

Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho”
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara
Programa de Pós Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia

**Análise funcional da proteína 14-3-3 de *Paracoccidioides brasiliensis* e
prospecção de alvos terapêuticos inibidores da interação de *P. brasiliensis* à
pneumócitos**

Patricia Akemi Assato

Araraquara

2014

Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho”
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara
Programa de Pós Graduação em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia

**Análise funcional da proteína 14-3-3 de *Paracoccidioides brasiliensis* e
prospecção de alvos terapêuticos inibidores da interação de *P. brasiliensis* à
pneumócitos**

Patricia Akemi Assato

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

Orientadora: Ana Marisa Fusco Almeida
Co-orientador: Cleslei Fernando Zanelli

Araraquara

2014

Ficha Catalográfica

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

A844a Assato, Patricia Akemi
Análise funcional da proteína 14-3-3 de *Paracoccidioides brasiliensis* e prospecção de alvos terapêuticos inibidores da interação de *P. brasiliensis* à pneumócitos / Patricia Akemi Assato. – Araraquara, 2014
153 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Biotecnologia e Biotecnologia aplicadas à Farmácia
Orientador: Ana Maria Fusco de Almeida
Coorientador: Cleslei Fernando Zanneli

1. *Paracoccidioides brasiliensis*. 2. Proteína 14-3-3. 3. Paracoccidioidomicose. I. Almeida, Ana Maria Fusco de, orient. II. Zanneli, Cleslei Fernando, coorient. III. Título.

CAPES: 40300005

Este trabalho foi desenvolvido na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara/SP – UNESP, sendo a mestranda contemplada com bolsa CAPES e contou com auxílio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP – (processo nº 2011/18038-9) e CNPq (processo nº 473119/2010-2).

Agradecimentos especiais

Agradeço aos meus pais, **Fernando** e **Luiza**, vocês são minha base, meus exemplos. Obrigada pela dedicação, por sempre estarem ao meu lado, por todos os ensinamentos, por entenderem quando tenho que ficar um tempo sem voltar e por virem me visitar, mesmo trabalhando tanto, mas agradeço principalmente pelo amor, esse amor incondicional que me dá forças para sempre seguir em frente. Todas minhas conquistas são e serão dedicadas a vocês, sem vocês nada seria. E minhas irmãs, **Fernanda** e **Mileine**, desde sempre minhas melhores amigas, sinto tanta saudade de vocês, das conversas no quarto até tarde, das risadas, dos momentos de férias na praia. Infelizmente hoje esses momentos que não acontecem com muita frequência, mas ainda bem que mesmo longe conseguimos ficar perto. Agradeço todo apoio e amor. Amo vocês!

Aos meus familiares, em especial minhas avôs **Hideko** e **Hatue** e ao meu avô **Seisho**, pelo apoio e amor.

A minha orientadora, Prof. Dra. **Ana Marisa Fusco Almeida**, agradeço a oportunidade dada há quatro anos, quando aceitou orientar meu trabalho de conclusão de curso e posteriormente no desenvolvimento desse trabalho, obrigada pela orientação, pelos conselhos e conversas. Agradeço a confiança em mim e no meu trabalho.

Ao co-orientador, Prof. Dr. **Cleslei Fernando Zanelli**, agradeço toda ajuda e suporte indispensáveis para realização deste trabalho.

As pessoas me auxiliaram no desenvolvimento desse trabalho, **Julhiany de Fátima e Silva**, **Haroldo César de Oliveira**, **Caroline Maria Marcos** e **Ana Carolina Alves de Paula e Silva**, obrigada pela ajuda nos experimentos e pelos ensinamentos.

Agradecimentos

A **Prof. Dr. Maria José Soares Mendes Giannini** que auxiliou no desenvolvimento deste trabalho e por quem tenho profunda admiração.

Agradeço a **Dr. Danuza Rossi**, a **Mariana Marchi Santoni** e aos alunos do Laboratório de Biologia Molecular da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Unesp pela colaboração no desenvolvimento deste trabalho

A grande família **Micologia**, com quem passo a maior parte do tempo e com quem divido minhas felicidades, preocupações e conquistas. Agradeço a todos que fazem parte dessa família que de alguma maneira contribuíram para o meu desenvolvimento pessoal e profissional.

Agradeço a **Rosângela**, você é a nossa mãe, aquela que escuta, cuida, dá conselhos e broncas. Obrigada por tudo, Rô!

Agradeço a **Julhiany** pela paciência, disposição e broncas que tanto contribuíram para meu amadurecimento, por toda contribuição neste trabalho e pela amizade que formamos ao longo destes anos, você faz falta! Ao **Haroldo** uma pessoa que admiro muito, alguém que se tornou um amigo querido e sempre disposto a ajudar. Agradeço por toda ajuda ao longo desses anos. A **Caroline** (Panta) responsável pela minha entrada no laboratório, uma grande amiga que se tornou companheira de laboratório e por quem tenho grande admiração. Obrigada pela amizade, pela ajuda no laboratório e por ainda estar por perto ainda, depois de tantas mudanças. A **Ana Carolina, Liliana e Suélen** que logo se tornaram muito mais que companheiras de trabalho, são amigas queridas que sempre me ajudam, dentro e fora do laboratório. Obrigada pelas conversas, pelo apoio e pelo companheirismo! A **Fernanda Sangalli** que já não está mais no laboratório, mas sempre será uma pessoa muito querida, que faz falta todos os dias! A **Natália** por sempre estar disposta a ajudar e conversar, passamos por tanta coisa juntas durante este período, que acabamos construindo uma amizade. A **Junya, Caroline B., Luana, Fernanda Campos, Nayla, Fernanda Gullo, Janaína, Jaqueline, Mônica, Paulo e Warley** por sempre estarem dispostos a ajudar quando precisei. A **Wanessa** que mal chegou e já se tornou uma pessoa querida, obrigada pelo apoio. A **Daniella**, que nos ajudou tanto, sempre disposta a aprender e ajudar, obrigada Tomate! À **Cláudia** pelo auxílio técnico, especialmente nas etapas finais deste trabalho e pela amizade.

Aos agregados Micologia, **Rosemira, Marisa, Eliana, Márcia, Jandira, Cida**, agradeço a companhia sempre acompanhada de muitas risadas.

Aos amigos, **Cris, Má, Ester, Ana, Isa, Lila, Morgane, Zé, Dú, Felipe, Leo, Mari, Sabrina, Fer Polverari, Verônica, Abra**, a todas **KTK's**, a minhas queridas **FSF, Fernanda e Thais**, e todas as pessoas que estiveram ao meu lado, de perto ou de longe, sempre torcendo por mim. Obrigada pelas conversas e por todos os momentos de descontração, como churrascos, reencontros, almoços, tereré ou simplesmente uma visita para colocar a conversa em dia.

Agradeço a equipe da **Seção de Pós Graduação** pelo apoio técnico necessário para o desenvolvimento deste trabalho.

A **CAPES** – Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior pela bolsa concedida e a **FAPESP** pelo auxílio financeiro para o desenvolvimento deste trabalho

Sumário

Lista de Figuras	10
Lista de Tabelas.....	11
Resumo	12
Abstract.....	13
Capítulo 1	14
1. Introdução	14
2. Objetivos.....	23
2.1 Objetivos Gerais	23
2.2 Objetivos Específicos	23
3. Materiais e Métodos.....	24
3.1 Microrganismos e condições de cultivo	24
3.2 Cultura de células	24
3.3 Extração do RNA de <i>P. brasiliensis</i>	24
3.4 Síntese do cDNA codificante da proteína 14-3-3 de <i>P. brasiliensis</i>	25
3.5 Extração de DNA de <i>S. cerevisiae</i>	25
3.6 Preparo de bactérias ultracompetentes <i>E. coli</i> DH5α e DH10B	26
3.7 Construção do homólogo funcional de 14-3-3Pb em <i>S. cerevisiae</i>	27
3.7.1 Estratégia <i>Overlap</i>	27
3.7.1.1 Obtenção do fragmento híbrido contendo a região codificadora da proteína 14-3-3 de <i>P. brasiliensis</i>	27
3.7.1.2 Clonagem.....	31
3.7.1.3 Transformação em bactérias <i>E. coli</i> DH10B ultracompetentes	33
3.7.1.4 Confirmação da transformação.....	34
3.7.2 Estratégia pYES	34
3.7.2.1 Obtenção da região codificadora da proteína 14-3-3 de <i>P. brasiliensis</i> ..	34
3.7.2.2 Clonagem.....	35
3.7.2.3 Transformação em bactérias <i>E. coli</i> DH5α ultracompetentes.....	36
3.7.2.4 Confirmação da transformação.....	37
3.7.3 Transformação em levedura.....	37
3.7.4 Avaliação da complementação.....	38
3.7.5 Teste de Adesão	38
3.8 Teste de Sensibilidade.....	39
3.9 Análise do anticorpo monoclonal anti-14-3-3 (Mab14-3-3).....	40

3.9.1	Obtenção do Mab 14-3-3.....	40
3.9.2	Ensaio de inibição da adesão de <i>P. brasiliensis</i> a células A549	40
4.	Resultados e Discussão.....	42
4.1	Alinhamento das sequências de aminoácidos Bmh1p e Bmh2p de <i>S. cerevisiae</i> e da sequência da proteína 14-3-3 de <i>P. brasiliensis</i>	42
4.2	Confirmação do nocaute das linhagens de <i>S. cerevisiae</i> $\Delta bmh1$ e $\Delta bmh2$	42
4.3	Construção do homólogo funcional 14-3-3Pb em <i>S. cerevisiae</i>	43
4.3.1	Estratégia <i>Overlap</i>	43
4.3.2	Estratégia pYES.....	47
4.3.3	Avaliação da complementação de 14-3-3Pb	50
4.3.4	Teste de Adesão	54
4.4	Teste de sensibilidade	56
4.5	Ensaio de inibição da adesão de <i>P. brasiliensis</i>	63
5.	Conclusões	65
6.	Referências Bibliográficas.....	66
Capítulo 2	74

Lista de Figuras

Figura 1 Esquema representativo da Estratégia <i>Overlap</i>	30
Figura 2 Mapa dos vetores utilizados na clonagem do fragmento híbrido.....	32
Figura 3 Mapa do vetor utilizado na clonagem do gene <i>BMH1</i> de <i>S. cerevisiae</i>	33
Figura 4 Mapa do vetor pYes2 (Invitrogen).....	35
Figura 5 Alinhamento da sequência de aminoácido de Bmh1 e Bmh2 de <i>S. cerevisiae</i> e 14-3-3 de <i>P. brasiliensis</i>	42
Figura 6 Confirmação do nocaute dos genes de <i>BMH1</i> e <i>BMH2</i> das linhagens de <i>S. cerevisiae</i> $\Delta bmh1$ e $\Delta bmh2$	43
Figura 7 Amplificação dos fragmentos 3'UTR, 5'UTR e <i>BMH1</i> de <i>S. cerevisiae</i> e da região codificadora da proteína 14-3-3 de <i>P. brasiliensis</i>	44
Figura 8 Obtenção do fragmento híbrido.....	44
Figura 9 Gel de agarose 0,8% para confirmação dos clones.....	46
Figura 10 Confirmação da amplificação da ORF de 14-3-3Pb e da ORF de <i>BMH1Sc</i>	47
Figura 11 Confirmação da digestão do vetor pYES2 (Invitrogen) por gel de agarose 0,8%.	48
Figura 12 Confirmação da transformação do plasmídeo pYES-14-3-3Pb em <i>E. coli</i> DH5 α .	49
Figura 13 Confirmação da transformação do plasmídeo pYES- <i>BMH1Sc</i> em <i>E. coli</i> DH5 α .	50
Figura 14 Avaliação da complementação de 14-3-3Pb em <i>S. cerevisiae</i>	51
Figura 15 Gráficos dos perfis de adesão dos transformantes de <i>S. cerevisiae</i>	54
Figura 16 Padronização do inoculo de <i>S. cerevisiae</i> <i>wt</i> , $\Delta bmh1$ e $\Delta bmh2$ para o teste de sensibilidade.....	57
Figura 17 Teste de sensibilidade aos antifúngicos VCZ, ITZ e AMB.....	59
Figura 18 Teste de sensibilidade aos derivados de ácido gálico.	62
Figura 19 Gráfico da inibição da adesão de <i>P. brasiliensis</i> , isolado Pb18, às células epiteliais A549.....	64

Lista de Tabelas

Tabela 1 Derivados dos ácidos gálicos	40
Tabela 2 CIMs dos antifúngicos VCZ, ITZ e AMB para as cepas de <i>S. cerevisiae</i> wt, $\Delta bmh1$ e $\Delta bmh2$	58
Tabela 3 Valores de CIMs para derivados de ácido gálico das cepas de <i>S. cerevisiae</i> wt, $\Delta bmh1$ e $\Delta bmh2$	61

Resumo

Paracoccidioidomicose (PCM) é uma micose sistêmica endêmica na América Latina, de alta prevalência no Brasil, que tem como agente etiológico os fungos dimórficos do gênero *Paracoccidioides*, *P. brasiliensis* e *P. lutzii*. No processo de infecção as adesinas, substâncias sintetizadas por estes fungos que se ligam a matriz extracelular, são importantes fatores de virulência para o estabelecimento da infecção. A proteína de 30kDa, pertencente a família de proteínas 14-3-3, se destaca no processo adesivo deste fungo. As proteínas 14-3-3 são uma família de proteínas presentes em todas as células eucariotas e possuem múltiplas funções. Em *P. brasiliensis*, a proteína 14-3-3Pb, liga-se a laminina, principal componente da matriz extracelular das células hospedeiras, e durante a infecção sua expressão é aumentada. Com o intuito de compreender melhor a função desta proteína o objetivo deste estudo foi realizar a análise funcional da 14-3-3Pb através da obtenção de um homólogo funcional em *S. cerevisiae* e análise do anticorpo monoclonal anti-14-3-3Pb. *S. cerevisiae* foi escolhida como modelo de estudo por ser uma levedura amplamente utilizada na pesquisa genética, ao contrário de *P. brasiliensis*, e por possuir duas isoformas de 14-3-3, Bmh1p e Bmh2p, com alta identidade com 14-3-3Pb. Para obtenção do homólogo funcional, foi realizada a transformação do vetor pYES-14-3-3Pb em *S. cerevisiae*. A partir da obtenção dos transformantes a avaliação da complementação foi realizada e foi observado uma complementação parcial das proteínas Bmh1p e Bmh2p por 14-3-3Pb. Ainda foram realizados teste de sensibilidade aos antifúngicos e a derivados semissintéticos do ácido gálico, onde foi possível observar um aumento da sensibilidade das linhagens com nocaute para os genes *BMH1* e *BMH2*, *S. cerevisiae* $\Delta bmh1$ e $\Delta bmh2$, quando comparado à linhagem selvagem. A análise do anticorpo monoclonal foi realizada através de ensaio de adesão onde foi possível observar uma diminuição da adesão de *P. brasiliensis* às células A549 mediante ao tratamento com anticorpo monoclonal, porém a associação com derivados do ácido gálico não acarretou aumento da inibição. Esses resultados sugerem uma alta similaridade nas funções exercidas por 14-3-3Pb e as proteínas Bmh1p e Bmh2p, seu possível envolvimento em vias de síntese de ergosterol e a importância da 14-3-3Pb na adesão aos hospedeiros, permitindo um maior conhecimento de suas funções em *P. brasiliensis*.

Abstract

Paracoccidioidomycosis (PCM) a systemic mycosis endemic in Latin America, with high prevalence in Brazil, has as etiological agent dimorphic fungi *Paracoccidioides* spp., *P. brasiliensis* e *P. lutzii*. During the infection process the adhesins, substances synthesized by fungi that interacts with host's extracellular matrix (ECM), are important virulence factors for the establishment of infection. A 30kDa protein that belongs to 14-3-3 proteins family stands out in the adhesion process of this fungus. The 14-3-3 proteins are present in all eukaryotic cells and play multiple functions. In *P. brasiliensis*, the 14-3-3Pb protein binds to lamin, the major component of ECM from host cells, and during the infection the expression is increased. In order to have a better understanding of 14-3-3Pb functions the aim of this study is to perform a functional analysis of this protein through achieving a functional homologous in *S. cerevisiae* and to analyze the monoclonal antibody anti-14-3-3Pb during infection. *S. cerevisiae* was chosen as model because it's widely use in genetic research, unlike *P. brasiliensis*, and has two isoforms of 14-3-3 proteins, Bmh1p and Bmh2p, with high identity with 14-3-3Pb. The functional homologous were obtained by yeast transformation of pYES-14-3-3Pb vector. Complementation assay was performed with obtained transformants, and it was observed that 14-3-3Pb partially complements Bmh1p and Bmh2p, with higher complementation of Bmh2p. Also susceptibility assays were performed with antifungal drugs and semi-synthetic compounds derived from gallic acid where it was observed that *S. cerevisiae* wild type was less sensitive to antifungals than the knockout strains, *S. cerevisiae* $\Delta bmh1$ and $\Delta bmh2$. Monoclonal antibody anti14-3-3Pb was evaluated alone and in association with substances with antifungal activities through inhibition adhesion assay, where it was observed that the anti-14-3-3Pb alone is able to inhibit *P. brasiliensis* adhesion to pulmonary epithelial cell, A549, but the association didn't promote an increase of inhibition. This results suggests that 14-3-3Pb may play important role in the metabolism of ergosterol, once this antifungal targets are proteins involved in ergosterol metabolism and the important role of 14-3-3Pb in cell adhesion contributing for a better understanding of its function in *P. brasiliensis*.

Capítulo 1

1. Introdução

Paracoccidioidomicose

Estima-se que cerca de 100 espécies de fungos são patógenos humanos causando alergias, doenças superficiais e invasivas. A partir da década de 80, os fungos são os maiores causadores de doenças em humanos, apresentando alta morbidade e mortalidade, devido ao aumento de indivíduos imunocomprometidos, ao uso de antibióticos e quimioterápicos (Horn *et al.*, 2012; Falcone *et al.*, 2014).

As micoses invasivas são as formas mais graves das infecções fúngicas, sendo a paracoccidioidomicose (PCM) uma das mais importantes em nosso meio devido sua frequência e gravidade de algumas manifestações clínicas (Franco *et al.*, 1994). A PCM é uma doença geograficamente restrita a América Latina, com maior prevalência no Brasil, seguido por Venezuela, Colômbia, Equador e Argentina (Brummer, Castaneda e Restrepo, 1993; Mendes-Giannini *et al.*, 2004; Ameen, Talhari e Talhari, 2010). Estima-se que cerca de 10 milhões de pessoas em áreas endêmicas já entraram em contato com o fungo (San-Blas, Niño-Vega e Iturriaga, 2002). Entre as doenças infecciosas e parasitárias, a PCM apresenta-se como a oitava causa de morte, possuindo a maior taxa de mortalidade entre as micoses sistêmicas no Brasil, apresentando mortalidade de até 59,9% em áreas endêmicas, sendo as regiões Sudeste e Sul, especificamente São Paulo, Minas Gerais, Paraná e Rio Grande do Sul, as que apresentaram o maior número de casos. (Coutinho *et al.*, 2002; Santo, 2008; Prado *et al.*, 2009).

As manifestações clínicas são variadas, sendo que o acometimento pulmonar e lesões na mucosa oral são as mais comuns, apresentando-se em 63,8% e 50% dos casos, respectivamente, linfadenopatia generalizada e lesões cutâneas, que são mais comuns em pacientes mais jovens. Além dessas, o comprometimento do baço, estômago, laringe, sistema nervoso central, ossos e adrenais pode ocorrer, porém com menor frequência (Bellissimo-Rodrigues *et al.*, 2013).

A aquisição da doença ocorre através da inalação de conídios da forma micelial do fungo. Nos alvéolos pulmonares, sob o estímulo da temperatura, o fungo sofre transição para a forma leveduriforme (Mcewen *et al.*, 1987). O estabelecimento e desenvolvimento da doença dependem de vários fatores, uma vez que a interação fungo-hospedeiro é um evento complexo e dinâmico. Os fungos, causadores de micoses sistêmicas, possuem inúmeros fatores que podem causar danos ao

hospedeiro e que auxiliam no estabelecimento, na colonização, na disseminação e na capacidade de resistir ao ambiente hostil criado pela resposta imune do hospedeiro na tentativa de combater a infecção (Mendes-Giannini *et al.*, 2000; Filler e Sheppard, 2006; Rappleye e Goldman, 2006). Assim, a doença pode-se apresentar na forma aguda, crônica e residual.

A forma aguda, também chamada de juvenil por acometer principalmente indivíduos jovens de ambos os sexos, é a forma mais comumente desenvolvida por pacientes imunocomprometidos. Considerada a forma mais grave, por possuir uma rápida evolução, ocasionando febre, perda de peso e anemia, as lesões cutâneas são frequentes, bem como o acometimento do sistema imune, linfonodos, baço, medula óssea, apresentando uma alta taxa de mortalidade.

A forma crônica acomete principalmente adultos do sexo masculino, é a forma mais comum da doença, de evolução mais lenta, podendo não apresentar manifestações clínicas por anos ou décadas, tem como principal característica o acometimento do trato respiratório inferior, podendo se disseminar para outros órgãos e tecidos (Restrepo *et al.*, 2008; Bocca *et al.*, 2013). A maior prevalência no sexo masculino está relacionada à presença de um receptor de esterol que se liga ao estradiol, hormônio feminino, desencadeando resposta imune e possivelmente impedindo a transição da forma miceliar para leveduriforme, essencial para o estabelecimento da doença. (Loose *et al.*, 1983; Shankar *et al.*, 2011). Loth e colaboradores (2011), descreveram 102 novos casos de PCM em 18 meses em Foz do Iguaçu - Paraná, sendo que 91,1% dos casos apresentavam-se na forma crônica e 8,8% na forma aguda.

A forma residual está relacionada com sequelas de lesões antigas provocadas pela doença manifestando-se como uma insuficiência pulmonar crônica devido à fibrose, sequela mais grave (Franco *et al.*, 1994; De Abreu E Silva *et al.*, 2012; Marques, 2013).

O diagnóstico padrão é a visualização de células características, com múltiplos brotamentos, no exame direto em fluidos biológicos ou histopatológicos ou através do isolamento dos fungos de espécimes clínicas. Exames imunológicos também são utilizados para o diagnóstico e acompanhamento do paciente, sendo as técnicas de imunodifusão e contraímunoeletrofores as mais utilizadas devido ao custo-especificidade. O imunoensaio enzimático (ELISA) também pode ser aplicado no diagnóstico, porém possui um custo maior e reações cruzadas em pacientes com

histoplasmose ou com a doença de Jorge Lobo, já foram relatadas. O *Imunoblotting* normalmente utilizado como exame comprobatório e acompanhamento da terapia, utilizando as glicoproteínas de 43kDa e 70kDa, gp43 e gp70 (Fraser *et al.*, 1999; De Camargo e De Franco, 2000; San-Blas, Niño-Vega e Iturriaga, 2002; Ameen, Talhari e Talhari, 2010).

A terapêutica varia de acordo com a severidade da doença, do sistema imune do paciente e da disponibilidade do medicamento. Os fármacos de escolha são: itraconazol para as formas mais leves e moderadas e anfotericina B, para as formas mais graves da doença, porém a associação sulfametoxazol-trimetropim, apesar de possuir menor eficácia e exigir um período de tratamento mais prolongado, é amplamente utilizada, devido sua disponibilidade no sistema de saúde público e custo. A alta toxicidade associada à anfotericina B; os longos períodos de tratamento com itraconazol, que acabam resultando no abandono do tratamento pelo paciente; o aumento de pacientes imunodeprimidos ou com co-infecção, que apresentam maiores problemas em relação à terapia devido a interações medicamentosas e/ou efeitos adversos despertam a necessidade de novas alternativas terapêuticas, como prospecção de substâncias naturais com potencial antifúngico (Ghannoum e Rice, 1999; Krcmery, 2005; Shikanai-Yasuda *et al.*, 2006; Di Santo, 2010; Marques, 2013).

Complexo *Paracoccidioides* spp.

A primeira descrição de *Paracoccidioides* spp. foi realizada por Adolpho Lutz, em 1908 e em 1911 recebeu a denominação *Zymonema brasiliensis* após estudos morfológicos de Alfonso Splendore. Em 1930, após estudos comparativos entre a doença no Brasil e um granuloma coccidióco presente nos Estados Unidos, provocado por *Coccidioides immitis*, o gênero *Paracoccidioides* foi criado mantendo-se a espécie *brasiliensis* proposta por Splendore, pertencente ao reino *Fungi*; divisão *Eumycota*; ordem *Onygenales* e família *Ajjelomycetaceae* (Da Silva Lacaz, 2002).

Em estudos filogenéticos realizados com 65 isolados de *P. brasiliensis*, provenientes de seis áreas endêmicas, Matute e colaboradores (2006) identificaram três espécies filogenéticas em *P. brasiliensis*, denominadas S1, PS2 e PS3, sendo S1 um grupo parafilético, contendo isolados provenientes da Argentina, Brasil, Peru e Venezuela; PS2 um grupo monofilético, com isolados encontrados no Brasil e Venezuela e; PS3 grupo monofilético, restrito a Colômbia.

Carrero e colaboradores (2008) através de estudos de regiões codificadora e não codificadoras de vários genes e da região ITS utilizando 21 isolados, sendo sete novos isolados obtiveram resultados semelhantes aos de Matute e colaboradores (2006), sendo agrupados nas espécies filogenéticas S1 e PS3, porém o isolado Pb01 apresentou distanciamento das três espécies filogenéticas, e uma nova espécie filogenética foi proposta, denominada Pb-01-*like*. Posteriormente, Teixeira e colaboradores (2009), em estudos comparativos entre a espécie filogenética Pb-01-*like* e as outras três espécies filogenéticas (S1, PS2 e PS3), identificaram que entre os 88 isolados estudado, 17 pertenciam à espécie filogenética Pb-01-*like* e sugeriram um possível isolamento reprodutivo desta espécie filogenética propondo a separação desta como uma nova espécie, denominada *Paracoccidioides lutzii*.

Paracoccidioides spp é um complexo formado por fungos dimórficos, que sofrem a transição de micélio para levedura devido à alteração de temperatura (Mcewen *et al.*, 1987), à temperatura ambiente, 25°C a 27°C crescem como micélios produzindo conídios, considerada a fase infectante do fungo, macroscopicamente, apresenta-se na forma de colônias brancas, cotonosas. A 37°C em meios enriquecidos ou no hospedeiro, o fungo se encontra na forma leveduriforme, fase parasitária, apresentando-se como células arredondadas de parede dupla e múltiplos brotamentos, que formam colônias de aparência cerebriforme e levemente amareladas (Franco *et al.*, 1994).

O fungo tem como habitat natural solos ricos, água e plantas, porém são frequentemente isolados de tatus, *Dasytus novemcinctus* e *Cabassous centralis*, de áreas endêmicas devido ao grande contato que possuem com o solo, e acredita-se que eles auxiliam na disseminação de esporos (Bagagli *et al.*, 2003).

Os fungos do complexo *Paracoccidioides* tem a capacidade de aderir, extravasar e invadir as barreiras impostas pelo hospedeiro. Dependendo do isolado fúngico e da resposta do hospedeiro, o fungo pode apresentar diferentes fenótipos de crescimento sintetizando inúmeras substâncias ou moléculas que participam de forma direta ou indireta na relação fungo-hospedeiro (Lenzi *et al.*, 2000; Mendes-Giannini *et al.*, 2000; Mendes-Giannini *et al.*, 2004). Um importante fator para a relação fungo-hospedeiro e o estabelecimento da infecção é a habilidade de *Paracoccidioides spp.* em aderir aos componentes da matriz extracelular da célula hospedeira que ocorre através da secreção de substâncias denominadas adesinas (Mendes-Giannini *et al.*, 2006). Diversas adesinas já foram descritas para os fungos

do complexo *Paracoccidioides* spp. entre elas a glicoproteína de 43kDa (gp43), gliceraldeído-3-fostato desidrogenase (GAPDH), triosefosfato isomerase (TPI), malato sintase (MLS), enolase (ENO) e uma proteína de 30kDa, posteriormente classificada como uma proteína 14-3-3.

A glicoproteína de 43 kDa de *P. brasiliensis* é a molécula mais estudada deste fungo, sendo descrita como um fator de virulência de *P. brasiliensis* e está relacionada com a adesão à células epiteliais, através da interação com componentes da matriz extracelular (Hanna, Monteiro Da Silva e Giannini, 2000). Em estudo de Torres *et al.*(2013) foi observado que a diminuição de gp43 na parede celular prejudica a interação com as células dos hospedeiros e na fagocitose das leveduras, além de sugerir que a gp43 pode possuir um efeito imunomodulador que auxiliaria a evasão de *P. brasiliensis* do sistema imune do hospedeiro, contribuindo para o estabelecimento da infecção.

A enzima glicolítica gliceraldeído-3-fostato desidrogenase (GAPDH) é encontrada em grande quantidade na parede celular de *P. brasiliensis*, na porção mais externa da parede. Provavelmente está envolvida nos estágios iniciais da infecção, podendo se ligar aos componentes da matriz extracelular de células dos hospedeiros como laminina, fibronectina e colágeno tipo I. Também já foi observada diminuição na adesão e infecção do fungo à pneumócitos após tratamento com GAPDH e após incubação de *P. brasiliensis* com anticorpo policlonal anti-GAPDH (Barbosa *et al.*, 2006).

Em estudos de Pereira e colaboradores (2007), observou-se que a produção da proteína triose fosfato isomerase (TPI) aumenta conforme *P. brasiliensis* sofre a transição de micélio para levedura, sugerindo um papel importante durante a infecção. Além disso, demonstrou que esta proteína liga-se a laminina e fibronectina.

A proteína malato sintase (MLS), previamente descrita como uma adesina de *Mycobacterium tuberculosis*, também pode estar envolvida na adesão de *P. brasiliensis* uma vez que ao tratar células epiteliais A549 com a proteína recombinante a taxa de adesão de *P. brasiliensis* a estas células é reduzida, assim como após o tratamento de *P. brasiliensis* com anticorpos policlonais anti-MLS. Além disso, já foi demonstrado que MLS é um ligante de fibronectina e colágenos tipos I e IV (Da Silva Neto *et al.*, 2009).

Nosso grupo através de Donofrio e colaboradores (2009) identificou e caracterizou a proteína enolase (ENO) de *P. brasiliensis* como ligante de fibronectina

e relataram uma diminuição de 82%, na adesão do fungo em células epiteliais cultivadas após tratamento com anticorpos policlonais anti-enolase. Em estudo posterior, foi demonstrado que durante a infecção, a presença da ENO na parede celular aumenta, confirmando que esta proteína tem um importante papel na adesão durante a infecção (Marcos *et al.*, 2012).

Em outro estudo de nosso grupo Andreotti e colaboradores (2005) descreveram uma proteína de 30kDa que foi diferencialmente expressa após a recuperação do isolado em animal. Esta proteína apresentou-se como ligante de laminina, componente majoritário da membrana basal, que apresenta um importante papel na adesão e na interação patógeno-hospedeiro. Em células Vero pré-tratadas com a proteína de 30kDa foi observado uma grande inibição de adesão e infecção de *P. brasiliensis* quando comparado com células previamente tratadas com gp43, sugerindo um papel importante dessa proteína na virulência do fungo. Em estudo posterior a proteína de 30kDa foi identificada como pertencente à família de proteínas 14-3-3 (Da Silva *et al.*, 2013).

Proteínas 14-3-3

As proteínas 14-3-3 foram primeiramente descritas como proteínas específicas do cérebro, relacionadas à síntese de neurotransmissores, porém podem ser encontradas em todos os tecidos e organismos eucariotos já estudados. Estas proteínas constituem uma família de proteínas altamente conservadas, pequenas, diméricas e ácidas, podendo apresentar múltiplas isoformas, como por exemplo, em mamíferos foram descritas sete isoformas. Em plantas, como *Arabidopsis thaliana* que possui 13 isoformas e em leveduras, como *Saccharomyces cerevisiae* possui 2 isoformas (Obsil e Obsilova, 2011).

Já foram descritas mais de 500 proteínas que interagem com as proteínas 14-3-3, e estas possuem múltiplas funções em diversos processos celulares, entre eles, apoptose, transdução de sinal, regulação do ciclo celular e transcrição (Fu, Subramanian e Masters, 2000; Ottmann, 2013). Em humanos, as proteínas 14-3-3 são amplamente estudadas, podendo ser relacionadas com o câncer e doenças neurodegenerativas, como Creutzfeldt-Jakob, doença de Alzheimer e Parkinson, sendo estudadas como potenciais marcadores ou alvos terapêuticos (Steinacker, Aitken e Otto, 2011; Zhao *et al.*, 2011).

A primeira descrição de proteínas 14-3-3 em fungos foi realizada por Van Heusden e colaboradores (1992), em estudos realizados com o gene *BMH1* de *S. cerevisiae* onde foi observado que a proteína Bmh1p possui uma identidade maior que 50% com a proteína 14-3-3 de cérebro bovino. Posteriormente, estes pesquisadores (Van Heusden *et al.*, 1995), relataram e caracterizaram um segundo gene que expressa proteína 14-3-3 em *S. cerevisiae*, o gene *BMH2*. Em *Schizosaccharomyces pombe*, dois genes codificadores de proteínas 14-3-3, foram descritos, *RAD24* e *RAD25*, e foram relacionados à resposta ao dano ao DNA (Van Heusden e Steensma, 2006). Apesar de possuírem diferentes papéis em diferentes organismos, pouco se conhece sobre sua função em fungos patogênicos.

Em estudo realizado por Bruckmann e colaboradores (2004), foi investigado o papel da proteína 14-3-3 em *S. cerevisiae*, na regulação da transcrição onde foi demonstrado que esta proteína estimula a transcrição de genes envolvidos no metabolismo de ergosterol (*HES1*, *HMG1*, *ERG11*, *ERG1*, *ERG25* e *ERG28*) e regulam genes envolvidos na síntese de quitina em *S. cerevisiae*.

Em *Aspergillus nidulans* foi identificada a expressão de proteína 14-3-3 pelo gene *ART1*, que possui alta homologia com a proteína 14-3-3 de *P. brasiliensis*. Em *A. nidulans* esta proteína tem um importante papel na morfogênese da hifa uma vez que sua superexpressão provoca defeitos no estabelecimento do tubo germinativo e o desenvolvimento assexuado (Kraus, Hofmann e Harris, 2002).

Candida albicans também possui um gene que codifica a proteína 14-3-3, *BMH1*, que é essencial ao fungo e está envolvido no estágio inicial da germinação e na extensão da hifa, podendo regular vias de crescimento deste fungo (Kelly *et al.*, 2009).

Em *Cryptococcus neoformans*, a proteína 14-3-3 foi utilizada como marcador, para o estudo de vesículas durante a infecção cerebral, uma vez que esta proteína está presente em grande quantidade nas microvesículas, porém ainda não há relatos na literatura sobre sua função neste fungo (Huang *et al.*, 2012).

Em *Paracoccidioides brasiliensis* a proteína de 30 kDa, descrita como uma adesina ligante de laminina, foi identificada como uma proteína 14-3-3 através de sequenciamento de aminoácidos e apresenta uma alta homologia com as proteínas Bmh1p e Bmh2p de *S. cerevisiae*, de 76% e 80%, respectivamente. Em ensaios de infecção de *Paracoccidioides brasiliensis* em cultura de células e camundongos foi observado acúmulo da proteína 14-3-3 de *P. brasiliensis*, 14-3-3Pb, na parede

celular durante a infecção, tanto nos ensaios *in vitro* quanto *in vivo* (Da Silva et al., 2013). Ainda, a proteína 14-3-3Pb foi encontrada em vesículas secretadas pelo fungo, sugerindo uma importante participação desta proteína durante a interação fungo-hospedeiro (Vallejo *et al.*, 2012).

A proteína 14-3-3 de *P. brasiliensis* por esse interessante papel na interação fungo-hospedeiro se torna uma molécula de grande interesse como alvo para drogas anti-*Paracoccidioides*, já que a inibição desta proteína pode levar a uma inibição do processo de adesão, processo crucial para o estabelecimento da infecção e consequentemente a disseminação do fungo pelo organismo do hospedeiro.

***Saccharomyces cerevisiae* em estudos de análise funcional**

S. cerevisiae, ao contrário de *P. brasiliensis*, é um microrganismo extensamente utilizado na pesquisa genética por ser de fácil manipulação, de rápido crescimento e por permitir a integração de sequências de DNA exógeno em seu genoma através de recombinação homóloga (Barr, 2003). Além disso, por ter seu genoma inteiramente sequenciado (Goffeau *et al.*, 1996) é possível realizar a comparação de suas sequências gênicas com outros microrganismos, permitindo sua utilização em estudos de análise funcional. Assim a inserção de genes em *S. cerevisiae* permite o estudo de similaridade funcional de sistemas de biossíntese de proteínas ancoradas na parede da superfície celular envolvidas na morfogênese ou de potenciais GPIs que podem caracterizar moléculas envolvidas na adesão

Este tipo de estratégia já foi utilizado em diferentes fungos patogênicos. A proteína gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de *Candida magnoliae* também foi caracterizada utilizando como modelo a levedura *S. cerevisiae* (Lee *et al.*, 2005). Análises funcionais de 45 âncoras de GPI de *Candida albicans* foram realizadas, transformando plasmídios contendo as ORFs das sequências de GPIs mutagenizadas por transposon em mutantes homólogos de *S. cerevisiae* (Plaine *et al.*, 2008).

Liu e colaboradores (2013) realizaram a caracterização da proteína Hxs1 de *Cryptococcus neoformans* através da expressão heteróloga em mutante de *S. cerevisiae* *hxs1*, e demonstraram que esta proteína atua no transporte de glicose e na produção de melanina, sugerindo sua importância na virulência, bem como interação fungo-hospedeiro.

O papel da proteína transportadora ABC (ATP-binding cassette) de *Aspergillus fumigatus*, também foi estudado através desta estratégia, utilizando o mutante *pdr1Δ* de *S. cerevisiae* e os resultados sugeriram o envolvimento desta proteína no transporte de fármacos e na regulação da internalização de proteínas (Paul e Moye-Rowley, 2013).

Castro e colaboradores (2009) utilizaram esta estratégia para caracterização e análise funcional β -1,3-glicosiltransferase 3 (*PbGel3p*) de *P. brasiliensis*, utilizando o mutante de *S. cerevisiae* *gas1Δ* que possui um fenótipo diferenciado, como redução no crescimento, morfologia, na permeabilidade da parede celular. Neste estudo foi possível observar que o transformante, *PbGEL3* suprimiu as alterações morfológicas e as respostas induzidas pela ausência de Gas1p, sendo possível implicar seu papel na biossíntese e morfogênese da parede celular de *P. brasiliensis*, principalmente na fase micelar. Posteriormente, De Sousa Lima e colaboradores (2012), realizaram a caracterização da família β -1,3-glicosiltransferase (Gel) de *Paracoccidioides* spp., utilizando os isolados PI01 e Pb18 de *P. lutzii* e *P. brasiliensis*, respectivamente, mostrando a participação da proteína Gel2p na manutenção da integridade parede celular, ao contrário de Gel1p, que não suprimiu as alterações morfológicas ocasionadas pela deficiência de Gas1p em *S. cerevisiae*, porém restabeleceu o silenciamento telomérico presente no mutante *gas1Δ*, sugerindo seu envolvimento no silenciamento transcricional em *Paracoccidioides* spp..

Esta abordagem também foi utilizada para a caracterização da quitina sintase 3 de *P. brasiliensis*, utilizando como modelo o mutante nulo de *S. cerevisiae* para *CHS3*. Neste estudo, demonstrou-se que o transformante obtido apresentava uma atividade de Chs3p dobrada em relação ao controle contendo apenas o vetor. Através de ensaios de imunofluorescência observou-se a presença de uma camada mais espessa de quitina, quando comparado ao mutante que possuía apenas o vetor e ao controle positivo (Barreto *et al.*, 2010).

A manipulação genética dos fungos do complexo *Paracoccidioides* spp. é de difícil execução, sendo os mutantes pouco estáveis dificultando o estudo funcional das diferentes proteínas identificadas e com papel implicado na virulência do fungo durante a interação com o hospedeiro.

Portanto este trabalho visa elucidar as funções da proteína 14-3-3 de *P. brasiliensis*, através da obtenção do homólogo funcional utilizando como modelo a

levedura *Saccharomyces cerevisiae* e estudar a proteína como alvo terapêutico, utilizando a proteína recombinante 14-3-3 de *P. brasiliensis*, moléculas antifúngicas sintéticas derivadas de substâncias naturais selecionadas do Projeto Biota FAPESP e fármacos antifúngicos testes *in vitro*.

2. Objetivos

2.1 Objetivos Gerais

Analisar a função da proteína 14-3-3 de *P. brasiliensis* através de clonagem por complementação homóloga em *S. cerevisiae* para verificação do seu papel em *P. brasiliensis*, bem como localizá-la em *S. cerevisiae* contendo o gene homólogo e em sistema de infecção. Adicionalmente realizar a prospecção de novas substâncias com atividade anti-14-3-3Pb.

2.2 Objetivos Específicos

- Construção dos plasmídeos para inserção do gene 14-3-3 e BMH1 para transformação e obtenção de homólogo funcional em *S. cerevisiae*;
- Avaliar a complementação de 14-3-3Pb em *S. cerevisiae*
- Avaliação da capacidade de adesão de *S. cerevisiae* contendo o homólogo funcional
- Verificação da sensibilidade às drogas itraconazol, voriconazol, anfotericina B de *S. cerevisiae* contendo o homólogo funcional;
- Avaliação de protótipos antifúngicos com potencial atividade antiadesiva

3. Materiais e Métodos

3.1 Microrganismos e condições de cultivo

Neste estudo foi utilizado o isolado 18 de *P. brasiliensis* (Pb18), na fase leveduriforme, proveniente de um caso de paracoccidiodomicose, procedente da micoteca da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FM-USP). O isolado foi mantido em meio Fava Netto (1% peptona, 0,5% extrato de levedura, 0,3% proteose peptona, 0,5% extrato de carne, 0,5% NaCl, 4% glicose, 1,4% ágar) a 37°C e repicado a cada 3-4 dias.

As linhagens de *S. cerevisiae wild type* (*wt*) e com nocaute para os genes *BMH1* e *BMH2* (*bmh1::KanMX4* e *bmh2::KanMX4*) – Δ *bmh1* e Δ *bmh2* – foram cedido pelo Laboratório de Biologia Molecular da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara-Unesp. As linhagens foram mantidas em meio YEPD (1% extrato de levedura, 2% peptona, 2% glicose, 2% ágar) a 25°C. Após a transformação, as leveduras foram mantidas em meio sintético seletivo- SD-URA (0,67% YNB sem aminoácido – *yeast nitrogen base*, 2% de glicose, suplementado com aminoácidos, 2% de ágar)

As linhagens de bactéria *E. coli* DH5 α e DH10B foram mantidas em meio Luria-Bertani – LB (1% extrato de levedura, 1,6% peptona, 0,5% NaCl, 0,2% glicose e 2% ágar). Após a transformação as bactérias são selecionadas e mantidas em meio LB contendo ampicilina, na concentração necessária.

3.2 Cultura de células

Foi utilizada a linhagem contínua A549, de células epiteliais respiratórias, pneumócitos tipo I, obtida do Banco de Células do Rio de Janeiro. As células foram cultivadas em meio HAM-F12, suplementados com 10% de soro fetal bovino e mantidas a temperatura de 36,5°C.

3.3 Extração do RNA de *P. brasiliensis*

A extração do RNA foi realizada de acordo com o método do Trizol, de acordo com as instruções do fabricante, através da maceração das células fúngicas com nitrogênio líquido. A amostra foi submetida à agitação vigorosa em 3,5 mL de Trizol e pérolas de vidro e posteriormente centrifugada à 1620xg por 10 minutos. A fase aquosa foi separada, e a esta, foi adicionada 0,2 mL de clorofórmio para cada 0,75 mL de Trizol recuperado. Após repouso por 10 minutos, a amostra foi centrifugada e

a fase aquosa transferida para um novo tubo. A cada 0,75 mL de trizol recuperado inicialmente foi adicionado 0,25 mL de isopropanol e 0,25 mL de solução de citrato de sódio 0,4M e cloreto de sódio 0,8M. A amostra foi agitada gentilmente e deixada em repouso por 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, submetida à centrifugação à 1620xg por 30 minutos, o sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com etanol 75% e submetido à nova centrifugação a 1620xg por 30 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi seco a temperatura ambiente e posteriormente ressuscitado em 30µL de água DEPC (dietilpirocarbonato) 0,01% e armazenado à -70°C. A integridade do material foi avaliada através de eletroforese em gel de agarose 1% e a quantificação e pureza foram analisadas no espectrofotômetro GeneQuant 1300 (GE Healthcare)

3.4 Síntese do cDNA codificante da proteína 14-3-3 de *P. brasiliensis*

A síntese da primeira fita de cDNA foi realizada através de uma reação contendo 1,0µg de RNA total de *P. brasiliensis*, 10,0 pmol/µL da sequência iniciadora (5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCGGG-3'). A reação foi aquecida a 72°C por 2 minutos. Em seguida foi acrescentado 10,0 pmol/µL do oligodT modificado (5'- AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACT(30)N1N, onde n=A, C ou T; N1=A, G ou C), 2,0µL de uma mistura de dNTP (10mM), 2,0µL de RNaseOUT (40U/µL), 0,4µL de DTT (100nM), 1,2µL de cloreto de magnésio (50mM), 2,0µL da enzima transcriptase reversa (200U/µL) (RT Superscript II) e 4,0µL de tampão 5X (Tris-HCL 250mM pH 8,3; KCL 375mM; MgCl₂15mM). Esta reação foi aquecida durante 1 hora e 30 minutos a 42°C. Após este período, foi adicionado 80µL de TE (Tris HCl 10 nM; EDTA 1mM pH8,0) seguido de aquecimento por mais 7 minutos a 72°C.

3.5 Extração de DNA de *S. cerevisiae*

Uma colônia de *S. cerevisiae* foi inoculada em 10 mL de meio YEPD até a saturação ($DO_{600nm} > 1$), após o crescimento a cultura foi submetida a centrifugação à 3.000xg por 15 minutos à 4°C, o sobrenadante foi descartado e as células ressuscitadas em 500µL de água MilliQ estéril e transferido para microtubo estéril.

O suspensão foi submetida à nova centrifugação a 3.000xg por 1 minuto, o sobrenadante descartado e as células ressuscitadas no volume residual através de uma breve agitação em vórtex.

À suspensão foi adicionado 200µL de Tampão de Lise (2% Triton X100, 1%SDS, NaCl 100mM, Tris-HCl pH8,0 10mM, EDTA pH 8,0 1mM, água MilliQ q.s.p 1mL) e 200 µL de PCI (fenol/clorofórmio/isoamílico) e pérolas de vidro.

O microtubo foi submetido à agitação em vórtex por 3-4 minutos, alternando com incubações em gelo por 1 minutos, a cada 1 minuto em vórtex. Após a agitação, foram adicionados 200 µL de TE pH 8,0, vortexado por 1 minuto e centrifugado por 5 minutos a 13.400xg.

Posteriormente, cuidadosamente, a fase aquosa foi transferida para um novo microtubo e 200 µL de PCI foram adicionados seguido de breve agitação em vórtex e centrifugação por 5 minutos a 13.400xg, após a centrifugação, a fase aquosa foi transferida para novo microtubo e 1mL de etanol gelado foi adicionado e a realizada a homogeneização por inversão.

A amostra foi submetida à centrifugação por 2 minutos a 13.400xg e o sobrenadante descartado e adicionado 400 µL de TE pH8,0 para ressuspender seguido da adição de 3,0 µL de RNase (10 mg/ml) e submetido a incubação à 37°C por 30 minutos. Após a incubação, 200 µL de PCI foram adicionados e vortexado por 15 segundos, seguido de centrifugação por 5 minutos a 13.400xg.

A fase aquosa foi transferida para um novo microtubo e 10 µL de acetato de amônio 4M e 1,0 mL de etanol absoluto foram adicionados, em seguida foi realizada a mistura por inversão e centrifugação por 2 minutos a 13.400xg. O sobrenadante foi descartado e 400 µL de etanol 75% foram adicionados e após homogeneizar por inversão, a amostra foi submetida à centrifugação por 2 minutos a 13.400xg. O sobrenadante foi descartado e o tubo invertido para secar e posteriormente o DNA foi ressuspendido em 50 µL de TE pH8,0.

A avaliação da qualidade do DNA genômico extraído foi realizado através de eletroforese em gel de agarose 0,8% e a quantificação e pureza determinadas no espectrofotômetro GeneQuant 1300 (GE Healthcare) de acordo com as instruções do fabricante.

3.6 Preparo de bactérias ultracompetentes *E. coli* DH5α e DH10B

Para a preparação das bactérias ultracompetentes, uma colônia de bactéria *E. coli* não competente foi inoculado em 25mL de meio LB e incubada a 37°C sob agitação por 12-16h. Após incubação, 2,0 mL da cultura obtida foi inoculada em 200mL de meio LB e incubada a 37°C sob agitação até atingir a $D.O._{600nm} = 0,375$.

Ao atingir a densidade óptica desejada, a cultura foi aliqotada em tubos tipo falcon, previamente gelados, e incubados em gelo por 10 minutos e posteriormente centrifugados a 1600xg por 7 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e cada pellet formado foi ressuscendido gentilmente em 10mL de solução de CaCl₂ (CaCl₂ 60mM, glicerol 15%, PIPES pH7,0 10mM) e submetidos a centrifugação a 1100xg por 5 minutos à 4°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuscendido em 10 mL de solução de CaCl₂ e mantidos no gelo por 30 minutos. As células foram novamente centrifugadas a 1100xg por 5 minutos a 4°C e ressuscendidas em 2mL de solução de CaCl₂ e mantidas no gelo por 1 hora e 30 minutos. Após a incubação, as células foram aliqotadas em microtubos, congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -70°C.

Posteriormente a avaliação da competência é realizada transformando 100µL de células competentes com 6ng do vetor pUC18 por choque térmico, incubando por 30 minutos no gelo seguido de incubação à 42°C por 2 minutos. Após a recuperação das bactérias em LB por 1 hora, é realizado plaqueamento de 1 µL, 10 µL e 25 µL da transformação em meio LB contendo ampicilina (100 µg/mL).

As placas são incubadas a 37°C e após o crescimento número de colônias é obtido e aplicado na fórmula:

$$\text{Eficiência} = \frac{\Sigma \text{ colônias}}{\Sigma \text{ volume (36 } \mu\text{L)}} \times 10^5 \text{ colônias}/\mu\text{g de DNA}$$

Considera-se uma boa eficiência quando os valores obtidos entre 10⁶ e 10⁷ colônias/µg de DNA

3.7 Construção do homólogo funcional de 14-3-3Pb em *S. cerevisiae*

A obtenção do mutante de *S. cerevisiae* contendo a região codificadora da proteína 14-3-3Pb foi realizada através de duas estratégias, descritas abaixo.

3.7.1 Estratégia *Overlap*

3.7.1.1 Obtenção do fragmento híbrido contendo a região codificadora da proteína 14-3-3 de *P. brasiliensis*.

Esta estratégia consiste na obtenção de um fragmento híbrido contendo as regiões 3'UTR e 5'UTR de *S. cerevisiae* e a ORF de 14-3-3Pb de *P. brasiliensis* (Figura 1) para clonagem em vetores de expressão em levedura.

A região codificadora da proteína 14-3-3Pb foi obtida através da amplificação a partir de primers desenhados por meio da análise da sequência nucleotídica depositada no GeneBank, número de acesso AY462124 .

P3: 5´-TAAACTAAAGATAAAAATGGGTTACGAAGATGCTGTATATC-3´

P4: 5´-GATTTATCAGAATACCTACTCAGCGGCCTTAGGAGC-3´

A reação foi realizada utilizando 50ng de cDNA de *P. brasiliensis*, 1,5 µL de cada primer 50µM, 1,5µL dNTP 10mM, 1,5µL MgSO₄ 50mM, 5,0µL solução enhancer 10x, 5,0µL tampão da enzima 10x e 0,5µL de *Pfx* DNA Polymerase (Invitrogen). A reação foi realizada no termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems-Life Technologies) seguindo o seguinte protocolo: um ciclo inicial à 94°C por 2 minutos; 25 ciclos à 94°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos, 68°C por 1 minuto e 10 segundos; e um ciclo de 68°C por 7 minutos.

Além da amplificação da região codificadora, a amplificação das regiões 3´UTR e 5´UTR do gene *BMH1* de *S. cerevisiae* foram realizadas para posterior construção do fragmento híbrido, 3´UTRSc+14-3-3Pb+5´UTRSc, a partir dos seguintes primers:

-Para a amplificação da região 5´UTR do gene *BMH1* de *S. cerevisiae*

P1: 5´-CGGGATCCGTGGCAAATAGCTCC-3´

P2: 5´-GCATCTTCGTAACCCATTTTTATCTTTAGTTTATCTTTAAC-3´

-Para a amplificação da região 3´UTR do gene *BMH1* de *S. cerevisiae*

P5: 5´-AAGGCCGCTGAG TAGGTATTCTGATAAATCTAAAGAG-3´

P6: 5´-CGGGATCCGATGCGACATTTACCC-3´

A reação foi realizada utilizando 50ng de DNAg de *S. cerevisiae*, 1,5 µL de cada primer 50µM, 1,5µL dNTP 10mM, 1,5µL MgSO₄ 50mM, 5,0µL solução enhancer 10x, 5,0µL tampão da enzima 10x e 0,5µL de *Pfx* DNA Polymerase (Invitrogen). A reação foi realizada no termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems-Life Technologies) seguindo o seguinte protocolo: um ciclo inicial à 94°C por 2 minutos; 25 ciclos à 94°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos, 68°C por 1 minuto; e um ciclo de 68°C por 7 minutos.

Os produtos de PCR foram analisados através de eletroforese em gel de agarose 0,8% e purificados utilizando o QIAquick PCR Purification kit (Qiagen), de acordo com as instruções do fabricante. A quantificação do produto de PCR e sua

pureza foram verificadas no equipamento GeneQuant 1300 (GE Healthcare) de acordo com as instruções do fabricante.

Após a obtenção destes fragmentos, foram realizadas duas reações de *overlap*, reações de PCR para a ligação dos fragmentos com a finalidade de obter o fragmento 3'UTRSc+14-3-3Pb+5'UTRSC.

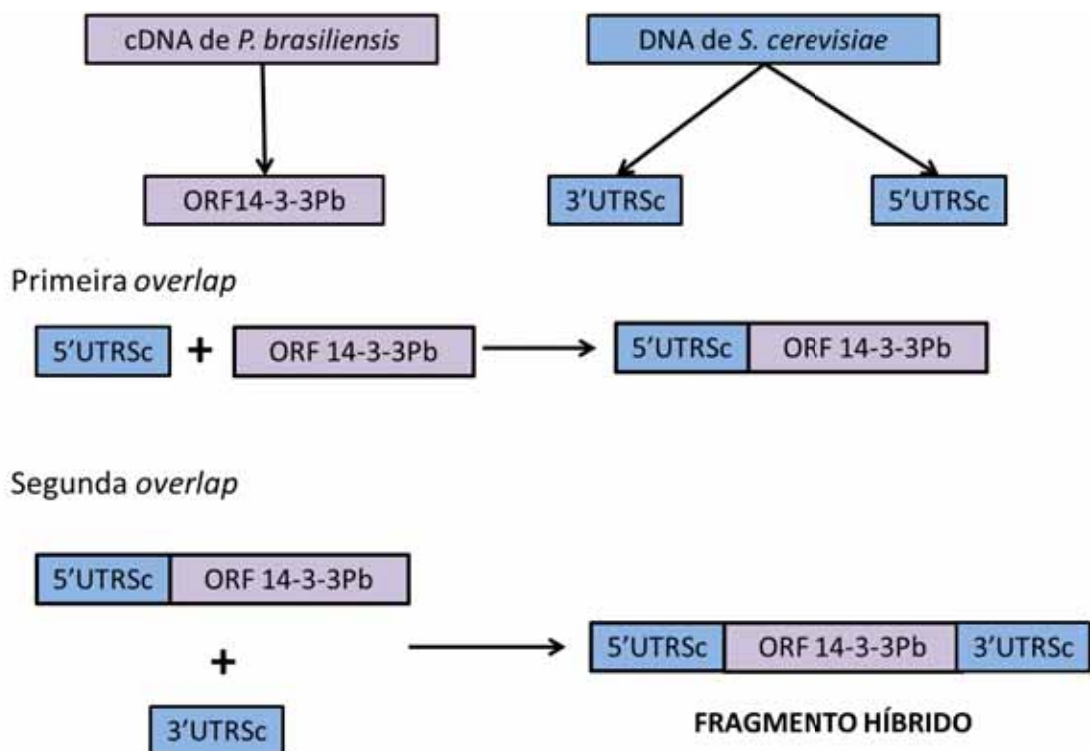
Primeiramente foi realizada a ligação do fragmento da região codificadora da proteína 14-3-3Pb e o fragmento 5'UTR de *S. cerevisiae*, de acordo com a seguinte reação: 50ng de cada fragmento, 0,75µL dNTP 10mM, 0,75µL MgSO₄ 50mM, 2,5µL solução Enhancer 10x, 2,5µL tampão da enzima 10x e 0,25µL de *Pfx* DNA Polymerase (Invitrogen), água MilliQ qsp 25 µL. A reação foi realizada no termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems-Life Technologies) seguindo o seguinte protocolo: um ciclo inicial à 94°C por 5 minutos; 4 ciclos à 94°C por 1 minuto, 60°C por 30 segundos, 68°C por 2 minutos. Ao final do 4º ciclo foi adicionado à reação 1,5 µL dos primers P1 e P4 50mM, 0,75µL dNTP 10mM, 0,75µL MgSO₄ 50mM, 2,5µL solução Enhancer 10x, 2,5µL tampão da enzima 10x e 0,25µL de *Pfx* DNA Polymerase (Invitrogen), água MilliQ qsp 25 µL, para esta reação a programação do termociclador foi: um ciclo inicial a 94°C por 5 minutos; 25 ciclos a 94°C por 1 minuto, 60°C por 30 segundos, 68°C por 2 minutos, e um ciclo de 68°C por 7 minutos. O produto obtido foi analisado através de eletroforese em gel de agarose 0,8%, posteriormente purificado utilizando QIAquick PCR Purification kit (Qiagen) e quantificado no espectrofotômetro GeneQuant 1300 (GE Healthcare) de acordo com as instruções dos fabricantes

Posteriormente, foi realizado a segunda *overlap*, utilizando o fragmento obtido anteriormente (14-3-3Pb+5'UTRSc) e o fragmento 3'UTR de *S. cerevisiae*. Foi utilizada a seguinte reação: 50ng de cada fragmento, 0,75µL dNTP 10mM, 0,75µL MgSO₄ 50mM, 2,5µL solução Enhancer 10x, 2,5µL tampão da enzima 10x e 0,25µL de *Pfx* DNA Polymerase (Invitrogen), água MilliQ qsp 25 µL. A reação foi realizada no termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems-Life Technologies) seguindo o seguinte protocolo: um ciclo inicial à 94°C por 5 minutos; 4 ciclos à 94°C por 1 minuto, 60°C por 30 segundos, 68°C por 2 minutos. Ao final do 4º ciclo foi adicionado à reação 1,5 µL dos primers P1 e P6, 0,75µL dNTP 10mM, 0,75µL MgSO₄ 50mM, 2,5µL solução Enhancer 10x, 2,5µL tampão da enzima 10x e 0,25µL de *Pfx* DNA Polymerase (Invitrogen), água MilliQ qsp 25 µL, para esta reação a programação do termociclador foi: um ciclo inicial à 94°C por 5 minutos; 25 ciclos à

94°C por 1 minuto, 50°C por 30 segundos, 68°C por 2 minutos, e um ciclo de 68°C por 7 minutos.

O fragmento obtido foi analisado por eletroforese em gel de agarose 0,8%, purificado utilizando o QIAquick PCR Purification kit (Qiagen), de acordo com as instruções do fabricante e realizada a quantificação e verificado a pureza no equipamento GeneQuant 1300 (GE Healthcare) de acordo com as instruções do fabricante.

Figura 1 Obtenção do fragmento híbrido – 5'UTRSc+14-3-3PB+3'UTRSc



3'UTRSc e 5'UTRSc: regiões iniciadora e terminadora do gene *BMH1* de *S. cerevisiae*. A partir do cDNA de *P. brasiliensis* e DNA genômico de *S. cerevisiae*, foram obtidos respectivamente, a ORF de 14-3-3Pb e as regiões 3'UTRSc e 5'UTRSc. A partir da ORF de 14-3-3Pb e 5'UTRSc foi realizada a primeira *overlap*, obtendo-se o fragmento 5'UTRSc+14-3-3Pb. A segunda *overlap* foi realizada a partir do fragmento obtido anteriormente e o fragmento 3'UTRSc, obtendo-se o fragmento híbrido, 5'UTRSc+14-3-3Pb+3'UTRSc.

A amplificação do gene *BMH1* de *S. cerevisiae* foi realizada utilizando os seguintes primers:

P1: 5'-CGGGATCCGTGGCAAATAGCTCC-3'

P6: 5'-CGGGATCCGATGCGACATTTACCC-3'

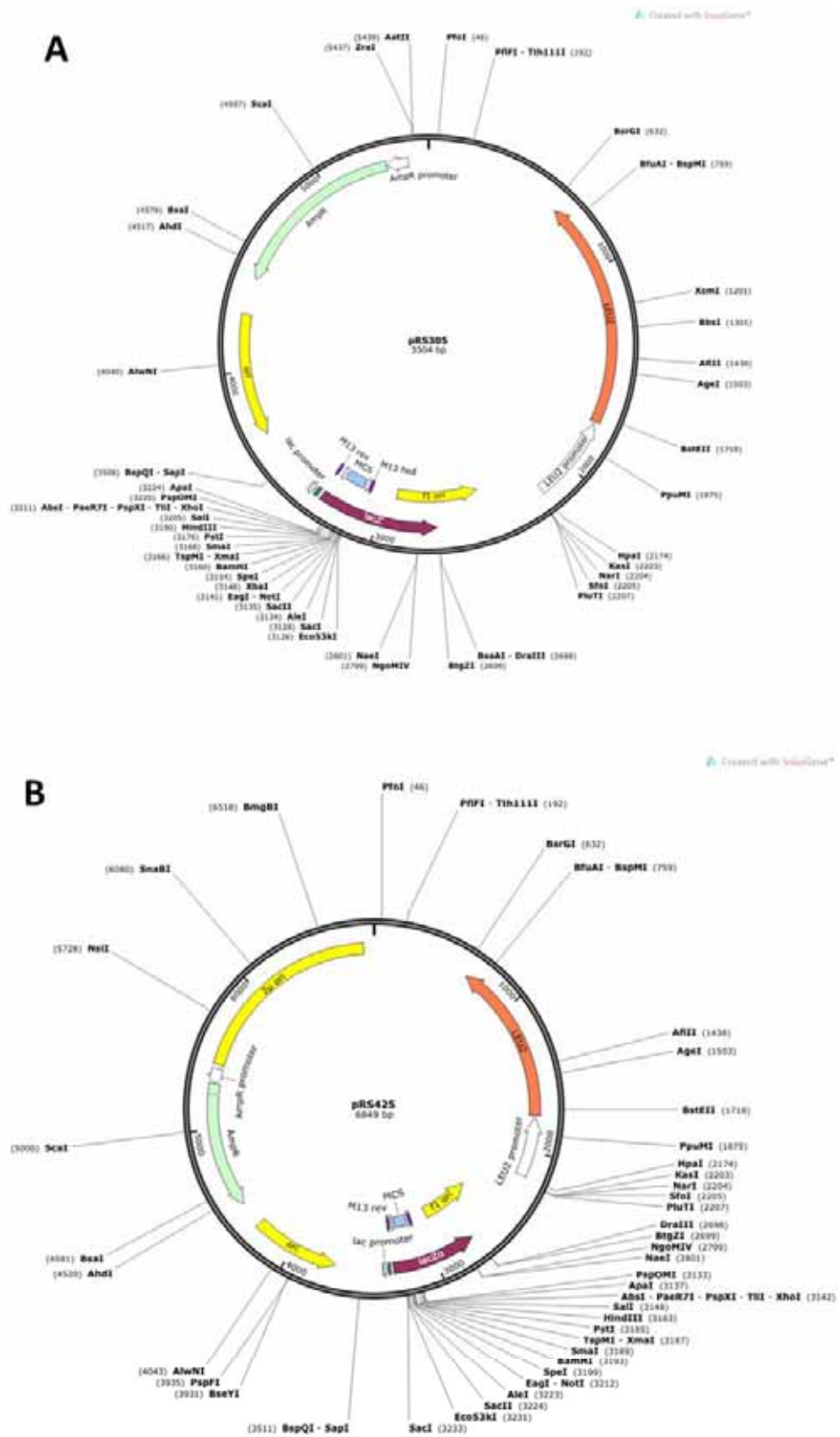
A reação foi realizada utilizando: 50ng de DNAg de *S. cerevisiae*, 1,5 µL de cada primer 50µM, 1,5µL dNTP 10mM, 1,5µL MgSO₄ 50mM, 5,0µL solução enhancer 10x, 5,0µL tampão da enzima 10x e 0,5µL de *Pfx* DNA Polymerase (Invitrogen), água Milli-Q qsp 50 µL. A reação foi realizada no termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems-Life Technologies) seguindo o seguinte protocolo: um ciclo inicial à 94°C por 2 minutos; 25 ciclos à 94°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos, 68°C por 2 minutos; e um ciclo de 68°C por 7 minutos.

Após a reação de PCR, o produto foi analisado por eletroforese em gel de agarose 0,8%, purificado utilizando o QIAquick PCR Purification kit (Qiagen), seguindo as instruções do fabricante, e posteriormente quantificado e verificado a pureza no equipamento GeneQuant 1300 (GE Healthcare) de acordo com as instruções do fabricante.

3.7.1.2 Clonagem

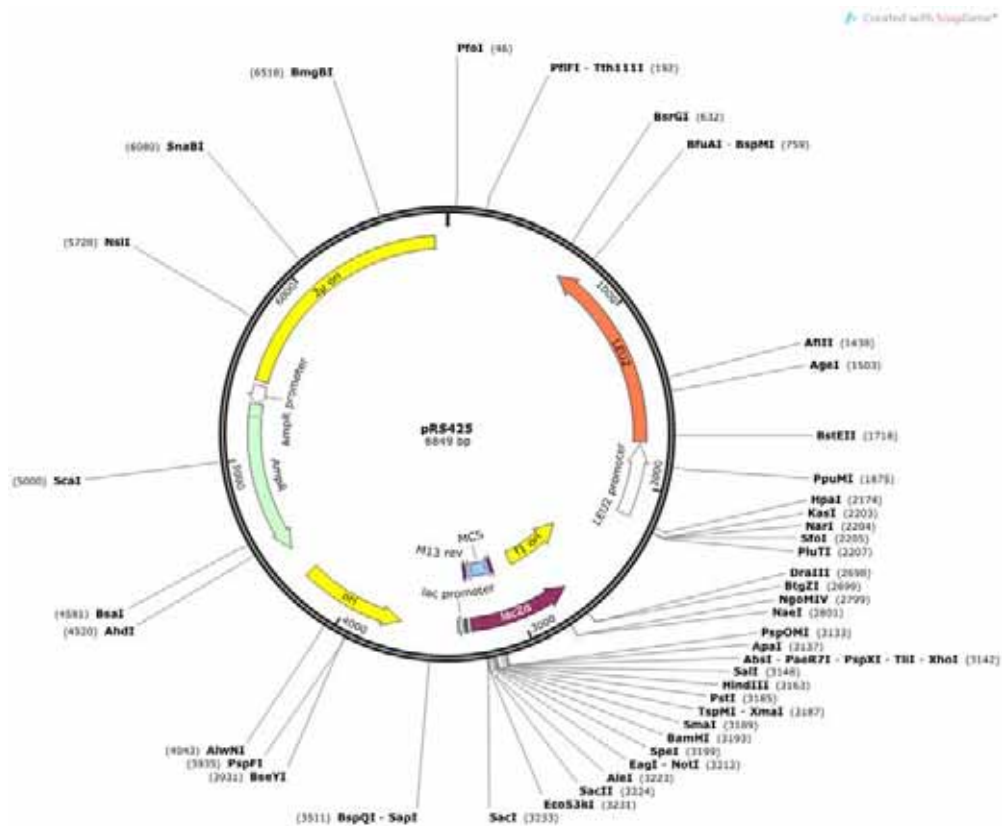
A clonagem foi realizada nos seguintes vetores: pRS305, pRS306 e pRS425 (Addgene), sendo o pRS305 e pRS425 utilizados na clonagem do fragmento híbrido e o pRS306 na clonagem utilizando o produto da amplificação do gene *BMH1* de *S. cerevisiae*, utilizado como controle. (Figura 2 e 3)

Figura 2 Mapa dos vetores utilizados na clonagem do fragmento híbrido



A: vetor pRS305 (centromérico) e **B:** vetor pRS425 (2μm) utilizados na clonagem do fragmento híbrido 3'UTRSc+14-3-3Pb+5'UTRSc

Figura 3 Mapa do vetor utilizado na clonagem do gene *BMH1* de *S. cerevisiae*.



Os vetores e o fragmento híbrido foram digeridos com a enzima *BamHI* (Promega), segundo a reação: 5,0 μ L de vetor/inserto, 2,0 μ L de tampão E 10x, 0,2 μ L de BSA 10x, 0,5 μ L de *BamHI* e água MilliQ qsp 20 μ L. Esta reação foi incubada a 37°C por 3 horas e a inativação da enzima foi realizada a 65°C por 15 minutos. A desfosforilação dos vetores foi realizada posteriormente utilizando 2,0 μ L da restrição, 2,0 μ L de tampão 10x e 1,5 μ L FASTAP (Fermentas), esta reação foi incubada por 20 minutos a 37°C e em seguida por 10 minutos a 75°C para inativação da enzima.

Para a ligação dos vetores e inserto foi realizada utilizando a enzima T4 ligase (Fermentas) de acordo com as instruções do fabricante. Esta reação foi incubada por 2 horas a 22°C.

3.7.1.3 Transformação em bactérias *E. coli* DH10B ultracompetentes

A transformação foi realizada em bactérias *E. coli* DH10B ultracompetentes através de choque térmico, onde em 50 μ L de bactérias foram adicionados 2,0 μ L de ligação e submetido a incubação em gelo por 45 minutos e em seguida, por 2

minutos à 42°C. Após a incubação, adicionou-se 200 µL de meio LB e submetido à incubação por 1 hora 37°C, sob agitação. Após a recuperação das bactérias, realizou-se plaqueamento de 100 µL e volume residual após breve centrifugação, com o auxílio de pérolas de vidro em meio LB com ampicilina 100 µg/mL. As placas foram incubadas a 37°C por 12-16 horas.

3.7.1.4 Confirmação da transformação

A verificação dos clones positivos foi realizada através de PCR de colônia, segundo a reação: 12,5 µL de Master Mix (Fermentas), 1,0 µL do pré inoculo, 0,5 µL de cada primer, água MilliQ qsp 25 µL. O protocolo utilizado no termociclador foi: 1 ciclo 94°C por 2 minutos, 35 ciclos a 94°C 30 segundos, 60°C 30 segundos, 72°C por 1 minuto e 10 segundos, e um ciclo a 72°C por 7 minutos. Os produtos foram verificados através de eletroforese em gel de agarose 0,8%.

3.7.2 Estratégia pYES

3.7.2.1 Obtenção da região codificadora da proteína 14-3-3 de *P. brasiliensis*

A região codificadora da proteína 14-3-3Pb foi obtida através da amplificação a partir dos seguintes primers:

Primer 14-3-3F: 5' CG GGATCCATGGGTTACGAAGATG 3'

Primer 14-3-3R: 5' CCGCTCGAGCTACTCAGCGGCCTTAGG 3'

A reação foi realizada utilizando 1,0µL de cDNA de *P. brasiliensis*, 1,5 µL de cada primer 50µM, 1,5µL dNTP 10mM, 1,5µL MgSO₄ 50mM, 5,0µL solução enhancer 10x, 5,0µL tampão da enzima 10x e 0,5µL de *Pfx* DNA Polymerase (Invitrogen). A reação foi realizada no termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems-Life Technologies) seguindo o seguinte protocolo: um ciclo inicial à 94°C por 2 minutos; 25 ciclos à 94°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos, 68°C por 1 minuto e 10 segundos; e um ciclo de 68°C por 7 minutos.

A região codificadora da proteína Bmh1p também foi amplificada, para a obtenção do vetor pYES+BMH1Sc, através de reação de PCR, utilizando os seguintes primers:

Primer BMH1F: 5' CG GGATCC ATGTCAACCAGTCGTGAAG'

Primer BMH1R: 5' CG GAATTC TTA CTTTGGTGCTTCACC 3'

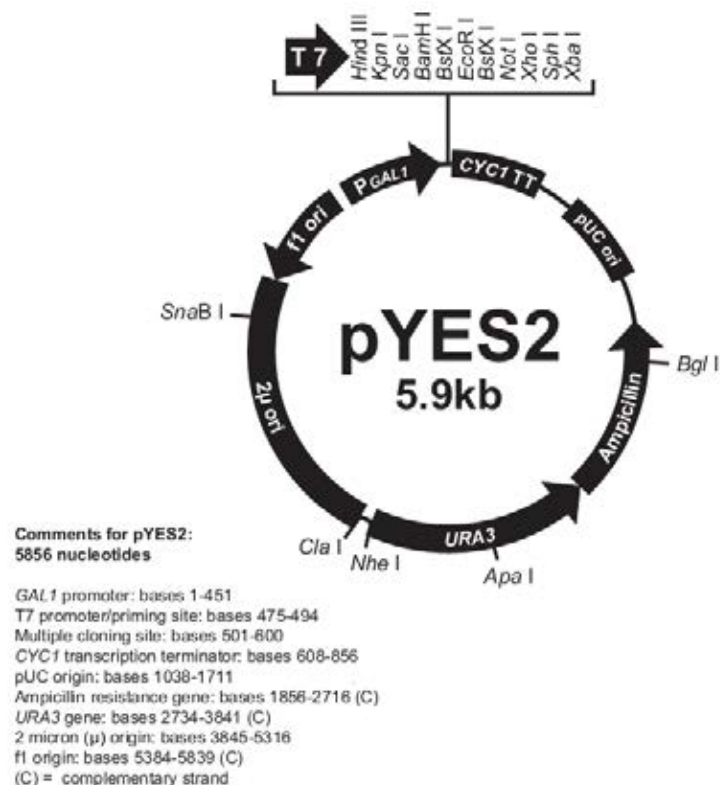
A reação de PCR foi realizada utilizando 50ng de DNAg de *S. cerevisiae* 1,5 µL de cada primer 50µM, 1,5µL dNTP 10mM, 1,5µL MgSO₄ 50mM, 5,0µL solução enhancer 10x, 5,0µL tampão da enzima 10x e 0,5µL de *Pfx* DNA Polymerase (Invitrogen). A reação foi realizada no termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems-Life Technologies) protocolo: um ciclo inicial à 94°C por 2 minutos; 25 ciclos à 94°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos, 68°C por 1 minuto e 10 segundos; e um ciclo de 68°C por 7 minutos.

Após as reações de amplificação, os produtos de PCR foram analisados através de eletroforese em gel de agarose 0,8% e purificado utilizando o QIAquick PCR Purification (Qiagen), seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante. A quantificação do produto de PCR e sua pureza foram verificadas no equipamento NanoVue Plus (GE Healthcare) de acordo com as instruções do fabricante

3.7.2.2 Clonagem

Nesta estratégia foi utilizado o vetor pYES2 (Invitrogen), que se diferencia por possuir um promotor induzível por galactose (*GAL1*) permitindo a clonagem da ORF do gene de interesse (Figura 4).

Figura 4 Mapa do vetor pYes2 (Invitrogen)



Para obtenção do vetor pYES+14-3-3Pb, primeiramente foi realizada a digestão do vetor e da ORF 14-3-3Pb, obtida por PCR, utilizando as enzimas de restrição *BamHI* e *XhoI* (Promega), de acordo com as instruções do fabricante. Estas reações foram incubadas a 37°C, o inserto por 30 minutos e o vetor por 1 hora e posteriormente a 65°C por 15 minutos para inativação das enzimas.

A construção do vetor pYES+BMH1Sc também iniciou-se a partir da digestão do vetor e do produto de PCR obtido anteriormente, ORF BMH1Sc, utilizando as enzimas *BamHI* e *EcoRI* (New England Biolabs), de acordo com as instruções do fabricante. Estas reações foram incubadas a 37°C, o inserto por 30 minutos e o vetor por 1 hora. Após a incubação, o inserto foi purificado utilizando o kit QIAquick PCR Purification (Qiagen) e o vetor foi submetido a eletroforese em gel de agarose 0,8% e purificado utilizando o QIAquick Gel Extraction (Qiagen)

Após a digestão, os inserto e o vetor foram quantificados no espectrofotômetro NanoVue Plus (GE Healthcare) e a partir da análise da quantificação e pureza, calculou-se a molaridade através da seguinte equação:

$$\text{Molaridade (nmol)} = \frac{\text{Concentração da amostra em ng} \times \text{mol.pb}}{\text{Tamanho do fragmento em pb} \quad 660}$$

Após a determinação da molaridade do vetor e do inserto, padronizamos a proporção de 1:10, de vetor para inserto, para a realização da ligação.

As ligações foram realizadas utilizando 1,0uL de T4 ligase (NEB) e 2,0 de Buffer T4 para cada 20,0 µL de reação final, incubada a 16°C por diferentes períodos de tempo, 16h, 24h, 48h, para determinar o melhor tempo de ligação. Para cada ligação, um controle negativo, utilizando apenas o vetor foi realizado.

3.7.2.3 Transformação em bactérias *E. coli* DH5α ultracompetentes

Para as transformações, 50µL de bactérias ultracompetentes foram transformadas com 1,0µL de ligação, as células foram incubadas por 30 minutos no gelo e posteriormente por 2 minutos a 42°C. A recuperação das células foi realizada em meio LB, durante uma hora a 37°C, sob agitação. Após a recuperação, 50µL, 250µL e 150µL (volume residual) as bactérias foram plaqueadas em meio LB contendo ampicilina (100µg/mL) e incubadas por 12-16 horas a 37°C.

3.7.2.4 Confirmação da transformação

A confirmação da presença dos vetores ligados aos insertos, pYES-14-3-3Pb e pYES+BMH1Sc, nos clones selecionados através de diagnóstico por restrição.

Para realizar o diagnóstico por restrição as colônias selecionadas foram inoculadas em 5,0mL de meio LB com ampicilina (100µg/mL) líquido e após crescimento overnight, realizou-se a miniprep, através do kit QIAprep Spin Miniprep (Qiagen), segundo as instruções do fabricante. Após a miniprep, foi realizada a restrição, seguindo mesmo protocolo da digestão anterior.

Adicionalmente, foi realizada uma segunda restrição do produto de miniprep, utilizando uma enzima que possui o sítio de restrição no meio da sequência da ORF e no vetor, para confirmar que a soma dos fragmentos obtidos correspondem ao peso do plasmídeo ligado ao inserto. Após a análise das sequências do vetor e das regiões codificadoras de 14-3-3Pb e BMH1Sc, a enzima escolhida para confirmação, tanto de pYES+14-3-3Pb quanto pYES+BMH1Sc, foi a enzima *HindIII* (Promega), após a digestão utilizando esta enzima espera-se obter um fragmento de 605pb referente ao vetor pYES+14-3-3Pb e um fragmento de 615pb referente ao vetor pYES+BMH1Sc. Os produtos da digestão foram analisados em gel de agarose 0,8%.

3.7.3 Transformação em levedura

A partir confirmação da obtenção do plasmídeo pYES+14-3-3Pb, foi dado início a transformação em levedura, pelo método de acetato de lítio, das linhagens *S. cerevisiae wild type (wt)*, $\Delta bmh1$ e $\Delta bmh2$.

Para isso, uma colônia de cada linhagem foi cultivada em meio YEPD líquido, de 12-16 horas a 30°C, sob agitação. Após a incubação, 25µL de células para cada reação, foram centrifugadas e ressuspensas em 1,0mL de água e submetidas a nova centrifugação a velocidade máxima por 5 segundos. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 1mL de LiAc 100mM e incubadas por 5 minutos a 30°C.

Após esta incubação, as células foram centrifugadas, o sobrenadante retirado e ao pellet de células foram adicionados os seguintes reagentes, na ordem descrita: 240µL de PEG (50% w/v); 36µL de LiAc 1.0M; 25µL de SS-DNA (2.0mg/mL); 5.0µL de DNA plasmidial (100ng to 5µg); 45µL de água Milli-Q estéril.

Os microtubos foram submetidos à agitação em vórtex por pelo menos 1 minuto e incubados a 42°C por 20 minutos, após a incubação realizou-se uma

centrifugação, a velocidade máxima por 5 segundos e com a ajuda de uma micropipeta o sobrenadante foi retirado e as células ressuspensas em água MilliQ estéril.

As células foram plaquedadas em meio seletivo, SC-URA, e incubadas a 30°C até o crescimento de colônias.

3.7.4 Avaliação da complementação

Após busca no banco de dados *Saccharomyces Genome Database* (<http://www.yeastgenome.org/>) para as alterações fenotípicas dos mutantes de *S. cerevisiae* $\Delta bmh1$ e $\Delta bmh2$, o fármaco fluconazol foi selecionado para verificação da complementação de 14-3-3Pb em *S. cerevisiae*.

Os transformantes foram crescidos em 10mL de meio SC-URA até atingir a concentração de 1×10^7 céls/mL ($A_{600nm}=0,6-0,9$). Um volume ideal de cada cultura foi centrifugado por 7 minutos a 2.500 rpm e as células ressuspensas em glicerol 50% numa concentração de $2,5 \times 10^8$ cels/mL.

Posteriormente, 100 μ L de cada suspensão foram transferidas para os primeiros poços da microplaca, nos cinco poços seguintes foram adicionados 90 μ L de glicerol 50% e realizada a diluição seriada de cada inóculo.

Em placas de SC-URA contendo 2% de galactose contendo fluconazol 35 μ M e sem o fármaco para controle de crescimento. Foram adicionados 2,5 μ L de cada diluição. As placas foram incubadas a 30°C até o crescimento das seis diluições nas placas controle.

A avaliação da complementação foi analisada mediante ao aparecimento ou não de crescimento.

3.7.5 Teste de Adesão

O teste de adesão foi realizado de acordo com Younes *et al.* (2013) com algumas modificações. Os transformantes de *S. cerevisiae* foram crescidos em meio SC-URA contendo 2% de rafinose durante 12-16 horas a 30°C e transferidos para o meio de indução, SC-URA contendo 2% de galactose e submetidos à incubação por 2 e 4 horas a 30°C.

Em placas de 24 poços, foram adicionadas 500 μ L de células A549 em meio HAM-F12, suplementado com soro fetal bovino. As placas foram submetidas à incubação a 36,5°C, 5% de CO₂ até formação de monocamada.

Após a formação da monocamada, as células foram lavadas e 300 µL de meio HAM F-12 foi adicionado. Em cada poço, 300 µL de inoculo foi adicionado a cada poço a uma concentração final de 1×10^4 células/mL.

As placas foram incubadas por 30 minutos a 36,5°C e após incubação lavadas três vezes com PBS para retirar as células não aderidas. As células foram lisadas com 100 µL de água gelada e plaqueadas em meio YEPD.

As placas foram incubadas a 30°C por 36 horas, posteriormente foi realizada a contagem do número de colônias e comparada com o controle, contendo o plaqueamento da mesma concentração de *S. cerevisiae* utilizada na adesão. A taxa de adesão foi expressa como porcentagem de células aderidas em relação às placas controle.

A análise estatística foi realizada utilizando o teste ANOVA com pós-teste de Tukey através do software Prism5.

3.8 Teste de Sensibilidade

Para a avaliação da sensibilidade, as linhagens de *S. cerevisiae wt*, $\Delta bmh1$ e $\Delta bmh2$ repicadas em placas de meio YEPD e incubadas por 24 horas a 25°C e posteriormente uma alçada foi transferida para YEPD líquido e mantidos por 5 horas a 25°C/150rpm.

Após a incubação as células foram centrifugadas por 5 minutos a 5000 rpm à 25°C. O inóculo foi preparado de acordo com o documento M27-A3, do CLSI, as células foram ressuspendidas em PBS estéril e o inoculo foi ajustado em câmara de Neubauer a 5×10^6 células/mL. O inóculo foi ajustado de acordo com o número de células viáveis, verificadas através do método de tripan. Posteriormente, este inóculo foi diluído em meio YEPD para obtenção de uma concentração 5×10^3 e 5×10^4 .

Os antifúngicos utilizados no experimento foram itraconazol (ITZ), voriconazol (VCZ) e anfotericina B (AMB), diluídos de acordo com o documento M27-A3, do CLSI, na faixa de concentração de 16 a 0,03µg/ml, em meio YEPD, o qual foi considerado favorável para estas cepas, uma vez que em testes realizados previamente, utilizando o meio padrão para este protocolo, meio RPMI-1640, não foi observado crescimento das mesmas.

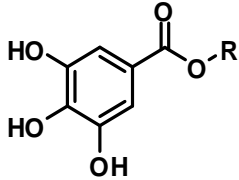
Foi realizado o controle de DMSO, substância utilizada para solubilizar as concentrações de trabalho de todos os antifúngicos.

Em placas de 96 poços, 100µL de cada diluição foram dispostos e posteriormente mais 100 µL de inóculo, levando a uma concentração de $2,5 \times 10^3$ e $2,5 \times 10^4$ de inóculo, concentrações utilizadas para verificar a melhor visualização no teste.

A leitura da concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada visualmente após 24 horas através da adição de 30 µL de solução de resazurina 0,01%.

Após a padronização utilizando os antifúngicos, realizamos o teste de sensibilidade utilizando derivados do ácido gálico, G-4, G-6, G-7, G10, G-11, G-12, G-14, G-17 (Tabela 1), na faixa de concentração de 62,5 a 0,122 µg/mL.

Tabela 1 Derivados dos ácidos gálicos



G4	propyl gallate	$(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$
G6	butyl gallate	$(\text{CH}_2)_3\text{CH}_3$
G7	pentyl gallate	$(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$
G10	hexyl gallate	$(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$
G11	heptyl gallate	$(\text{CH}_2)_6\text{CH}_3$
G12	octyl gallate	$(\text{CH}_2)_7\text{CH}_3$
G14	decyl gallate	$(\text{CH}_2)_9\text{CH}_3$
G17	tetradecyl gallate	$(\text{CH}_2)_{13}\text{CH}_3$

3.9 Análise do anticorpo monoclonal anti-14-3-3 (Mab14-3-3)

3.9.1 Obtenção do Mab 14-3-3

O anticorpo monoclonal anti-14-3-3 foi desenvolvido pela empresa Rheabiotec, a partir da proteína purificada por eletroeluição e lisados bacterianos de *E.coli* BL21 e GRO, obtida em estudos anteriores.

3.9.2 Ensaio de inibição da adesão de *P. brasiliensis* a células A549

P. brasiliensis, Pb18, foi cultivado em meio Fava Netto durante 4-7 dias e após crescimento uma suspensão em PBS de concentração 5×10^6 foi preparada para realização do ensaio. Os inóculos foram tratados com Mab anti - 14-3-3 (1:100) com os galatos associados ao Mab anti-14-3-3 (1:100), com os galatos em sua respectiva

CIM ou com anticorpo policlonal (PAb), por 1h a 37°C. Após a incubação os inóculos foram lavados três vezes com PBS estéril e ressuspensos no volume original.

As células epiteliais A549 foram crescidas em placas de 96 poços até confluência, depois foram lavadas três vezes com PBS estéril e fixadas com paraformaldeído 4% por 30 minutos a temperatura ambiente.

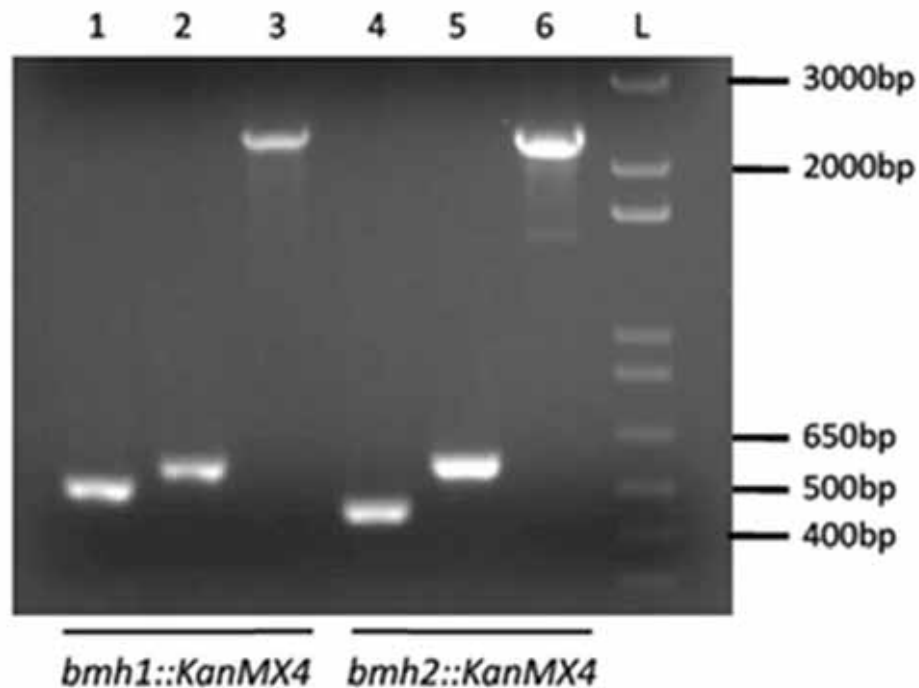
Após a incubação, foram adicionados 100 µL dos inóculos de *P. brasiliensis*, a placa foi incubada novamente por 24 horas à 37°C.

Após o período de infecção deu-se início ao ensaio de ELISA. As placas foram lavadas 3 vezes com PBS-Tween e a foi realizado a adição do anticorpo primário, anti cell-free (1:100). A placa foi incubada por 1 hora a 37°C, lavadas novamente 3 vezes com PBS-T e adicionado o anticorpo secundário, anti-rabbit IgG (1:3000) e a placa foi submetida a nova incubação por 1 hora a 37°C.

As placas foram lavadas com PBS-T e as leituras foram realizadas através de uma reação colorimétrica após a adição da solução reveladora (fosfato de sódio/ácido cítrico/ortofenilenodiamino/água oxigenada), por 10 minutos, seguido da adição de ácido clorídrico 1M.

A absorbância foi determinada a 490nm e estes dados convertidos em % de inibição e a análise estatística foi realizada utilizando o teste ANOVA, através do software *OriginLab 7.5*.

Figura 6 Confirmação do nocaute dos genes de *BMH1* e *BMH2* das linhagens de *S. cerevisiae* $\Delta bmh1$ e $\Delta bmh2$



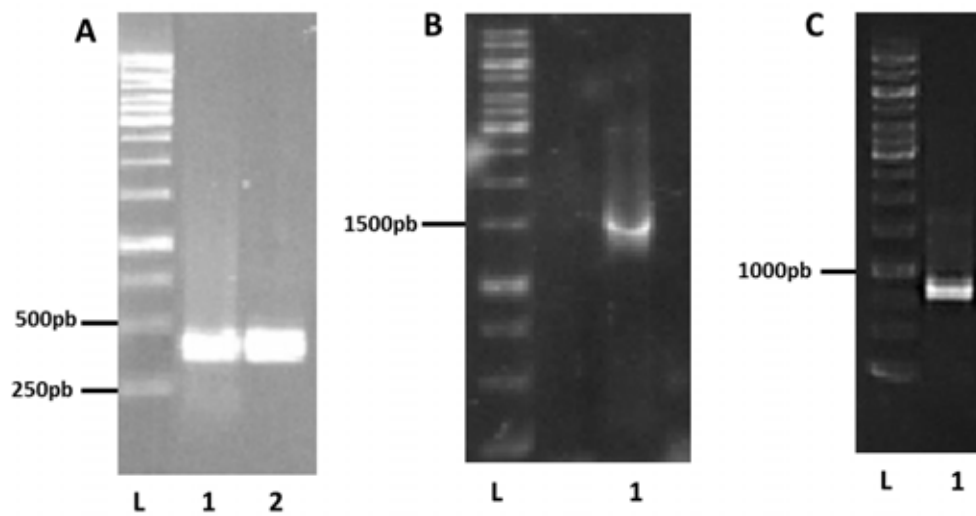
Eletroforese dos produtos de PCR a partir do DNA genômico das linhagens *bmh1::KanMX4* e *bmh2::KanMX4*. As canaletas **1**, **2** e **3** correspondem, respectivamente, à amplificação dos fragmentos ConfirmAbmh1 + VZO897 (extremidade 5' da recombinação – 523 bp), ConfirmDbmh1 + VZO898 extremidade 3' da recombinação – 585 bp) e ConfirmAbmh1 + ConfirmDbmh1 (gene inteiro nocauteado – 2326 bp). As canaletas **4**, **5** e **6** correspondem, respectivamente, à amplificação dos fragmentos ConfirmAbmh2 + VZO897 (extremidade 5' da recombinação – 467 bp), ConfirmDbmh2 + VZO898 (extremidade 3' da recombinação – 590 bp) e ConfirmAbmh2 + ConfirmDbmh2 (gene inteiro nocauteado -2275 bp). L corresponde ao padrão de peso molecular de 1Kb (Invitrogen)

4.3 Construção do homólogo funcional 14-3-3Pb em *S. cerevisiae*

4.3.1 Estratégia *Overlap*

Os fragmentos 3'UTR, 5'UTR e *BMH1* de *S. cerevisiae* foram obtidos a partir do DNA genômico desta levedura e a região codificadora da proteína 14-3-3Pb foi obtida a partir do cDNA de *P. brasiliensis*, através de reações PCR. (Figura 7).

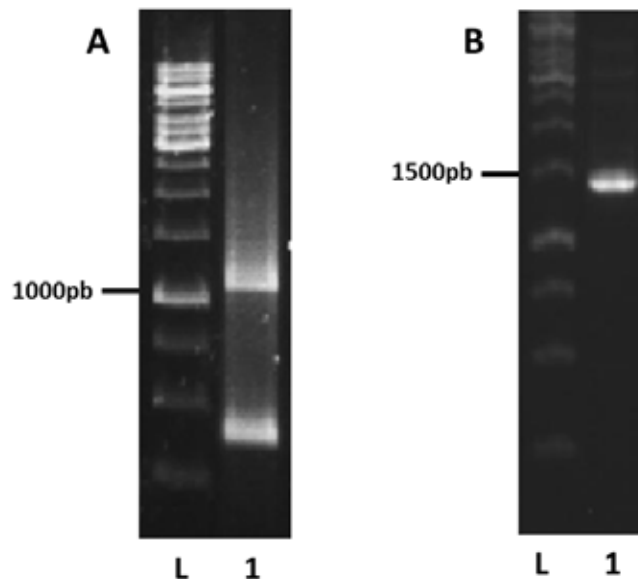
Figura 7 Amplificação dos fragmentos 3'UTR, 5'UTR e BMH1 de *S. cerevisiae* e da região codificadora da proteína 14-3-3 de *P. brasiliensis*.



A - L: peso molecular de 1Kb (Fermentas), **1:** fragmento 3'UTRSc (261pb), **2:** fragmento 5'UTR Sc(314pb); **B - L:** peso molecular de 1Kb (Fermentas), **1:** fragmento BMH1Sc (1379pb) e **C - L:** peso molecular de 1Kb (Fermentas) e **1:** fragmento 14-3-3Pb(798pb)

Após purificação destes fragmentos, estes, foram submetidos a duas overlaps, para obtenção de um fragmento híbrido, contendo a região codificadora da proteína 14-3-3Pb e as extremidades 5'UTR e 3'UTR de *S. cerevisiae*.(Figura 8)

Figura 8 Obtenção do fragmento híbrido

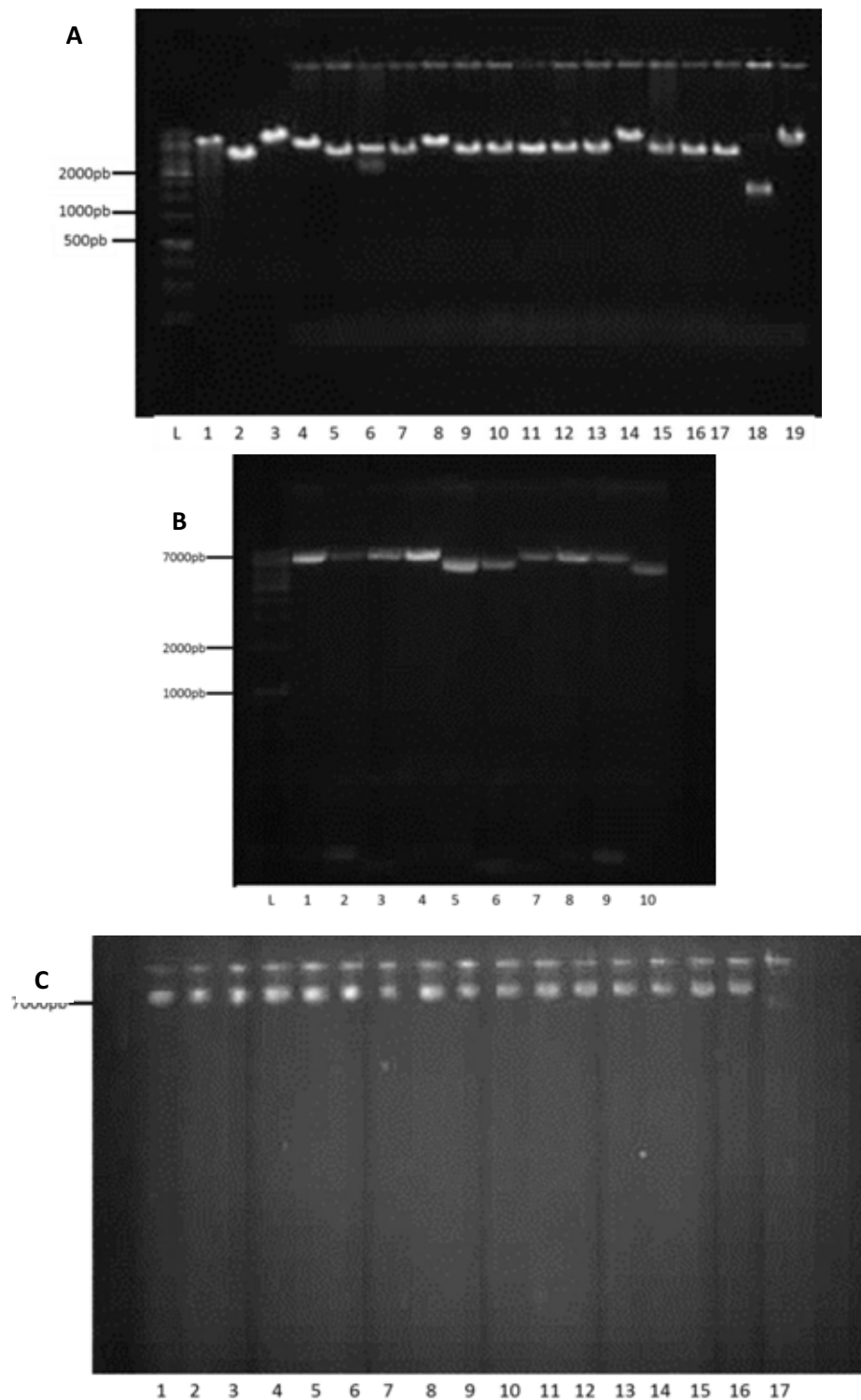


A - L: peso molecular de 1Kb (Fermentas), **1:** 5'UTR+14-3-3; **L:** peso molecular de 1Kb (Fermentas), **1:** fragmento híbrido (5'UTRSc+14-3-3Pb+3'UTRSc)

Após a obtenção do fragmento híbrido (5'UTRSc+14-3-3 Pb +3'UTRSc) e BMH1, amplificado a partir do DNA genômico de *S. cerevisiae*, foram realizadas ligações com os plasmídeos selecionados, onde o híbrido foi ligado aos plasmídeos pRS305 (centromérico) e pRS425 (2 µm) e BMH1 foi ligado ao plasmídeo pRS306 (centromérico). Estes plasmídeos recombinantes foram transformados em bactérias *E. coli* DH10B ultracompetentes através de choque térmico. Após o desenvolvimento das colônias, estas foram selecionadas e crescidas em meio LB suplementado com 50ug/mL de ampicilina overnight a 37°C com agitação de 200rpm.

Após a incubação foi realizada a extração plasmidial das mesmas, através do método da lise alcalina e foi verificada a presença dos insertos através da remoção dos mesmos pelo uso da enzima *BamHI*, onde foi observado positividade em um clone no plasmídeo pRS306 e em dois clones no plasmídeo pRS425 e em um clone no plasmídeo pRS305. Esse diagnóstico por restrição foi realizado por 3h a 37°C e ao término do período de incubação as amostras foram inativadas e analisadas em agarose 0,8%, como apresentado na figura 9.

Figura 9 Gel de agarose 0,8% para confirmação dos clones



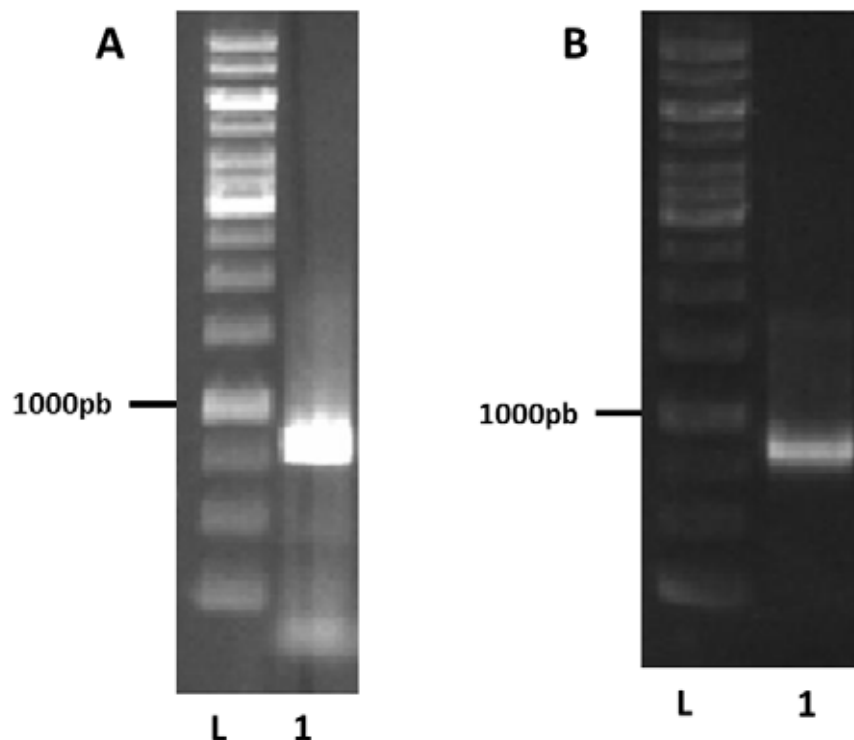
L: marcador molecular 1kb (Fermentas); **A:** Rastreamento através de restrição utilizando *Bam*HI no plasmídeo pRS306, demonstrando positividade no clone 15 (**18**). **B:** Rastreamento através de restrição utilizando *Bam*HI no plasmídeo pRS425, demonstrando positividade nos clone 5 e 6 (**5 e 6**). **C:** Rastreamento através de restrição utilizando *Bam*HI no plasmídeo pRS305, demonstrando positividade no clone 17 (**17**).

Devido aos problemas ocorridos com os clones obtidos, a estratégia foi reiniciada, porém diversos problemas surgiram impedindo a obtenção do homólogo funcional através desta estratégia, por isso para a obtenção do mesmo, outra abordagem foi utilizada, denominada Estratégia pYES.

4.3.2 Estratégia pYES

Utilizando o cDNA de *P. brasiliensis* realizou-se a amplificação da ORF da proteína 14-3-3 através de PCR e a partir do DNAg de *S. cerevisiae* foi obtida a ORF da proteína Bmh1p. A amplificação foi verificada através de eletroforese em gel de agarose 0,8%. (Figura10)

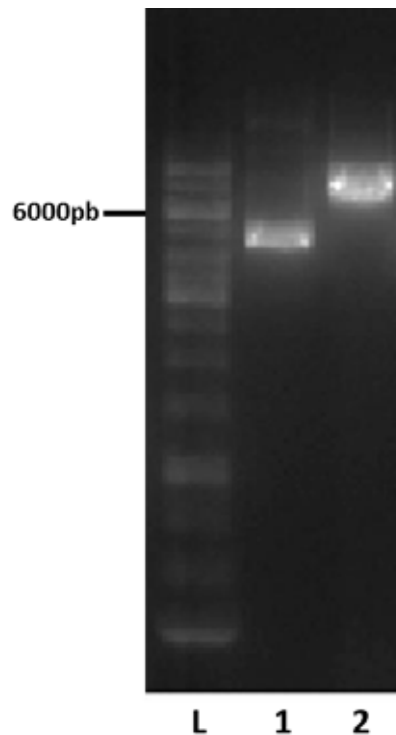
Figura 10 Confirmação da amplificação da ORF de 14-3-3Pb e da ORF de BMH1Sc



A: L- peso molecular de 1Kb (Fermentas), **1** – região codificadora da proteína 14-3-3 de *P. brasiliensis* (798pb); **B:** L-peso molecular de 1Kb (Fermentas), **1** – região codificadora da proteína Bmh1p de *S. cerevisiae* (804pb)

A digestão do inserto e do vetor foi realizada utilizando as enzimas *BamHI* e *XhoI* (Promega) nas condições já descritas. Foram testados vários tempos de digestão a fim de verificar o melhor tempo de digestão. O tempo mais adequado para a digestão foi o de uma hora. (Figura 11).

Figura 11 Confirmação da digestão do vetor pYES2 (Invitrogen) por gel de agarose 0,8%

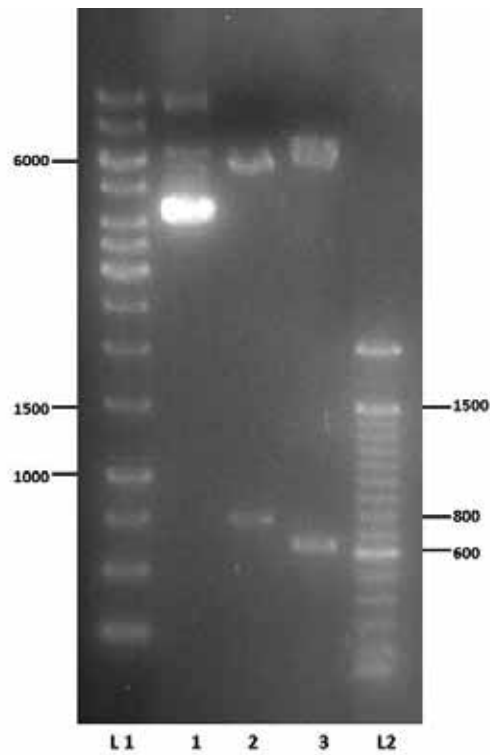


L- peso molecular de 1Kb (Fermentas), 1- vetor não digerido e 2- vetor digerido

Após a digestão do vetor e do inserto a ligação foi realizada utilizando a enzima T4 DNA ligase (NEB), durante 12 -16 horas a 16°C. Após este período, 1,0 µL de da ligação foi utilizada para a transformação em bactérias *E. coli* DH5α ultracompetentes. Em 50µL de bactéria foi adicionado 1,0µL de ligação, incubado por 30 minutos no gelo e 2 minutos a 42°C. Para a recuperação das bactérias, foram adicionados 2,0mL de meio LB e foi submetido à agitação a 37°C durante 1 hora. Após esta incubação, foi realizado o plaqueamento de 50 µL, 250 µL e do volume residual em placas de LB contendo ampicilina 100 µg/mL. As placas foram incubadas a 37°C por 12 a 16 horas.

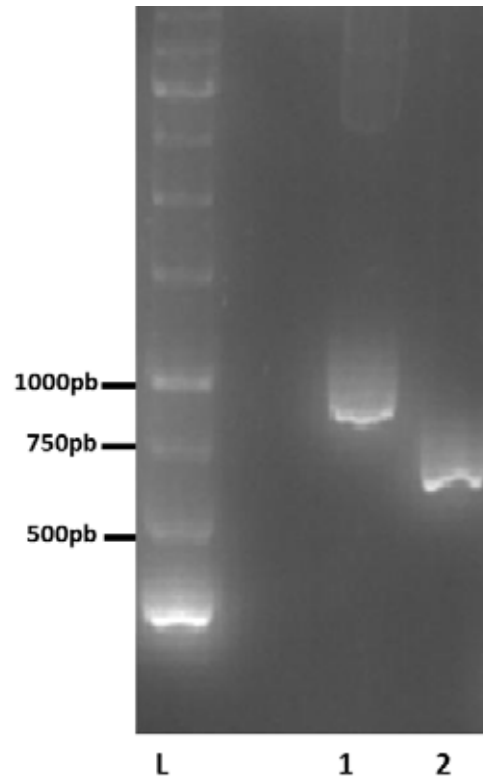
A confirmação das colônias positivas foi realizada através de dois diagnósticos por restrição. (Figura 12 e 13).

Figura 12 Confirmação da transformação do plasmídeo pYES-14-3-3Pb em *E. coli* DH5 α



L1: peso molecular de 1Kb (Fermentas), **1:** pYES-14-3-3Pb, **2:** produtos da restrição utilizando as enzimas *XhoI* e *BamHI* (Promega), ORF 14-3-3Pb (798pb) e pYes2 (5,9Kb), **3:** Produtos da digestão utilizando a enzima *HindIII* (Promega) - 605pb

Figura 13 Confirmação da transformação do plasmídeo pYES-BMH1Sc em *E. coli* DH5 α



L: peso molecular de 1Kb (Fermentas), **1:** produto da restrição utilizando as enzimas *EcoRI* e *BamHI* (Promega), ORF BMH1Sc (804pb) **2:** Produto da digestão utilizando a enzima *HindIII* (Promega) (615pb)

A partir da obtenção dos clones positivos pYES-14-3-3Pb e pYES-BMH1Sc deu-se início a transformação em levedura.

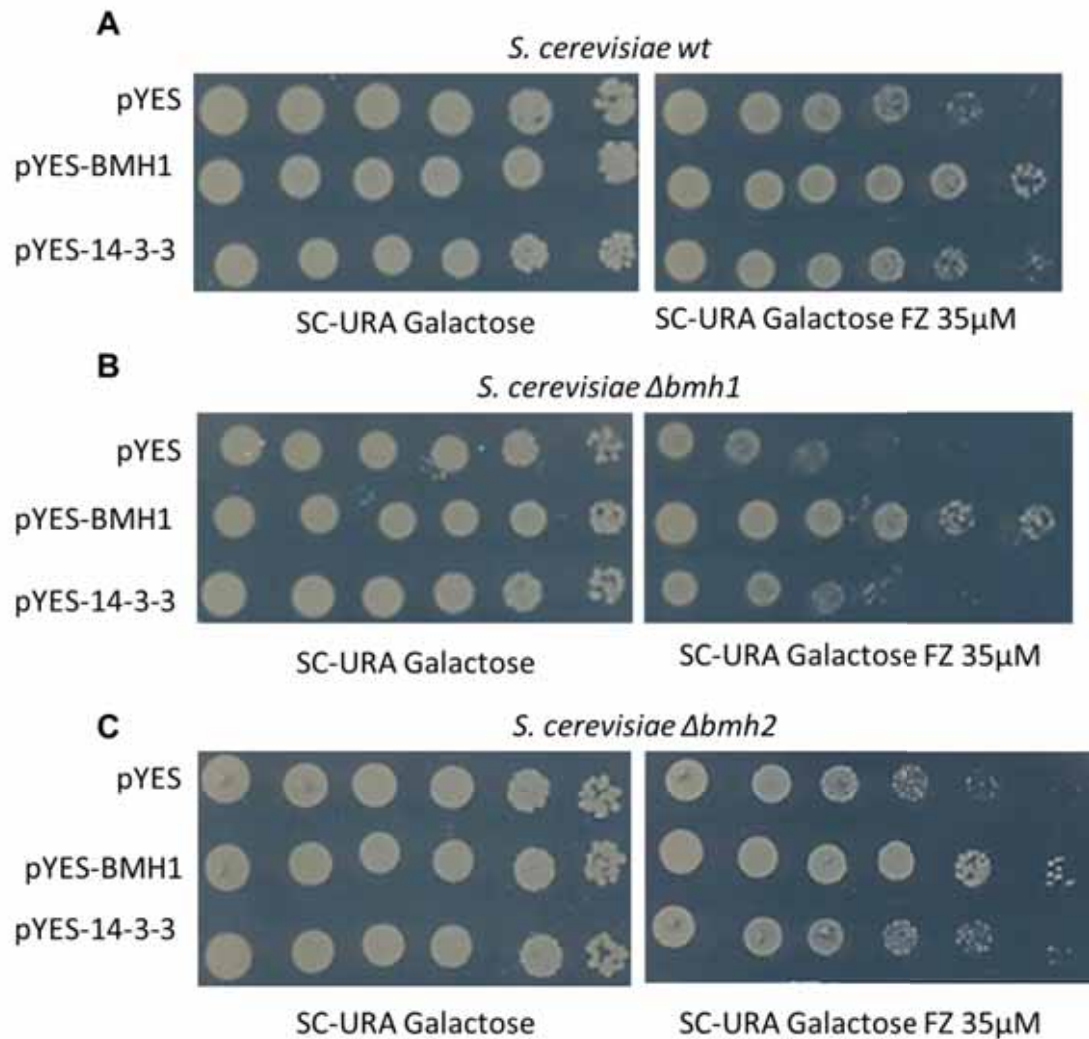
Os genes *BMH1* e *BMH2* de *S. cerevisiae* são essenciais à levedura, assim o duplo nocaute leva a letalidade (Van Heusden *et al.*, 1995), por isso decidimos avaliar a complementação da proteína 14-3-3Pb realizando a transformação da linhagens de *S. cerevisiae* *wt*, Δ *bmh1* e Δ *bmh2*, utilizando: o vetor pYES vazio, como controle de transformação; pYES-BMH1Sc como controle de complementação, uma vez que este é o gene majoritário de *S. cerevisiae* e pYES-14-3-3Pb. Os transformantes são selecionados em meio SC-URA.

4.3.3 Avaliação da complementação de 14-3-3Pb

A partir da obtenção dos transformantes, deu-se início aos ensaios de complementação, utilizando o banco de dados *Saccharomyces Genome Database* para avaliação das possibilidades para realização deste estudo, alguns fármacos

foram selecionados para os ensaios de complementação, porém apenas o fármaco fluconazol (FZ), na concentração de 35 μ M apresentou diferenças fenotípicas entre os transformantes controle (*S. cerevisiae wt*, Δ *bmh1* e Δ *bmh2* com *pYES*), assim este foi selecionado verificar a complementação de 14-3-3Pb em *S. cerevisiae*. (Figura 14)

Figura 14 Avaliação da complementação de 14-3-3Pb em *S. cerevisiae*



Avaliação da complementação mediante diminuição da sensibilidade dos transformantes de *S. cerevisiae wt* (**A**), Δ *bmh1* (**B**) e Δ *bmh2* (**C**). SC-URA Galactose foi utilizado como controle de crescimento e SC-URA Galactose contendo fluconazol 35 μ M para avaliação da complementação, onde é possível observar diminuição da sensibilidade ao fluconazol dos transformantes contendo o vetor pYES-BMH1 e pYES-14-3-3 quando comparado aos transformantes contendo vetor vazio (pYES).

A levedura *S. cerevisiae* possui duas isoformas da proteína 14-3-3, Bmh1p e Bmh2p, que após realizarmos o alinhamento das sequências de aminoácidos entre

estas proteínas e a proteína 14-3-3Pb foi observado uma alta identidade entre elas, de 76% e 80% para Bmh1p e Bmh2p, respectivamente. Os genes *BMH1* e *BMH2* de *S. cerevisiae* são essenciais à célula, sendo o duplo nocaute letal, porém a deleção de apenas um dos genes não causa inviabilidade celular, assim neste estudo foram utilizadas as linhagens de *S. cerevisiae wt*, $\Delta bmh1$ e $\Delta bmh2$ para o estudo da proteína 14-3-3Pb.

Apesar de duas estratégias terem sido utilizadas para a obtenção do homólogo funcional de 14-3-3Pb, não foi possível a obtenção deste através da estratégia *Overlap*, devido a problemas ocorridos durante esta abordagem. Assim outra estratégia foi adotada para a obtenção do homólogo funcional, denominada Estratégia pYES. Esta consiste na utilização do vetor pYES2 (Invitrogen), amplamente utilizado para expressão de proteínas em *S. cerevisiae*, pois esse plasmídeo permite a clonagem apenas da ORF do gene de interesse, uma vez que contém um promotor de *S. cerevisiae*, *GAL1*, onde o controle da expressão se dá pela indução por galactose.

Através desta estratégia, foi realizada a transformação nas três linhagens de *S. cerevisiae*, utilizando: vetor vazio (pYES), como controle de transformação; vetor ligado à ORF do gene *BMH1* (pYES-BMH1), como controle de complementação; e vetor ligado à 14-3-3Pb (pYES-14-3-3Pb), objeto de estudo. A transformação foi realizada através do método de acetato de lítio e os transformantes foram selecionados em meio SC-URA.

Os ensaios de complementação demonstraram, como pode ser observado na figura 13, a proteína 14-3-3Pb apresentou uma complementação parcial da função das proteínas Bmh1p e Bmh2p, uma vez que apesar de apresentar menor sensibilidade ao fluconazol, quando comparado aos transformantes de *S. cerevisiae* pYES, nos transformantes de *S. cerevisiae* pYES-BMH1, esta sensibilidade é ainda menor. A maior complementação ocorreu na linhagem *S. cerevisiae* $\Delta bmh2$, o que era esperado uma vez que a maior identidade entre as sequências de proteína ocorreu entre Bmh2p e 14-3-3Pb. Além disso, foi possível observar que nos transformantes *S. cerevisiae wt* a expressão da proteína ocorreu e mesmo com esta linhagem possuindo os dois genes que codificam proteínas 14-3-3, os *BMH1* e *BMH2*, as proteínas expressas pelo vetor estão desenvolvendo outra função provavelmente relacionada à potencialização da síntese de ergosterol promovido pelo aumento da transcrição de genes da via biossintética de ergosterol, por

exemplo, o gene ERG11 (Bruckmann *et al.*, 2004), que codifica a proteína 14-alfa demetilase, alvo do fármaco fluconazol. Isso pode ser observado na redução da sensibilidade dos transformantes *S. cerevisiae wt* pYES-BMH1 e pYES-14-3-3

Assim, apesar da complementação parcial de 14-3-3Pb às proteínas de *S. cerevisiae*, Bmh1p e Bmh2p, pode-se sugerir que, assim como em *S. cerevisiae*, 14-3-3Pb desempenha múltiplas funções, entre elas, na morfogênese e no crescimento celular. Conforme descrito em estudo de análise funcional das proteínas Bmh1p e Bmh2p para *S. cerevisiae*, onde foi construído um mutante condicional na ausência dos dois genes, *BMH1* e *BMH2* e também contendo um plasmídeo ligado a 14-3-3 de *Arabidopsis*, em condições onde a expressão da proteína foi gradualmente diminuída, foi observada uma diminuição na taxa de crescimento, bem como alterações morfológicas nas leveduras apresentando-se maiores e com formatos irregulares (Van Heusden *et al.*, 1995). Em outro estudo, o desenvolvimento de pseudohifas de *S. cerevisiae* também foi relacionado às proteínas Bmh1p e Bmh2, via cascata de sinalização RAS/MAPK, ativada em condições de privação de nitrogênio (Roberts, Mösch e Fink, 1997). Em outros fungos, como *Candida albicans*, onde os mutantes para Bmh1p apresentaram diversos defeitos na filamentação e diminuição na taxa de crescimento (Cognetti, Davis e Sturtevant, 2002; Kelly *et al.*, 2009) e *Aspergillus nidulans*, que também apresenta uma proteína 14-3-3, denominada ArtA, onde esta apresentou sua função relacionada a morfogênese onde a superexpressão de *ArtA* acarretou defeitos no tubo germinativo e no desenvolvimento assexuado (Kraus, Hofmann e Harris, 2002).

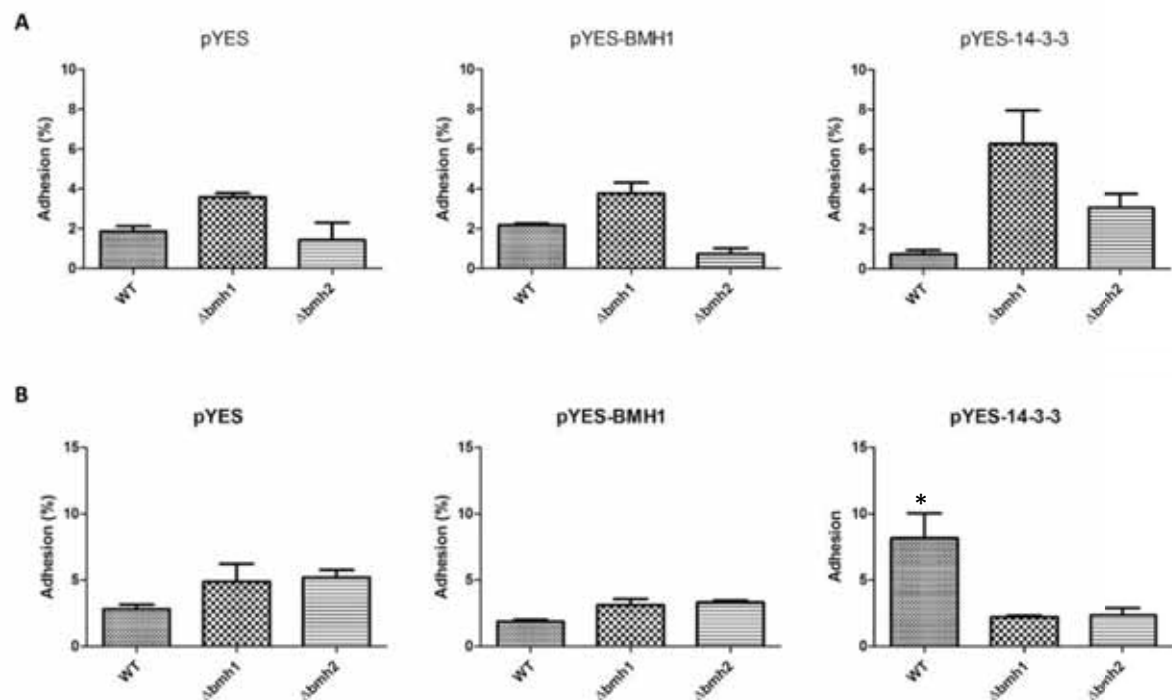
Em estudo realizado por Kakiuchi e colaboradores (2002), foi demonstrada a interação *in vivo* das proteínas Bmh1p e Bmh2p com mais de 200 proteínas, implicando o papel dessas proteínas em inúmeros processos celulares, como em resposta ao dano ao DNA, sendo requeridas nas vias de *DNA checkpoint* e na manutenção da estabilidade do genoma; ciclo celular; resposta ao stress; transporte vesicular (Gelperin *et al.*, 1995; Van Heusden e Steensma, 2006; Lottersberger *et al.*, 2007; Grandin e Charbonneau, 2008). Neste estudo, foi detectada a interação das proteínas Bmh1p e Bmh2p com a proteína gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH), que além de participar no metabolismo da glicose, pode ser encontrada na parede celular de *S. cerevisiae* em resposta a mudança de temperatura (Delgado, Gil e Gozalbo, 2003) e em *P. brasiliensis* a GAPDH também foi caracterizada como uma adesina, ligante de laminina, fibronectina e colágeno tipol

(Barbosa *et al.*, 2006). A interação entre 14-3-3Pb e outras adesinas poderia auxiliar no processo de infecção de *Paracoccidioides* spp. e no estabelecimento da infecção, tornando esta proteína ainda mais interessante como um possível alvo terapêutico, porém mais estudos são necessários para verificar as possíveis interações entre 14-3-3 e as outras adesinas de *Paracoccidioides* spp.

4.3.4 Teste de Adesão

O teste de adesão ainda está em padronização, porém foi realizado um teste preliminar por plaqueamento de acordo com Younes e colaboradores (2013), com algumas modificações, e os resultados são demonstrados a seguir, na figura 15

Figura 15 Gráficos dos perfis de adesão dos transformantes de *S. cerevisiae*



A: Perfil da adesão às células A549 após indução por galactose por 2 horas dos transformantes de *S. cerevisiae*. **pYES:** transformantes de *S. cerevisiae* wt, Δ bmh1 e Δ bmh2 contendo pYES (vetor vazio); **pYES-BMH1:** transformantes de *S. cerevisiae* wt, Δ bmh1 e Δ bmh2 contendo pYES-BMH1 e **pYES-14-3-3:** transformantes de *S. cerevisiae* wt, Δ bmh1 e Δ bmh2 contendo pYES-14-3-3Pb. **B:** Perfil da adesão às células A549 após indução por galactose por 4 horas dos transformantes de *S. cerevisiae* **pYES:** transformantes de *S. cerevisiae* wt, Δ bmh1 e Δ bmh2 contendo pYES (vetor vazio); **pYES-BMH1:** transformantes de *S. cerevisiae* wt, Δ bmh1 e Δ bmh2 contendo pYES-BMH1 e **pYES-14-3-3:** transformantes de *S. cerevisiae* wt, Δ bmh1 e Δ bmh2 contendo pYES-14-3-3Pb. (*) $p < 0,005$

Em duas horas, foi possível observar um aumento na expressão da adesão dos transformantes *S. cerevisiae* $\Delta bmh1$ e $\Delta bmh2$ contendo o vetor pYES-14-3-3Pb, porém o mesmo não pode ser observado para o transformante *S. cerevisiae* *wt* contendo o vetor pYES-14-3-3Pb. Após 4 horas de indução por galactose, a situação se inverteu e foi possível observar um aumento na adesão de *S. cerevisiae* *wt* contendo o vetor pYES-14-3-3Pb e uma diminuição na adesão de *S. cerevisiae* $\Delta bmh1$ e $\Delta bmh2$ contendo o vetor pYES-14-3-3Pb.

Em *P. brasiliensis* já foi demonstrado a presença da proteína 14-3-3Pb durante o processo de infecção em cultura celular, às células A549 como neste estudo, e em camundongos, onde foi observado um acúmulo de 14-3-3Pb durante estas interações (Da Silva *et al.*, 2013).

A indução realizada por galactose ainda está em processo de padronização uma vez que durante os experimentos de adesão foi observada uma diferença no crescimento que pode ser atribuída aos tempos de indução, uma vez que o plasmídeo utilizado apresenta um alto número de cópias, a expressão da proteína deve ser avaliada de maneira cuidadosa, como em experimento de viabilidade, para verificar se a expressão da proteína pode ser tóxica para a levedura, após diferentes tempos de indução por galactose, e expressão da proteína marcada com o anticorpo monoclonal anti-14-3-3 (experimentos em andamento).

Ao realizar uma busca na literatura é possível encontrar inúmeros artigos utilizam vetores com promotor de galactose para estudos de análise funcional de proteínas de diversos organismos, assim não se esperava uma influência da galactose na avaliação da adesão. Porém a utilização da galactose pela levedura ocasiona ativação ou supressão de uma série de promotores da própria levedura (Timson, 2007) que poderia levar a alterações na expressão do fenótipo de uma maneira inesperada, por isso toda a avaliação da expressão da proteína 14-3-3Pb em *S. cerevisiae* está sendo padronizada.

Apesar da técnica ainda estar sob padronização, é possível observar um aumento na adesão das linhagens transformadas com pYES-14-3-3, destacando-se o transformante *S. cerevisiae* *wt* contendo o vetor pYES-14-3-3Pb, que após a indução da expressão por 4 horas apresentou um significativo aumento na adesão as células A549. A linhagem selvagem possui os dois genes da levedura, *BMH1* e *BMH2*, assim pode-se sugerir que ao contrário das linhagens *S. cerevisiae* $\Delta bmh1$ e $\Delta bmh2$, que possuem a deficiência na produção de 14-3-3, assim quando

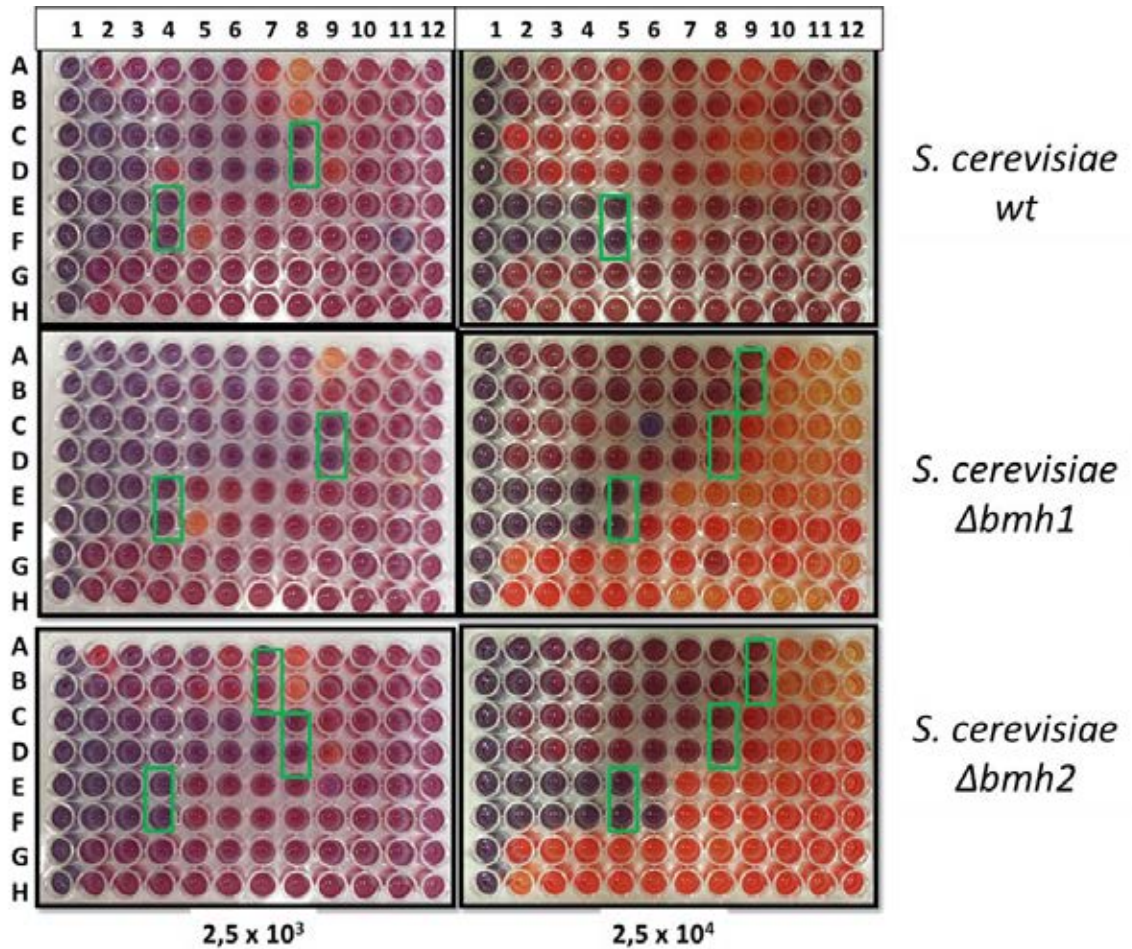
transformadas com o vetor pYES-14-3-3Pb, assim a 14-3-3Pb complementa, parcialmente como visto anteriormente, a função das proteínas Bmh1p e Bmh2p, porém no caso da linhagem selvagem, essa deficiência não ocorre, sendo possível ocorrer um recrutamento da 14-3-3Pb apenas para a adesão, como ocorre em *Paracoccidioides* spp (Da Silva *et al.*, 2013).

4.4 Teste de sensibilidade

O teste de sensibilidade das linhagens de *S. cerevisiae* *wt*, Δ *bmh1e* Δ *bmh2* frente aos antifúngicos. O método foi realizado de acordo com o documento M27-A3, do CLSI, com modificações descritas a seguir. O meio utilizado foi YEPD, pois em experimento anterior utilizando o meio preconizado pelo documento, RPMI-1640, não houve crescimento satisfatório das leveduras. Comparou-se a utilização de duas concentrações de inóculo, $2,5 \times 10^3$ e $2,5 \times 10^4$ para verificar qual era melhor concentração a ser utilizada nos demais teste, onde foi determinado que a concentração de $2,5 \times 10^4$ seria utilizada, embora as CIMs apresentaram-se iguais nas duas concentrações, a melhor visualização do resultado ocorreu com esta concentração. (Figura 16)

A leitura das placas foi realizada visualmente após 24 horas de incubação mediante a adição da solução de resazurina 0,001%.

Figura 16 Padronização do inóculo de *S. cerevisiae wt*, $\Delta bmh1$ e $\Delta bmh2$ para o teste de sensibilidade.



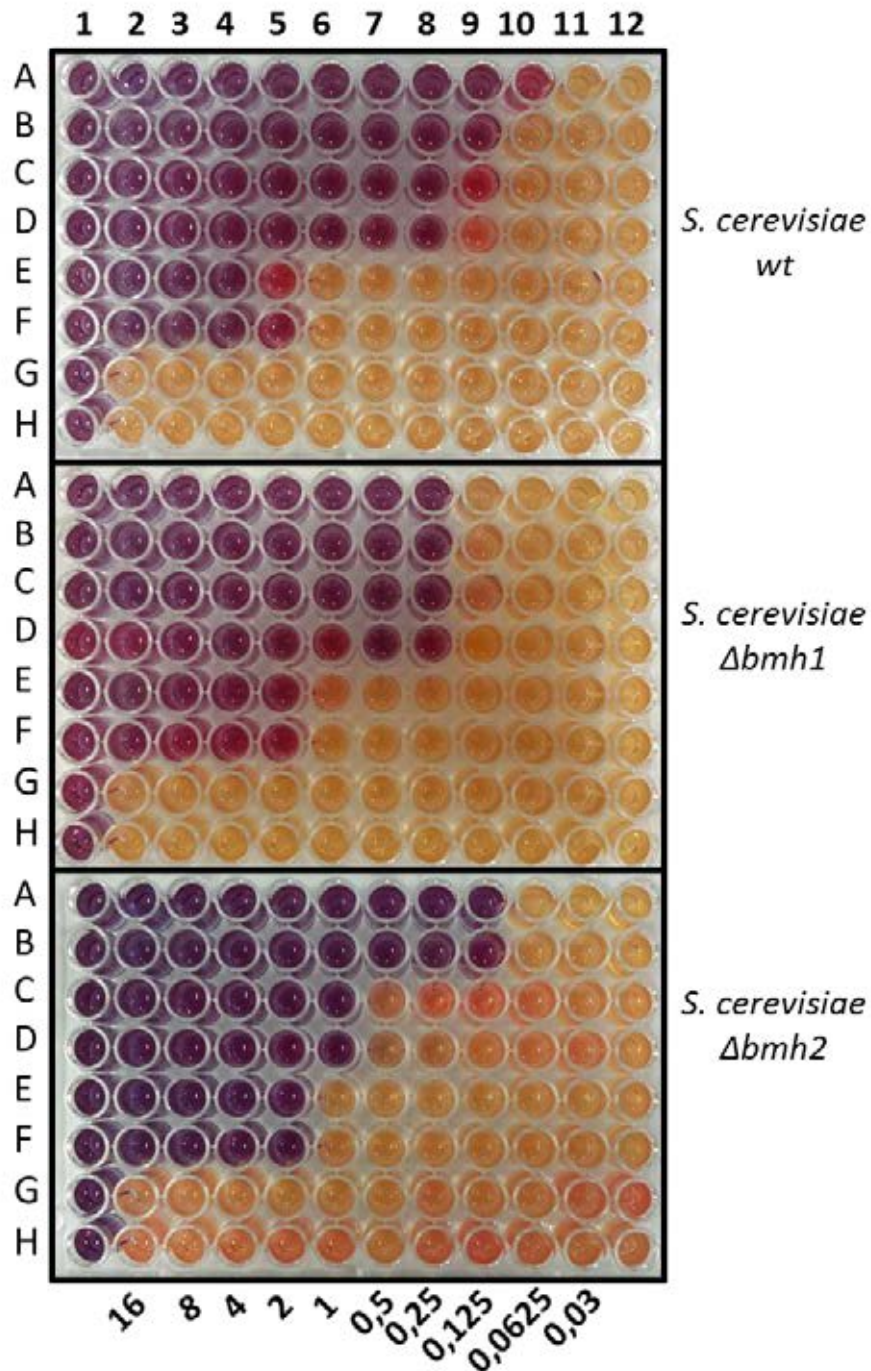
Linhas - A e B: VCZ, **C e D:** ITZ, **E e F:** AMB, **G e H:** DMSO (dilúente dos fármacos) **Colunas - 1:** controle de esterilidade do meio, **12:** control negativo (fungo sem os antifúngicos), **2-11:** diluição seriada dos antifúngicos, iniciando-se na concentração de 16µg/mL no poço 2.

Após a padronização do inóculo, foi realizado o teste de sensibilidade com os antifúngicos itraconazol (ITZ), voriconazol (VCZ) e anfotericina B (AMB) e do controle de DMSO, de acordo com o documento M27-A3, do CLSI, com as modificações citadas acima e utilizando o inóculo de $2,5 \times 10^4$ (Figura 17). Na tabela abaixo (tabela 2) se pode notar que as linhagens de *S. cerevisiae* $\Delta bmh1$ e $\Delta bmh2$ são mais suscetíveis às drogas antifúngicas quando comparadas a *S. cerevisiae wt*.

Tabela 2 CIMs dos antifúngicos VCZ, ITZ e AMB para as cepas de *S. cerevisiae* wt, $\Delta bmh1$ e $\Delta bmh2$

Concentração Inibitória Mínima ($\mu\text{g/mL}$)			
Cepa	VCZ	ITZ	AMB
<i>S. cerevisiae</i> wt	0,25	0,5	4,0
<i>S. cerevisiae</i> $\Delta bmh1$	0,25	0,25	2,0
<i>S. cerevisiae</i> $\Delta bmh2$	0,0125	1,0	2,0

Figura 17 Teste de sensibilidade aos antifúngicos VCZ, ITZ e AMB



Linhas - A e B: VCZ – CIM de 0,25µg/mL para *S. cerevisiae wt* e *Δbmh1* e 0,0125 µg/mL para *S. cerevisiae Δbmh2*, **C e D:** ITZ - CIM de 0,5 µg/mL para *S. cerevisiae wt*, 0,25 µg/mL para *S. cerevisiae Δbmh1* e 0,0125 µg/mL para *S. cerevisiae Δbmh2*, **E e F:** AMB - CIM de 4,0 µg/mL para *S. cerevisiae wt* e 2,0 µg/mL para *S. cerevisiae Δbmh1* e *Δbmh2*. **G e H:** DMSO – diluente dos fármacos. **Colunas - 1:** controle de esterilidade do meio, **12:** controle negativo (fungo sem os antifúngicos), **2-11:** diluição seriada dos antifúngicos, iniciando-se na concentração de 16µg/mL no poço 2.

Os fármacos itraconazol e voriconazol são antifúngicos da classe dos azóis e atuam na biossíntese de ergosterol, principal lipídeo presente nos fungos, a diminuição da produção de ergosterol acarreta uma desestabilização da membrana, tornando o fungo mais vulnerável e altera a ligação de enzimas ligantes de membrana relacionadas a nutrição e produção de quitina (Sheehan, Hitchcock e Sibley, 1999). Itraconazol, um triazol de primeira geração, é um dos fármacos de escolha para o tratamento da paracoccidioidomicose com baixa ou moderada severidade, enquanto voriconazol, triazol de segunda geração, tem sido utilizado em apenas alguns casos de paracoccidioidomicose, e o conhecimento sobre sua eficácia contra *Paracoccidioides* spp. ainda é limitado (Granzoto, Vitali e Martinez, 2013).

A anfotericina B, pertence à classe dos polienos, considerada padrão-ouro para o tratamento de infecções sistêmicas, inclusive em formas severas de paracoccidioidomicose, seu principal mecanismo de ação é a ligação ao ergosterol, provocando uma desestabilização da membrana celular e consequente desequilíbrio osmótico. O dano oxidativo à célula fúngica também já foi associado a este fármaco (Georgopapadakou e Walsh, 1996; Ellis, 2002; Cataño e Aguirre, 2013).

Por estes fármacos serem relacionados com ergosterol, o fenótipo de sensibilidade de *S. cerevisiae wt*, $\Delta bmh1$ e $\Delta bmh2$ a estes antifúngicos foram avaliados para verificar uma possível relação entre as proteínas 14-3-3 e o ergosterol, conforme relatado por Bruckmann e colaboradores (2004), que descreveram a relação de 14-3-3 na regulação da transcrição no metabolismo de ergosterol.

O aumento da sensibilidade aos antifúngicos das linhagens nocauteadas, *S. cerevisiae* $\Delta bmh1$ e $\Delta bmh2$ quando comparado com a linhagem selvagem, *S. cerevisiae wt*, sugere que a diminuição da expressão destas proteínas, devido ao nocaute, acarreta numa diminuição da produção de ergosterol e na presença da droga a quantidade de ergosterol na célula poderia ser ainda menor, provocando danos na célula acarretando no aumento da sensibilidade.

Possivelmente a proteína 14-3-3Pb, por possuir alta identidade e ser capaz de complementar parcialmente as funções de Bmh1p e Bmh2p, a proteína 14-3-3Pb pode também estar envolvida na via biossintética de ergosterol, e isso será analisado através de ensaios de sensibilidade e quantificação de ergosterol nos transformantes obtidos. Estes ensaios estão em fase de padronização, uma vez que

a alteração do meio de YEPD para SC-URA, meio seletivo dos transformantes, acarreta numa alteração das CIM's.

As proteínas 14-3-3 desempenham inúmeras funções e em *P. brasiliensis* foi relacionado ao processo adesivo às células do hospedeiro, assim tornam-se potenciais alvos para o desenvolvimento e prospecção de substâncias antifúngicas.

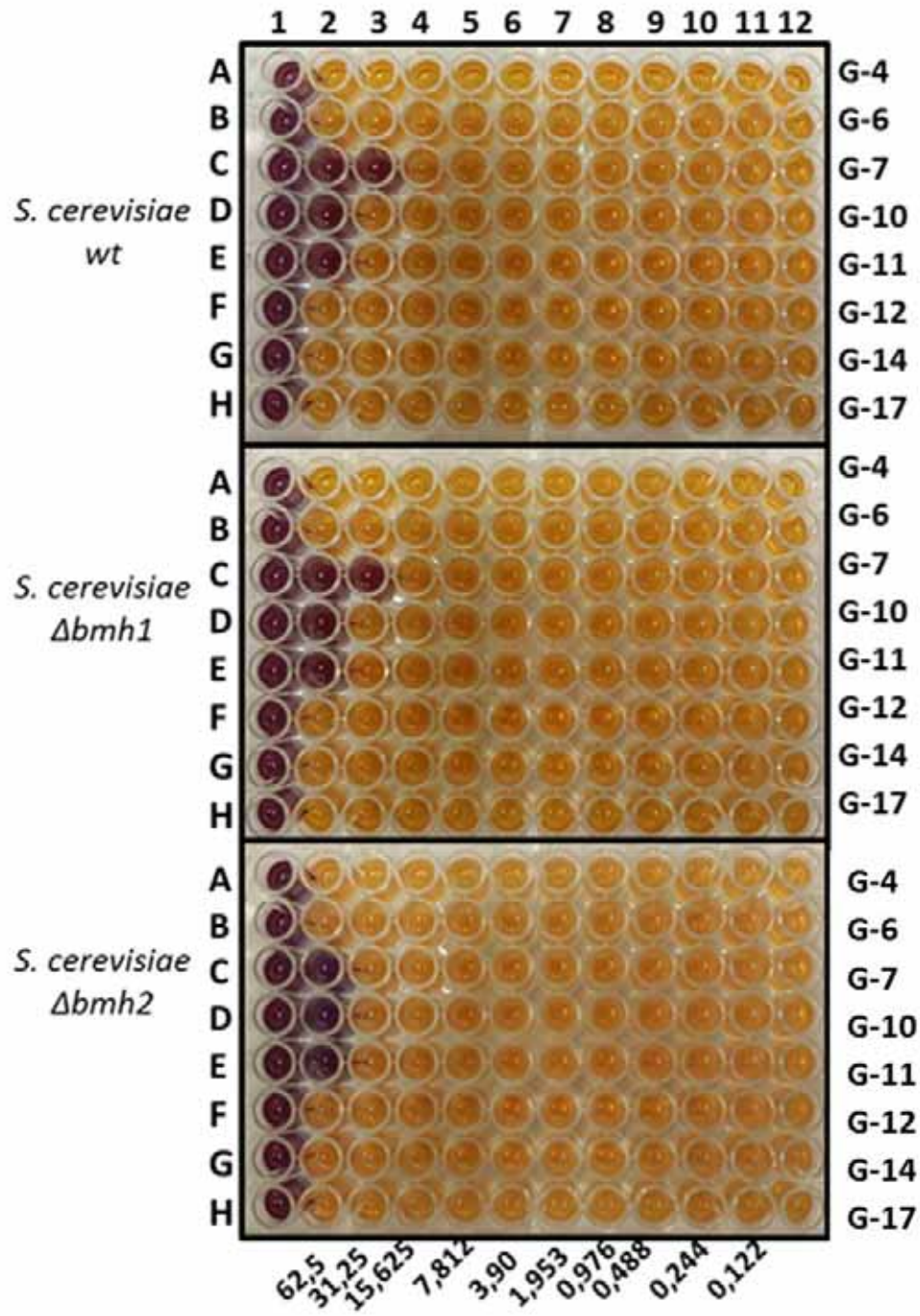
O ácido gálico bem como seus derivados, galatos de alquila, já foram descritos quanto a sua atividade antifúngica (Nguyen *et al.*, 2013; Ito *et al.*, 2014). Em estudo anterior em nosso laboratório foi verificado a atividade antifúngica do ácido gálico, proveniente da *Alchornea glandulosa* e seus derivados, onde estes apresentaram potencial atividade anti-*Paracoccidioides*. Ainda neste estudo, foi realizada a análise proteômica diferencial de isolados de *Paracoccidioides* sp quando tratados com galatos de alquila, onde foi identificado uma diminuição na expressão da proteína 14-3-3Pb quando tratado, levantando o questionamento de qual seriam as possíveis relações entre o galato de alquila e as proteínas 14-3-3Pb (De Paula E Silva, 2012).

Assim, a prospecção moléculas com potencial antifúngico, com atividade anti-*Paracoccidioides*, cuja ação pode estar relacionada com proteínas 14-3-3, foi realizado teste de sensibilidade das linhagens *S. cerevisiae wt*, $\Delta bmh1$ e $\Delta bmh2$ frente aos galatos de alquila, seguindo a padronização realizada com as drogas antifúngicas, descritas previamente. As leveduras não se mostraram sensíveis à maioria dos galatos, exceto para os galatos G-7, G-10 e G-11. (Tabela 3 e Figura 18). Não houve diferença entre as CIMs, exceto para G-7, entre a linhagem selvagem e as nocauteadas, o que indica que os galatos de alquila não agem diretamente na proteína 14-3-3, mas sim em vias que ativam a expressão desta proteína.

Tabela 3 Valores de CIMs para derivados de ácido gálico das cepas de *S. cerevisiae wt*, $\Delta bmh1$ e $\Delta bmh2$.

Concentração Inibitória Mínima ($\mu\text{g/mL}$)			
Cepa	G-7	G-10	G-11
<i>S. cerevisiae wt</i>	31,25	62,5	62,5
<i>S. cerevisiae $\Delta bmh1$</i>	31,5	62,5	62,5
<i>S. cerevisiae $\Delta bmh2$</i>	62,5	62,5	62,5

Figura 18 Teste de sensibilidade aos derivados de ácido gálico.



Colunas - 1: controle de esterilidade do meio, 12: controle do inoculo, 2-11: diluição seriada dos galatos, iniciando-se na concentração de 62,5 μ g/mL no poço 2.

4.5 Ensaio de inibição da adesão de *P. brasiliensis*

O ensaio de inibição foi realizado para verificar a interferência do MAb 14-3-3 e da sua associação com ácido gálico e seus derivados na ligação de *P. brasiliensis* a células epiteliais A549, através da técnica de ELISA.

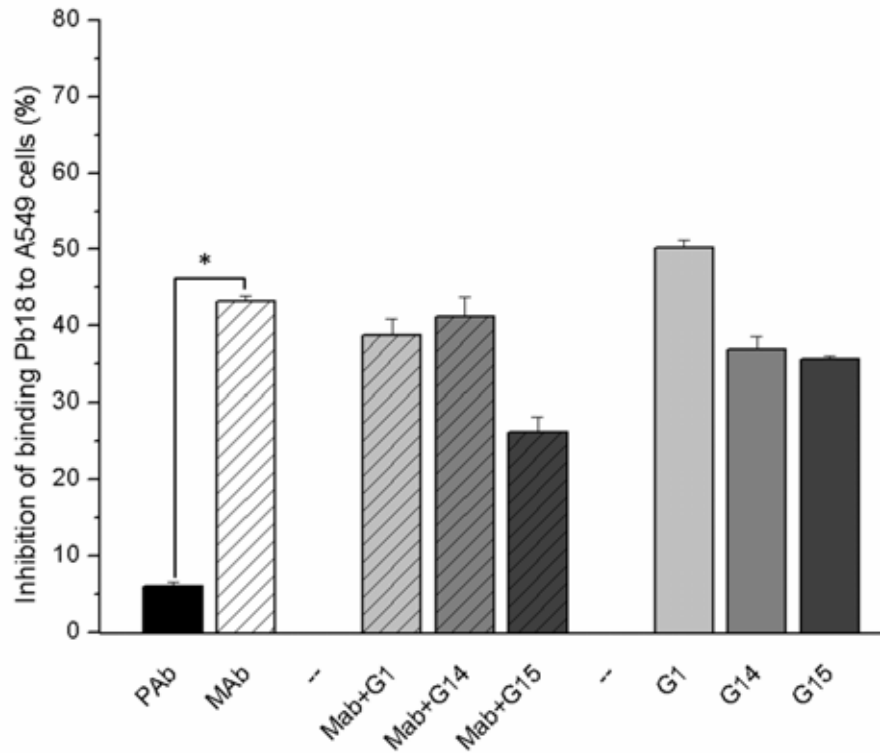
Para o experimento, o inóculo foi previamente tratado com MAb 14-3-3 (1:1000); com galatos associados ao MAb 14-3-3 (1:1000); com galatos de alquila em suas respectivas concentrações inibitórias mínimas (CIMs), obtidos em estudos anteriores (de Paula e Silva, 2012); ou com o PAb 14-3-3, por 1 hora a 37°C. Após o pré-tratamento os inóculos foram lavados e ressuspensos no volume original e adicionado às células, após incubação por 24 horas a 37°C, deu-se início ao ensaio de ELISA, utilizando anti-cell free (1:100) como anticorpo primário e anti-rabbit IgG (1:3000) como anticorpo secundário.

Foram utilizadas células não infectadas e células infectadas sem o pré-tratamento como controles experimentais.

A proteína 14-3-3Pb, descrita em nosso laboratório, como ligante de laminina, componente majoritário da matriz extracelular da célula hospedeira (Andreotti *et al.*, 2005), também foi encontrada na parede celular do fungo durante a infecção *in vitro* e *in vivo* (Da Silva *et al.*, 2013). Assim este ensaio teve como objetivo avaliar a interferência do mAb 14-3-3 na adesão às células A549. Adicionalmente, foi realizado a associação do mAb 14-3-3 com galatos de alquila, uma vez que, como descrito anteriormente, foi observado uma diminuição na expressão da proteína 14-3-3Pb mediante ao tratamento de *Paracoccidioides* spp com galatos de alquila (De Paula E Silva, 2012). Assim, a fim de verificar a possibilidade do galato de alquila ter um papel na inibição da adesão, sendo capaz de promover um aumento da inibição da adesão conferida pelo mAb 14-3-3, a associação mAb14-3-3 e galatos de decila, foram avaliados no teste de adesão.

A inibição de *Paracoccidioides brasiliensis* mediante tratamento com mAb 14-3-3 isolado ou em associação com galatos de alquila foi maior que 40%, demonstrando a importância da proteína 14-3-3 durante o processo de adesão de *P. brasiliensis* às células hospedeiras, porém a associação com os galatos de alquila não promoveu uma aumento da inibição, levando a crer que os galatos de alquila não possuem uma ação anti-adesiva, apresentando apenas capacidade de inibição da adesão dos fungos às células demonstrada pelo tratamento com os galatos alquila, relacionada a ação antifúngica destas substâncias. (Figura 19).

Figura 19 Gráfico da inibição da adesão de *P. brasiliensis*, isolado Pb18, às células epiteliais A549.



pAb: anticorpo policlonal anti-14-3-3Pb; **mAb:** anticorpo monoclonal anti -14-3-3Pb; **mAb+G1**, **mAb+G14** e **mAb+G15:** associação entre anticorpo monoclonal anti-14-3-3Pb e ácido gálico e derivados G14 e G15, respectivamente, **G1:** ácido gálico; **G14** e **G15:** derivados do ácido gálico.
 (*) $p < 0,005$

5. Conclusões

- Foi possível obter homólogo funcional de 14-3-3Pb utilizando como modelo a levedura *S. cerevisiae*
- 14-3-3Pb é capaz de complementar parcialmente a função das proteínas Bmh1p e Bmh2p de *S. cerevisiae*, sendo possível observar uma maior complementação na função da proteína Bmh2p, com quem possui maior identidade (80%)
- O índice de adesão, às células epiteliais A549, dos transformantes de *S. cerevisiae* expressando a proteína 14-3-3Pb é maior, quando comparado aos controle
- De acordo com os testes de sensibilidade aos antifúngicos foi demonstrada a possível interação entre as proteínas 14-3-3 e a via de ergosterol
- Na avaliação com anticorpo monoclonal, foi possível verificar a inibição da adesão de *P. brasiliensis* de maneira mais eficaz que o anticorpo policlonal e assim confirmar a função no processo adesivo
- Os galatos de alquila, apesar de apresentarem potencial antifúngico, sua ação provavelmente não está diretamente relacionada com as proteínas 14-3-3.

6. Referências Bibliográficas

AMEEN, M.; TALHARI, C.; TALHARI, S. Advances in paracoccidioidomycosis. **Clin Exp Dermatol**, v. 35, n. 6, p. 576-80, Aug 2010. ISSN 1365-2230. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19874328> >.

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

BAGAGLI, E. et al. High frequency of *Paracoccidioides brasiliensis* infection in armadillos (*Dasypus novemcinctus*): an ecological study. **Med Mycol**, v. 41, n. 3, p. 217-23, Jun 2003. ISSN 1369-3786. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12964713> >.

BARBOSA, M. S. et al. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Paracoccidioides brasiliensis* is a cell surface protein involved in fungal adhesion to extracellular matrix proteins and interaction with cells. **Infect Immun**, v. 74, n. 1, p. 382-9, Jan 2006. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16368993> >.

BARR, M. M. Super models. **Physiol Genomics**, v. 13, n. 1, p. 15-24, Mar 2003. ISSN 1531-2267. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12644630> >.

BARRETO, L. et al. Expression of *Paracoccidioides brasiliensis* CHS3 in a *Saccharomyces cerevisiae* chs3 null mutant demonstrates its functionality as a chitin synthase gene. **Yeast**, v. 27, n. 5, p. 293-300, May 2010. ISSN 1097-0061. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20037924> >.

BELLISSIMO-RODRIGUES, F. et al. Endemic paracoccidioidomycosis: relationship between clinical presentation and patients' demographic features. **Med Mycol**, v. 51, n. 3, p. 313-8, Apr 2013. ISSN 1460-2709. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22928923> >.

BOCCA, A. L. et al. Paracoccidioidomycosis: eco-epidemiology, taxonomy and clinical and therapeutic issues. **Future Microbiol**, v. 8, n. 9, p. 1177-91, Sep 2013. ISSN 1746-0921. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24020744> >.

BRUCKMANN, A. et al. Regulation of transcription by *Saccharomyces cerevisiae* 14-3-3 proteins. **Biochem J**, v. 382, n. Pt 3, p. 867-75, Sep 2004. ISSN 1470-8728. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15142031> >.

BRUMMER, E.; CASTANEDA, E.; RESTREPO, A. Paracoccidioidomycosis: an update. **Clin Microbiol Rev**, v. 6, n. 2, p. 89-117, Apr 1993. ISSN 0893-8512. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8472249> >.

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

CASTRO, N. A. S. et al. Characterization and functional analysis of the beta-1,3-glucanosyltransferase 3 of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **FEMS Yeast Res**, v. 9, n. 1, p. 103-14, Feb 2009. ISSN 1567-1364. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19076240> >.

CATAÑO, J. C.; AGUIRRE, H. D. Disseminated paracoccidioidomycosis. **Am J Trop Med Hyg**, v. 88, n. 3, p. 407-8, Mar 2013. ISSN 1476-1645. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23468353> >.

COGNETTI, D.; DAVIS, D.; STURTEVANT, J. The *Candida albicans* 14-3-3 gene, BMH1, is essential for growth. **Yeast**, v. 19, n. 1, p. 55-67, Jan 2002. ISSN 0749-503X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11754483> >.

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

DA SILVA, J. E. F. et al. Paracoccidioides brasiliensis 30 kDa adhesin: identification as a 14-3-3 protein, cloning and subcellular localization in infection models. **PLoS One**, v. 8, n. 4, p. e62533, 2013. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23638109> >.

DA SILVA LACAZ, C. U. H. B. G. C. B. B. I. U. **Tratado de micologia médica Lacaz**. Sarvier, 2002.

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

DE ABREU E SILVA, M. A. et al. Important aspects of oral paracoccidioidomycosis-a literature review. **Mycoses**, Oct 2012. ISSN 1439-0507. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23088400> >.

DE CAMARGO, Z. P.; DE FRANCO, M. F. Current knowledge on pathogenesis and immunodiagnosis of paracoccidioidomycosis. **Rev Iberoam Micol**, v. 17, n. 2, p. 41-8, Jun 2000. ISSN 1130-1406. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15813694> >.

DE PAULA E SILVA, A. C. A. **Avaliação por métodos fenotípicos e proteômicos de galatos de alquila com atividade anti – complexo *Paracoccidioides***. 2012. 109 (mestrado). Análises Clínicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Unesp - Campus Araraquara

DE SOUSA LIMA, P. et al. Characterization of the *Paracoccidioides* beta-1,3-glucanosyltransferase family. **FEMS Yeast Res**, v. 12, n. 6, p. 685-702, Sep 2012. ISSN 1567-1364. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22691175> >.

DELGADO, M. L.; GIL, M. L.; GOZALBO, D. Starvation and temperature upshift cause an increase in the enzymatically active cell wall-associated glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase protein in yeast. **FEMS Yeast Res**, v. 4, n. 3, p. 297-303, Dec 2003. ISSN 1567-1356. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14654434> >.

DI SANTO, R. Natural products as antifungal agents against clinically relevant pathogens. **Nat Prod Rep**, v. 27, n. 7, p. 1084-98, Jul 2010. ISSN 1460-4752. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20485730> >.

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

ELLIS, D. Amphotericin B: spectrum and resistance. **J Antimicrob Chemother**, v. 49 Suppl 1, p. 7-10, Feb 2002. ISSN 0305-7453. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11801575> >.

FALCONE, M. et al. Identification and management of invasive mycoses in internal medicine: a road-map for physicians. **Intern Emerg Med**, May 2014. ISSN 1970-9366. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24871636> >.

FILLER, S. G.; SHEPPARD, D. C. Fungal invasion of normally non-phagocytic host cells. **PLoS Pathog**, v. 2, n. 12, p. e129, Dec 2006. ISSN 1553-7374. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17196036> >.

FRANCO, M. et al. **Paracoccidioidomycosis**. Boca Ráton: CR Press Inc., 1994.

FRASER, R. et al. Paracoccidioidomycosis. In: (Ed.). **Diagnosis of diseases of the chest**. 4th. Philadelphia: Saunders, 1999. p.902–904.

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

GELPERIN, D. et al. 14-3-3 proteins: potential roles in vesicular transport and Ras signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 92, n. 25, p. 11539-43, Dec 1995. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8524799> >.

GEORGOPAPADAKOU, N. H.; WALSH, T. J. Antifungal agents: chemotherapeutic targets and immunologic strategies. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 40, n. 2, p. 279-91, Feb 1996. ISSN 0066-4804. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8834867> >.

GHANNOUM, M. A.; RICE, L. B. Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. **Clin Microbiol**

Rev, v. 12, n. 4, p. 501-17, Oct 1999. ISSN 0893-8512. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10515900> >.

GOFFEAU, A. et al. Life with 6000 genes. **Science**, v. 274, n. 5287, p. 546, 563-7, Oct 1996. ISSN 0036-8075. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8849441> >.

GRANDIN, N.; CHARBONNEAU, M. Budding yeast 14-3-3 proteins contribute to the robustness of the DNA damage and spindle checkpoints. **Cell Cycle**, v. 7, n. 17, p. 2749-61, Sep 2008. ISSN 1551-4005. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18728387> >.

GRANZOTO, D. S.; VITALI, L. H.; MARTINEZ, R. Efficacy of voriconazole in experimental rat paracoccidioidomycosis. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 46, n. 1, p. 79-83, 2013 Jan-Feb 2013. ISSN 1678-9849. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23563830> >.

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

HORN, F. et al. Systems biology of fungal infection. **Front Microbiol**, v. 3, p. 108, 2012. ISSN 1664-302X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22485108> >.

HUANG, S. H. et al. Cryptococcus neoformans-derived microvesicles enhance the pathogenesis of fungal brain infection. **PLoS One**, v. 7, n. 11, p. e48570, 2012. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23144903> >.

ITO, S. et al. Antifungal activity of alkyl gallates against plant pathogenic fungi. **Bioorg Med Chem Lett**, v. 24, n. 7, p. 1812-4, Apr 2014. ISSN 1464-3405. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24618299> >.

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

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

KRCMERY, V. C. Antifungal chemotherapeutics. **Med Princ Pract**, v. 14, n. 3, p. 125-35, 2005 May-Jun 2005. ISSN 1011-7571. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15863983> >.

LEE, R. E. et al. Genome-wide expression profiling of the response to ciclopirox olamine in *Candida albicans*. **J Antimicrob Chemother**, v. 55, n. 5, p. 655-62, May 2005. ISSN 0305-7453. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15814599> >.

LENZI et al. **Two patterns of extracellular matrix expression in experimental paracoccidioidomycosis**. *Medical Mycology*, p.115-9. 2000

LIU, T. B. et al. The glucose sensor-like protein Hxs1 is a high-affinity glucose transporter and required for virulence in *Cryptococcus neoformans*. **PLoS One**, v. 8, n. 5, p. e64239, 2013. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23691177> >.

LOOSE, D. S. et al. Estradiol binds to a receptor-like cytosol binding protein and initiates a biological response in *Paracoccidioides brasiliensis*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 80, n. 24, p. 7659-63, Dec 1983. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6584880> >.

LOTH, E. A. et al. Occurrence of 102 cases of paracoccidioidomycosis in 18 months in the Itaipu Lake region, Western Paraná. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 44, n. 5, p. 636-7, Oct 2011. ISSN 1678-9849. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22031083> >.

LOTTERSBERGER, F. et al. Functional and physical interactions between yeast 14-3-3 proteins, acetyltransferases, and deacetylases in response to DNA replication perturbations. **Mol Cell Biol**, v. 27, n. 9, p. 3266-81, May 2007. ISSN 0270-7306. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17339336> >.

MARCOS, C. M. et al. Surface-expressed enolase contributes to the adhesion of *Paracoccidioides brasiliensis* to host cells. **FEMS Yeast Res**, v. 12, n. 5, p. 557-70, Aug 2012. ISSN 1567-1364. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22443156> >.

MARQUES, S. A. **Paracoccidioidomycosis: epidemiological, clinical, diagnostic and treatment up-dating**. *Anais Brasileiros de Dermatologia*. 88(5): 700-11 p. 2013.

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

MCEWEN, J. G. et al. Experimental murine paracoccidioidomycosis induced by the inhalation of conidia. **J Med Vet Mycol**, v. 25, n. 3, p. 165-75, Jun 1987. ISSN 0268-1218. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3612432> >.

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

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

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

NGUYEN, D. M. et al. Antifungal activity of gallic acid purified from Terminalia nigrovenulosa bark against Fusarium solani. **Microb Pathog**, v. 56, p. 8-15, Mar 2013. ISSN 1096-1208. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23333407> >.

OBSIL, T.; OBSILOVA, V. Structural basis of 14-3-3 protein functions. **Semin Cell Dev Biol**, v. 22, n. 7, p. 663-72, Sep 2011. ISSN 1096-3634. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21920446> >.

OTTMANN, C. Small-molecule modulators of 14-3-3 protein-protein interactions. **Bioorg Med Chem**, v. 21, n. 14, p. 4058-62, Jul 2013. ISSN 1464-3391. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23266179> >.

PAUL, S.; MOYE-ROWLEY, W. S. Functional analysis of an ATP-binding cassette transporter protein from Aspergillus fumigatus by heterologous expression in Saccharomyces cerevisiae. **Fungal Genet Biol**, v. 57, p. 85-91, Aug 2013. ISSN 1096-0937. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23796749> >.

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

PLAINE, A. et al. Functional analysis of Candida albicans GPI-anchored proteins: roles in cell wall integrity and caspofungin sensitivity. **Fungal Genet Biol**, v. 45, n. 10, p. 1404-14, Oct 2008. ISSN 1096-0937. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18765290> >.

PRADO, M. et al. Mortality due to systemic mycoses as a primary cause of death or in association with AIDS in Brazil: a review from 1996 to 2006. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 3, p. 513-21, May 2009. ISSN 1678-8060. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19547881> >.

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

RESTREPO, A. et al. Pulmonary paracoccidioidomycosis. **Semin Respir Crit Care Med**, v. 29, n. 2, p. 182-97, Apr 2008. ISSN 1069-3424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18366000> >.

ROBERTS, R. L.; MÖSCH, H. U.; FINK, G. R. 14-3-3 proteins are essential for RAS/MAPK cascade signaling during pseudohyphal development in S. cerevisiae. **Cell**, v. 89, n. 7, p.

1055-65, Jun 1997. ISSN 0092-8674. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9215628> >.

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

SANTO, A. H. [Paracoccidioidomycosis-related mortality trend, state of São Paulo, Brazil: a study using multiple causes of death]. **Rev Panam Salud Publica**, v. 23, n. 5, p. 313-24, May 2008. ISSN 1020-4989. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18510791> >.

SHANKAR, J. et al. Influence of 17 β -estradiol on gene expression of Paracoccidioides during mycelia-to-yeast transition. **PLoS One**, v. 6, n. 12, p. e28402, 2011. ISSN 1932-6203. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22194832> >.

SHEEHAN, D. J.; HITCHCOCK, C. A.; SIBLEY, C. M. Current and emerging azole antifungal agents. **Clin Microbiol Rev**, v. 12, n. 1, p. 40-79, Jan 1999. ISSN 0893-8512. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9880474> >.

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

STEINACKER, P.; AITKEN, A.; OTTO, M. 14-3-3 proteins in neurodegeneration. **Semin Cell Dev Biol**, v. 22, n. 7, p. 696-704, Sep 2011. ISSN 1096-3634. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21920445> >.

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

TIMSON, D. J. Galactose Metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. In: TEIXEIRA DA SILVA, J. A. (Ed.). **Dynamic Biochemistry, Process Biotechnology and Molecular Biology**: Global Science Books, 2007. p.65-73.

TORRES, I. et al. Inhibition of PbGP43 expression may suggest that gp43 is a virulence factor in Paracoccidioides brasiliensis. **PLoS One**, v. 8, n. 7, p. e68434, 2013. ISSN 1932-6203. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23874627> >.

VALLEJO, M. C. et al. Vesicle and vesicle-free extracellular proteome of Paracoccidioides brasiliensis: comparative analysis with other pathogenic fungi. **J Proteome Res**, v. 11, n. 3, p. 1676-85, Mar 2012. ISSN 1535-3907. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22288420> >.

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

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

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

YOUNES, S. S.; KHALAF, R. A. The *Candida albicans* Hwp2p can complement the lack of filamentation of a *Saccharomyces cerevisiae* flo11 null strain. **Microbiology**, v. 159, n. Pt 6, p. 1160-4, Jun 2013. ISSN 1465-2080. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23558263> >.

ZHAO, J. et al. 14-3-3 proteins as potential therapeutic targets. **Semin Cell Dev Biol**, v. 22, n. 7, p. 705-12, Sep 2011. ISSN 1096-3634. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21983031> >.

Capítulo 2



Patricia Akemi <patricia.assato@gmail.com>

Manuscript submitted - AJTMH-14-0397

1 message

ajtmh@hotmail.com <ajtmh@hotmail.com>
To: patricia.assato@gmail.com

Wed, Jun 25, 2014 at 8:01 PM

25-Jun-2014
Re: AJTMH-14-0397 Manuscript ID
Dear Mr. Patricia Assato:

This is to acknowledge that the above manuscript has been received by the American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. Please refer to this number in all your future correspondence with the Journal office.

Your user name is: patricia.assato@gmail.com
Your password may be found by using the password help function on the log-in page.

FOR ORIGINAL SUBMISSIONS:

This information refers to ORIGINAL SUBMISSIONS only. If this is a revised manuscript, please skip to the REVISIONS section of this letter below.

Please verify the following information and notify the journal office immediately if there are any discrepancies:

Manuscript type: Review article

Title: Paracoccidioidomycosis and the epidemiology in Latin America –a systematic review

Authors: Assato, Patricia; Ramirez, Yudi; Mendes-Giannini, Maria José; Fusco-Almeida, Ana Marisa

Number of tables: 2

Number of figures: 1

Word count: 3.300

Right running head: Paracoccidioidomycosis in Latin America

If you have not done so already, please be sure to download and sign the journal copyright form and return it to the journal office by fax or mail. This form can be accessed on the <http://mc.manuscriptcentral.com/ajtmh> site under the "Instructions and Forms" link. We also require the signatures of all contributing authors on the cover letter indicating that they participated in the study and concur with the submission and subsequent revisions submitted by the corresponding author.

There are page charges for publication in the Journal.

You will receive a separate e-mail from the journal office staff indicating your estimated page charges. Page charges do not apply to book reviews, CD reviews, Letters to the Editor, editorials, Images in Clinical Tropical Medicine and invited review articles. In addition, individual authors are usually not assessed page charges for articles that will appear in a supplement to the journal.

If you are not already a member of the American Society of Tropical Medicine and Hygiene (ASTMH), now would be a good time to join. Members receive a subscription to the journal, a reduction in page charges, and access to a professional network of peers in the field of tropical medicine. For information on membership, please visit http://www.astmh.org/Join_ASTMH.htm.

FOR REVISIONS:

Paracoccidioidomycosis and the epidemiology in Latin America –a systematic review

Patricia Akemi Assato^{1*}, Yudi Paulina Garcia Ramírez^{2*}, Maria José Soares Mendes Giannini¹ and Ana Marisa Fusco Almeida¹

* Both authors have equally contributed to the work and share the first authorship of the article.

¹ Departamento de análises clínicas , Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, UNESP.

² Departamento de Alimentos e Nutrição , Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, UNESP.

ABSTRACT

Paracoccidioidomycosis is a systemic mycosis, endemic, autochthonous of Latin America, with the highest incidence in Brazil, Argentina, Colombia and Venezuela, occurring in tropical and subtropical regions. It is caused by thermophilic fungi of *Paracoccidioides* complex. In Brazil, it has been reported in the South, Southeast and Midwest regions, being considered the eighth leading cause of death by infectious and parasitic diseases. This work aims to present a critical review about this subject, based on published articles that review the epidemiology of this disease in Latin America. The data collection was performed in the databases IBECS, LILACS and MEDLINE, until February 2014, using the keywords: Paracoccidioidomycosis, Mycoses, Epidemiology and Latin America. 304 publications were identified, in which 16 contemplated the inclusion criteria.

Keywords: Paracoccidioidomycosis, *Paracoccidioides brasiliensis*, mycosis. epidemiology and Latin America.



Haroldo Oliveira <haroldocdooliveira@gmail.com>

Fwd: PLOS Neglected Tropical Diseases has assigned MS # PNTD-D-13-00045 to "Adhesion profiles and the expression of adhesins of different phylogenetic species of the Paracoccidioides complex"

1 message

Maria José Giannini <gianninimj@gmail.com>
Para: Haroldo Oliveira <haroldocdooliveira@gmail.com>

—— Forwarded message ——

From: **PLOS Neglected Tropical Diseases** <plosntds@plos.org>

Date: 2014/2/16

Subject: PLOS Neglected Tropical Diseases has assigned MS # PNTD-D-13-00045 to "Adhesion profiles and the expression of adhesins of different phylogenetic species of the Paracoccidioides complex"

To: MARIA JOSÉ SOARES MENDES-GIANNINI <gianninimj@gmail.com>

Dear Dr. MENDES-GIANNINI,

Your Research Article entitled "Adhesion profiles and the expression of adhesins of different phylogenetic species of the Paracoccidioides complex" has been assigned the following manuscript number: PNTD-D-13-00045.

You will be able to check on the progress of your submission by logging on to Editorial Manager as an author.

<http://pntd.edmgr.com/>

Your username is: giannini

Your password is:

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Matthew Lopez
Publications Assistant
PLOS Neglected Tropical Diseases
plosntds@plos.org

Adhesion profiles and the expression of adhesins of different phylogenetic species of the *Paracoccidioides* complex

Haroldo Cesar de Oliveira¹, Julhiany de Fátima da Silva¹, Suelen Andréia Rossi¹, Caroline Maria Marcos¹, Ana Carolina Alves de Paula e Silva¹, Patrícia Akemi Assato¹, Rosângela Aparecida Moraes da Silva¹, Eduardo Bagagli², Ana Marisa Fusco Almeida¹, Maria José Soares Mendes Giannini^{1*}

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

2 Bioscience Institute, UNESP – Univ Estadual Paulista, Departament of Microbiology and Immunology, Botucatu, SP, Brazil.

***Corresponding author:** Maria José Soares Mendes Giannini

Tel.: +55 (16) 3301-5714

Address: R. Expedicionários do Brasil, 1621

Araraquara - São Paulo - Brazil

CEP - 14801-902

E-mail: gianninimj@gmail.com

Abstract

Members of the *Paracoccidioides* genus are dimorphic fungi and are the etiologic agents of paracoccidioidomycosis (PCM). The *Paracoccidioides* genus is composed of two species: *Paracoccidioides brasiliensis* (S1, PS2 and PS3 phylogenetic species) and *Paracoccidioides lutzii* (*Pb01-like*). The correct molecular taxonomy of these fungi has opened new possibilities for studying and understanding their relationships with their hosts. *Paracoccidioides* spp. have features that permit their growth in the adverse conditions enable them to adhere to and invade host tissues and may contribute to disease development. Cell-wall proteins called adhesins provide adhesion and are capable of mediating fungi-host tissues interactions during infection. This study aims to evaluate the adhesion profile of different isolates of *P. brasiliensis* and *P. lutzii* and analyze the expression of adhesin-encoding genes by real-time PCR. The adhesion experiments showed that the infection patterns vary within the same phylogenetic group.. Among the studied groups, the levels of infected cells varied from 32 to 60% for the “S1” group, 40 to 50% for the “PS2” group, 25 to 47% for “PS3” isolate and 25 to 52% for *P.lutzii*. Additionally, as determined by real-time PCR, there was not a consistent pattern of adhesins expression, and these varied depending on the *Paracoccidioides* phylogenetic species isolate. After one hour, the following genes were expressed to a greater extent: enolase in S1; GAPDH, 14-3-3 and aldolase in PS3; 14-3-3 in PS2 and enolase in *P.lutzii*. It is of note that the expression of 14-3-3 was upregulated after 10 minutes in the PS2 and PS3 groups and the expression of this gene was downregulated in the *P.lutzii*. these results showed a complex relationship between *Paracoccidioides* spp. and their host and demonstrated a phylogenetic-species-dependent arsenal used by the pathogen to adhere and cause infection.



Patricia Akemi <patricia.assato@gmail.co

Microbiology paper no. mic/2014/082024 - Manuscript submission

1 message

submit.mic@sgm.ac.uk <submit.mic@sgm.ac.uk> Tue, Jun 24, 2014 at 1:38 |
To: Maria José Soares Mendes-Giannini <giannini@fcar.unesp.br>
Cc: Caroline Maria Marcos <marcos_caroline@yahoo.com.br>, Haroldo Cesar Oliveira <haroldocdoliveira@gmail.com>, Julhiany de Fátima da Silva <julhiany.silva@gmail.com>, Patricia Akemi Assato <patricia.assato@gmail.com>, Ana Marisa Fusco-Almeida <ana.marisa@uol.com.br>

Dear Dr Maria José Soares Mendes-Giannini

Microbiology paper no. mic/2014/082024: Multifaceted roles of metabolic enzymes of *Paracoccidioides* specie complex

Receipt of your submission to Microbiology is acknowledged. You will receive a confirmatory message from the Editorial Office when your paper has been checked and assigned to an Associate Editor. Please note the Editorial Office will be closed from 24th December to 2nd January. Thank you for submitting to Microbiology.

Please note that future correspondence will be sent to the corresponding author only.

IMPORTANT:

(i) Papers in Press

The journal has a Papers in Press feature where accepted manuscripts will appear online in an unedited format before they are scheduled to appear in print. Unless you inform us otherwise, we will assume that you agree to your manuscript being used in this way.

Please make sure you check the details you have entered into the Bench>Press site very carefully, particularly the manuscript title, subject category and author details, as these will be used to generate the Papers in Press record.

(ii) Copies of files

If your paper is rejected, withdrawn or deleted, any source files you have uploaded will automatically be deleted from the system (the PDF used for review purposes will be retained). Please make sure you keep your own copies of any files you upload to the site.

This is an automated message: please do not reply to it.

Microbiology Editorial Office
Society for General Microbiology, 1st Floor, Charles Darwin House, 12 Roger Street
London, WC1N 2JU

Phone: +44 118 988 1800. micro@sgm.ac.uk
<http://www.sgmjournals.org/>
<http://www.sgm.ac.uk/>

Society for General Microbiology. Registered as a Charity in England and Wales, no. 264017. A charity registered in Scotland, no. SC039250.
Company Limited by Guarantee. Registered in England No. 1039582. Registered Office as above.

Multifaceted roles of metabolic enzymes of *Paracoccidioides* specie complex

Authors: Caroline Maria Marcos, Haroldo Cesar de Oliveira, Julhiany de Fátima da Silva, Patrícia Akemi Assato, Ana Marisa Fusco-Almeida, Maria José Soares Mendes-Giannini*

¹ Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, FCFAr, - Univ Estadual Paulista - UNESP – Araraquara, Department of Clinical Analyses, Clinical Mycology Laboratory, SP, Brazil.

*corresponding author: Maria José Soares Mendes Giannini

Tel.: +55 (16) 33015716

Fax: +55 (16) 33015714

Address: Rua Expedicionários do Brasil, 1621.

Araraquara - São Paulo - Brazil

CEP - 14801-902

E-mail: giannini@fcfar.unesp.br

Word counts for the - Abstract : 215 words
Main text in the manuscript: 4265 words

Number of - Tables: 1
Figures: 1

ABSTRACT

Paracoccidioides spp. are dimorphic fungi, etiologic agents of paracoccidioidomycosis, disease of multiple organic implications and prolonged evolution. The large number of tissues that this fungus can colonize and infect suggests a variety of surface molecules for adhesion. A surprising finding is that the majority of the proteins of the glycolytic pathway or proteins involved in tricarboxylic acid (TCA) cycle in *Paracoccidioides* spp. have some adhesive properties as the interaction with extracellular matrix acting as moonlighting proteins contributing to the virulence of this fungus. Moonlighting proteins have multiple functions and add another dimension to cellular complexity and benefit cells in several ways. This subject is common in eukaryotic organisms and studies show that moonlighting proteins from the glycolytic pathway or the TCA cycle play some role in bacterial pathogenesis, either by acting as secreted cell signaling agents and/or cell surface bacterial adhesins. This review highlights the multiple roles exhibited by a range of *Paracoccidioides* spp. proteins, involved in the glycolytic pathway and TCA cycle as aconitase, aldolase, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, isocitrate lyase, malate synthase, triose phosphate isomerase, fumarase and enolase and the role that such moonlighting activity plays in the virulence characteristics in this fungus as well as several human pathogens during the interaction with the host and the importance of knowing moonlighting functions to proteome studies.

Keywords: *Paracoccidioides* spp., moonlighting proteins, virulence, glycolytic pathway and tricarboxylic acid cycle.