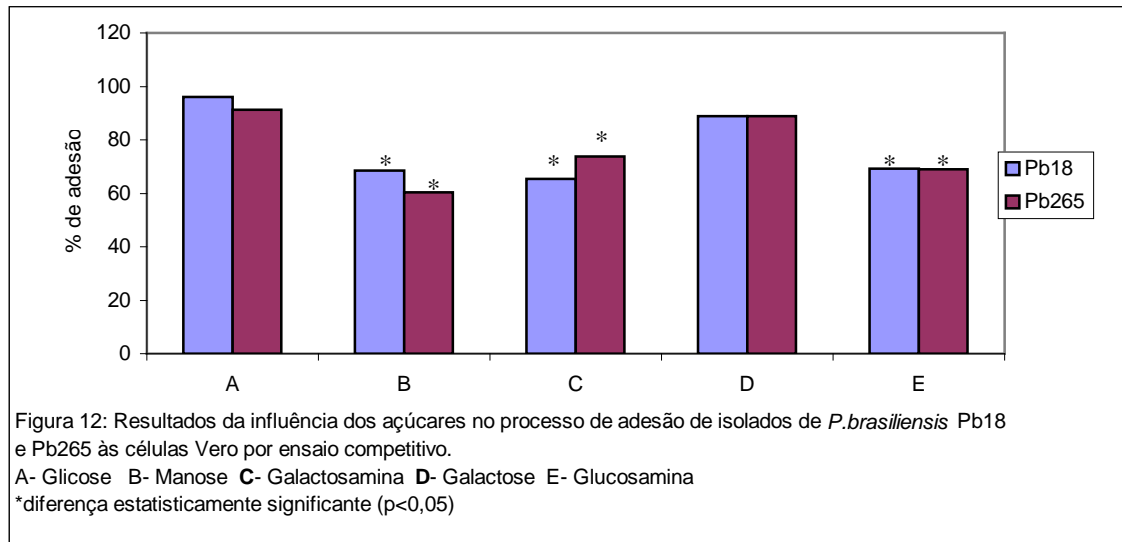
b) Teste competitivo

O emprego dos açúcares glicose, manose, galactosamina, galactose e glucosamina em ensaio competitivo apresentou resultados similares ao teste por inibição: apenas a glucosamina, a galactosamina e manose interferiram no processo de adesão de forma significativa, provocando uma inibição em torno de 30% para os isolados fúngicos, independente da linhagem celular (Figuras 12 e 13).

A manose inibiu a adesão de Pb18 e Pb265 às células Vero em 31,5% e 29,7% respectivamente, e em relação às células HeLa 37,4% e 28,8% (Tabelas 10 e 11 – em anexo).

A inibição pela galactosamina foi de 34,5% e 26,3%, respectivamente para os isolados Pb18 e Pb265 em relação às células Vero, e de 34,4,5% e 29,0% com as células HeLa.

A glucosamina inibiu a adesão de Pb18 e Pb265 as células Vero em 30,7% e em 30,9%, respectivamente. Em células HeLa a inibição foi de 27,3% para Pb18 e 32,4% para Pb265.



4.5. Interações proteína-proteína na adesão de *P.brasiliensis*

Na tentativa de se conhecer o mecanismo molecular envolvido na adesão de *P.brasiliensis* às células, foram feitos ensaios com proteínas da matriz extracelular e peptídeos sintéticos. O potencial de certo peptídeo de agir como antagonista na adesão do fungo às células foi diretamente avaliado como grau de adesão, tentando assim estabelecer os tipos de interação deste fungo.

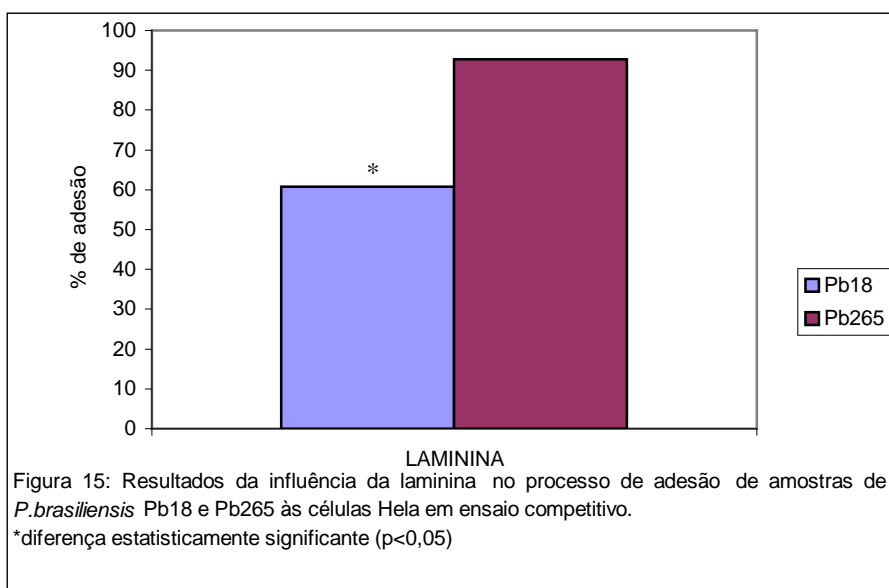
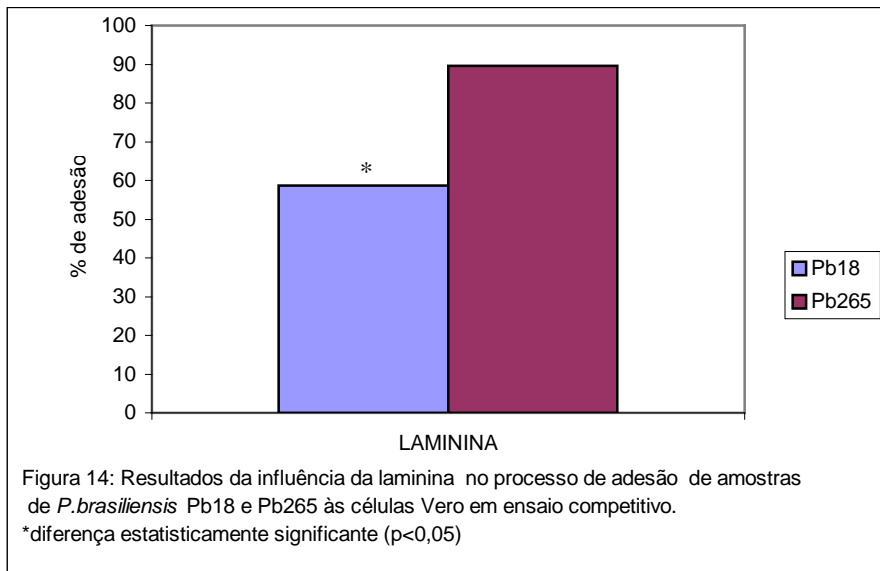
O uso da laminina em ensaio competitivo entre as células e elementos fúngicos possibilitou melhor avaliação da adesão dos isolados às culturas celulares (Figuras 14 e 15).

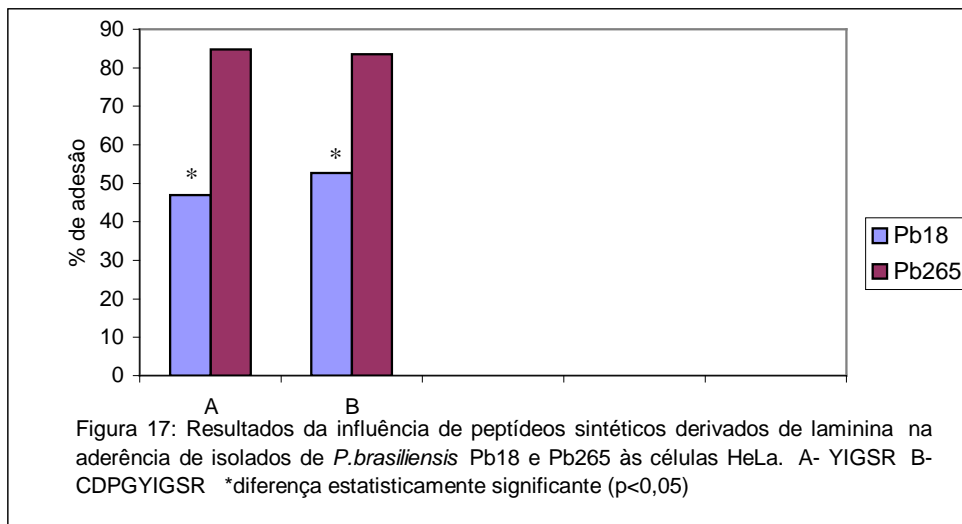
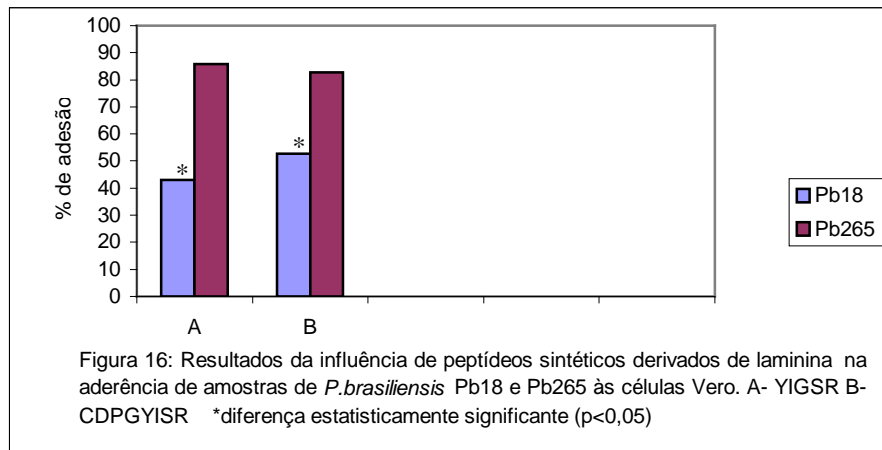
A laminina promoveu maior inibição da adesão do isolado Pb18 às células Vero (41,3%) e HeLa (39,2%), quando comparado com a adesão do isolado Pb265 as mesmas células.(Tabelas 12 e 13 – em anexo).

Os resultados da adesão dos isolados fúngicos pré-tratadas com peptídeos sintéticos derivados da laminina nas tabelas 14 e 15 (em anexo) e dependendo do peptídeo utilizado, foi observada inibição no processo de adesão (Figuras 16 e 17).

O peptídeo sintético CDPGYIGSR-NH₂ derivado da cadeia B da laminina inibiu a aderência em 47,2% do isolado Pb18 às células Vero, enquanto que houve redução de 17,2% com o isolado Pb265. Com a linhagem HeLa, este peptídeo inibiu a aderência em 47,4% e 16,5%, respectivamente os isolados Pb18 e Pb265. O peptídeo YIGSR inibiu a adesão em 57,0% e 14,2%, respectivamente os isolados Pb18 e Pb265 em relação as células Vero, e 53,1% e 15,2% para as células HeLa. Assim, os dois fragmentos inibiram significativamente a aderência do isolado Pb 18 às células Vero e HeLa (Tabelas 14 e 15). Comparando-se o comportamento dos isolados frente aos

peptídeos sintéticos verificou-se que houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre estas em relação aos peptídeos derivados da laminina.





4.6. Imunotransferência – Evento de sinalização celular

O anticorpo anti-Raf fosforilado foi testado através de imunotransferência com os sobrenadantes obtidos das culturas de células A549 não infectadas e também de células infectadas com *P.brasiliensis* isolado Pb18a e pb18b, bem como células tratadas com a proteína gp 43 na concentração de 25 ug/mL, por diferentes períodos (10 min, 30 min, 1h, 5h, 8h, 24h, 48h e 72 h).

Foi detectada uma proteína de 65 kDa correspondente à proteína Raf (Figura 18). No período de 10 min a 8 h foi observado aumento na expressão da proteína Raf fosforilada tanto em células controle como nas infectadas com *P. brasiliensis* avirulento e virulento e nas tratadas com gp43, com exceção de menor ativação com o fungo avirulento e com a gp43 em 30 minutos. No período de uma hora há nítido aumento da expressão de Raf com o fungo virulento e a gp43. Até 24 horas foi observada expressão semelhante da proteína Raf fosforilada nas células controles e nas células infectadas com o fungo e tratadas com a gp 43. A partir de 24 horas, diminuição na expressão de Raf foi observada tanto nas células controle como nas infectadas e tratadas, sendo mais acentuada com o fungo virulento.

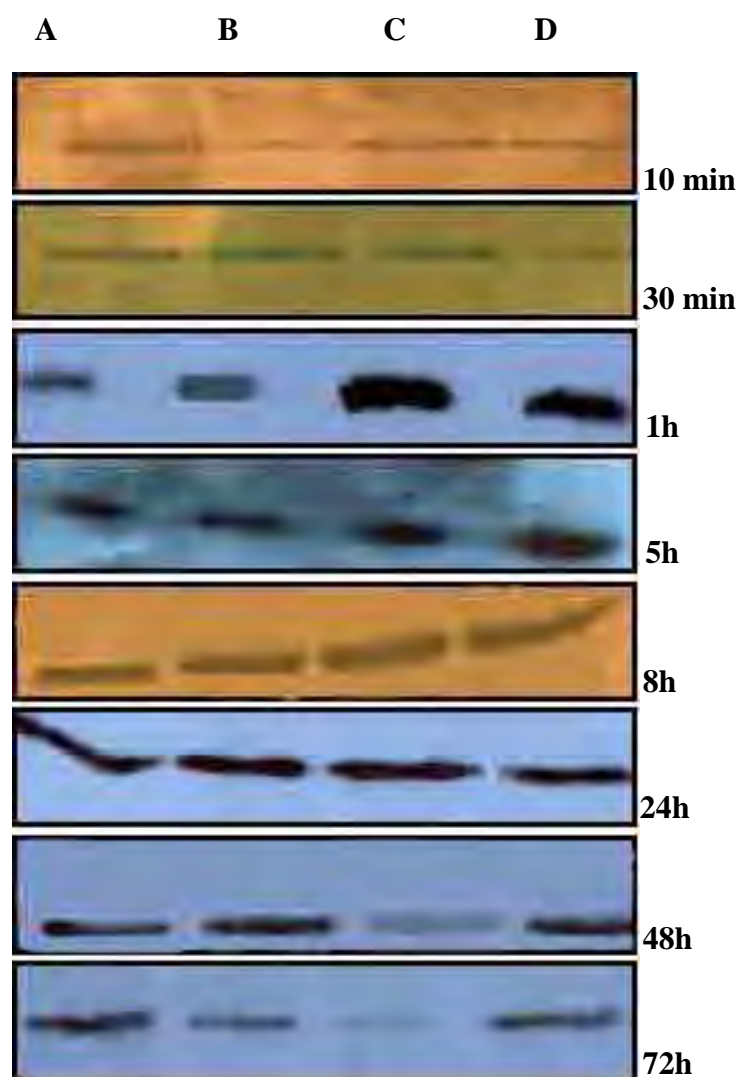


Figura 18: Imunotransferência dos sobrenadantes de células A549 lisadas nos diferentes períodos de tempo. Revelação com o anticorpo anti-Raf fosforilado. **A:** células controle; **B:** células infectadas com *P. brasiliensis* isolado Pb18b; **C:** células infectadas com *P. brasiliensis* isolado Pb18a ; **D:** células tratadas com gp43 (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

A figura 19 mostra o perfil de expressão da proteína AKT, de 56 kDa, em diferentes períodos de tempo por imunotransferência, utilizando o anticorpo anti- AKT 1/2/3. No período de 10 min a 5 h foi observado aumento de expressão da proteína AKT fosforilada nas células infectadas com o fungo Pb18a e Pb18b e nas tratadas com gp 43 em relação às células controles. Diminuição na expressão desta proteína foi observada a partir de 8 horas, chegando a pouca expressão em 48 horas, principalmente nas células tratadas com o fungo virulento.

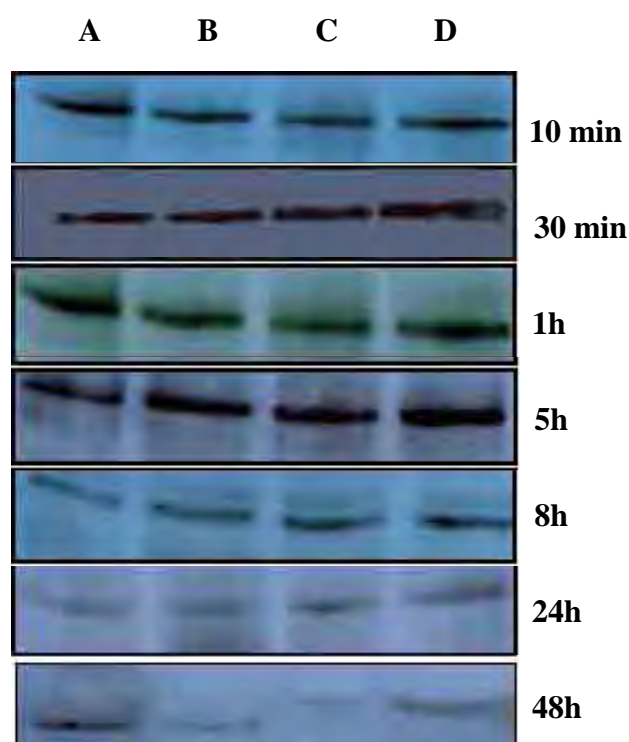


Figura 19 : Imunotransferência dos sobrenadantes de células A549 lisadas nos diferentes períodos de tempo. Revelação com o anticorpo anti-AKT 1/2/3 fosforilado. **A:** células controle; **B:** células infectadas com *P. brasiliensis* isolado (Pb18b); **C:** células infectadas com *P. brasiliensis* isolado (Pb18a); **D:** células tratadas com gp43 (25 $\mu\text{g/mL}$).

O perfil de expressão da proteína Rho fosforilada foi avaliado nos sobrenadantes dos lisados de culturas de células A549 não infectadas e infectadas com *P. brasiliensis* isolado 18 (Pb18b e Pb18a) , bem como células tratadas com gp43 (25 ug/mL) nos seguintes tempos: 30 min, 8h , 24h, 48h e 72h. Foi revelada uma proteína de 29 kDa correspondente à proteína Rho. No período de 8 h foi observado aumento na expressão de Rho nas células infectadas com o fungo e nas células tratadas com gp43. Nas células infectadas com o fungo Pb18a e tratadas com a gp 43 foi observada diminuição na expressão desta proteína nos períodos de 24 e 48 h; a expressão foi semelhante a do período anterior nas células tratadas com o fungo Pb18b. No período de 72 horas, uma diminuição significativa na expressão de Rho foi observada em todos os tratamentos em relação às células não tratadas (figura 20).

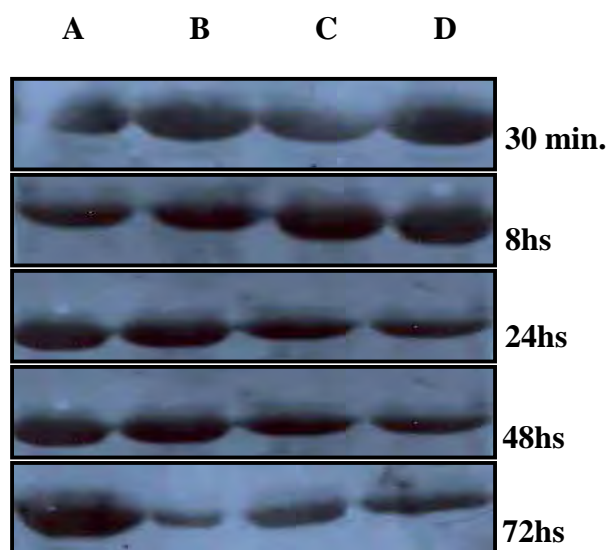


Figura 20: Imunotransferência dos sobrenadantes de células A549 lisadas nos diferentes períodos de tempo. Revelação com o *Rho Activation Kit* (USBiological) **A:** células controle; **B:** células infectadas com *P. brasiliensis* isolado Pb18b; **C:** células infectadas com *P. brasiliensis* isolado Pb18a; **D:** células tratadas com gp43 (25 µg/mL).

5. DISCUSSÃO

5.1. Bases moleculares no processo de adesão

O processo de infecção envolve duas etapas principais: a entrada do fungo e o seu estabelecimento com conseqüente colonização do tecido, culminando na produção de lesões progressivas. A aderência dos microrganismos patogênicos aos tecidos tem sido apontada como primeiro passo na colonização e disseminação do parasito sendo até, considerada como pré-requisito para a infecção (LENZI et al., 2000). As bases moleculares do processo de adesão, aparentemente variam de acordo com a natureza do patógeno. Essa interação específica é mediada por moléculas referidas como adesinas, que se combinam com estruturas complementares das células hospedeiras referidas como receptores. Vários trabalhos têm procurado elucidar os mecanismos e as prováveis adesinas de fungos como em *C. albicans* (HOSTETTER, 1994), *A. fumigatus* (TRONCHIN et al., 1993), *H. capsulatum* (McMAHON et al., 1995; GIL et al., 1996; PEÑALVER et al., 1996) e *P. brasiliensis* (VICENTINI, et al. 1994; MENDES-GIANNINI, et al., 1994; HANNA, et al., 2000; MENDES-GIANNINI et al., 2000; ANDREOTTI et al., 2005; GONZALEZ et al., 2005; BARBOSA et al., 2006).

Em trabalhos anteriores, *P. brasiliensis* sem qualquer tratamento prévio, foi capaz de aderir, seguido aparentemente de invasão de células epiteliais de linhagem contínua (MENDES-GIANNINI, 1994B; HANNA, 1995; UEMURA, 1996). Foi também observado que isolados de *P. brasiliensis* são capazes de aderir às células epiteliais após 30 minutos e que os mais virulentos para animais (SINGER-VERMES et al., 1989) têm também maior capacidade de adesão (HANNA et al., 2000). Os isolados com comportamento polar são Pb18, mais virulenta e Pb 265 menos virulenta.

Na continuação desta linha de trabalho, pretendeu-se estudar os fatores envolvidos na aderência, comparando as duas linhagens celulares Vero e HeLa utilizando dois isolados de *P. brasiliensis* Pb18 e Pb265, respectivamente, mais ou menos virulento, de acordo com estudos em animais e mais e menos aderentes, em estudos de ligação à células Vero (SINGER-VERMES et al., 1989; HANNA, 1995; UEMURA, 1996; HANNA et al., 2000).

A adesão de células de *P. brasiliensis* aos tecidos do hospedeiro deve ser um dos passos cruciais no estabelecimento da paracoccidioidomicose. A habilidade do fungo em aderir às células epiteliais pode representar um mecanismo no qual o fungo evitaria o muco que recobre os ductos respiratórios e o movimento das células ciliares, tendo então papel na patogenese. Entretanto, pouco é conhecido como este mecanismo ocorre.

Assim, o desenvolvimento de *P. brasiliensis* requer inicialmente a adesão dos conídios (formas infectantes) ao epitélio bronco-pulmonar, ou à membrana basal subepitelial bem como a produção de várias enzimas incluindo proteases que mediarão a subsequente invasão (GONZALEZ et al., 2005).

Embora nessa parte do estudo as linhagens celulares epiteliais não seja derivadas de células pulmonares, elas possuem proteínas da matriz extracelular e em consequência receptores que são comuns ao de outras linhagens. Nossos experimentos com células HeLa e Vero revelaram que a amostra Pb18 aderiu fortemente quando comparada com Pb265. Estes dados confirmam os achados de Hanna, (1995), Uemura (1996) e Hanna et al., (2000).

Os tratamentos químicos e físicos das células leveduriformes de *P. brasiliensis* influenciaram no processo de adesão. O tratamento prévio das células em diferentes temperaturas influenciou na aderência, sendo esta redução mais acentuada nas células tratadas a 121°C seguido de 100°C, quando comparadas com células não tratadas de *P.*

brasiliensis ou tratadas a 56°C. O tratamento térmico deve alterar estruturas da parede celular de *P. brasiliensis* que sofrem alterações em altas temperaturas, provavelmente componentes protéicos. Recentemente, foi verificado que a inativação do soro pelo calor usado para opsonização e o tratamento com EDTA de duas linhagens de macrófagos diminuiu a fagocitose (JIMENEZ et al., 2006).

A formalina, aparentemente, no presente estudo não interferiu no processo de adesão, deve-se ressaltar, no entanto, que o tratamento de uma hora com formalina não inviabiliza as células de *P. brasiliensis* conforme verificado por Shikanai-Yasuda et al, (1991); e neste caso as estruturas moleculares podem não ter sofrido alterações que interferissem com a adesão.

A ação inibitória da azida sódica sugeriu que a adesão de *P. brasiliensis* pode ser regulada por processo energia-dependente. Neste trabalho, não foi verificado se este componente interferiu mais na expressão de prováveis receptores de adesão na superfície da célula epitelial, do que propriamente na célula fúngica. No entanto, nosso resultado vem de encontro a outros trabalhos como em *C. albicans* onde parte do processo de adesão depende da expressão de moléculas de superfície do fungo, sendo, portanto parcialmente dependente de energia (OLLERT et al., 1993).

Os polissacarídeos da parede celular em *P. brasiliensis* têm importante papel nas relações parasita-hospedeiro. A parede celular deste fungo é composta de polissacarídeos como a quitina e α e β -D-glucana e galactomanana (SAN BLAS & SAN BLAS, 1994).

O tratamento com concanavalina A mostrou ser esta capaz de inibir parcialmente a adesão de *P. brasiliensis* às linhagens celulares Vero e HeLa. Esta lectina tem afinidade especial com resíduos de manana, portanto, estas moléculas de superfície devem participar como adesina neste modelo. Em *C. albicans* tem sido demonstrado

que uma das adesinas é uma manoproteína e, portanto inibida por concanavalina A. Este sistema tem atividade semelhante à lectina e reconhece os resíduos de fucose ou de n-acetilglucosamina em células epiteliais (CALDERONE, 1993). Gp 43 é um antígeno de massa molecular alta e pesadamente glicosilado, sendo estes componentes glicosilados reconhecidos por soros de pacientes com a doença. Este último foi isolado recentemente e verificou-se que se liga a n-acetilglucosamina (GlcNAc) e pode ser inibido por GlcNAc, seguido de D-glicose and D-manana e não por D-galactose, N-acetyl-galactosamina or L-fucose. Esta fração também se liga a laminina, portanto tem propriedades adesivas (COLTRI et al., 2006).

Periodato de sódio influenciou no processo, causando redução na aderência. A oxidação dos resíduos de açúcar alterou a adesão, mostrando que a porção carboidrato da parede celular deste fungo está envolvida neste processo.

É bem documentado que animais e homens infectados com *P. brasiliensis* produzem anticorpos que reagem com vários tipos de antígenos. Em trabalho anterior foi verificado que soro de paciente com PCM inibia a aderência de *P. brasiliensis* às células epiteliais, o mesmo não ocorrendo com soro de indivíduo normal. Confirmando este achado, neste trabalho foi verificado que soro de indivíduo normal e soro inativado, sem complemento, não inibiram a aderência deste fungo às células.

Heparina, que é encontrada em grânulos intracelulares de mastócitos, é uma glicosamina com grande quantidade de resíduos de sulfato. A inibição da aderência pela adição de glicosaminoglicanos é geralmente a primeira indicação que receptores das células epiteliais podem ser proteoglicanas. Se heparina inibe adesão e outras glicosaminoglicanas (ex.: sulfato de condroitina e sulfato de dermatano), não o fazem, então a adesão é considerada específica para proteoglicanas do tipo sulfato de heparano. Muitas bactérias, parasitas e vírus utilizam proteoglicanas como receptores de adesão.

Estes aparentemente ligam-se ao sulfato de heparano (ROSTAND & ESKO, 1997). Em nosso caso, no entanto, heparina não alterou o processo de adesão, indicando que a interação tipo mucopolissacarídeo (heparina) não ocorreu.

O tratamento das células leveduriformes de *P. brasiliensis* com tripsina influenciou significativamente ($p < 0,01$) no processo de adesão às células Vero e HeLa, mostrando que a porção protéica é um componente ativo das adesinas deste fungo. Aparentemente, a cepa Pb18 sofreu mais drasticamente os efeitos deste tratamento do que a cepa Pb 265.

O uso de mono ou dissacarídeos como inibidores da aderência de *P. brasiliensis* às células epiteliais Vero e HeLa sugerem que mecanismos de adesão tipo lectina podem ocorrer e são de importância nesta interação. Os açúcares aminados glucosamina e galactosamina seguido de manose foram os que mais eficientemente inibiram a adesão de *P. brasiliensis* às células epiteliais. Não foi observada diferença significativa entre as duas linhagens celulares.

Os padrões de inibição observados com as duas amostras sugerem mecanismos específicos tipo lectina. O padrão foi semelhante ao observado para *C. albicans* e células epiteliais vaginais (SEGAL et al., 1982), em relação aos açúcares aminados. Enquanto que a inibição com manose foi semelhante aos de *Candida* no processo de adesão às células epiteliais bucais. Recentemente, foi verificado que a inativação do soro pelo calor usado para opsonização e o tratamento com EDTA de macrófagos diminuiu a fagocitose em duas linhagens avaliadas. O tratamento com Alfa-metil-d-manosídeo reduziu a fagocitose de macrófagos B10R, sugerindo que o receptor de manose participa na fagocitose destas células (JIMENEZ et al., 2006). Por outro lado, o principal antígeno deste fungo, a GP 43, contém em sua cadeia de carboidratos uma parte constituída de alto conteúdo em manose (ALMEIDA et al., 1996), e como esta

molécula já foi descrita como adesina, não se exclui que a inibição encontrada com manose em nosso estudo, possa envolver esta glicoproteína. Aparentemente, à semelhança do trabalho com macrófagos, o receptor de manose participa da interação *P. brasiliensis* - células epiteliais. No entanto, para se obter dados mais específicos do papel das interações tipo lectina no processo de adesão de *P. brasiliensis* às células epiteliais, oligossacarídeos mais complexos deverão ser ensaiados.

Adesão de microrganismos à tecidos do hospedeiro é considerado como um evento essencial no desenvolvimento de infecções. O reconhecimento de células hospedeiras pelo patógeno requer a presença em sua superfície de moléculas complementares. Várias proteínas do hospedeiro como laminina, colágeno, fibronectina, fibrinogênio e o componente C₃ do complemento são potenciais ligantes celulares de microrganismos. Estas glicoproteínas normalmente não são expostas na superfície do epitélio e endotélio. Entretanto, qualquer tipo de trauma que altere o tecido do hospedeiro pode levar a exposição de membranas basais e tornar acessíveis seus componentes como laminina, colágeno tipo IV, entactina/nidogem e proteoglicanas como sulfato de heparano.

Proteínas da matriz extracelular são implicadas na adesão em uma variedade de patógenos extra e intracelulares à tecidos do hospedeiro ou células. Laminina é uma glicoproteína da matriz ligada à membrana basal e sua interação com moléculas de superfície celulares e receptores promove adesão célula-célula, migração das células e diferenciação celular. Este componente consiste de três grandes cadeias polipeptídicas α (A); β (B₁) e γ (B₂), arranjadas em uma estrutura cruciforme (TIMPL & BROWN, 1994). Tem sido postulado que seu reconhecimento pode influenciar na patogenicidade de vários microrganismos incluindo bactérias, protozoários e fungos (TRONCHIM et al., 1997). Receptores de laminina são encontrados em células epiteliais, endoteliais,

células musculares e neurônios e também em macrófagos, leucócitos e células tumorais humanas e animais. Entre os receptores de laminina foi descrito um que pertence à família das integrinas (CALDERONE & FONZI, 2001).

Estas proteínas transmembranas reconhecem diferentes ligantes por sua seqüência RGD, que é comum a uma grande variedade de proteínas, incluindo laminina, fibrinogênio e fibronectina. No entanto, algumas integrinas ligam-se a seqüência peptídica IKVAV, localizada no fragmento E₈. Receptores tipo não integrinas foram também descritos, principalmente um de 67 kDa que reconhece o pentapeptídeo YIGSR altamente específico de laminina e localizado no fragmento P₁ (IWAMOTO et al., 1987; SAWYER et al., 1992).

Em nosso trabalho, laminina inibiu significativamente a adesão da amostra Pb18 às células Vero e HeLa, o mesmo não ocorrendo com a amostra Pb265. Este resultado sugere que Pb18 apresenta um padrão de reconhecimento diferente de Pb265 em relação a esse componente. Em trabalho anterior, Vicentini et al., (1994) demonstraram que *P. brasiliensis* é capaz de se ligar à laminina e que a provável adesina seria a gp 43. De acordo com nosso resultado, isto se confirmou com a amostra Pb18, no entanto a amostra Pb265 que também produz gp43 não mostrou o mesmo padrão de inibição, sugerindo que a possível adesina neste caso não seria somente a gp 43, que é comum para diferentes isolados de *P. brasiliensis*.

O peptídeo CDPGYIGSR-NH₂ que é parte da cadeia β da laminina e a seqüência YIGRS correspondente a porção mínima requerida para inibição da metástase de células tumorais em modelos animais foram usados nesse estudo. Assim, em nossos experimentos, ambos os peptídeos reduziram significativamente a aderência do isolado Pb18 às células HeLa e Vero, enquanto que o mesmo não foi observado com o Pb265.

O uso de peptídeos sintéticos derivados da laminina confirmou o achado com este componente da MEC, mostrando que Pb18 tem padrão diferencial de adesão em relação à Pb265. Por outro lado, este achado mostra que o padrão de virulência de determinadas amostras pode estar relacionado à sua maior e menor capacidade de se ligar a componentes da matriz extracelular.

Fungos como *P. brasiliensis* (LOPES et al., 1994; VICENTINI et al., 1994; MENDES-GIANNINI, et al., 2000; HANNA, et al., 2000; ANDREOTTI, et al., 2000; GONZALEZ, et al., 2005; BARBOSA, et al., 2006), *C. albicans* (LOPEZ-RIBOT et al., 1994) e *H. capsulatum* (MCMAHON et al., 1995) expressam proteínas que se ligam à laminina que variam em sua massa molecular de 37 a 70 kDa. Em *C. albicans*, três polipeptídeos de 37, 60 e 67 kDa tem sido associados à laminina e em *H. capsulatum* e *P. brasiliensis* respectivamente, as frações de 50, 43 e 30 kDa. Em *H. capsulatum* tem sido reconhecido que a seqüência peptídica IKVAV, localizada na região carboxil do domínio α -hélice da cadeia α é reconhecida como uma seqüência de reconhecimento do receptor tipo integrina (McMAHON et al., 1995).

Em *C. albicans*, o peptídeo CDPGYGSR-NH₂ também está envolvido na redução da aderência de um isolado de *C. albicans* (4918) à cultura de queratinócitos (OLLERT et al., 1993).

Os mecanismos de aderência envolvendo a seqüência RGD têm sido relacionados ao receptor tipo três do complemento (CR₃, CD₁₁ e CD₁₈) e também a aderência às células endoteliais e às proteínas da matriz extracelular como a fibronectina, colágeno e laminina (CALDERONE & FONZI, 2001).

Em *C. albicans* a adesão com RGD parece ser mais importante em células endoteliais que as epiteliais (OLLERT et al., 1993). Assim, embora em nosso estudo

fosse observado certo grau de inibição, este poderá ser maior dependendo da linhagem celular.

Nossos dados sugerem que a interação de *P. brasiliensis* às células epiteliais é um mecanismo complexo, envolvendo interações proteína-proteína e lectina-carbohidrato. Há padrões diferentes de interação entre as amostras Pb18 e Pb265, sugerindo provável explicação às diferenças observadas no processo de adesão que poderão implicar num maior ou menor grau de virulência de cada isolado, como observado nas infecções experimentais. Como em outros microrganismos, múltiplos mecanismos de interação podem estar envolvidos na aderência de *P. brasiliensis* às células epiteliais.

5.2. Sinalização celular

Os patógenos podem estabelecer interações com seus hospedeiros e alguns têm habilidade para aderir, invadir e ativar numerosas vias de sinalização. O estudo da interação patógeno/hospedeiro nos fornece dados para a compreensão desta diversidade biológica. Em *P. brasiliensis* pouco se sabe sobre quais vias este fungo ativa para sobreviver e escapar do sistema monocítico-fagocitário. Recentemente, Monteiro da Silva et al., (2006) observaram uma inibição significativa na invasão do fungo 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. Neste estudo foram realizados ensaios para avaliar as vias de sinalização envolvidas na proliferação celular durante a interação de *P.*

brasiliensis com células epiteliais. As vias Ras/Raf e Rho/Rac disparam sinais citosólicos que ativam proteínas da família MAPquinase (proteína quinase ativada por mitógeno) responsáveis por eventos nucleares de proliferação (ALBERTS et al., 2002). Em relação à via Ras/Raf, foi investigada a proteína Raf fosforilada na serina 338 e foi observado que o tempo de 10 minutos foi suficiente para sua expressão nas células infectadas com o fungo recentemente recuperado de inoculação animal, com propriedades adesivas aumentadas (Pb18a) e o subcultivado 312 vezes (Pb18b), bem como o tratamento com a gp43, apresentando cinco isotipos. Em 10 minutos há uma nítida diminuição de raf ativada nas células em contato com o fungo avirulento e ligeiramente superior em intensidade no fungo virulento (Pb18a) e na gp 43. Aparentemente esse resultado sugere que em 10 minutos o fungo avirulento (Pb18b) oferece menor estresse citotóxico, resultando num sinal de proliferação menos intenso. Em contrapartida, o fungo virulento e a gp 43 poderia oferecer maior estímulo proliferativo, pois a célula tentaria aumentar sinais de proliferação para manter sua sobrevivida. Quando as células foram tratadas por 30 minutos, somente o tratamento com gp43 faz com que Raf ativa esteja diminuída, revertendo este processo em período de uma hora, quando sua expressão foi bem maior. Aparentemente, esta proteína fúngica tem papel na regulação desta molécula envolvida na sinalização celular. Os sinais intracelulares de sobrevivência envolvem as vias Ras/Raf e PI3K (phosphoinositide 3-kinase) / Akt (protein kinase B). Raf é uma serina/treonina quinase que possui três isoformas com grande similaridade em suas sequências, no entanto, estas têm funções individuais que ainda estão longe de ser completamente compreendidas (BACCARINI, 2005) Raf é um efetor crítico de Ras (WEBER, et al., 2000) e Raf foi descrito como um supressor da apoptose, cooperando com Bcl-2 na membrana externa da mitocôndria (MIKULA et al., 2001; ALGECIRAS et al., 2002 ; BACCARINI, 2002), assim como

influi na resposta celular e na habilidade de Raf ativar o fator de transcrição NF-B, o principal regulador da resposta inflamatória e nas transições mesenquimal-epiteliais (LI & SEDIVY et al., 1993; BAUMANN et al., 2000; ; ODABAEI et al., 2004; BACCARINI, 2005).

No entanto, no tempo de uma até 8 horas houve aumento de sua expressão nas células infectadas com *P. brasiliensis* e tratadas com a gp 43, demonstrando que os sinais proliferativos foram ativados. Porém, depois de 24 h há progressiva diminuição de sua expressão, com nítida diminuição de intensidade em 48 e 72 horas, principalmente com o *P. brasiliensis* virulento. Sabendo que Raf só é ativada por ativação de Ras e esta sinaliza proliferação, acreditamos que *P. brasiliensis* utilize esta via, para que a célula epitelial continue viva e possa alojá-lo, supostamente permitindo posterior escape do sistema monocítico-fagocitário (ANDRADE & ANDREWS, 2004). A via Ras/Raf/MEK/ERK é a principal via de sinalização que está associada à proliferação, diferenciação, sobrevivência da célula bem como apoptose (FEIG & BUCHSBAUM, 2002; COX & DER, 2003). A superfamília Raf ativa a cascata da Raf quinase levando a ativação de MAP quinase, que então fosforila e ativa proteínas de transcrição, proteínas de citoesqueleto, quinases e fosfatases (KOLCH, 2000). Embora os passos com base regulatória tenham sido elucidados, muitos dos aspectos desta via estão para serem descobertos. Kolch, 2000 fez uma revisão focalizando o papel das interações proteínas-proteínas na regulação desta via e como elas contribuem para coordenar a ativação de proteínas, redistribuição celular, fosforilação do substrato e cruzar sinais com outras vias de sinalização. A via da MAPquinase é um dos sistemas primordiais de sinalização que é ativada para executar uma variedade de tarefas e nos eucarióticos, controla processos como proliferação, diferenciação, sobrevivência e apoptose (ALBERTS et al., 2002)). Após ativação de ras/raf os sinais são encaminhados

para primeira proteína da via de sinalização MAPquinase, denominada chamada de uma MAP- quinase- quinase (MEK). Uma vez ativada, sucede-se uma cascata de ativação de outras proteínas da família MAPkinase até a ativação de ERK, que no núcleo ativará fatores de transcrição para genes envolvidos com a proliferação celular (Alberts et al., 2002).

Neste trabalho investigamos uma outra via de transdução de sinal que envolve sobrevivência celular e crescimento, denominada a PI 3-quinase/proteína quinase B (AKT). A presença de AKT fosforilada foi observada progressivamente aumentada no tratamento com fungo virulento e gp 43 a partir do 30 minutos até 5h. Nas células tratadas com o fungo avirulento os sinais de AKT ativada foram semelhantes ao virulento nos mesmos tempos de tratamento. A ativação de AKT diminuiu progressivamente a partir de 8 até 48h. Embora haja diminuição desses sinais de sobrevivência nos tratamentos entre 8h a 48h, no fungo virulento e na células tratadas com GP43 os sinais de sobrevivência persistem com maior intensidade em comparação ao avirulento e as células não tratadas. Aparentemente somente a GP43 não induz estresse celular acentuado como o fungo virulento. Os sinais de sobrevivência diminuem mais rapidamente a partir de 8h enquanto que raf ativada mantém sinais de proliferação até 24h. As vias de sinalização ras/raf e AKT agem sinergicamente para potencializar efeitos de proliferação e sobrevivência (JANSON et al., 2006). Para os sinais de sobrevivência celular, receptores tirosina quinase presentes na membrana recebem sinais extracelulares de sobrevivência e ativam PI3 quinase que irá fosforilar PIP2, resultando na formação de um novo sinal fosfolipídico – PIP3. Em seguida, PIP3 interage com proteína AKT inativa e PDK, resultando na ativação de PDK que por sua vez fosforila AKT, tornando-a ativa. AKT ativa fosforila proteínas alvo responsáveis pela manutenção da sobrevivência celular. A fosforilação de Bad por AKT inibe sua função

pró-apotótica, impedindo este sinal de apoptose. Caspase 9 fosforilada por AKT também é inibida, resultando no bloqueio de sinais apoptóticos pela via das Caspases. Ainda, a ativação por fosforilação de AKT de fatores de transcrição e GSK3 mantém, respectivamente, a célula transcrevendo genes de proliferação celular e coordenando o maior metabolismo e síntese protéica. No presente estudo, a diminuição de AKT ativada poderia indicar a perda parcial de sinais proliferativos e que se intensificarão posteriormente com a diminuição de sinais ras/raf. Em trabalho recente (dados não publicados) foi observado que depois de 24 horas, gp43 levou aumento da expressão de Bak em relação ao controle e a Bcl-2, sugerindo que o sinal de sobrevivência foi perdido depois deste período. Quando as células foram tratadas com a gp43 durante 48 horas foi observado um aumento significativo em Bak e expressão de Bcl-2 quando relacionado aos controles, porém, quando foi comparado a expressão entre Bak e Bcl-2 foi observado que expressão de Bak foi superior a Bcl-2 que mostra que o tratamento com a adesina leva ativação da apoptose em células epiteliais pulmonares, resultado semelhante a indução de morte celular programada verificada durante a infecção de *P. brasiliensis* (MENDES-GIANNINI et al., 2004).

Nossos dados sugerem que inicialmente por duas vias diferentes, o fungo e a gp 43 sinalizaram para a sobrevivência e crescimento celular, onde o fungo procura se alojar e escapar dos fagócitos por um determinado tempo, para depois sair e invadir outras células do hospedeiro. Este fato é muito interessante quando contrastamos com os dados de Andreotti, (2006), que houve um aumento acentuado de proteínas que sinalizam apoptose a partir de 72 horas.

Neste trabalho conseguimos detectar a proteína Rho ativada após 30 minutos, tanto nas células tratadas com a gp 43, nas células infectadas com *P. brasiliensis* Pb(18a) e Pb(18b) e nas células controles (sem nenhum tratamento). Com oito horas

de incubação, houve um aumento da expressão de Rho nas células infectadas com Pb(18a) e tratadas com a gp 43. Após 24 horas houve diminuição da expressão e em 72hs, esta diminuição foi mais acentuada. Aparentemente, esses períodos estão relacionados aos encontrados em trabalho anterior em que o fungo invade células epiteliais (MENDES-GIANNINI et al.,2004).

No citoesqueleto de actina, ocorre um rearranjo estrutural total em resposta a sinais externos que são disparados através de diversos receptores da superfície da célula, mas todos estes sinais parecem converter para o interior da célula, num grupo relativamente fechado de proteínas, que são as GTPases monoméricas que são membros da família das proteínas Rho (Cdc 42, Rac e Rho). Semelhante a outros membros da superfamília Ras, estas proteínas Rho agem como uma chave molecular para controlar processos entre o estado ativo (GTP) e inativo (GDP). Ativação de CDC 42 dispara polimerização de actina e empacotamento para formar filopódios ou protusões curtas nas células chamadas de microespículas. Ativação de Rac promove polimerização de actina na periferia da célula formando lamelopódios extensos e enrugamento das membranas. A ativação de Rho promove tanto o empacotamento nos filamentos de actina com filamentos de miosina II no interior causando estresse das fibras e o agrupamento de integrinas e proteínas associadas para formar contatos focais. Esta dramática e complexa mudança estrutural ocorre porque cada uma das três proteínas citadas tem numerosas proteínas alvos que influenciam na organização e dinâmica de actina (no mínimo, oito tem sido encontradas para cada uma) e as suas proteínas alvos vão influenciar na transcrição de genes (ALBERTS, et al., 2002).

Fukata et al., (2003) estudaram as funções da família das proteínas Rho GTPases na polarização e direcionamento de migração nas células.

Por outro lado, vários trabalhos têm se preocupado em como Raf-1 pode regular Rho. Tem sido proposto que a formação de um complexo Raf-1–Rok limita a ativação de Rok, que influenciaria na formação de lamelipódios. A ativação de Rok por Rho envolve a reorganização da rede de vimentina, que sofre alterações e correlaciona-se com contratilidade da célula. Esta etapa diminui a afinidade da vimentina a Rok- e contribui para o colapso dos filamentos intermediários, ou por indução ou através de uma realimentação positiva envolvendo a ativação de Rok- α . Como pode Raf antagonizar este processo? A presença de Raf-1 poderia aumentar a afinidade de Rok- α pela vimentina, ou Raf-1 pode ter um papel mais direto e inibir a atividade de Rok- α quinase. Ambas Raf-1 e Rok- α são reguladas por inibição intramolecular nas regiões NH₂ em Raf-1, e em COOH em Rok- α , ligando-se ao domínio quinase e inibindo suas atividades (EHRENREITER et al., 2005).

Por outro lado, estudos prévios demonstraram que Raf Ser338 pode ser fosforilado por Pak2 que é a molécula alvo de Cdc42 e Rac. Porém, o mecanismo exato não está claro, porque expressão de Pak sozinho, geralmente não é suficiente para ativar Raf ou a via de ERK. Além disso, expressão de Cdc42 ativo ou Rac induz ativação de Raf, enquanto expressão de Ras ativo pode induzir ativação de Raf. Assim, co-expressão de Pak com Rac ativo pode induzir ativação de Raf, indicando um papel potencial de Cdc42/Rac e Pak na regulação de Raf.

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. 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. 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. 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 et al., 2004). Por outro lado, MARQUES et al., (2004) identificaram quatro genes, RHO1, SEP1, FLB1 e PCK1, que estão envolvidos na sinalização da célula e polaridade. O gene RHO1 estava expresso 10 a 15 vezes mais em meio mínimo do que em meio completo. Desta maneira, este trabalho reforça os nossos dados quanto à ativação da família Rho, contribuindo para o maior conhecimento da interação deste fungo com células epiteliais pulmonares. Assim, a entrada de *P. brasiliensis* na célula epitelial pode aparentemente requerer a ativação da família de pequenas GTPases Rho, como demonstrado neste trabalho. Assim, neste estudo foi descrito pela primeira vez a participação das vias de proliferação celular, crescimento e de sinais citosólicos associados ao citoesqueleto durante o processo de invasão.

6. CONCLUSÕES

Pelos resultados obtidos podemos concluir que no processo de adesão entre isolados de *P.brasiliensis* e linhagens epiteliais tem-se:

- Presença de adesinas fúngicas termo-lábeis.
- Parte do processo de interação fungo-hospedeiro foi realizado por adesinas com forte indício de serem de natureza protéica e estarem ligadas principalmente com açúcares aminados.
- Existência de frações ou sequências específicas de carboidratos (aminados/manose) capazes de mediar o processo de adesão.
- Parte do processo de interação fungo -hospedeiro é energia dependente.
- Existem sequência(s) semelhante(s) aos peptídeos derivados da laminina que reconhecem parte dos sítios adesivos em células de Pb18 e não em Pb265.
- Padrão diferencial de adesão entre Pb18 e Pb265 às células Vero e HeLa quando tratadas com peptídeos derivados da laminina podem sugerir uma associação com as diferenças de patogenicidade entre os dois isolados.
- Neste estudo foi descrito pela primeira vez a participação das vias de proliferação celular, crescimento e de sinais citosólicos associados ao citoesqueleto (Ras-Raf, AKT e Rho) durante o processo de invasão.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALAEI, S.; LARCHER, C.; EBENBICHLER, C.; PRODINGER, W.M.; JANATOVA, J.; DIERICH, M.P. Isolation and biochemical characterization of the iC_{3b} receptor of *Candida albicans*. **Infect. Immun**, v. 61, p. 1395-1399, 1993.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Molecular Biology of the Cell**. 4th. ed. 2002. 1462p.

ALGECIRAS-SCHIMNICH, A.; BARNHART, B.C.; PETER, M.E. Apoptosis-independent functions of killer caspases. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v.14, p. 721–726, 2002.

ALMEIDA, I.C.; NEVILLE, D.C.; MEHLERT, A; TREUMANN, A; FERGUSON, M.A; PREVIATO, J.O; TRAVASSOS, L.R. Structure of the N-linked oligosaccharide of the main diagnostic antigen of the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **Glycobiology.**, v. 6, p. 507-15, 1996 .

ANDRADE, L.O.; ANDREWS, N.W. Lysosomal fusion is essential for the retention of *Trypanosoma cruzi* inside host cells. **J. Exp. Med.**, v. 200, p. 1135-43, 2004.

ANDREOTTI, P.F. **Isolamento e caracterização de adesina envolvida na interação de *Paracoccidioides brasiliensis* com células epiteliais**. Dissertação (Mestrado em Análises Clínicas) Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2002. 121f.

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

ANDREOTTI, P.F. **Interação de *Paracoccidioides brasiliensis* com células epiteliais. Caracterização de prováveis fatores de virulência**. Tese (Doutorado em análises clínicas) Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2006, 124p.

ARELLANO, M.; COLL, P.M.; PÉREZ, P. RHO GTPases in the control of cell morphology, cell polarity, and actin localization in fission yeast. **Microscopy Research and Technique**, v. 47, p.51-60.1999.

AZUMA, I.; KANETSUNA, F.; TANAKA, Y.; YAMAMURA, Y.; CARBONELL, L.M. Chemical and immunological properties of galactomannans obtained from *Histoplasma capsulatum*, *Paracoccidioides brasiliensis* and *Blastomyces dermatidis*. **Mycopath. Mycol.**, v. 54, p.111-125, 1974.

BACCARINI, M. An old kinase on a new path: Raf and apoptosis. **Cell Death Differ.**, v.9(8), p. 783-5, 2002.

BACCARINI, M. Second nature: Biological functions of the Raf-1 "kinase. **Fe BS Lett.**, v.13, p.3271-7, 2005.

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

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

BAUMANN, B.; WEBER, C.K.; TROPPEMAIR, J.; WHITESIDE, S.; ISRAEL, A.; RAPP, U.R.; WIRTH, T. Raf induces NF-KB by membrane shuttle kinase MEKK1, a signaling pathway critical for transformation. **Proc Natl Acad Sci**, v. 97, p. 4615-20, 2000.

BIAGIONI, L.; SADATSUNE, T.; FRANCO, M.F.; MATTOS, M.C.F. A comparative study of the immuno-antigenicity of eight *Paracoccidioides brasiliensis* isolates. **Rev.Inst.Med.Trop.**, v.28, p. 281-286, 1986.

BLOTTA, M.H.S.; CAMARGO, Z.P. Immunological response to cell free antigens of *Paracoccidioides brasiliensis*: relationship with the clinical forms of paracoccidioidomycosis. **J. Clin. Microbiol.**, v. 31, p. 671-675, 1993.

BOUALI, A.; ROBERT, R.; TRONCHIN, G.; SENET, J.M. Characterization of binding of human fibrinogen to the surface of germ tubes and mycelium of *Candida albicans*. **J. Gen. Microbiol.**, v. 133, p. 545-51, 1987.

BOUCHARA, J.P. ; TRONCHIN, G. ; ANNAIX, V. Laminin receptors on *Candida albicans* germin tubes. **Infect. Immun.**, v. 58, p. 48-54, 1990.

BRITO, T. De ; CARVALHO, R.P. de S. ; CASTRO, R.M. ; FURTADO, J.S. Pathogenesis of experimental paracoccidioidomycosis. **PAHO Scient. Publ.**, v. 254, p. 257-60, 1972.

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

BRUMMER, E.; RESTREPO, A.; HANSON, L. H.; STEVENS, D.A. Virulence of *Paracoccidioides brasiliensis*: The influence of in vitro passage and storage. **Mycopathologia**, v. 109, p. 13-18, 1990.

CHAN, T. O.; RITTENHOUSE, S.E; TSICHLIS, P.N. Akt/Pkb and other D3 phosphoinositide-regulated kinases: kinase activation by phosphoinositide-dependent phosphorylation. **Annu Rev. Biochem.**, v. 68, p.965-1014, 1999.

CALDERONE, R.A., LINCHAN, L., WADSWORTH, E., SANDBERG, A.L. Identification of C_{3d} receptors on *Candida albicans*. **Infect. Immun.**, v. 56, p. 252-258, 1988.

CALDERONE, R.A.; BRAUN, P.C. Adherence and receptor relationship of *Candida albicans*. **Microbiol. Rev.**, v. 55, p. 275-279, 1991.

CALDERONE, R.A. Molecular interaction at the interface of *Candida albicans* and host cells. **Archieve of Medical Research.**, v. 24, p. 275-279, 1993.

CALDERONE, R.A. Recognition between *Candida albicans* and host cells. **Trends Microbiol.**, v. 1, p. 55-58, 1993.

CALDERONE, R.A.; FONZI, W.A. Virulence factors of *Candida albicans*. **Trends Microbiol.**, v.9, p. 327-35, 2001.

CAMARGO, Z.P.; TABORDA, C.P.; RODRIGUES, E.G.; TRAVASSOS, L.R. The use of cell-free antigens of *Paracoccidioides brasiliensis* in serological tests. **J. Med. Vet. Mycol.**, v. 29, p. 31-8, 1991.

CASANOVA, M.; LOPEZ-RIBOT, J.L.; MONTEAGUDO, C.; LLOMBART-BOSCH, A; SENTANDREU, R.; MARTINEZ, J.P. Identification of a 58-kilodalton cell surface fibrinogen-binding mannoprotein from *Candida albicans*. **Infect. Immun.**, v. 60, p. 4221- 4229,1992.

COLTRI, K.C.; FORTUNATO, A.S.C.; CARDOSO, M.L.G.; PINZAN, C.F.; RUAS, L.P.; MARIANO, V.S.; MARTINEZ, J.C.R.; PANUNTO-CASTELO, A.; ROQUE-BARREIRA, M.C. Paracoccin, a GlcNac-binding lectin from *Paracoccidioides brasiliensis*, binds to laminin and induces TNF- α production by macrophages. **Microb. Infect.**, v.8, p. 704-713, 2006.

COOPER, G.M. **The cell. A molecular approach.** 2 ed. ASM Press & Sinaver Associates Inc. Washington D.C., 2000, 689p.

COX, A.D.; DER, C.J. The dark side of Ras: regulation of apoptosis. **Oncogene**, v.22, p. 8999-9006, 2003.

COXON, P.Y.; SUMMERSGILL, J.T.; RAMIREZ, J.A.; MILLER, R.D. Signal Transduction during *Legionella pneumophila* Entry into Human Monocytes. **Infect. Immun.**, v. 66, p. 2905-2913, 1998.

EHRENREITER. K.; PIAZZOLLA, D.; VELAMMOOR, V., SOBCZAK, I., SMALL, J.V.; TAKEDA, J.; LEUNG, T.; BACCARINI, M. M.Raf-1 regulates Rho signaling and cell migration. **J. Cell. Biol.**, v.168, p. 955-64, 2005.

FAVORETO, S.; DORTA, M.L.; YOSHIDA, N. *Trypanosoma cruzi* 175 kDa protein tyrosine phosphorylation is associated with host cell invasion. **Exp. Parasitol.**, v.89, p. 188-194, 1998.

FEIG, L.A.; BUCHSBAUM, R.J. Cell signaling: life or death decisions of ras proteins. **Curr. Biol.**, v.12 ,p. 259-61, 2002.

FILLER, S.G.; SWERDLOFF, J.N.; HOBBS, C.; LUCKETT, P.M. Penetration and damage of endothelial cells by *Candida albicans*. **Infect.Immun.**, v. 3, p. 976-983, 1995.

FINLAY, B.B.; FALKOW, S. Common themes in microbial pathogenicity. **Microbiol. Rev.**, v. 53, p. 210-30, 1989.

FINLAY, B.B.; LEUNG, K.Y.; ROSENSHINE, I. *Salmonella* interactions with the epithelial cell. **ASM News.**, v. 58, p. 486-490, 1992.

FRANCO, M. Host- parasite relationships in paracoccidioidomycosis. **J. Med. Veter. Micol.**, v. 25, p. 5-18, 1986.

FRANCO, M.F.; MENDES, R.P.; MOSCARDI-BACCHI, M.; REZZALLAH-WASSO, M.; MONTENEGRO, M.R. London, Bailliere's. Clinical Tropical medicine and Communicable Disease. Paracoccidioidomycosis. p. 18-196, 1989.

FRANCO, M.; BAGAGLI, E.; SCAPOLIO, S.; LACAZ, C.S. A critical analysis of isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from soil. **Med. Micol.**, v. 38, p. 185-191, 2000.

FUKATA, M.; NAKAGAWA, M.; KAIBUCHI, K. Roles of Rho-family GTPases in cell polarisation and directional migration. **Curr. Op. Cell Biol.**, v. 15, p. 590-597, 2003.

GONZALEZ, A.; GOMEZ, B.L.; DIEZ, S.; HERNANDEZ, O.; RESTREPO, A.; HAMILTON, A.J.; CANO, L.E. Purification and partial characterization of a *Paracoccidioides brasiliensis* protein with capacity to bind to extracellular matrix proteins. **Infect. Immun.**, v. 73, p. 2486-95, 2005.

GUEIRARD, P.; DRUILHE, A.; PRETOLANI, M.; GUIISO, N. Role of adenylate cyclase-hemolysin in alveolar macrophage apoptosis during *Bordetella pertussis* infection in vivo. **Infect. Immun.**, v.66, p. 1718-1725, 1998.

HANNA, S.A. **Estudo dos mecanismos e fatores de virulência de *Paracoccidioides brasiliensis* em culturas de células.** Tese de Mestrado - Instituto de Biociências - UNESP, 1995, 166f.

HANNA, S.A.; UEMURA, M.A.; MORAES, R.; RICCI, L.C.; MENDES-GIANNINI, M.J.S. Adherence and virulence of *Paracoccidioides brasiliensis*. In: Encuentro Internacional sobre Paracoccidioidomicosis, v. 6, p. 81, 1996.

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

HOSTETER, M.K. Adhesins and ligands involved in the interaction of *Candida* spp with epithelial and endothelial surfaces. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 1, p. 29-42, 1994

HOWLET, J.A.; SQUIER, A. *Candida albicans* ultrastructure: colonization of oral epithelium. **Infect. Immun.**, v. 29, p. 252-256, 1980.

HYNES, R.O. Integrins: a family of cell surface receptors. **Cell.**, v. 48, p. 549-554, 1987.

ISBERG, R.; LEONG, J.M. Multiple β_1 chain integrins are receptor for invasion, a protein that promotes bacterial penetration into mammalian cells. **Cell.**, v. 60, p. 861-871, 1990.

ISBERG, R. R., TRAN VAN NHIEU, G. Binding and internalization of microorganisms by integrin receptors. **Trends Microbiol.**, v. 2, p.10-14, 1994.

IWAMOTO, Y.; ROBEY, J.; GRAF, M.; SASAKI, M., KLEINMAN, H.K., YAMADA, Y., MARTIN, G.R. YIGSR, a synthetic lamin pentapeptide, inhibits experimental metastasis formation. **Science**, v. 238, p. 1132-1134, 1987.

JACOBSON, M.D.; WEIL, M.; RALF, M.C. Programmed cell death in animal development. **Cell.**, v. 88, p. 347-354, 1997.

JIMENEZ, M.del P.; RESTREPO, A.; RADZIOCH, D.; CANO, L.E.; GARCIA, L.F. Importance of complement 3 and mannose receptors in phagocytosis of *Paracoccidioides brasiliensis* conidia by Nramp1 congenic macrophages lines. **Fems Immunol. Med. Microbiol.**, v. 47, p. 56-66, 2006.

KADURUGAMUWA, J.L.; RHODE, M.; WEHLAND, J. Intercellular spread of *Shigella flexneri* through a monolayer mediated by membranous protusions and associated with reorganization of the cytoskeletal protein vinculin. **Infect. Immun.**, v. 43, p. 3463-3471, 1991.

KALO, A.; SEGAL, E.; SAHAR, E.; DYAN, S. Interaction of *Candida albicans* with genital mucosal surfaces: involvement of fibronectin in adherence. **J. Infect. Dis.**, v. 157, p. 1253-1256, 1988.

KANETSUNA, F.; CARBONELL, L.M.; MORENO, R.E.; RODRIGUEZ, J. Cell wall composition of the yeast and mycelial forms of *Paracoccidioides brasiliensis*. **J. Bacteriol.**, v. 97, p. 1036-1041, 1969.

KANETSUNA, F., CARBONELL, L.M. Cell wall glucans of the yeast and mycelial forms of *Paracoccidioides brasiliensis*. **J Bacteriol.**, v. 101, p. 675-80, 1970.

KANETSUNA, F. Biochemical characteristics of *Paracoccidioides brasiliensis*. In: Pan American Symposium on Paracoccidioidomycosis. I-Medellin, 1971. Proceedings, Wahington. PaHo, 1972, **Scient Publ.**, v. 254, p. 31-37, 1972.

KANETSUNA, F.; CARBONELL, L.M.; AZUMA, I.; YAMAMURA, Y. Biochemical studies on the thermal dimorphism of *Paracoccidioides brasiliensis*. **J. Bacteriol.**, v. 110, p. 208-218, 1972.

KASHINO, S.S.; CALICH, V. L.; BURGER, E.; SINGER-VERMES, L.M. In vivo and in vitro characteristics of six *Paracoccidioides brasiliensis* strains. **Mycophatology**, v. 92, p. 173-178, 1985.

KASHINO, S.S.; SINGER-VERMES, L.M.; CALICH, V.L.G.; BURGER, B. Alterations in the pathogenicity of one *Paracoccidioides brasiliensis* isolate do not correlate with its in vitro growth. **Mycopathologia**, v. 109, p. 173-180, 1990.

KERR, J. R. Cell adhesion molecules in the pathogenesis of and host defense against microbial infection. **Mol. Pathol.**, v. 52, p. 220-230, 1999.

KHAN, I.A.; MATSURA, T.; KASPER, L.H. Activation-mediated D4+ T cell unresponsiveness during acute *Toxoplasma gondii* infection in mice. **Int. Immunol.**, v. 8, p. 887-896, 1996.

KLOTZ, S.A. Adherence of *Candida albicans* to components of the extracellular matrix. **FEMS Microbiol.Lett.**, v. 68, p. 249-54, 1990.

KLOTZ, S.A.; SMITH, R.L. A fibronectin receptor on *Candida albicans* mediates adherence of the fungus to extracellular matrix. **J. Infect. Dis.**, v. 163, p. 604-610, 1991.

KLOTZ, S.A.; RUTTEN, M.J.; SMITH, R.L.; BABCOCK, S.R.; CUNNINGHAM, M.D. Adherence of *Candida albicans* to immobilized extracellular matrix proteins is mediated by calcium-dependent surface glycoproteins. **Microb.Pathog.**, v. 2, p. 133-147, 1993.

KOLCH, W. Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. **Biochem. J.**,v. 351, p. 289-305, 2000.

LACAZ, C.S. Historical evolution of the knowledge on paracoccidioidomycosis and its etiologic agent, *Paracoccidioides brasiliensis*. In: FRANCO M.; LACAZ C.S.; RESTREPO-MORENO A.; DEL-NEGRO G. **Paracoccidioidomycosis**. Boca Raton, Florida, EUA, p. 1-11, 1994.

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

LENGELER, K.B.; DAVIDSON, R.C.; D`SOUZA, C.; HARASHIMA, T., SHEN, W. C.; WANG, P.; PAN X.; WAUGH M.; HEITMAN J. Signal transduction cascades regulating fungal development and virulence. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 64, p.746-785, 2000.

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

LI, S.; SEDIVY, J.M. Raf-1 protein kinase activates the NF- κ B transcription factor by dissociating the cytoplasmic NF- κ B-I κ B complex. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 90, p. 9247-9251, 1993.

LODISH, H.F., KONG, N. Perturbation of cellular calcium blocks exit of secretory proteins from the rough endoplasmic reticulum. **J. Biol. Chem.**, v. 5, p. 10893-10899, 1990.

LOPES, J.D.; MOURA-CAMPOS, M.C.; VICENTINI, A.P.; GESZTESI, J.L.; DE-SOUZA, W.; CAMARGO, Z.P. Characterization of glycoprotein gp43, the major laminin-binding protein of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Braz. J. Med. Biol.**, v. 27, p. 2309-2313, 1994.

LOPEZ-RIBOT, J.L.; CASANOVA, M.; MONTEAGUDO, C.; SEPULVEDA, P.; MARTINEZ, J.P. Evidence for the presence of a high-affinity laminin-receptor-like molecule on the surface of *Candida albicans* yeast cells. **Infect. Immun.**, v. 62, p. 742-746, 1994.

LOPEZ-RIBOT, J.L.; CHAFFIN, W.L. Binding of the extracellular matrix component entactin to *Candida albicans*. **Infect. Immun.**, v. 62, p. 4564-4571, 1994.

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

MAHLERT, M.; LEVELEKI, L.; HLUBEK, A.; SANDROCK, B.; BÖLKER, M. Rac1 and Cdc42 regulate hyphal growth and cytokinesis in the dimorphic fungus *Ustilago maydis*. **Molec. Microbiol.**, v.59, p.567-578, 2006.

McMAHON, J.P.; WHEAT, J.; SOBEL, M.E.; PASULA, R.; DOWNING, J.F.; MARTIN, W.J. Murine Laminin binds to *Histoplasma capsulatum*. A possible mechanism of dissemination. **J. Clin. Inv.**, v. 96, p. 1010-1017, 1995.

MARAIS, R.; MARSHALL, C.J. Control of the ERK MAP Kinase cascade by Ras and Raf. **Cancer Surv.**, v. 27, p. 101-125, 1996.

MARAIS, R.; LIGHT, Y.; PATERSON, H. F.; MASON, S.C.; MARSHALL, C.J. Differential regulation of Raf-1, A-Raf and B-Raf by oncogenic ras and tyrosine kinases. **J. Biol. Chem.**, v. 272, p. 4378-4383, 1997.

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

MASON, C.S.; SPRINGER, C.J.; COOPER, R.G.; SUPERTI-FURGA, G.; MARSHALL, C.J.; MARAIS, R. Serine and tyrosine phosphorylations cooperate in Raf-1, but not B-Raf activation. **Embo J.**, v. 18, p. 2137-2148, 1999.

MATUTE, D.R.; MCEWEN, J.G.; PUCCIA, R.; MONTES, B.A.; SAN-BLAS, G.; BAGAGLI, E.; RAUSCHER, J.T.; RESTREPO, A.; MORAIS, F.; NIÑO-VEGA, G.; TAYLOR, J.W. Cryptic speciation and recombination in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* as revealed by gene genealogies. **Mol. Biol. Evol.**, v. 22, p. 1-9, 2005.

Mc ORIST, S.; ROBERTS, L.; JASNI, S.; ROWLAND, A.C.; LAWSON, G.H.; GEBHART, C.L.; BOSWORTH, B. Developed and reolving lesions in porcine proliferative enteropathy: possible pathogenetic mechanisms. **J. Comp. Pathol.**, v. 115, p. 35-45, 1996.

MENDES-GIANNINI, M.J.S., BUENO, J.P., SHIKANAI-YASUDA, M.A, FERREIRA, A.W.; MASUDA, A. Antibody response to the 43 kDa glycoprotein of *Paracoccidioides brasiliensis* as a marker for the evaluation of patients under treatment. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v. 43, p. 200-206, 1990.

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

MENDES-GIANNINI, M.J.S.; RICCI, L.; UEMURA, M.A.; TOSCANO, E.; ARNS, C.W. Invasion of Vero cells by *Paracoccidioides brasiliensis*. **Rev. Arg. Micol.**, v.15, p. 29, 1992.

MENDES-GIANNINI, M.J.S.; UEMURA, M.A.; HANNA, S.A.; RICCI, T.A. Vero and HeLa cells infection by different strain of *Paracoccidioides brasiliensis*. In: International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology Division, 7th, and International Congress of Mycology Division, 7th, Praga, República Theca, 1994. Anais, p. 352.

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

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

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

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

MENDES-GIANNINI, M.J.S.; ANDREOTTI, P.F.; VINCENZI, L.R.; MONTEIRO DA SILVA, J.L.; LENZI, H.L.; BENARD, G.; ZANCOPÉ-OLIVEIRA, R.; GUEDES, H.L.M.; SOARES, C.P. Binding of extracellular matrix proteins to *Paracoccidioides brasiliensis*. **Microb. Infect.**, v. 8, p. 1550-1559, 2006.

MENZIES, B.E.; KOURTEVA, I. Internalization of *Staphylococcus aureus* by endothelial cells induces apoptosis. **Infect. Immun.**, v. 66, p. 5994-5998, 1998.

MIKULA, M.M.; SCHREIBER, Z.; HUSAK, L.; KUCEROVA, J.; RUTH, R.; WIESER, K.; ZATLOUKAL, H.; BEUG, E.F.; BACCARINI, M. Embryonic lethality and fetal liver apoptosis in mice lacking the c-raf-1 gene. **EMBO J.**, v. 20, p. 1952–1962, 2001.

MONACK, D.M.; RAUPACH, B.; HROMOKYJ, A.E.; FALKOW, S. *Salmonella typhimurium* invasion induces apoptosis in infected macrophages. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 93, p. 9833-9838, 1996.

MONACK, D.M.; MECSAS, J.; BOULEY, D.; FALKOW, S. *Yersinia*-induced apoptosis *in vivo* aids in the establishment of a systemic infection of mice. **J. Exp. Med.**, v. 188, p. 2127-2137, 1997.

MONTEIRO DA SILVA, J.L. **Aderência, ligação à fibronectina e invasão de *Paracoccidioides brasiliensis* às células Vero.** Dissertação de Mestrado, 2000, 120f.

MONTEIRO DA SILVA, J.L.; ANDREOTTI, P.F.; BENARD, G.; SOARES, C.P.; MIRANDA, E.T.; MENDES-GIANNINI, M.J.S. Epithelial cell treated with genistein inhibit adhesion and endocytosis of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 90, 2006.

MOREIRA, A.P.; CAMPANELLI, A.P.; CAVASSANI, K.A.; SOUTO, J.T., FERREIRA, B.R., MARTINEZ, R., ROSSI, M.A.; SILVA JS. Intercellular adhesion molecule-1 is required for the early formation of granulomas and participates in the resistance of mice to the infection with the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **Am J Pathol.**, v. 169, p.1270-81, 2006.

MOULDING, D.A.; WALTER, C.; HART, A.; EDWARDS, S.W. Effects of staphylococcal enterotoxins on human neutrophil functions and apoptosis. **Infect. Immun.**, v. 67, p. 2312-2318, 1999.

MULLER, A.; HACKER, J.; BRAND, B.C. Evidence for apoptosis of human macrophages-like HL-60 cells by *Legionella pneumophila* infection. **Infect. Immun.**, v. 64, p. 4900-4906, 1996.

MÜNTER, S.; WAY, M.; FRISCHKNECHT, F. Signaling during pathogen infection. **Sci. Stke**, v. 335, p. 517-607, 2006.

NEUHOFF, V.; AROLD, N.; TAUBE, D.; EHRHARDT, W. 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**, v.9, p.255-262, 1988.

NIELSEN, B.L.; BROWN, L.R. The bases for colored silver protein complex formation in stained polyacrilamide gels. **Anal. Biochem.**, v. 141, p. 311-315, 1984.

ODABAEI, G.; CHATTERJEE, D.; JAZIREHI, A.R.; GOODGLICK, L.; YEUNG, K.; BONAVIDA, B. Raf-1 kinase inhibitor protein: structure, function, regulation of cell signaling and pivotal role in apoptosis. **Adv. Cancer. Res.** v. 91, p.169-200, 2004.

O'FARRELL, P.H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. **J. Biol. Chem.**, v.250, p. 4007-4021, 1975.

OLLERT, M.W.; SÖHNCHEN, R.; KORTING, H.C.; OLLERT, U.; BRÄUTIGAM, S.; BRÄUTIGAM, W. Mechanisms of Adherence of *Candida albicans* to cultured human epidermal keratinocytes. **Infect. Immun.**, v. 61, p. 4560-4568, 1993.

PARIS, S. ; BOISVIEUX-ULRICH, E. ; CRESTANI, B. ; HOUCINE, O. ; TARAMELLI, D. ; LOMBARDI, L. ; LATGÉ, J.P. Internalization of *Aspergillus fumigatus* conidia by epithelial and endothelial cells. **Infect. Immun.**, v. 4, p. 1510-1514, 1997.

PENALVER, M.C.; CASANOVA, M.; MARTINEZ, J.P.; GIL, M.L. Cell wall protein and glycoprotein constituents of *Aspergillus fumigatus* that bind to polystyrene may be responsible for the cell surface hydrophobicity of the mycelium. **Microbiology.**, v.142, p.1597-604, 1996.

PERAÇOLI, M.T.S.; SUGIZAKI, M.F.; MENDES, R.P.; NAIFF, R.D.; SARTORI, A.; MONTENEGRO, M.R. Estudo da virulência de amostra de *Paracoccidioides brasiliensis* isolada de tatu (*Dasypus novemcinctus*). **Rev. Argent. Micol.**, v. 15, p. 41, 1992.

POULAIN, D.; TRONCHIN, G.; BIGUET, J.; DUBREMETZ, J.F. Ultrastructure of the cell wall of *Candida albicans* blastospores: study of its constitutive layers by the use of cytochemical technique revealing polysaccharides. **Ann. Microbiol.**, v. 129, p. 10-16, 1978.

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

PUCCIA, R.; TRAVASSOS, L.R. 43 kilodalton glycoprotein from *Paracoccidioides brasiliensis*: Immunochemical reactions with sera from patients with paracoccidioidomycosis, histoplasmosis or Jorge Lobo's disease. **J. Clin. Microbiol.**, v. 29, p. 1610, 1991.

RESTREPO, A. The ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*. A puzzle still unsolved. **J. Med. Vet. Mycol.**, v. 23, p. 323, 1985.

ROSTAND, K.S.; ESKO, J.D. Microbial adherence to and invasion through proteoglycans. **Infect Immun.**, v. 65, p. 1-8, 1997.

RUPLEY, J.A. The hydrolysis of chitin by concentrated hydrochloric acid and the preparation of low molecular weight substrates for lysozyme. **Bioch. Biophys. Acta.**, v. 83, p. 245-255, 1964.

SAJJAN, U.S.; SYLVESTER, F.A.; FORSTNER, J.F. Cable-piloted *Burkholderia cepacia* binds to cytokeratin 13 of epithelial cells. **Infect. Immun.**, v. 68, p. 1787-1795, 2000.

SALYERS, A.A.; WHITT, D.D. **Bacterial pathogenesis: a molecular approach.** ASM Press. Washington, D.C., 418 p, 1994.

SAMARANAYAKE, L.P.; McFARLANE, T.W. The adhesion of the yeast *Candida albicans* to epithelial cells of human origin "in-vitro". **Arch. Oral. Biol.**, v. 26, p. 815-820, 1981.

SAN-BLAS, G.; SAN-BLAS, F. *Paracoccidioides brasiliensis*: cell wall structure and virulence. **Mycopathol.**, v. 62, p. 77-86, 1977.

SAN-BLAS, F.; SAN-BLAS, G. Biochemistry of *Paracoccidioides brasiliensis* dimorphism. In **Paracoccidioidomycosis**. FRANCO, M.; LACAZ, C.S.; RESTREPO-MORENO, A.; DEL NEGRO, G.(Eds). London: Boca raton, CRC Press, 1994 , p. 49-66.

SAN-BLAS, G.; SAN-BLAS, F. *Paracoccidioides brasiliensis*: virulence and host response. In **Fungal pathogenesis: principles and clinical applications**. CIHLAR, R.L.; CALDERONE, R.A. (Eds). New York: Marcel Dekker, Inc, 2000.

SANSONETTI, P.J. Genetic and molecular basis of epithelial cell invasion by *Shigella* species. **Rev. Infect. Dis.**, v. 13, p. 5285-5292, 1991.

SAWYER, R.T.; GARNER, R.E.; HUDSON, J.A. Arg-Gly-Asp(RGD) peptides alter hepatic killing of *Candida albicans* in the isolated perfused mouse liver model. **Infect. Immun.**, v. 60, p. 213-218, 1992.

SEGAL, E.; LEHRER, N.; OFEK, I. Adherence of *Candida albicans* to human vaginal epithelial cells, inhibition by amino sugars. **Expl.Cell. Biol.**, v. 50, p.13-17, 1982.

SHIKANAI-YASUDA, M.A.; TAGUCHI, R.T.; SATO, M.K.; MELO, N.T.; ASSIS, C.M.; NIGRO, R.C.; CAMARGO, E.E.; LACAZ, C.S.; AMATO NETO, V.; SESSO, A. In vitro action of some disinfectants on *Paracoccidioides brasiliensis* yeast forms. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 33, p. 37-43, 1991.

SINGER-VERMES, L.M.; BURGER, E.; FRANCO, M.J.; MOSCARDI-BACHI, M.; MENDES-GIANNINI, M.J.S.; CALICH, V.L.C. Evaluation of the pathogenicity and immunogenicity of seven *Paracoccidioides brasiliensis* isolates in susceptible in bred mice. **J. Med. Vet. Mycol.**, v. 27, p. 71-82, 1989.

SINGER-VERMES, L.M.; BURGER, E.; CALICH, V.L.G.; MODESTO-XAVIER, L.H. Pathogenicity and immunogenicity of *Paracoccidioides brasiliensis* isolates in the human disease and in experimental murine model. **Clin. Exper. Immun.**, v. 97, p. 113-119, 1994.

SKERL, K.G.; CALDERONE, R.A.; SEGAL, E.; SREEVALSAN, T; SCHELD, W.M. In vitro binding of *Candida albicans* yeast cells to human fibronectin. **Can. J. Microbiol.**, v. 30, p. 221-227, 1983.

SONG, G.; OUYANG, G.; BAO, S. The activation of AKT/PKB signaling pathway and cell survival. **J. Cell. Mol. Med.**, v.9, p.59-71, 2005.

SOUZA, M.C; GESZTESI, J.L.; SOUZA, A.R.; MORAES, J.Z.; LOPES, J.D. Differences in reactivity of paracoccidioidomycosis sera with gp43 isoforms. **J. Med. Vet. Mycol.**, v. 35, p. 13-8, 1997.

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

TAMURA, G.S.; NITTAYAJARN, A. Group B streptococci and other gram-positive cocci bind to cytokeratin 8. **Infect Immun.**, v. 68, p. 2129-2134, 2000.

THOMPSON, C.B. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. **Science**, v. 267, p. 1456-1462, 1995.

TIMPL, R.; BROWN, J.C. The laminins. **Matrix Biol.**, v.14, p. 275-81, 1994.

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

TRAN VAN NHIEU, G.; SANSONETTI, P.J. Mechanisms of *Shigella* entry into epithelial cells. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 2, p. 51-55, 1999.

TRAVERSE, S.; COHEN, P.; PATERSON, H.; MARSHALL, C.; RAPP, U.; GRAND, R.J. Specific association of activated MAP kinase kinase kinase (Raf) with the

plasma membranes of ras-transformed retinal cells. **Oncogene**, v. 8, p. 3175-3181, 1993.

TRONCHIN, G.; BOUCHARA, J.P.; FERRON, M.; LARCHER, G.; CHABASSE, D. Cell surface properties of *Aspergillus fumigatus* conidia: correlation between adherence, agglutination and rearrangements of the cell wall. **J. Microbiol.**, v. 41, p. 714-721, 1993.

UEMURA, M.A. **Evidências da participação dos mecanismos de adesão e invasão celular na patogenicidade do *Paracoccidioides brasiliensis***. Dissertação de Mestrado - Instituto de Biologia -UNICAMP, 1996, 99p.

UEMURA, M.A.; HANNA, S.A.; RICCI, L.C.; SANDOVAL, M.; MENDES-GIANNINI, M.J.S. An electron microscopy study of *Paracoccidioides brasiliensis* adherence and invasion of culture cells. In: Encontro Internacional sobre Paracoccidioidomicosis. Poto Alegre-Rio Grande do Sul, 1996.

UNTEREINER, W.A.; SCOTT, J.A.; NAVEAU, F.A.; SIGLER, L.; BACHEWICH, J.; ANGUS, A. The Ajellomycetaceae, a new family of vertebrate-associated Onygenales. **Mycology**, v. 96, p.812-861, 2004.

VAUX D. L.; KORSMEYER, S. J. Cell death in development. **Cell**, v. 96, p. 245-254, 1999.

VESPA, M.N.; LOPEZRIBOT, J.L.; CHAFFIN, W.L. Adherence of germ tubes of *Candida albicans* to tissues from immunocompromised mice. **FEMS Immun. Med. Microbiol.**, v. 11, p. 57-63, 1995.

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

VINCENZI, L.R. **Bases moleculares do processo de adesão de *Paracoccidioides brasiliensis* à proteínas da matriz extracelular**. Dissertação (Mestrado)-Instituto de Química-UNESP, 2000, 103p.

WATARI, M.; FUNATO, S.; SASAKAWA, C. Interaction of Ipa proteins of *Shigella flexneri* with $\alpha_5\beta_1$ integrin promotes entry of the bacteria into mammalian cells. **J. Exp. Méd.**, v. 183, p. 991-999, 1996.

WEBER, C.K.; SLUPSKY, J.R.; HERRMANN, C.; SCHULER, M.; RAPP, U.R.; BLOCK, C. Mitogenic signaling of Ras is regulated by differential interaction with Raf isozymes. **Oncogene**, v. 19, p.169-176, 2000.

WELLS, C. L.; VANDE WESTERLO, E.M.A.; JECHOREK, R.P.; HAINES, H.M.; ERLANDSEN, S.L. Cytochalasin Induced actin disruption of polarized enterocytes can augment internalization of bacteria. **Infect. Immun.**, v. 66, p. 2410-2419, 1998.

YARZÁBAL, L.A.; BOUT, D.; NAQUIRA, F.; FRUIT, J.; ANDRIEU, S. Identification and purification of the specific antigen of *Paracoccidioides brasiliensis* responsible for immunoelectrophoretic band E. **Sabouraudia**, v. 15, p. 79-85, 1977.

YARZÁBAL, L.A. Composición antigênica do *Paracoccidioides brasiliensis*. In: DEL NEGRO, G., LACAZ, C.S., FIORILLO, A.M. Paracoccidioidomycose. São Paulo: Sarvier, 1982.

YOSHIDA, N.; FAVORETO, S.; FERREIRA, A.T.; MANQUE, P.M. Signal transduction induced in *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes during the invasion of mammalian cells. **Braz. J. Med. Biol. Research.**, v. 33, p. 269-278, 2000.

ZACHARIAS, D.; VEDA, A.; MOSCARDI-BACHI, M.; FRANCO, M.; SAN-BLAS, G.A. A comparative histopathological, immunological and biochemical study of experimental intravenous paracoccidioidomycose induced in mice by three *Paracoccidioides brasiliensis* isolates. **J. Med.Vet. Mycol.**, v. 24, p. 445-454, 1986.

ZAR, J.H. **Bioestatistical Analysis**. 2th ed. Englewood Cliffs. Prentice Hall, 1984, 718p.

ZINK, S.; THORSTEN, N.A.; ROSEN, P.; ERNST, F. Migration of the fungal pathogen *Candida albicans* across endothelial monolayers. **Infect. Immun.**, v.12, p. 5085-5091, 1996.

ZYCHLINSKY, A.; THIRUMALAI, K.; ARONDEL, J.; CANTEY, R.J.; ALIPRANTIS, A.O.; SANSONETTI, P.J. *In vitro* apoptosis in *Shigella flexneri* infections. **Infect. Immun.**, v. 64, p. 5357-5365, 1996.

8. ANEXO

Tabela 2 - Influência da temperatura na adesão dos isolados de *P.brasiliensis* Pb18 e Pb265 às células Vero.

Vero	Aderência relativa % ± D.P.		
	Amostras		
Tratamento térmico	Pb18	Pb265	p ^a
Sem Tratamento	100	100	-
121 ⁰ C	46,6 ± 6,2	44,2 ± 6,0	P<0,05
100 ⁰ C	63,4 ± 9,1	77,5 ± 6,0	P<0,05
56 ⁰ C	89,6 ± 8,6	84,3 ± 6,6	P>0,05

Dados apresentam média mais desvio-padrão de 3 experimentos.

p^a: teste estatístico, considerado significativo (p<0,05).

Tabela 3- Resultados da influência da temperatura na adesão dos isolados de *P.brasiliensis* Pb18 e Pb265 às células HeLa.

HeLa	Aderência relativa % ± D.P.		
	Isolados		
Tratamento térmico	Pb18	Pb265	p ^a
Sem tratamento	100	100	-
121 ⁰ C	44,6 ± 4,5	48,6 ± 3,8	P<0,05
100 ⁰ C	63,2 ± 3,6	77,3 ± 13,4	P<0,05
56 ⁰ C	75,3 ± 7,4	87,6 ± 6,4	P>0,05

Dados apresentam a média e o desvio padrão de 3 experimentos.

p^a: teste estatístico, considerado significativo (p<0,05).

Tabela 4- Resultados do efeito de agentes químicos e de lectinas na adesão dos isolados de *P.brasiliensis* Pb18 e Pb265 às células Vero

Vero	Aderência relativa % \pm D.P.		
	Isolados		
pré-tratamento	Pb18	Pb265	p ^a
Sem tratamento	100	100	-
Formalina	103,2 \pm 4,3	95,0 \pm 10,7	p>0,05
Azida sódica	61,4 \pm 11,8	55,5 \pm 8,3	P<0,05
Periodato de sódio	48,9 \pm 1,9	59,0 \pm 4,8	P<0,05
Concanavalina A	64,2 \pm 7,8	50,2 \pm 10,4	P<0,05

-Dados apresentam a média e o desvio padrão de 3 experimentos.

-p^a: teste estatístico, considerando efeito dos tratamentos químicos na adesão e sua significância ao nível de p<0,05

Tabela 5- Resultados do efeito de vários agentes químicos e lectinas na adesão dos isolados de *P.brasiliensis* Pb18 e Pb265 às células HeLa.

HeLa	Aderência relativa % \pm D.P.		
	Isolados		
pré-tratamento	Pb18	Pb265	p ^a
Sem tratamento	100	100	-
Formalina	88,2 \pm 8,6	80,2 \pm 11,3	p>0,05
Azida sódica	64,2 \pm 3,5	64,5 \pm 7,6	p<0,05
Periodato de sódio	46,5 \pm 4,4	47,2 \pm 13,1	p<0,05
Concanavalina A	58,2 \pm 8, 8	60,4 \pm 8,3	p<0,05

- Dados apresentam a média mais o desvio padrão de 3 experimentos.

p^a: teste estatístico, considerando efeito dos tratamentos químicos na adesão e sua significância ao nível de p<0,05

Tabela 6 – Resultados do efeito das várias substâncias na aderência de *P.brasiliensis* às células Vero.

Vero Pré-tratamento	Aderência relativa %± DP		
	Pb18	Pb265	p ^a
Sem tratamento	100	100	-
Tripsina	31,6±5,8	45,6±6,2	P<0,05
SHN	100,0±7,7	102,1±21,4	p>0,05
SHN inativado	101,8±10,4	103,7±18,6	p>0,05
Heparina	93,9±7,8	91,1±22,4	p>0,05

- Dados apresentam a média mais o desvio padrão de 3 experimentos.

- p^a: teste estatístico, mostrando o efeito dos tratamentos ao nível de significância de p<0,05.

- SHN - soro humano normal

Tabela 7- Resultados do efeito de várias substâncias na aderência de *P.brasiliensis* às células HeLa.

HeLa Pré-tratamento	Aderência relativa % ± DP		
	Pb18	Pb265	p ^a
Sem tratamento	100	100	-
Tripsina	40,5±5,1	45,5±11,2	p<0,05
SHN	89,4±7,7	87,2±6,5	p>0,05
SHN inativado	97,9±3,7	95,8±3,3	p>0,05
Heparina	91,5±11,8	78,5±8,5	p>0,05

- Dados apresentam a média e mais o desvio padrão de 3 experimentos. -p^a: teste estatístico, ao nível de significância p<0,05.

- SHN - soro humano normal.

Tabela 8 – Resultados do efeito de açúcares e quitina na aderência dos isolados de *P.brasiliensis* Pb18 e Pb265 às células Vero.

Vero	Aderência relativa % ± D.P.		
Açúcares	Pb18	Pb265	p^a
Sem tratamento	100	100	-
D(+)glucosamina	52,4±6,7	48,5±1,4	p<0,05
D(+)galactosamina	55,3±7,3	50,1±6,0	p<0,05
alfa-lactose	89,7±8,2	93,4±5,8	p>0,05
D(+)manose	65,1±12,7	55,4±6,2	p<0,05
mio-inositol	97,5±11,7	97,4±10,5	p>0,05
D(+)galactose	98,0±9,0	119,3±5,7	p>0,05
D(+)glicose	101,4±1,2	94,8±21,6	p>0,05
Maltose	94,3±2,5	104,4±13,8	p>0,05
Quitina	94,7±5,6	90,8±16,0	p>0,05

-Dados apresentam a média mais ou menos o desvio padrão de 3 experimentos.

-p^a: teste estatístico, mostrando o efeito dos tratamentos e significativo quando ao nível de p<0,05.

Tabela 9- Resultados do efeito de açúcares e quitina na aderência de *P.brasiliensis* às células HeLa.

HeLa	Aderência relativa % ± D.P.		
Açúcares	Pb18	Pb265	p^a
Sem tratamento	100	100	-
D(+)glucosamina	70,1±5,6	58,1±9,0	p<0,05
D(+)galactosamina	70,7±5,5	51,4±1,6	p<0,05
alfa-lactose	91,1±8,5	100,1±5,6	p>0,05
D(+)manose	60,3±6,7	65,2±3,5	P<0,05
mio-inositol	90,4±10,9	92,4±13,8	p>0,05
D(+)galactose	97,1±9,8	108,4±4,8	p>0,05
D(+)glicose	101,0±9,5	97,6±5,7	p>0,05
maltose	91,71±9,0	94,51±8,2	p>0,05
quitina	93,9±4,0	99,6±4,2	p>0,05

-Dados apresentam a média mais ou menos o desvio padrão de 3 experimentos.

- p^a: teste estatístico mostrando ser significativo ao nível de p<0,05

Tabela 10 – Resultados do efeito de açúcares no processo de adesão de *P.brasiliensis* às células Vero por ensaio competitivo.

Vero	Aderência relativa % \pm DP		
	Isolados fúngicos		
	Pb18	Pb265	P ^a
Controle	100	100	-
Glicose	96,0 \pm 1,5	91,3 \pm 6,7	p>0,05
Manose	68,5 \pm 2,5	60,3 \pm 4,7	p<0,05
Galactosamina	65,5 \pm 3,9	73,7 \pm 4,9	p<0,05
Galactose	88,9 \pm 6,2	88,8 \pm 6,9	p>0,05
Glucosamina	69,3 \pm 2,5	69,1 \pm 2,8	p<0,05

- Dados apresentam a média mais ou menos o desvio padrão de 3 experimentos.

- p^a: teste estatístico significativo (p<0,05).

Tabela 11- Resultados do efeito de açúcares no processo de adesão de *P. brasiliensis* às células HeLa por ensaio competitivo.

HeLa	Aderência relativa % \pm DP		
	Isolados fúngicos		
	Pb18	Pb265	P ^a
Controle	100	100	-
Glicose	90,2 \pm 7,9	88,5 \pm 9,5	p>0,05
Manose	62,6 \pm 5,6	71,2 \pm 10,3	p<0,05
Galactosamina	65,6 \pm 8,3	71,0 \pm 3,9	p<0,05
Galactose	91,3 \pm 5,7	89,1 \pm 7,7	p>0,05.
Glucosamina	72,7 \pm 9,0	67,6 \pm 13,2	p<0,05

- Dados apresentam a média mais ou menos o desvio padrão de 3 experimentos.

- p^a: teste estatístico significativo (p<0,05).

Tabela 12 – Resultados do efeito da laminina no processo de adesão às células Vero em ensaio competitivo.

Vero	Aderência relativa % \pm DP	
	Isolado	
	Pb18	Pb265
Controle	100	100
Laminina	58,7 \pm 7,6 ^a	89,6 \pm 14,8

Dados estatísticos apresentam a média mais ou menos o desvio padrão de 3 experimentos.

a: teste estatístico significante (p<0,05).

Tabela 13 – Resultados do efeito da laminina no processo de adesão às células HeLa em ensaio competitivo.

HeLa	Aderência relativa % \pm DP	
	Isolado	
	Pb18	Pb265
Controle	100	100
Laminina	60,8 \pm 9,2 ^a	92,7 \pm 12,5

Dados estatísticos apresentam a média mais ou menos o desvio padrão de 3 experimentos.

a: teste estatístico significância ($p < 0,05$).

Tabela 14- Resultados do efeito de peptídeos sintéticos derivados da laminina na aderência de *P.brasiliensis* às células Vero.

Vero	Aderência relativa % \pm DP	
	Isolados	
	Pb18	Pb265
Controle	100	100
YIGSR ¹	43,0 \pm 5,4 ^{a,b}	85,8 \pm 5,5 ^b
CDPGYIGSR-NH ₂ ¹	52,8 \pm 5,1 ^{a,b}	82,8 \pm 9,4 ^b

- Dados apresentam a média mais ou menos o desvio padrão de 3 experimentos.

a: teste estatístico, significante entre tratamentos ($p < 0,05$).

b: teste estatístico significante entre os isolados ($p < 0,05$).

-1-derivados de laminina

Tabela 15-Resultados do efeito de peptídeos sintéticos derivados da laminina na aderência de *P.brasiliensis* às células HeLa.

HeLa	Aderência relativa % \pm DP	
	Isolado	
	Pb18	Pb265
Controle	100	100
YIGSR ¹	46,9 \pm 8,0 ^{a,b}	84,8 \pm 10,1 ^b
CDPGYIGSR-NH ₂ ¹	52,6 \pm 8,5 ^{a,b}	83,5 \pm 12,3 ^b

Dados apresentam a média mais ou menos o desvio padrão de 3 experimentos.

a: teste estatístico, significativo entre tratamentos ($p < 0,05$).

b: teste estatístico significativo entre as amostras ($p < 0,05$).

1- derivados de laminina.