

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA**

Haroldo Cesar de Oliveira

**Caracterização e identificação de moléculas de superfície presentes
em *Paracoccidioides* spp.**

Araraquara

2014

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA**

Haroldo Cesar de Oliveira

**Caracterização e identificação de moléculas de superfície presentes
em *Paracoccidioides* spp.**

Tese 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 Doutor.

ORIENTADORA: Profa. Dra. Maria José Soares Mendes Giannini

Araraquara

2014

Ficha Catalográfica

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

O46c

Oliveira, Haroldo Cesar de
Caracterização e identificação de moléculas de superfície presentes em
Paracoccidioides spp / Haroldo Cesar de Oliveira – Araraquara, 2014
155 f.

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

1. Paracoccidioides spp. 2. Moléculas de superfície. 3. Adesão. 4. Adesinas.
5. Interação fungo-hospedeiro. I. Giannini, Maria José Soares Mendes, orient.
II. Título.

CAPES: 40300005

Este trabalho foi desenvolvido na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara/SP – UNESP, sendo o doutorando contemplado 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-RENAMA (processo nº CNPQ403586/2012-7).

*"Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito.
Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes".*

Marthin Luther King

Dedicatória

Dedico este trabalho especialmente à minha mãe Irene Aparecida Pinto de Oliveira e ao meu pai Antônio Aparecido de Oliveira que sempre me apoiaram e que vêm, durante todo esse tempo de doutorado, me mostrando o quanto são fortes e que, apesar de às vezes as coisas ficarem muito difíceis (e como ficaram ultimamente), a vida sempre nos dá a força necessária através da união, perseverança e da confiança. Vocês são dois lutadores exemplares, os quais com palavras não consigo expressar o tanto de amor que sinto por vocês. Obrigado por tudo desde sempre! Além de vocês, dedico também esse trabalho à minha irmã Erica Cristina de Oliveira por toda a força, amizade, companheirismo e por “segurar a barra” em um momento muito difícil para permitir que eu realizasse um sonho, muito obrigado, amo muito você também!

Dedico também à Profa. Maria José Soares Mendes Giannini por confiar muito no meu trabalho, sempre me proporcionando desafios que contribuíram muito para meu crescimento profissional e pessoal, além disso, dedico não só a orientadora, mas também a amiga que nos momentos difíceis sempre esteve pronta para ajudar, com certeza termino esse doutorado como uma nova pessoa, muito diferente daquela que você conheceu há muito tempo atrás, e com certeza você é também uma grande responsável por todas essas mudanças, muito obrigado!

E por último, porém com a mesma importância, às amigas da micologia Julhiany de Fátima da Silva, Caroline Maria Marcos, Liliana Scorzoni, Ana Carolina Alves de Paula e Silva, Rosângela Moraes da Silva, Fernanda Sangalli Leite, Patrícia Akemi Assato, Suelen Andréia Rossi e Daniella Sayuri Yamazaki, pois sem a ajuda de vocês este trabalho não seria possível. É sempre bom poder contar com as pessoas simplesmente pela amizade, sem interesses, e vocês, sempre e a qualquer momento estavam dispostas a ajudar, não importando, sábados, domingos, feriados, dias e noites. Muito obrigado, esse trabalho também é um pouco de cada uma de vocês, que além de serem praticamente minha família, são os melhores profissionais com quem eu poderia trabalhar nesta caminhada do doutorado!

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, tenho que agradecer a Deus pela minha família. Ultimamente estamos passando por poucas e boas, porém, o amor e a cumplicidade esta cada vez maior. Muito obrigado por torcerem por mim e por vibrarem com cada uma das minhas vitórias, se estou chegando nesse momento da minha vida, com certeza boa parte da responsabilidade é de vocês, obrigado, avós, tios, primos, primas e toda a “parentada” que com certeza me orgulho de fazer parte.

À todos os irmãos da Micologia! Desde que entrei tenho a certeza de ser um lugar especial, afinal é difícil encontrar um lugar que reúna tanta gente especial, em vários sentidos, assim. Panta, Laranja, Lili, Fer Sangalli, Carol, Sú, Jú, Tomate, Thaís, Carol MG, Junya, Natália, Tati, Fer Gullo, Nayla, Aline, Regina, Jaque, Fer Campos, Warley, Jú Vicentim e Thamires muito obrigado pela convivência e por tornarem esses quatro anos de doutorado muito mais divertidos. Obrigado por tudo!

À Rô por ser a Rô. Muito mais que uma técnica e sim responsável por tornar nossos dias melhores! Nos faz rir o tempo todo, até quando está mal humorada. Sempre pronta pra ajudar, seja no laboratório, seja na vida. Muito obrigado por estar sempre disponível e por ser essa pessoa incrível. E para de graça e vem logo para o campus!

À Profa. Ana Marisa Fusco Almeida, muito obrigado por todo o esforço para manter o laboratório “à todo vapor” além é claro dos momentos de descontração!

À Cláudia, que entrou com técnica e hoje já é nossa grande amiga. Você é muito especial e com certeza torço muito pelo seu sucesso! Obrigado pelos cafezinhos e por toda a ajuda na organização do laboratório, e claro, pela grande ajuda na purificação da proteína!

Aos “agregados” Rosemira, Marisinha, Eliana e Tirene, muito obrigado por fazerem parte do nosso dia-a-dia vocês são pessoas especiais e que hoje, nos fazem uma grande falta, estamos com saudade do dia-a-dia com vocês. Obrigado de coração pela convivência e ajuda em diversos momentos!

Aos grandes e eternos amigos que sempre torceram por mim e que são pessoas muito especiais, sem as quais minha vida, com certeza, não seria tão legal assim: Gutão, Talita, Paula, João, Rô, Sabrina, Glauber, Fer Porva, Renata (Velhota), Dú, Michele, Gustavo, Amanda (Purga), Abrahão (Profeta), Thaís (Legal), Karina, Dani, Roberto, Feijão, Xande, Aline, Carlão, Renata. Vocês são muito importantes para mim e por isso faço questão do nome de vocês aqui, afinal sem vocês no meu dia-a-dia tudo seria mais difícil, obrigado!

A todos os professores e funcionários que trabalham para o bom andamento do curso de pós-graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia! Lembrando das secretárias da pós, Cláudia, Joyce, Dani e Flávia pela paciência e apoio nas atividades acadêmicas.

Ao professor Ricardo José Giordano, por acreditar na nossa ideia e por abrir as portas do seu laboratório para aprender sobre o *Phage Display*. Além disso, agradeço a todos os seus orientados Leila, Fenny, Carlos e Laura e especialmente à Jussara Michaloski por todo o ensinamento e

suporte no meu treinamento. Muito obrigado por me receberem tão bem todas as vezes que fui ao laboratório, fazendo me sentir “em casa”!

À professora Jenifer Coburn do Medical College of Wisconsin por me receber tão bem durante seis meses em seu laboratório. A confiança depositada e os aprendizados adquiridos foram de grande importância para o meu crescimento profissional. A todos os seus orientados, Karen Evangelista, Laura Ristow, Jenny Ritchie, Michael Curtis e às técnicas Lavinia Padmore e Beth Hahn por toda a ajuda e amizade durante minha estadia em Milwaukee! Além disso, agradeço a todos os profissionais do Medical College of Wisconsin que proporcionaram minha estadia no laboratório da Profa. Jenifer Coburn.

Falando em Milwaukee, tenho que agradecer à pessoas que em tão pouco tempo se tornaram muito especiais para mim durante a realização do doutorado-sanduíche. À Jamária Martins por todo o suporte e não medir esforços para me ajudar em tudo o que eu precisei, com certeza nunca vou me esquecer de tudo o que fez por mim e serei eternamente grato, muito obrigado! Às grandes amigas Luana Melnek, Raquel Monegatto e Cíntia Ferreira, vocês são muito especiais e fizeram com que minha temporada em Milwaukee fosse inesquecível, afinal, um pouco loucas como eu, vocês sempre estiveram disponíveis para tudo, principalmente para dar muitas risadas! Foi muito divertido conhecê-las e seis meses foi o suficiente para eu me tornar o eterno “Eraldo, amigo das au-pairs”! Agradeço também, mais uma vez, à amiga Lavinia Padmore e a sua família, Charles e Alaina, pois vocês são pessoas especiais que levarei pra sempre na lembrança. Estar com vocês me fazia me sentir mais perto da minha família e isso os tornam muito especiais para mim, obrigado! Além destas pessoas, deixo meu agradecimento à comunidade de brasileiros de Milwaukee que me receberam tão bem, afinal, é muito bom estar perto de um monte de gente que está naquele lugar pelo mesmo motivo que você: a realização de um sonho!

Ainda falando sobre o doutorado sanduíche, não posso deixar de agradecer duas pessoas que durante esse período nos descobrimos amigos de verdade: Tatiana Watanabe e Túlio Alves da Silva! Uma viagem à Las Vegas e uma amizade construída para sempre! Muito obrigado por dividirem comigo dias tão especiais em terras estrangeiras, com certeza na volta essa amizade continua com toda a força, e como diria a Tati, “na velocidade 5 do...”!

À todos os citados aqui e àqueles que por ventura tenho me esquecido deixo minha eterna gratidão por fazerem parte desse momento tão especial na minha carreira, sem vocês eu não teria chegado aqui!

Em memória da minha avó Terezinha Alves de Oliveira

Muito obrigado!

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática do vetor pGEM-T Easy (Promega) circularizado utilizado na etapa de clonagem do inserto do gene de interesse, CS protein. Em destaque as enzimas de restrição utilizadas.	38
Figura 2. Representação esquemática do vetor pET32a (Novagen) circularizado utilizado na etapa de clonagem para expressão da proteína de interesse, em destaque as enzimas de restrição utilizadas.	40
Figura 3. Esquema indicando os passos na construção da biblioteca de fagos. 1) oligonucleotídeos sintéticos (inserto em vermelho) contendo o códon degenerado (NNK) _n (N= qualquer nucleotídeo; K= nucleotídeos T ou G com a finalidade de reduzir o número de possíveis códons de parada e n = número de aminoácidos desejado), digeridos com a enzima de restrição BglI foram inseridos na região que codifica o gene da proteína pIII no vetor fUSE55 previamente digerido com BglI. O produto da reação de ligação (2) foi transformado na bactéria eletrocompetente <i>E.coli</i> cepa MC1061 F- (3) e os fagos produzidos, expressando proteína recombinante pIII (4), foram recuperados por precipitação com PEG/NaCl (Giordano <i>et al.</i> , 2001).	44
Figura 4. Esquema representativo da técnica BRASIL. A seleção de fagos ligantes da superfície celular de interesse é realizada em apenas uma etapa de centrifugação o que torna o processo mais rápido e eficiente do que os métodos convencionais conhecidos de <i>bipanning</i> . Imagem de Ricardo José Giordano disponível no site http://www2.iq.usp.br/docente/giordano/tecnologia.html	45
Figura 5. Esquema do plaqueamento para a verificação do número de TU's após a 2ª rodada. Pt 1, Pt 2 e Pt 3 representam diferentes diluições da cultura da bactéria K91 infectada com os fagos selecionados durante o <i>biopanning</i>	47
Figura 6. Perfil de adesão de diferentes isolados de <i>P. brasiliensis</i> e <i>P. lutzii</i> à pneumócitos A549 após 2 e 5 horas de infecção. * indica diferença estatisticamente significativa na taxa de adesão após 2.0 e 5.0 horas, p<0.05.	56
Figura 7. Gráfico com a mediana dos experimentos de infecções entre os isolados de <i>P. brasiliensis</i> e <i>P. lutzii</i> após 2 e 5 horas de infecção. Após a análise estatística, não foi observada diferença significativa entre as adesões.	57
Figura 8. Perfil de adesão das diferentes espécies do gênero <i>Paracoccidioides</i> aos componentes da MEC (laminina, fibronectina, colágeno tipo I e colágeno tipo IV) após 2 horas de infecção. * indica diferença estatisticamente significativa na taxa de adesão, p<0.05.	59
Figura 9. Expressão relativa da adesina GP43 em <i>P. brasiliensis</i> e <i>P. lutzii</i> . * p<0,05 61	61
Figura 10. Expressão relativa da adesina enolase em <i>P. brasiliensis</i> e <i>P. lutzii</i> . * p<0,05 62	62
Figura 11. Expressão relativa da adesina 14-3-3 em <i>P. brasiliensis</i> e <i>P. lutzii</i> . * p<0,05 63	63
Figura 12. Expressão relativa da adesina TPI em <i>P. brasiliensis</i> e <i>P. lutzii</i> . * p<0,05 64	64
Figura 13. Expressão relativa da adesina GAPDH em <i>P. brasiliensis</i> e <i>P. lutzii</i> . * p<0,05 65	65
Figura 14. Expressão relativa da adesina MLT em <i>P. brasiliensis</i> e <i>P. lutzii</i> . * p<0,05 66	66
Figura 15. Curva de sobrevivência de camundongos C57-BLACK6 infectados com <i>P. brasiliensis</i> e <i>P. lutzii</i> avaliada durante 200 dias após a infecção, demonstrando uma maior capacidade de <i>P. brasiliensis</i> de matar os camundongos sendo a diferença para o controle significamente diferente.	67
Figura 16. Amplificação do cDNA correspondente à proteína CS protein de <i>P. lutzii</i>	70
Figura 17. Gel de agarose 1,5% corado com GelRed. Amostras 1-9: Diferentes clones da proteína CS protein sendo positivos apenas os clones 1, 2 e 7.	71
Figura 18. Eletroferograma para o gene CS protein de <i>P. lutzii</i>	71
Figura 19. Sequência gerada após o seqüenciamento do gene CS protein de <i>P. lutzii</i>	72
Figura 20. PCR de colônia para verificação do inserto referente à proteína CS protein de <i>P. lutzii</i>	73
Figura 21. Digestão do plasmídeo pET-PbCSp com as enzimas <i>NcoI</i> e <i>SacI</i> liberando fragmento de aproximadamente 710 pb referente ao gene da proteína CSP.	73
Figura 22. SDS-Page (10%) para verificação da expressão proteína recombinante após a indução da expressão com IPTG, sendo verificada expressão para todos tempos e todas as concentrações de IPTG testadas.	74

Figura 23. Cromatograma de purificação da proteína CS protein, realizada em cromatografo FPLC e eluição com tampão imidazol em concentração crescente de 0 a 100%, sendo observado o pico de eluição da proteína ao final da corrida cromatográfica.	75
Figura 24. Cromatograma de purificação da proteína CS realizado em cromatografo FPLC e eluição com tampão imidazol 100%, sendo observado o pico de eluição da proteína logo no início da corrida cromatográfica.	76
Figura 25. Purificação da proteína CS protein recombinante. A) Primeira cromatografia: FT, Flowthrough; 23-26, diferentes eluições coletadas durante a cromatografia. B) Segunda cromatografia: FT, Flowthrough; 04-06, diferentes eluições coletadas durante a cromatografia. Gel SDS-PAGE 10%.	76
Figura 26. Resultado da purificação da proteína CS protein recombinante em gel de SDS-PAGE 10%.	77
Figura 27. Inibição da adesão de <i>P. lutzii</i> a pneumócitos A549 pela proteína recombinante CSP.	78
Figura 28. Inibição da adesão de <i>P. lutzii</i> e <i>P. brasiliensis</i> aos componentes da MEC (laminina, fibronectina, colágeno tipo I e colágeno tipo IV) pela proteína recombinante CSP. * $p < 0,05$	79
Figura 29. Gráfico representativo do número de unidades transdutoras após a segunda rodada do <i>phage display</i>	82
Figura 30. Gráfico representativo do número de unidades transdutoras após a terceira rodada do <i>phage display</i>	82
Figura 31. Enriquecimento das bibliotecas X6 e CX8C após as 2 ^o e 3 ^o rodadas do <i>phage display</i>	83
Figura 32. Gel representativo dos resultados da PCR das colônias, em gel de agarose 2% corado com GelRed. Colônias infectadas com o fago recombinante após a PCR devem exibir um produto de 300 pb, e os resultados acima demonstraram positividade para todas as colônias testadas.	84
Figura 33. Esquema representativo do processamento de duas sequências de peptídeos ligantes de <i>P. brasiliensis</i>	85
Figura 34. Ensaio de ligação do Pep1 aos diferentes isolados de <i>S. cerevisiae</i> e <i>Paracoccidioides</i> spp. Fd) Fago selvagem. * diferença estatística em relação à ligação do fago selvagem Fd ^Δ diferença estatística em relação à ligação do peptídeo à <i>S. cerevisiae</i>	90
Figura 35. Ensaio de ligação do Pep2 aos diferentes isolados de <i>S. cerevisiae</i> e <i>Paracoccidioides</i> spp. Fd) Fago selvagem. * diferença estatística em relação à ligação do fago selvagem Fd ^Δ diferença estatística em relação à ligação do peptídeo à <i>S. cerevisiae</i>	90
Figura 36. Ensaio de ligação do Pep3 aos diferentes isolados de <i>S. cerevisiae</i> e <i>Paracoccidioides</i> spp. Fd) Fago selvagem. * diferença estatística em relação à ligação do fago selvagem Fd ^Δ diferença estatística em relação à ligação do peptídeo à <i>S. cerevisiae</i>	91
Figura 37. Ensaio de ligação do Pep4 aos diferentes isolados de <i>S. cerevisiae</i> e <i>Paracoccidioides</i> spp. Fd) Fago selvagem. * diferença estatística em relação à ligação do fago selvagem Fd ^Δ diferença estatística em relação à ligação do peptídeo à <i>S. cerevisiae</i>	92
Figura 38. Ensaio de inibição da adesão pelo Pep1 dos diferentes isolados <i>Paracoccidioides</i> spp. frente aos componentes da MEC, determinado pelo método de inib-ELISA. Lm-laminina; Fn-fibronectina; CI-colágeno I; CIV-colágeno IV.	93
Figura 39. Ensaio de inibição da adesão pelo Pep2 dos diferentes isolados <i>Paracoccidioides</i> spp. frente aos componentes da MEC, determinado pelo método de inib-ELISA. Lm-laminina; Fn-fibronectina; CI-colágeno I; CIV-colágeno IV.	93
Figura 40. Ensaio de inibição da adesão pelo Pep3 dos diferentes isolados <i>Paracoccidioides</i> spp. frente aos componentes da MEC, determinado pelo método de inib-ELISA. Lm-laminina; Fn-fibronectina; CI-colágeno I; CIV-colágeno IV.	94
Figura 41. Ensaio de inibição da adesão pelo Pep4 dos diferentes isolados <i>Paracoccidioides</i> spp. frente aos componentes da MEC, determinado pelo método de inib-ELISA. Lm-laminina; Fn-fibronectina; CI-colágeno I; CIV-colágeno IV.	95
Figura 42. Ensaio de inibição da adesão de <i>Paracoccidioides</i> spp. à cultura de pneumócitos A549 pelo método inib-ELISA.	96
Figura 43. Viabilidade celular após tratamento de pneumócitos A549 com os peptídeos selecionados em diferentes concentrações variando de 25 a 100 μ g; controle positivo = * $p < 0,01$. 98	

Figura 44. Viabilidade celular após tratamento da linhagem Hep-G2 com os peptídeos selecionados em diferentes concentrações variando de 25 a 100 µg; controle positivo = *p<0,01.99	
Figura 45. Sobrevivência de larvas de <i>Galleria mellonella</i> infectadas com o isolado Pb01 (<i>P. lutzii</i>) após tratamento com os diferentes peptídeos selecionados por 3 horas.	101
Figura 46. Sobrevivência de larvas de <i>Galleria mellonella</i> infectadas com o isolado Pb01 (<i>P. lutzii</i>) após tratamento com os diferentes peptídeos selecionados por 24 horas.	102
Figura 47. Densidade hemocitária após tratamento das larvas por 3 e 24 horas com os peptídeos advindos de estudo com phage display, sendo observado o aumento do número de hemócitos após o tratamento das larvas com os peptídeos.	104
Figura 48. Gel de agarose 1% para visualização das diferentes extrações de DNA de <i>P. brasiliensis</i> . A) Logo após a extração; B) Após envio de amostras ao EUA.	107
Figura 49. Padronização de tempo de digestão do DNA com a enzima <i>MseI</i> por diferentes tempos (15, 30, 45, 60, 120 e 150 minutos) sendo observado a digestão entre 120 e 150 minutos.	108
Figura 50. Porção do gel com o peso molecular corado por brometo de etídio; B) DNA de <i>P. brasiliensis</i> antes e após a seleção da porção de 1000 a 200 pb.....	109
Figura 51. Verificação da ligação do DNA aos adaptadores em gel de agarose 0,8%, sendo observada a amplificação, confirmando assim a ligação dos adaptadores ao DNA de <i>P. brasiliensis</i>	110
Figura 52. Digestão do vetor com a enzima <i>SfiI</i> . 1) Controle sem enzima, 2) Digestão do vetor fdBUG com a enzima.	110
Figura 53. Verificação da eficiência em evitar a recircularização do vetor fdBUG com o tratamento da enzima fosfatase alcalina (CIP) em gel de agarose 0,8%.	111
Figura 54. PCR de colônia para verificação da eficiência da ligação do DNA de <i>P. brasiliensis</i> ao vetor fdBUG. A corrida foi realizada em gel de agarose 1%.	114
Figura 55. PCR para verificação da eficiência da ligação dos adaptadores. Corrida eletroforetica realizada em gel de agarose 1%.	115
Figura 56. Gel de agarose 0,8% para verificação da sonicação do DNA de <i>P. brasiliensis</i>	116
Figura 57. PCR de colônia para verificação da eficiência da ligação do DNA de <i>P. brasiliensis</i> ao vetor fdBUG. 1 – Controle positivo; 2 – Controle negativo; 3-13 – diferentes colônias testadas. Gel de agarose 1%.	118

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Isolados pertencentes às diferentes espécies do gênero <i>Paracoccidioides</i> utilizados nos ensaios de adesão.	30
Tabela 2. Iniciadores desenhados para análise de expressão de genes codificantes de adesinas de <i>Paracoccidioides</i> spp.	34
Tabela 3. Iniciadores utilizados na amplificação por PCR.....	36
Tabela 4. Teste de infectividade da bactéria K91.....	81
Tabela 5. Titulação das bibliotecas X6 e CX8C.....	81
Tabela 6. Alinhamento das sequencias dos peptídeos frente ao genoma humano.	86
Tabela 7. Determinação da concentração inibitória mínima-CIM- dos peptídeos desenvolvidos a partir da metodologia de phage display frente a <i>Paracoccidioides</i> spp.	98
Tabela 8. Placa sem tetraciclina.	112
Tabela 9. Plaqueamento das amostras de fdBUG não digerido em placa com tetraciclina.....	112
Tabela 10. Plaqueamento das amostras de fdBUG T4+ e T4- em placas com tetraciclina.....	112
Tabela 11. Placas sem tetraciclina.....	113
Tabela 12. Plaqueamento das amostras de Ligação PbDNA T4+ e T4- em placas com tetraciclina.	113
Tabela 13. Relação das amostras analisadas no gel de agarose.....	115
Tabela 14. Placas sem tetraciclina.....	117
Tabela 15. Plaqueamento das amostras de Ligação PbDNA T4+ e T4- em placas com tetraciclina.	117

Sumário

ÍNDICE DE FIGURAS.....	VIII
ÍNDICE DE TABELAS.....	XI
RESUMO.....	XVII
ABSTRACT.....	XVIII
Capítulo I - Tese	19
1. INTRODUÇÃO.....	20
2. OBJETIVOS.....	29
2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	29
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	30
3.1. Comitê de ética.....	30
3.2. Análise dos perfis de adesão e expressão de adesinas nas espécies do gênero <i>Paracoccidioides</i> e sua influência na virulência desses fungos.....	30
3.2.1. Microrganismos.....	30
3.2.2. Avaliação de adesão das diferentes espécies filogenéticas do complexo <i>Paracoccidioides</i> à cultura de células.....	31
3.2.2.1. Cultura celular.....	31
3.2.2.2. Ensaio de Adesão à pneumócitos A549.....	31
3.2.3. Ensaio de Adesão de isolados das diferentes espécies filogenéticas do gênero <i>Paracoccidioides</i> aos componentes da MEC.....	32
3.2.3.1. Sensibilização de placas com componentes da MEC.....	32
3.2.3.2. Adesão das diferentes espécies filogenéticas do gênero <i>Paracoccidioides</i>	32
3.2.4. Análise da expressão de adesinas por PCR em Tempo Real durante a infecção das diferentes espécies filogenéticas do complexo <i>Paracoccidioides</i> em camundongos BALB/C.....	32
3.2.4.1. Extração de RNA e síntese de cDNA.....	33
3.2.4.2. Análise da Expressão de adesinas por PCR em Tempo Real.....	33
3.2.5. Análise da relação adesão/virulência nos diferentes isolados de <i>Paracoccidioides</i> spp.....	34
3.3. Clonagem e expressão heteróloga da proteína CS protein (CSP) que pode estar envolvida na virulência de <i>Paracoccidioides</i> spp.....	35
3.3.1. Microrganismo e condições de cultivo.....	35
3.3.2. Extração de RNA de <i>Pb01</i>	35
3.3.3. Síntese de primeira fita de cDNA.....	36
3.3.4. Construção de oligonucleotídeos e amplificação dos genes.....	36

3.3.5. Clonagem intermediária em vetor pGEM-T easy do cDNA codificante da proteína CSP	37
3.3.6. Transformação da bactéria <i>E. coli</i> DH10B com os plasmídeos recombinantes pGEM-T easy	38
3.3.7. Construção do plasmídeo pET-PICSp	39
3.3.6. Indução da expressão heteróloga da proteína recombinante CSP de <i>P. lutzii</i>	41
3.3.7. Purificação da proteína recombinante CSP em coluna de afinidade	41
3.3.8. Ensaio de inibição da adesão de <i>P. lutzii</i> à pneumócitos A549 e aos componentes da MEC (laminina, fibronectina e colágenos tipo I e IV) pela proteína recombinante CSP através de ELISA de inibição (ELISA-inib)	42
3.4. Caracterização e Identificação de adesinas nas diferentes espécies filogenéticas de <i>Paracoccidioides</i> por <i>Phage Display</i>	42
3.4.1. Construção de bibliotecas de fagos apresentando peptídeos em sua superfície.....	43
3.4.2. Bibliotecas de <i>Phage Display</i>	44
3.4.3. BRASIL - Biopanning and rapid analysis of selective interactive ligands.....	45
3.4.3.1. Pré-clearing com <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	45
3.4.3.2. 1º rodada BRASIL	46
3.4.3.3. Precipitação dos fagos ligantes de <i>P. brasiliensis</i> do 1º rodada da técnica BRASIL....	47
3.4.3.4. 2º rodada da técnica BRASIL	47
3.4.3.5. 3º rodada da técnica BRASIL	48
3.4.4. Titulações e infectividade da bactéria K91.....	48
3.4.5. Seleção de clones, PCR e sequenciamento para a determinação do peptídeo apresentado pelo fago	49
3.4.6. Caracterização dos peptídeos identificados e seus receptores	49
3.4.7. Ensaio de ligação	50
3.4.8. Ensaio de inibição da adesão de <i>Paracoccidioides</i> aos componentes da matriz extracelular e pneumócitos A549 pelos peptídeos selecionados através de <i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i> (ELISA).....	50
3.4.8.1. Ensaio de inibição da adesão de <i>Paracoccidioides</i> aos componentes da matriz extracelular através de ELISA de inibição (ELISA-inib)	51
3.4.9. Determinação da atividade antifúngica dos peptídeos selecionados.....	51
3.4.10. Determinação da atividade citotóxica dos peptídeos selecionados por teste de sensibilidade do MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide).....	52
3.4.11. Ensaio preliminares <i>in vivo</i> usando <i>Galleria mellonella</i> como modelo	52
3.4.11.1. Toxicidade dos peptídeos selecionados em <i>Galleria mellonella</i>	53

3.4.11.2. Capacidade dos peptídeos selecionados de evitar a infecção por <i>Paracoccidioides</i> spp.	53
3.4.11.3. Determinação da densidade hemocitária.....	53
3.5. Construção da biblioteca de <i>phage display</i> de <i>Paracoccidioides</i>	54
3.6. Análises estatísticas.....	55
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
4.1. Análise dos perfis de adesão e expressão de adesinas nas espécies do gênero <i>Paracoccidioides</i> e sua influência na virulência desses fungos.....	56
4.1.1. Avaliação da infecção das diferentes espécies filogenéticas do complexo <i>Paracoccidioides</i> à cultura de células A549.....	56
4.1.2. Adesão das diferentes espécies filogenéticas do gênero <i>Paracoccidioides</i> aos componentes da MEC laminina, fibronectina, colágeno tipo I e colágeno tipo IV.	58
4.1.3. Análise da expressão de adesinas por PCR em Tempo Real durante a infecção das diferentes espécies filogenéticas do complexo <i>Paracoccidioides</i> em camundongos BALB/C.	60
4.1.4. Curva de sobrevivência de camundongos C57-BLACK6 para avaliação da relação adesão/virulência nas espécies do gênero <i>Paracoccidioides</i>	67
4.2. Clonagem e expressão heteróloga da proteína CS protein que pode estar envolvida na virulência de <i>Paracoccidioides</i> spp.....	68
4.2.1. Características gerais da proteína a ser produzida	69
4.2.2. Amplificação do cDNA relativo à proteína CS protein de <i>P. lutzii</i>	69
4.2.3. Clonagem do cDNA codificante da proteína CS protein no vetor pGEM-T-Easy para expansão do inserto	70
4.2.4. Clonagem do cDNA codificante da proteína CS protein no vetor de expressão pET-32a	72
4.2.5. Expressão heteróloga da proteína CS protein.....	74
4.2.6. Macroindução e purificação da proteína recombinante CS protein.....	75
4.2.7. Ensaio de inibição da adesão de <i>P. lutzii</i> à pneumócitos A549 pela proteína recombinante CSP através de ELISA de inibição (ELISA-inib).....	78
4.2.8. Ensaio de inibição da adesão de <i>P. lutzii</i> e <i>P. brasiliensis</i> aos componentes da MEC pela proteína recombinante CSP através de ELISA de inibição (ELISA-inib)	79
4.3. Caracterização e identificação de adesinas nas espécies do gênero <i>Paracoccidioides</i> por <i>Phage Display</i>	80
4.3.1. Padronização da cultura de <i>E. coli</i> K91.....	80
4.3.1.1. Testes de Infectividade da Bactéria <i>E. coli</i> K91	80
4.3.2. Técnica <i>BRASIL</i> aplicada à <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> Pb18.....	81
4.3.2.1. Titulação das bibliotecas X6 e CX8C.....	81

4.3.2.3. Contagem das TUs após 2º e 3º rodadas da técnica <i>BRASIL</i>	82
4.3.2.4. Enriquecimento das bibliotecas após as rodadas	83
4.3.2.5. Identificação dos fagos ligantes de <i>P. brasiliensis</i>	83
4.3.3. Sequenciamento e processamento dos peptídeos ligantes de <i>P. brasiliensis</i>	84
4.3.4. Caracterização dos peptídeos identificados e seus receptores	85
4.3.5. Ensaio de ligação	89
4.3.6. Ensaio de inibição da adesão de <i>Paracoccidioides</i> aos componentes da matriz extracelular através do teste de inib-ELISA.....	92
4.3.7. Ensaio de inibição da adesão de <i>Paracoccidioides</i> à pneumócitos A549	95
4.3.8. Determinação da atividade antifúngica dos peptídeos selecionados.....	97
4.3.9. Determinação da atividade citotóxica dos peptídeos selecionados por teste de sensibilidade do MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide).....	98
4.3.10. Ensaio preliminares <i>in vivo</i> usando <i>Galleria mellonella</i> como modelo	99
4.3.11. Toxicidade dos peptídeos selecionados em <i>Galleria mellonella</i>	100
4.3.12. Capacidade dos peptídeos selecionados de evitar a infecção por <i>Paracoccidioides</i> spp.	101
4.3.13. Determinação da densidade hemocitária	104
4.4. Construção de biblioteca de <i>Phage Display</i> a partir do DNA de <i>Paracoccidioides</i> spp.	106
4.4.1. Extração de DNA genômico de <i>P. brasiliensis</i>	106
4.4.2. Digestão parcial do DNA de <i>P. brasiliensis</i> com a enzima <i>Msel</i>	107
4.4.3. Ligação dos adaptadores ao DNA de <i>P. brasiliensis</i> digerido pela enzima <i>Msel</i>	108
4.4.4. Verificação da Ligação dos adaptadores ao DNA de <i>P. brasiliensis</i>	109
4.4.5. Digestão do vetor fdBUG com a enzima <i>Sfil</i>	110
4.4.6. Tratamento do vetor fdBUG com a enzima fosfatase alcalina (CIP).....	111
4.4.7. Transformação controle do vetor fdBUG em <i>E. coli</i> MC1061.....	111
4.4.8. Ligação do DNA de <i>P. brasiliensis</i> no vetor fdBUG e transformação em <i>E. coli</i> MC1061	113
4.4.9. PCR de colônia para checagem da eficiência da ligação/transformação.....	114
4.4.10. Verificação da eficiência da ligação dos adaptadores ao DNA de <i>P. brasiliensis</i> parcialmente digerido pela enzima <i>Msel</i>	115
4.4.11. Sonicação do DNA de <i>P. brasiliensis</i>	116
4.4.12. Formação de extremidade não-coesiva no vetor fdBUG	117
4.4.13. Ligação do DNA de <i>P. brasiliensis</i> no vetor fdBUG e transformação em <i>E. coli</i> MC1061 (Extremidades não-coesivas) e verificação da eficiência	117
5. CONCLUSÕES.....	120

<i>Referências</i>	122
Capítulo II - Artigos	138
1. Artigo submetido: Adhesion profiles and the expression of adhesins of different phylogenetic species of the <i>Paracoccidioides</i> complex.	139
2. Co-autoria em artigos publicados pelo grupo durante período de doutorado	151

RESUMO

O gênero *Paracoccidioides* consiste de fungos dimórficos, agentes etiológicos da paracoccidioidomicose (PCM). Atualmente, estudos filogenéticos dividem o gênero *Paracoccidioides* em duas espécies denominadas *Paracoccidioides brasiliensis* e *Paracoccidioides lutzii*. A primeira é dividida em três espécies filogenéticas S1, PS2 e PS3, e a segunda é chamada de Pb01-like. A correta taxonomia molecular do gênero abriu novas possibilidades para o estudo e compreensão de suas relações com seu hospedeiro. Os fungos do gênero *Paracoccidioides* têm algumas características que permitem o seu crescimento em condições adversas, que podem contribuir para o desenvolvimento da doença, e têm mecanismos que lhes permitem aderir e invadir os tecidos do hospedeiro. A adesão ocorre através de uma classe específica de proteínas presentes na parede celular, essas proteínas são chamadas adesinas, e são capazes de mediar interações do fungo com os tecidos do hospedeiro durante a infecção. Diferenças na adesão são responsáveis pelo aumento da virulência/patogenicidade de um isolado em relação aos outros. O objetivo deste trabalho foi contribuir para ao maior conhecimento de componentes superficiais de espécies do gênero *Paracoccidioides* e sua influência na virulência. Para tanto, foram analisados os perfis de adesão e expressão de adesinas, bem como a clonagem e expressão heteróloga da proteína CS (Cell surface protein) que pode estar envolvida na virulência de *Paracoccidioides* spp e a caracterização e identificação de moléculas por *phage display* com capacidade de inibir a ligação de *Paracoccidioides* spp. Assim, ao se avaliar o perfil de adesão das espécies *P. brasiliensis* e *P. lutzii* bem como uma análise da expressão de genes codificantes de adesinas previamente caracterizadas por PCR em Tempo Real, verificou-se alta heterogeneidade de comportamento nas diferentes espécies em relação à adesão, mostrando ainda que as adesinas 14-3-3 e enolase são as mais utilizadas pelo patógeno, independente de cepa, durante a interação com o hospedeiro, além disso, uma curva de sobrevivência nos revelou correlação entre taxa de adesão e de sobrevivência. Assim, *P. brasiliensis* apresentou a maiores taxa de adesão e expressão de adesinas e foi mais virulento quando comparado com a espécie *P. lutzii*. A clonagem e expressão heteróloga da molécula CSP que pode estar envolvida na virulência de *Paracoccidioides* foi purificada e aparentemente pode ter papel na interação *Paracoccidioides*-hospedeiro. Também neste trabalho, foi realizada a identificação de novas moléculas utilizadas pelo patógeno durante sua interação com o hospedeiro em diferentes espécies filogenéticas de *Paracoccidioides* utilizando a técnica de apresentação de fagos, o que nos mostrou ser de grande valia já que através desta técnica pode-se identificar quatro peptídeos com alta capacidade de ligação à diferentes isolados de *Paracoccidioides* e ainda capazes de inibir a adesão em até 60% do patógeno aos componentes da matriz extracelular (laminina, fibronectina, colágeno tipo I e colágeno tipo IV). Além disso, em estudo preliminar *in vivo* utilizando o modelo *Galleria mellonella* pode-se observar que os peptídeos foram capazes de aumentar a sobrevivência de larvas infectadas com *Paracoccidioides*. Com os dados apresentados neste trabalho, espera-se aumentar o conhecimento sobre o arsenal molecular que *Paracoccidioides* spp. utiliza para aderir e invadir as células hospedeiras e assim estabelecer a infecção, entender como estes fungos utilizam esse arsenal durante a interação com o hospedeiro e prospectar novos alvos moleculares que poderão, no futuro, ser aplicáveis para a profilaxia e terapêutica de PCM.

ABSTRACT

The *Paracoccidioides* genus consists of dimorphic fungi, etiologic agents of paracoccidioidomycosis (PCM). Currently, phylogenetic studies divide the *Paracoccidioides* genus in two species named *Paracoccidioides brasiliensis* and *Paracoccidioides lutzii*. The first is divided in three phylogenetic species, *S1*, *PS2* and *PS3* and the second is named *Pb01-like*. The correct molecular taxonomy of this fungus has opened new possibilities for the study and understanding of their relationships with their hosts. The fungi of the *Paracoccidioides* genus have some features that allow their growth in adverse conditions provided by the host, which may contribute to disease development and it have mechanisms that enable them to adhere and invade host tissues. Adhesion is provided by a particular class of proteins present in the cell wall called adhesins, capable of mediating interactions with the fungal host tissues during infection. Differences in adhesion are responsible for increased virulence/pathogenicity of an isolate in relation to others. The goal of this study was to contribute to a better knowledge of the superficial components of the species of *Paracoccidioides* genus e its influence in the fungi virulence. For this, we analyzed the adhesion profile and the adhesins expression during the interaction of the fungi with the host, cloned and expressed the CS protein, in a heterologous system, which may be involved in virulence of *Paracoccidioides* spp. as well as characterize and identify molecules capable of inhibit the adhesion of *Paracoccidioides* spp. using a *Phage Display* system. So, when we evaluated the adhesion profile of the species *P. brasiliensis* and *P. lutzii*, as well as the analysis of the expression of genes coding adhesins by Real Time PCR, it has been founded a high heterogeneity of behavior in the different species, showing that the adhesins 14-3-3 and enolase are the most used ones adhesins by the pathogen, independent of the strain during the interaction with the host, besides this, a survival curve revealed a correlation between adhesion rate and survival, so *P. brasiliensis* showed higher adhesion and adhesins expression rates e was more virulent when compared with th specie *P. lutzii*. The cloning and expression of the CS protein that may be involved in *Paracoccidioides* spp. virulence was purified and apparently play an important role in the interaction *Paracoccidioides*-host. Also in this study we realize the identification of new molecules, used by the pathogen during its interaction with the host in the different phylogenetic species of *Paracoccidioides* using the *Phage Display* technique and we could indentify four peptides with high binding capacity to different *Paracoccidioides* isolates e are capable to inhibit the adhesion up to 60% of the pathogen to extracellular matrix components (laminin, fibronectin, type I collagen and type IV collagen) and to pneumocytes A549. Besides this, in a preliminary *in vivo* study using *Galleria mellonella* as host model we observed that the peptides was capable to increase the larvae survival tha were infected with *Paracoccidioides*. With the data presented in this work, we hope to increase our knowledge about the molecular arsenal that *Paracoccidioides* spp. uses to adhere and invade host cells e them stablish the infection, understand how these fungi uses this arsenal during the interaction with the host e prospect new molecular targets that can, in the future, be applicable to prophylaxis and therapy of PCM.

1. INTRODUÇÃO

Paracoccidioides brasiliensis é um fungo dimórfico, agente etiológico da paracoccidioidomicose (PCM), micose sistêmica que atinge a América Latina, sendo o Brasil, o país que possui o maior número de áreas endêmicas para essa doença no mundo.

A PCM foi descrita pela primeira vez, em 1908, por Adolfo Lutz. Quatro anos depois, Splendore descreveu novos casos e estudou minuciosamente a morfologia do fungo, denominando-o *Zymonema brasiliensis*. Posteriormente, em 1930, Floriano Paulo de Almeida instituiu a denominação *Paracoccidioides brasiliensis*. O termo paracoccidioidomicose foi instituído em 1971 na reunião de micologistas das Américas em Medellin e persiste, até hoje, como nomenclatura oficial (Palmeiro, Cherubini e Yurgel, 2005).

O gênero *Paracoccidioides* provavelmente surgiu entre 23 e 5 milhões de anos durante o Mioceno. Sua evolução provavelmente ocorreu na América do Sul, alcançando posteriormente a América Central a cerca de cinco milhões de anos atrás, durante o Plioceno, com a ascensão do Istmo do Panamá unindo as Américas do Sul e Norte. Como ocorreu a chegada do fungo ao Norte ainda não é certo, porém estudos estão sendo feitos para tentar explicar, e uma das hipóteses seria o papel dos animais da ordem *Xenarthra*, carreando o fungo do Sul para o Norte. Esta relação vem sendo estudada, pois o fungo vem sendo isolado de tatus (principalmente *Dasypus novencintus*) jovens e adultos, ambos os sexos e sem nenhum sinal visível da paracoccidioidomicose. Porém, a presença de granuloma com elementos fúngicos compatíveis com *Paracoccidioides* é ocasionalmente observado em linfonodos, baço e pulmões de alguns animais indicando condição ativa da PCM (Bagagli *et al.*, 2006).

Nas áreas endêmicas da doença a incidência estimada é de, aproximadamente, um a três casos clínicos para cada 100.000 habitantes por ano (Coutinho *et al.*, 2002). A PCM atinge preferencialmente trabalhadores rurais do sexo masculino, entre 30 a 60 anos de idade (Svidzinski *et al.*, 1999; Villa *et al.*, 2000). O trabalho com solo e plantações em área rural é fator ocupacional predisponente para a aquisição da PCM (Franco, 1987). A maioria dos indivíduos expostos a propágulos do fungo desenvolve uma infecção assintomática, com lesões granulomatosas estabelecidas nos pulmões e linfonodos. Em alguns indivíduos, o fungo pode permanecer no estado latente e após

pode ocorrer disseminação para outros órgãos e tecidos, por meio das vias hematogênica e linfática (Franco *et al.*, 1989).

Com base em recentes análises filogenéticas, *P. brasiliensis* está classificado na Ordem Onygenales, na Família Ajellomycetaceae, formando um clado monofilético que inclui os gêneros *Blastomyces*, *Emmonsia* e *Histoplasma* (Untereiner *et al.*, 2004). Matute *et al.* (2006) estudaram 65 isolados de *P. brasiliensis*, e classificou-os em três diferentes espécies filogenéticas, S1, PS2 e PS3 sendo a espécie S1, um grupo parafilético encontrado no Brasil, Argentina, Paraguai, Peru e Venezuela, a espécie PS2, um grupo monofilético encontrado no Brasil e Venezuela e a espécie PS3, um grupo monofilético encontrado apenas na Colômbia. Carrero *et al.* (2008) estudaram 21 isolados de *P. brasiliensis*, incluindo sete novos isolados, com base na comparação de seqüências codantes e não codantes de diferentes genes, além das regiões ITS (seqüências espaçadoras internas). Estes foram classificados dentro de duas espécies filogenéticas, S1 e PS3, anteriormente descritas por Matute *et al.* (2006), que além de classificar o isolado Pb01 separado dos demais, propuseram a classificação deste como uma nova espécie filogenética. Teixeira *et al.* (2009) analisaram 88 isolados e identificaram 17 como pertencentes ao grupo Pb 01 e estimaram que as espécies filogenéticas S1/PS2/PS3 e Pb01 tiveram um ancestral comum a cerca de 32 milhões de anos, e através de análises de recombinação sugeriram a existência de isolamento reprodutivo entre estas espécies e por isso propõem os isolados Pb01 como uma nova espécie, *Paracoccidioides lutzii*. A correta taxonomia molecular deste fungo tem aberto novas possibilidades para o estudo e o entendimento de suas relações ecoepidemiológicas com seus hospedeiros (Bagagli *et al.*, 2006; Bagagli *et al.*, 2008).

Os agentes de micoses sistêmicas possuem alguns fatores que permitem o seu crescimento nas condições adversas proporcionadas pelo hospedeiro, que podem contribuir para o desenvolvimento da doença (Casadevall e Pirofski, 1999). Assim, o complexo *Paracoccidioides* possui mecanismos que o capacitam a aderir, extravasar e invadir barreiras impostas pelos tecidos do hospedeiro (Mendes-Giannini *et al.*, 1994; Mendes-Giannini *et al.*, 2000), sintetizando várias substâncias que participam direta ou indiretamente da relação parasita-hospedeiro. O sucesso de colonização dos tecidos do hospedeiro pelo fungo é, portanto, um evento complexo, geralmente envolvendo um ligante codificado pelo patógeno e um receptor da célula. O microrganismo tem como opção três tipos de componentes do hospedeiro, com os quais pode interagir: produtos

secretados pela célula, superfícies da célula hospedeira ou as proteínas da matriz extracelular (MEC), como os colágenos tipos I e IV, fibronectina e laminina (Andreotti, 2006). O entendimento e identificação de moléculas envolvidas na adesão de microrganismos a diferentes substratos no hospedeiro é um dos caminhos a serem seguidos na descoberta de tratamentos eficientes para as micoses sistêmicas.

A adesão é conferida por uma classe de proteínas especial presentes na parede celular denominadas de adesinas. O conhecimento da composição da parede celular e dos componentes exocelulares dos fungos contribui para a identificação de ligantes na superfície celular de patógenos. Estes componentes podem funcionar como adesinas capazes de mediar interações do fungo com tecidos do hospedeiro durante a infecção (Silva, 2008). Além do seu papel na fixação da célula hospedeira e também no acasalamento, adesinas fúngicas são implicadas em várias outras funções como agregação social, formação de biofilme sobre os tecidos, em prótese médica e cateteres e nas interações com outros micróbios (Nobile *et al.*, 2008). A formação de biofilme contribui para a resistência às drogas e aumento da persistência da infecção. Diferenças na adesão são responsáveis pela maior virulência/patogenicidade de um isolado em relação às outras (Andreotti *et al.*, 2005; Mendes-Giannini *et al.*, 2006). A variabilidade fenotípica e a plasticidade de adesinas as colocam como um mecanismo de defesa dos fungos que lhes permitem alterar as suas propriedades de adesão, em resposta a diferentes ambientes (Ramana e Gupta, 2010).

Alguns receptores fúngicos envolvidos na interação com a MEC foram identificados em nível molecular (Klotz *et al.*, 1993; Bromley e Donaldson, 1996; Gil *et al.*, 1996; Gaur e Klotz, 1997; López-Ribot *et al.*, 1999). Moléculas com características de ligantes da matriz extracelular foram descritas para *Candida albicans* (Bouchara *et al.*, 1990; López-Ribot e Chaffin, 1994; Sakata, Yamazaki e Kogure, 1999), *Aspergillus fumigatus* (Tronchin *et al.*, 1993), *Histoplasma capsulatum* (McMahon *et al.*, 1995), *P. brasiliensis* (Vicentini *et al.*, 1994; Hanna, Monteiro Da Silva e Giannini, 2000; Andreotti *et al.*, 2005; González *et al.*, 2005; Barbosa *et al.*, 2006) e *Penicillium marneffei* (Hamilton *et al.*, 1998).

A glicoproteína de 43 kDa, ligante de laminina e fibronectina, tem papel na adesão (Vicentini *et al.*, 1994; Mendes-Giannini *et al.*, 2006). Fato este confirmado desde que o soro anti-gp 43 inibiu o processo de adesão em 85% (Hanna, Monteiro Da Silva e Giannini, 2000). Mas provavelmente, outros componentes do fungo tenham

papel do processo de adesão (Mendes-Giannini *et al.*, 2000). Andreotti (2005) isolou uma adesina de 30 kDa de *P. brasiliensis*, com capacidade de ligação à laminina. Esta proteína foi mais expressa num isolado de *P. brasiliensis* que apresentava alta capacidade de adesão, sendo esta proteína caracterizada como pertencente à família 14-3-3. *P. brasiliensis* também apresenta em sua superfície celular duas proteínas de 19 e 32-kDa, detectados em ambas formas (M/L) que se ligam à três proteínas da MEC: laminina, fibronectina e fibrinogênio (González *et al.*, 2005). A proteína gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), recombinante de *P. brasiliensis*, foi capaz de se ligar à laminina, colágeno I e fibronectina. O tratamento de formas leveduriformes de *P. brasiliensis* com anti-GAPDH e de pneumócitos com GAPDH recombinante promoveu a inibição da infecção do fungo às células epiteliais (Barbosa *et al.*, 2006). Coltri *et al.* (2006) e Ganiko *et al.* (2007) descreveram a paracoccina, uma lecitina ligante de N-acetil-glucosamina de *P. brasiliensis*. Pereira *et al.* (2007) descreveram a triosefosfato isomerase de *P. brasiliensis* que se liga preferencialmente à laminina, determinada por ensaios de inibição. Donofrio *et al.* (2009) descreveram a proteína enolase como uma adesina de *P. brasiliensis* ligante de fibronectina, além disso, Marcos *et al.* (2012b) mais uma vez demonstraram que a enolase se liga à todas os componentes da MEC e também verificaram que a enolase é expressa em níveis elevados na parede celular celular do fungo, contribuindo assim na adesão do patógeno ao hospedeiro. Da Silva Neto *et al.* demonstraram que a proteína malato sintetase de superfície de *P. brasiliensis*, ligante de fibronectina e colágenos tipo I e IV, contribui para a adesão do fungo, comportando-se como uma adesina. Em outro estudo com esta mesma adesina, De Oliveira *et al.* (2013) demonstraram que a proteína malato sintetase de Paracoccidioides interage com proteínas de diferentes categorias moleculares como transporte celular, biosíntese de proteínas, modificação e degradação de proteínas e transdução de sinal sugerindo que esta proteína desempenha diferentes papéis na célula fúngica.

Os fungos do gênero *Paracoccidioides* possuem uma grande diversidade de moléculas, das mais distintas origens e funções, que atuam como moléculas de vital importância para a sobrevivência do fungo quando em contato com o hospedeiro, permitindo assim que o fungo se proteja e se defenda do ambiente hostil que deve enfrentar para se estabelecer e se disseminar pelo organismo do hospedeiro. Por conta desta grande variedade, distintas moléculas usadas pelo fungo durante essa interação, ainda são pouco conhecidas e esforços na caracterização de novas moléculas devem ser

realizados a fim de conhecer todo o arsenal utilizado pelo patógeno e delinear novas terapêuticas e melhorar o diagnóstico. Esta problemática se agrava com as recentes descobertas acerca do gênero *Paracoccidioides* que agora é composto por duas espécies, divididas em quatro espécies filogenéticas, sendo que essa diversidade também se reflete nas estratégias adotadas pelo patógeno para o estabelecimento da infecção.

Muitos genes foram descritos como provavelmente envolvidos na sobrevivência de *Paracoccidioides* spp. no hospedeiro. Entre estes há aqueles que codificam para proteínas essenciais para a vida do fungo, assim como aqueles envolvidos na interação com seu hospedeiro, caracterizando o fenótipo patogênico (Felipe, Andrade, *et al.*, 2005; Bailão *et al.*, 2006; Bastos *et al.*, 2007). Os avanços na caracterização de adesinas de *P. brasiliensis* têm sido obtidos com os estudos de transcriptoma (Felipe *et al.*, 2003; Felipe, Torres, *et al.*, 2005; Oliveira, 2010).

Neste sentido, Oliveira (2010) utilizando de técnicas de transcriptoma (*Representational Difference Analysis* - RDA) e de proteômica fez um estudo onde buscou identificar genes e proteínas diferencialmente expressas durante a interação de *P. lutzii* Pb01 com os componentes da matriz extracelular (MEC) laminina, fibronectina, colágeno tipo I e colágeno tipo IV quando em situação de depleção de metais de ferro e cobre mimetizando as condições de privação destes micronutrientes que o patógeno encontra durante sua interação com o hospedeiro.

Os resultados deste estudo demonstraram o grande arsenal utilizado pelo fungo para aderir aos componentes da MEC, sendo identificadas proteínas conhecidamente utilizadas pelo fungo como Enolase, 14-3-3, Malato sintase, Frutose bifosfato aldolase, GAPDH, além de proteínas que ainda não tiveram sua função na interação descrita para *P. brasiliensis*.

Dentre estas proteínas com seu papel na interação ainda não identificada está a Cell surface protein de *Aspergillus flavus* (CS protein) que têm papel importante já descrito na virulência de outros patógenos.

A CS protein é uma proteína de superfície celular de *Aspergillus flavus* (CS protein) que já foi identificada em várias espécies de patógenos fúngicos e bacterianos e que possui homologia com uma proteína hipotética identificada no genoma de *P. brasiliensis* e *P. lutzii*. Pela sua localização celular e por estar presente em diferentes microrganismos julgamos ser uma proteína interessante para o estudo, pois pode estar envolvida na interação de *P. brasiliensis* com o hospedeiro.

O estudo funcional desta proteína no gênero *Paracoccidioides* faz-se necessário e para tanto, a obtenção desta proteína através da expressão heteróloga em bactéria *Escherichia coli* é de fundamental importância para entendermos como esta participa da interação do fungo com o hospedeiro.

Reconhecimento da diversidade molecular de proteínas de superfície celular em diferentes doenças é essencial para o desenvolvimento de terapias específicas. Progressos na terapêutica orientada requerem o estabelecimento de estratégias eficazes para a identificação de marcadores de superfície clinicamente relevantes. Durante a última década, uma série de estratégias foi desenvolvida para a identificação de receptor-ligantes que podem servir como alvos terapêuticos e marcadores no diagnóstico da doença. A tecnologia de bibliotecas de peptídeos apresentadas em fagos, conhecida como “*Phage Display*”, tem sido extremamente importante para a identificação e caracterização de novos ligantes de alta afinidade e seus receptores em diversas doenças. A possibilidade de expressão de uma proteína de fusão no capsídeo de fagos, de maneira acessível ao reconhecimento por um ligante, demonstrada por Smith (1985), abriu o caminho para a construção de bibliotecas combinatorias apresentadas na superfície destas partículas virais. *Phage Display* é uma técnica eficiente para identificar peptídeos ou proteínas que se ligam a outras moléculas com diversas finalidades. A tecnologia é baseada no princípio de que polipeptídios podem ser expressos na superfície de fagos filamentosos pela inserção de um segmento de DNA exógeno no genoma dos mesmos, de modo que o peptídeo ou proteína expressa fica exposto na superfície da partícula fusionada a outra proteína endógena.

A tecnologia de *Phage Display* é atualmente bastante utilizada no estudo de grande diversidade de patógenos humanos sendo responsável pela identificação de importantes moléculas com diversas aplicabilidades, desde marcadores diagnósticos até possíveis moléculas a serem utilizadas no tratamento de pacientes acometidos por infecções com diferentes microrganismos.

No estudo da PCM esta técnica já foi utilizada e duas importantes moléculas foram analisadas. Kioshima *et al.* (2011) utilizaram a técnica e isolaram um peptídeo (chamado de p04) que se liga especificamente a isolados bastante virulentos de *P. brasiliensis*, sendo este peptídeo capaz de matar o fungo quando este é inoculado em camundongos infectados com *P. brasiliensis*, além disso, por sua seletividade a isolados virulentos, este peptídeo também foi proposto pelos autores como um biomarcador de

virulência de diferentes isolados do fungo. Caldini *et al.* (2012) através do *Phage Display* selecionaram um peptídeo (chamado de P2) que se liga ao anticorpo anti-gp75, que se mostrou eficiente como molécula para o diagnóstico sorológico da doença, já que este peptídeo é fortemente reconhecido no soro de pacientes com PCM e não demonstra nenhuma reatividade em pacientes não infectados e infectados com diferentes micoses como aspergilose e candidemias.

Lionakis *et al.* (2005) utilizaram *Phage Display* e selecionaram peptídeos ligantes de superfície celular tanto de conídios como de hifas de *A. fumigatus* que podem ser importantes em estudos de resposta imune contra *Aspergillus* além de novos agentes diagnósticos e terapêuticos contra a aspergilose invasiva. Em estudo recente, Zhao *et al.* (2012) utilizando *Phage Display* a partir de uma biblioteca de peptídeos, pode selecionar aqueles que inibem a adesão de *A. fumigatus* à células da córnea impedindo assim o desenvolvimento da ceratite, doença que ataca as células da córnea humana.

Laforce-Nesbitt (2008) utilizaram *Phage Display* e puderam isolar um fragmento de anticorpo humano (scFv) que se liga à proteína Als3 da superfície de hifas de *C. albicans* inibindo a capacidade do fungo de aderir a células humanas. Tsai *et al.* (2011) através de *Phage Display* descreveram quatro peptídeos, ligantes de LL-37 (Human Cathelicidin Antimicrobial Peptide Family) comumente expressos em vários tecidos humanos, incluindo tecidos epiteliais, mostrando potencial de inibir a adesão de *C. albicans* a poliestireno e por inferência a células do hospedeiro. Em outro aspecto importante, Anandakumar *et al.* (2011) utilizaram o *Phage Display* para identificação de sequências peptídicas que podem distinguir *C. albicans* de outras espécies além de peptídeos marcadores das diferentes formas morfológicas do fungo (Levedura e Hifa), o que resultou em peptídeos com grande potencial diagnóstico permitindo em tempo hábil o início da terapêutica correta em curto espaço de tempo.

O *Phage Display* já foi bastante utilizado para identificar moléculas que atuam como adesinas em diferentes microorganismos. Coburn *et al.* (1999) utilizando biblioteca de fago com o DNA de *Borrelia burgdorferi*, identificou uma molécula ligante da cadeia b3 de integrinas chamada p66, reconhecida no soro de pacientes com doença de Lyme além de ser expresso na superfície desta bactéria. Quando expressa na superfície de *E. coli*, esta proteína aumentou a adesão desta bactéria à cultura de células revelando a importância desta proteína na virulência de *B.burgdorferi*. Antonara *et al.*

(2007) utilizando *Phage Display in vivo* identificaram várias novas moléculas candidatas a adesinas e verificaram a atividade da adesina P66 de *B. burgdorferi* que foi previamente caracterizada *in vitro*.

Posadas *et al.* (2012) utilizando *Phage Display* puderam identificar genes de *Brucella suis* codificantes de adesinas que se ligam ao componente da matriz extracelular fibronectina e este achado destacou o papel de uma nova proteína de grande importância na adesão de *B. suis* durante a interação deste microrganismo com o hospedeiro.

Mullen *et al.* (2007) fizeram uma análise genômica comparativa das adesinas de *Pasteurellaceae* utilizando *Phage Display* e puderam identificar quatro genes codificantes de adesinas que ainda não tinham sido caracterizados: uma proteína de 34 kDa ligante de soroalbumina humana de *Haemophilus influenzae*; uma proteína de 12.8 kDa ligante de fibronectina de *Pasteurella multocida*; uma proteína de 13.7 kDa ligante de fibronectina de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*; e uma proteína de 9.5 kDa ligante de soroalbumina de *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Utilizando *Phage Display*, Shkoporov *et al.* (2008) identificaram um fragmento da sequência nucleotídica codificante de um polipetídeo ligante de células epiteliais HT-29 de *Bifidobacterium longum* caracterizado como uma adesina de grande importância para a virulência deste microrganismo.

Uma biblioteca de *Phage Display* de *Lactobacillus casei* BL23 foi construída e utilizada para a seleção de peptídeos capazes de ligar a fibronectina e colágeno por Muñoz-Provencio *et al.* (2010). Clones que apresentaram a capacidade de se ligar a essas proteínas foram isolados e sua importância como adesinas foi identificada confirmando seu envolvimento na interação com o hospedeiro.

Como já descrito acima, este estudo envolve a utilização da técnica de *Phage Display* para selecionar peptídeos que interajam com moléculas e receptores envolvidos na interação de *P. brasiliensis*-hospedeiro. A técnica de *Phage Display* permite expressar pequenos peptídeos com 5 a 15 aminoácidos que são apresentados numa das proteínas do capsídeo de bacteriófagos (Smith, 1985). Uma biblioteca de *Phage Display* pode conter mais de 10^9 diferentes peptídeos o que resulta em ligantes para virtualmente qualquer alvo biológico. Uma característica importante do *Phage Display* é que os peptídeos selecionados frequentemente apresentam atividade biológica relacionada com a natureza da molécula em estudo. Por exemplo, no caso de enzimas, o peptídeo

frequentemente mimetiza o substrato, ligando-se ao sítio ativo ou alostérico, inibindo ou ativando a enzima (Koivunen, Restel, *et al.*, 1999; Giordano *et al.*, 2001; Cloutier *et al.*, 2004; Giordano *et al.*, 2005), no caso de receptores de superfície, o peptídeo se assemelha a uma proteína ligante do receptor (Koivunen, Arap, *et al.*, 1999; Giordano *et al.*, 2001), competindo pela ativação do mesmo. Essa característica do *Phage Display* permite identificar alvos terapêuticos e marcadores de diagnóstico relevantes aos diversos processos biológicos de um organismo e, ao mesmo tempo, isolar e caracterizar peptídeos antagonistas ou agonistas dos alvos identificados. Esses peptídeos podem ser então explorados para o desenvolvimento de agentes terapêuticos. Portanto, *Phage Display* é uma técnica que encontra múltiplas aplicações, tais como, desenho racional de fármacos, terapias direcionadas, terapias gênicas, produção de vacinas, métodos diagnósticos, entre outras aplicações (Sergeeva *et al.*, 2006; Giordano *et al.*, 2009).

Adesinas e adesina-like proteínas são componentes da superfície celular e/ou do metabolismo que conferem aos microrganismos capacidade de fixação as células, tecidos e/ou superfícies abióticas. Adesinas correspondem às primeiras moléculas de contato do patógeno para posterior invasão da célula hospedeira e, portanto, indispensável determinante de sua virulência. Devido à sua importância na invasão da célula hospedeira, adesinas são intensamente investigadas por se constituírem também em potencial alvo para intervenção terapêutica (fármacos e/ou vacinas). Assim, abordagens diferenciais como a proposta neste estudo poderão abrir caminho para a descoberta de novas moléculas na interação *Paracoccidioides*-hospedeiro.

2. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi contribuir para ao maior conhecimento de componentes superficiais de espécies do gênero *Paracoccidioides* e sua influência na virulência.

2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o padrão de adesão à cultura de pneumócitos A549 e aos componentes da MEC (Laminina, Fibronectina, Colágeno tipo I e Colágeno tipo IV) das espécies *P. brasiliensis* e *P. lutzii*;
- Analisar o padrão de expressão de genes codificantes das adesinas, já descritas para o gênero *Paracoccidioides* (GP43, Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GADPH), Enolase, Malato sintetase, Triosefosfato isomerase, 14-3-3 e Aldolase) durante infecção experimental nas diferentes espécies do gênero;
- Realizar curva de sobrevivência de camundongos infectados para avaliação da relação adesão/virulência nas espécies do gênero estudadas;
- Expressão heteróloga da proteína cell surface protein (CSP) em *E. coli* e avaliar o papel da proteína recombinante na interação de *P. lutzii* com pneumócitos A549 e com os componentes da matriz extracelular, laminina, fibronectina, colágeno tipo I e colágeno tipo IV;
- Identificar peptídeos ligantes seletivos da superfície de *Paracoccidioides* utilizando a técnica de *Phage Display* com duas bibliotecas distintas (X6 e CX8C, X = qualquer aminoácido; C = cisteína), para isolar peptídeos ligantes da superfície de *P. brasiliensis*;
- Determinação das propriedades biológicas dos peptídeos selecionados avaliando a capacidade dos peptídeos selecionados de inibir a adesão de *Paracoccidioides* aos componentes da matriz extracelular (laminina, fibronectina, colágeno tipo I e colágeno tipo IV) e à pneumócitos A549, além de testes *in vivo* avaliando a capacidade destes peptídeos em evitar a infecção por *Paracoccidioides* spp. em *Galleria mellonella*;

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Comitê de ética

Os experimentos com animais foram realizados de acordo com a Lei Federal Brasileira 11.794 que estabelece os procedimentos para o uso de animais em pesquisas científicas e a lei Estadual que estabelece o código de proteção animal do Estado de São Paulo. Para estes estudo foram utilizados camundongos machos BALB/C e C57-BLACK6 e todos os esforços foram realizados para minimizar o sofrimento dos animais e foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentos Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – FCFAr UNESP (Processo 10/2011/CEUA/FCF).

3.2. Análise dos perfis de adesão e expressão de adesinas nas espécies do gênero *Paracoccidioides* e sua influência na virulência desses fungos

3.2.1. Microrganismos

Os experimentos foram realizados com diferentes isolados pertencentes às duas espécies do gênero *Paracoccidioides*, *P. brasiliensis* e *P. lutzii* (Tabela 1). Os isolados foram gentilmente cedidos pelo Dr. Eduardo Bagagli do Laboratório de Biologia de fungos do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências de Botucatu - UNESP na fase miceliar que foram então transferidos para meio Fava-Netto suplementado com soro fetal bovino até a reversão destes para a fase leveduriforme. Após a reversão os isolados foram mantidos a 36°C no meio de Fava-Netto sem suplementos sendo então repicados neste meio a cada sete dias. Os experimentos foram iniciados apenas após o 4º repique na fase leveduriforme.

Tabela 1. Isolados pertencentes às diferentes espécies do gênero *Paracoccidioides* utilizados nos ensaios de adesão.

Espécie	Isolado	Origem	Isolamento
<i>P. lutzii</i>	Pb66	Goiânia, Brasil	Pele humana
	Pb8334MMT	Goiânia, Brasil	Humano
	Pb01	Goiânia, Brasil	Pulmão humano - PCM aguda
<i>P. brasiliensis</i>	Bt60	São Paulo, Brasil	Escarro humano
	T3B6	São Paulo, Brasil	Fígado de tatu
	D011	São Paulo Brasil	Lesão cutânea humana
	Pb18	São Paulo, Brasil	Lesão cutânea humana

3.2.2. Avaliação de adesão das diferentes espécies filogenéticas do complexo *Paracoccidioides* à cultura de células

3.2.2.1. Cultura celular

Para este estudo foi utilizada a linhagem de pneumócitos A549, células epiteliais de pulmão humano. As células da linhagem epitelial A549 (pneumócitos tipo II) foram cultivadas em placas de cultura em meio HAM F-12, acrescido de 10% de soro fetal bovino.

3.2.2.2. Ensaio de Adesão à pneumócitos A549

Este ensaio foi realizado de acordo com Andreotti (2005). Após a formação da monocamada, as células foram lavadas três vezes com PBS estéril para então serem inoculadas com as respectivas suspensões de 10^6 cels/mL (DO=0,5 a 550nm) das diferentes espécies filogenéticas do gênero *Paracoccidioides*. Para a preparação dos inóculos, as suspensões padronizadas de fungos em PBS (solução fisiológica tamponada com fosfatos 0,05 M, pH 7,2) foram então incubadas por meia hora à 37°C com CFSE (5(6)-Carboxyfluorescein diacetate N-succinimidyl Ester, BioChemika), lavadas em PBS e, novamente, os fungos foram ressuspensos em PBS, a seguir foi realizada a infecção na monocamada de celular em placas de seis orifícios. Cada poço foi inoculado com 1000µL da suspensão de *Paracoccidioides* em PBS marcada CFSE e 1000µL de meio sem suplementos, Ham-F12 para pneumócitos. A seguir, as células infectadas foram incubadas por 2 e 5 horas a 36,5°C e 5% de CO₂. As células foram então tripsinizadas, lavadas em meio com soro fetal bovino, centrifugadas, fixadas em paraformaldeído 4% e avaliadas por citometria de fluxo para verificar a quantidade de fungos aderidos, diferenciando a capacidade de infecção dos diferentes isolados pertencentes às diferentes espécies filogenéticas do complexo *Paracoccidioides*.

3.2.3. Ensaio de Adesão de isolados das diferentes espécies filogenéticas do gênero *Paracoccidioides* aos componentes da MEC

3.2.3.1. Sensibilização de placas com componentes da MEC

As placas de 24 poços Corning^R foram sensibilizadas com os componentes da MEC, Laminina, Fibronectina, Colágeno tipo I e Colágeno tipo IV (SIGMA) na concentração de 50 µg/mL por 18 horas a 4°C e 1 hora a temperatura ambiente. Após o período de sensibilização as placas foram lavadas 3 vezes com PBS de acordo com Oliveira (2010).

3.2.3.2. Adesão das diferentes espécies filogenéticas do gênero *Paracoccidioides*

Para o ensaio de adesão, de acordo com Oliveira (2010), suspensões (5×10^6 cels/mL) das diferentes espécies filogenéticas do gênero *Paracoccidioides* em PBS foram preparadas. A seguir, 500 µL destas suspensões foram inoculada na placa já sensibilizada com os componentes da MEC, descrito anteriormente. Estas infecções foram incubadas a 37° C por 2 horas. Após este tempo, o sobrenadante foi retirado e a placa foi lavada três vezes com PBS e depois a cada poço foram adicionadas 300 µL de tripsina para retirar o fungo aderido aos componentes da MEC. As suspensões de tripsina foram então recolhidas em Eppendorfs e centrifugadas a 2500 RPM à 4°C. Os sobrenadantes foram então descartados e a cada eppendorf foi adicionado 500 µL de FACSFlow para posterior contagem de células através de citometria de fluxo (BD FACSCanto), com o auxílio do software BDFACS Diva.

3.2.4. Análise da expressão de adesinas por PCR em Tempo Real durante a infecção das diferentes espécies filogenéticas do complexo *Paracoccidioides* em camundongos BALB/C

Para esta análise, foram preparados dois inóculos (5×10^6 cels/mL) de cada um dos isolados representando cada uma das espécies de *Paracoccidioides*, Pb18 (*P. brasiliensis*) e Pb01 (*P. lutzii*), que foram infectados em camundongos BALB/C machos

pela veia caudal. Após os períodos de 10 minutos e 1 hora de infecção o sangue total dos camundongos foi coletado e este foi realizado para a extração de RNA, afim de recuperar o RNA do fungo que circulava pela corrente sanguínea dos animais. Este procedimento foi realizado de acordo com Bailão et al. (2006). Além disso, foi realizada a extração do RNA dos dois isolados mantidos em meio Fava-Netto que foram utilizados como controle nos experimentos de análise da expressão gênica por PCR em tempo real.

3.2.4.1. Extração de RNA e síntese de cDNA

O RNA foi extraído utilizando-se Trizol (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA) que é um reagente para a extração de RNA total que, durante a homogeneização ou lise, mantém a integridade do RNA, enquanto as células são rompidas e os componentes celulares dissolvidos. A adição de clorofórmio seguida da centrifugação permite a separação da solução em fase aquosa e orgânica. O RNA permanece exclusivamente na fase aquosa. Em seguida, após a transferência da fase aquosa, o RNA foi recuperado por precipitação com isopropanol. Após a extração do RNA, 1 ug desse foi utilizado na hibridização subtrativa para sintetizar a fita de cDNA, Neste processo, a primeira fita foi produzida utilizando-se a transcriptase reversa (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA).

3.2.4.2. Análise da Expressão de adesinas por PCR em Tempo Real

Foram selecionados sete genes codificantes de adesinas para ter sua expressão avaliada nas diferentes espécies filogenéticas, sendo sintetizados iniciadores específicos para cada um deles, conforme tabela abaixo:

Tabela 2. Iniciadores desenhados para análise de expressão de genes codificantes de adesinas de *Paracoccidioides* spp.

Gene	Iniciadores
GP43	Sense 5' CTTGTCTGGGCCAAAACTC3'; Antisense 5' GCCAGGGTTTGTGGACTGT3'
GADPH	Sense 5' AAATGCTGTTGAGCACGATG3' Antisense 5' CTGTGCTGGATATCGCCTTT3'
Enolase	Sense 5' TAGGCACCCTCACTGAATCC3' Antisense 5' GCTCTCAATCCCACAACGAT3'
14-3-3	Sense 5' TACTTAATGCGGGACGGAAG3' Antisense 5' AGCCATATGCCTTGATACGG3'
Malato sintetase	Sense 5' GTTCCCTTCATGGATGCCTA3' Antisense 5' TCTTTGATGGGGATTTGAGC3'
Triosefosfato isomerase	Sense 5' CCTTACGGCAGAATGACGTT3' Antisense 5'GCCATTTCCATGTCAGGTCT3'

As reações foram realizadas utilizando-se 1 uL de cDNA, 12,5 µL de Maxima® SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X) (Fermentas), e 0.5 uM de cada primer, sendo adicionado a reação água até atingir o volume de 25 µL. As reações foram realizadas com temperatura inicial de 50°C por 2 minutos, seguido por 10 minutos a 95°C. Depois, 40 ciclos de 95°C a 15 segundos, seguidos de anelamento e síntese a 60°C por um minuto. Em seguida a PCR a análise da curva de *melting* foi realizada para confirmar a emissão de sinal correspondente a um único produto. As reações foram realizadas em triplicata com o aparelho Applied Biosystems 7500 cycler. Os dados foram analisados pelo método $2^{-\Delta\Delta CT}$. Para os valores obtidos para as amostras em triplicata foram calculados a média e então o valor $2^{-\Delta\Delta CT}$ (sendo o gene L34 utilizado como referência) em seguida os valores para as amostras foram normalizado a partir da amostra de RNA extraído do fungo que não foi submetido à infecção *in vivo*. Como controle negativo será utilizado uma reação na qual conterà todos os reagentes exceto a amostra de cDNA. Além disso, um controle com o cDNA sintetizado a partir do RNA do sangue de animal não infectado.

3.2.5. Análise da relação adesão/virulência nos diferentes isolados de *Paracoccidioides* spp.

Para esta análise, foram preparados inóculos (5×10^6 células por mL) de cada espécie do gênero, *P. brasiliensis*, isolado Pb18, e *P. lutzii* isolado Pb01, que foram infectados em camundongos C57-BLACK6 machos através de inoculação intratraqueal.

Os camundongos foram anestesiados pela administração de 250 μ L da associação de 10 mg/kg de cloridrato de xilazina e 80 mg/kg de cloridrato de ketamina. Foi realizada uma pequena incisão na região da traquéia e inoculou-se 0,05mL da suspensão de fungo utilizando seringa de 1,0mL. A incisão foi suturada e os animais mantidos aquecidos para evitar hipotermia devido à ação do anestésico. Após a inoculação, foi observada a morte dos camundongos durante 200 dias pós-infecção. Cada grupo estudado continha oito camundongos. Como controle, outro grupo também de oito camundongos tratados com PBS foi utilizado.

3.3. Clonagem e expressão heteróloga da proteína CS protein (CSP) que pode estar envolvida na virulência de *Paracoccidioides* spp.

3.3.1. Microrganismo e condições de cultivo

Foi utilizado o isolado Pb01 de *P. lutzii* na fase leveduriforme, mantido regularmente em meio sólido de Fava-Netto em estufa a 35°C, repicado a cada 7 dias.

3.3.2. Extração de RNA de *Pb01*

O RNA foi extraído utilizando-se Trizol (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA), a partir de células cultivadas em meio de Fava-Netto. O Trizol (solução monofásica de fenol e isocianato de guanidina) é um reagente para a extração de RNA total que, durante a homogeneização ou lise, mantém a integridade do RNA, enquanto as células são rompidas e os componentes dissolvidos. A adição de clorofórmio seguida da centrifugação permite a separação da solução em fase aquosa e orgânica. O RNA permanece exclusivamente na fase aquosa. Em seguida, após a transferência da fase aquosa, o RNA foi recuperado por precipitação com isopropanol. A qualidade do RNA extraído foi checada em gel de agarose 1,5%. A dosagem do RNA e a verificação da pureza foram feitas em espectrofotômetro (leituras em 260nm, 280nm) e a relação 260/280 forneceu a pureza (ideal entre 1,8 e 2,0). Após a extração do RNA, este foi utilizado para a síntese de cDNA.

3.3.3. Síntese de primeira fita de cDNA

A reação de primeira fita de cDNA foi feita através do kit Smart (Clontech Laboratories, Palo Alto, CA, USA), neste processo foi utilizado 1 ug de RNA total de *Pb18*. A essa quantidade de RNA total foi adicionado 2 uL de iniciador dT₁₂₋₁₈ (10 pmol/L), sendo a mistura incubada a 72 °C por 2 minutos. Em seguida foram adicionados os seguintes reagentes: 2 uL de primer CDS (10 pmol/L), 4 uL tampão da transcriptase reversa 5X; 2 uL DTT 100mM; 2 uL dNTPs 10mM cada; 2 uL de RNA-out; 1,2 uL de MgCl₂; 200U da enzima transcriptase reversa (SuperScript II, Invitrogen), após a adição de cada um desses reagentes, aqueceu-se a 42 °C por 1,5h. Após esta incubação, adicionou-se 80 uL de TE (10mM Tris/1mM EDTA) e a mistura foi aquecida a 72°C durante 7 minutos.

3.3.4. Construção de oligonucleotídeos e amplificação dos genes

A sequência nucleotídica da ORF que codifica a proteína CS de *P. lutzii* foi amplificada através da reação de polimerase em cadeia (PCR). A estratégia resumiu-se em utilizar dois iniciadores (oligonucleotídeos iniciadores) complementares às extremidades 3' e 5' dos genes de interesse os quais hibridizavam com esta região e serviram como ponto de partida para a polimerização pela *Taq* DNA polymerase. No iniciador sense foi adicionado o sítio de restrição para a enzima *NcoI* e no antisense o sítio de restrição para a enzima *SacI* que geram extremidades coesivas (corte assimétrico) diferentes e estão presentes no sítio múltiplo de clonagem dos plasmídeos utilizados neste estudo. Para isto foi feita uma análise prévia a fim de escolher as enzimas que gerariam extremidades compatíveis para a ligação, atentando para que o gene envolvido não apresentasse nenhum sítio interno para as enzimas escolhidas, para isto utilizou-se o programa CLC Sequence Viewer 6.71. As características dos iniciadores estão detalhadas na tabela 3.

Tabela 3. Iniciadores utilizados na amplificação por PCR.

Iniciadores	Sequências
CS protein	Sense: CCATGGATGCATATCTCAGCCAT Anti-Sense: GAGCTCTTACAGGAAAGCAGCGAAGA

As amplificações foram realizadas em termociclador utilizando-se um volume final de 50 uL constituído de 1 uL do cDNA, 10mM de cada primer, 1,25 U Taq DNA *polymerase* (Fermentas).

As condições de amplificação compreenderam uma desnaturação inicial de 94°C por 5 min, seguida de 25 ciclos constituídos de desnaturação a 94°C por 30s, hibridização (*annealing*) através de *touchdown* PCR variando de 65°C a 55°C por 45s por 10 ciclos, diminuindo 1°C a cada ciclo, seguidos de 25 ciclos a 55°C por 45s e extensão dos primers a 72°C por 2 min. Ao final da reação a mesma foi interrompida por resfriamento a 4°C. Os produtos das amplificações foram analisados aplicando-se uma mistura de 5 uL da amostra e 5 uL de GelRed em gel de agarose 0,8% em tampão 1X TBE e em seguida foram submetidos a uma tensão de 80V por 2h. Em seguida foram visualizados sob luz UV. Uma vez confirmado o tamanho correto do fragmento de DNA obtido, o produto de PCR restante foi purificado utilizando-se o QIAquick PCR Purification KIT (QIAGEN), de acordo com as instruções do fabricante e em seguida foi quantificado e a pureza avaliada.

3.3.5. Clonagem intermediária em vetor pGEM-T easy do cDNA codificante da proteína CSP

Para uma maior eficiência de clonagem, foi realizada uma pré-clonagem em um vetor plasmidial, pGEM-T easy (Promega) (Figura 1) que é um kit que contém um plasmídeo linear que possui uma deoxitimidina (T) em cada uma das extremidades 3' que permite a inserção direta de produtos de PCR pela enzima T4 DNA ligase. A circularização do DNA pela inserção do produto de PCR nada mais é que a formação do plasmídeo recombinante a ser introduzido posteriormente dentro da bactéria *E. coli* visando a propagação plasmidial.

A sequência codificante do gene de interesse amplificada foi inserida no vetor pGEM-T-easy através de uma reação de ligação. A ligação foi preparada empregando-se um volume final de 10 uL constituídos de 1 uL do produto de PCR a 33 ng uL⁻¹, 1 uL da enzima T4 DNA ligase (Fermentas, 6U), 5 uL do tampão de ligação para a enzima T4 DNA ligase (2X) e 1 uL da solução contendo o vetor pGEM-T-easy a 50 ng uL⁻¹. Água DEPC foi utilizada para completar o volume total. Esta reação foi mantida a

16°C por 24 horas. A ligação foi utilizada na transformação por choque térmico de células ultracompetentes de *E.coli* DH10B. O plasmídeo obtido foi denominado pGEM-PICSp.

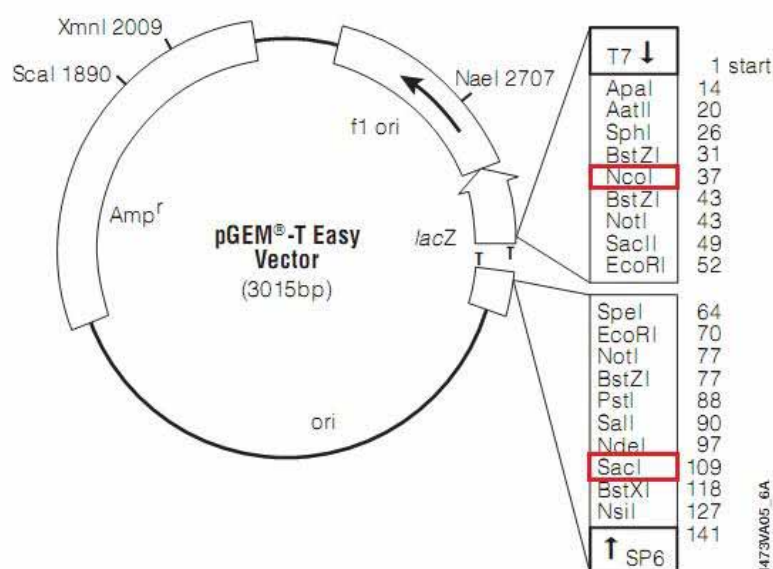


Figura 1. Representação esquemática do vetor pGEM-T Easy (Promega) circularizado utilizado na etapa de clonagem do inserto do gene de interesse, CS protein. Em destaque as enzimas de restrição utilizadas.

3.3.6. Transformação da bactéria *E. coli* DH10B com os plasmídeos recombinantes pGEM-T easy

A transformação foi realizada segundo protocolo de Avi Levy (1991). A suspensão de células ultracompetentes de *E. coli* DH10B foram mantidas pelo menos 10 minutos em banho de gelo. A cada 50 uL de células DH10B foram adicionados 10 uL da reação de ligação junto com 40 uL de Transfo Buffer (KCM 10X, PEG 10%, água). A mistura foi homogeneizada gentilmente e mantidas em gelo por 30 min. Em seguida, esta mistura foi incubada a temperatura ambiente por 10 min e subsequente adicionou-se 1 mL de meio LB e a mistura foi incubada a 37°C, sob agitação de 250 rpm por 50 min, após a incubação as células transformadas foram plaqueadas em placas de Petri contendo 20 mL de meio seletivo Luria-Bertani sólido suplementado com ampicilina (100 ug/mL) e incubadas overnight a 37°C em estufa. Após o período de incubação, algumas colônias resistentes (possíveis clones positivos) foram selecionadas a fim de realizar a extração de seus DNAs plasmidiais e análise preliminar através de

eletroforese em gel de agarose. A seleção definitiva dos recombinantes foi realizada através de reação de sequenciamento de DNA no sequenciador automático ABI Prism 3130 (Applied Biosystem), seguindo o protocolo do fabricante.

3.3.7. Construção do plasmídeo pET-PLCSp

O vetor de expressão escolhido foi o pET32a (Novagen) (figura 2) que possui várias regiões para a síntese de cauda de poli-histidina (His-Tag), portanto o inserto referente à proteína em questão será clonado neste vetor de forma a sintetizar proteínas recombinantes fusionadas com His-Tag. Através de cromatografia por afinidade, somente a proteína recombinante com His-Tag ligam-se à coluna de níquel, sendo separada (purificada) das demais proteínas da bactéria usada na expressão. Para a etapa de subclonagem no vetor de expressão pET32a, as sequências foram isoladas do vetor pGEM por tratamento com enzimas de restrição *NcoI* e *SacI* (New England) primeiramente foram realizadas as restrições dos plasmídeos recombinantes selecionados na etapa anterior. O plasmídeo pET32a também foi submetido ao tratamento com as mesmas enzimas de restrição, para assegurar que ambos, inserto e vetor, tenham extremidades coesivas para a perfeita ligação entre eles.

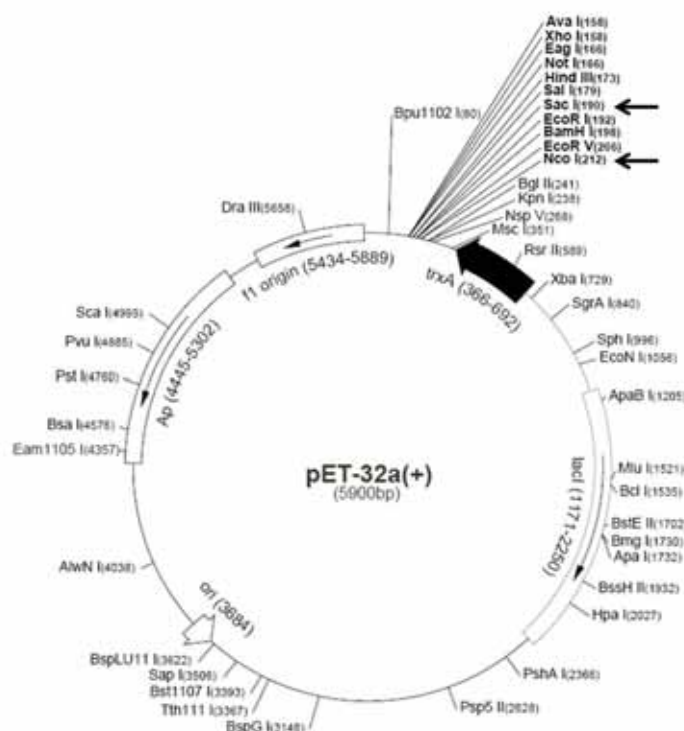


Figura 2. Representação esquemática do vetor pET32a (Novagen) circularizado utilizado na etapa de clonagem para expressão da proteína de interesse, em destaque as enzimas de restrição utilizadas.

A digestão do plasmídeo recombinante pGEM-PICSp foi feita em uma única reação, empregando-se 1 µg do DNA plasmidial, 1 unidade de cada enzima, *NcoI* e *SacI*, tampão de enzima CutSmart (1X). Esta reação foi mantida a 37°C por 1 hora. A reação foi inativada por 20 minutos a 65°C. Os produtos da digestão foram analisados em gel de agarose 0,8% e visualizados sob luz UV. Para o isolamento do fragmento de DNA de gel de agarose, foi utilizado o QIAquick PCR Purification kit (Qiagen). A reação de ligação do inserto ao vetor foi realizada juntando-se inserto digerido e vetor digerido em uma proporção equimolar de 20:1 respectivamente e a enzima T4 DNA ligase seguindo as instruções do fabricante. Esta reação foi mantida a 16°C, por 12 horas. Após o período de reação a ligação foi transformada em bactérias *E. coli* BL21 pLYS eletrocompetentes com o auxílio de eletroporador (Eppendorf, Alemanha). Após o pulso a cubeta lavada com 1mL de meio LB e a suspensão foi incubada a 37°C, sob agitação por uma hora e então plaqueada em LB sólido contendo ampicilina a 50µg/mL e mantidas a 37°C por 16 horas. Conforme descrito no item 3.6, as colônias que resistentes à ampicilina foram avaliadas quanto à presença do plasmídeo recombinante pET-PICSp.

3.3.6. Indução da expressão heteróloga da proteína recombinante CSP de *P. lutzii*

Bactérias transformadas com o plasmídeo recombinante pET-PbCSp foram cultivadas à 37°C em meio LB (Luria-Bertani), suplementado com ampicilina (50 µg/mL), até atingir densidade óptica de 0,6 em 600nm. A síntese das proteínas recombinantes foi então primariamente realizada em experimento piloto pela adição de IPTG (*isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside*), nas concentrações de 0,4, 0,6 e 1,0 mM, na cultura bacteriana, sendo então a cultura incubada novamente nas condições indicadas acima pelo período de 1, 3 e 5 horas e então a expressão da proteína recombinante avaliada por gel SDS-Page. Após a expressão piloto foi determinada que a melhor condição de expressão foi de 5 horas com a adição 0.6 mM de IPTG, sendo estas condições utilizadas para a macroindução que foi realizada em 1 litro de crescimento de *E. coli*.

3.3.7. Purificação da proteína recombinante CSP em coluna de afinidade

Para a purificação, após o período de macroindução, as células foram centrifugadas, lisadas (50mM fosfato de sódio, 20mM de imidazol, 200mM de cloreto de sódio, 1mM DTT, 1xPLAC, 1mM PMSF), sonicadas e novamente centrifugadas. O sobrenadante deste processo de lise foi utilizado para a purificação através de cromatografia de afinidade.

Para o processo de purificação utilizou-se coluna de níquel HisTrap FF crude-1mL no AKTA FPLC (*Fast protein liquid chromatography*) (GE Healthcare) com os seguintes tampões: lavagem (50mM fosfato de sódio, 20mM Imidazol, 300mM cloreto de sódio), eluição (50mM fosfato de sódio, 250mM Imidazol, 300mM cloreto de sódio) e as frações foram recolhidas e analisadas por SDS-PAGE. Além disso, as amostras foram filtradas e concentradas em filtros centricon (Millipore).

3.3.8. Ensaio de inibição da adesão de *P. lutzii* à pneumócitos A549 e aos componentes da MEC (laminina, fibronectina e colágenos tipo I e IV) pela proteína recombinante CSP através de ELISA de inibição (ELISA-inib)

Placas de 96 orifícios foram inoculadas com pneumócitos A549 e após a formação da monocamada, as células foram lavadas três vezes com PBS estéril seguido de fixação com paraformaldeído 4% por 30 minutos a temperatura ambiente. Para o ensaio com os componentes da MEC, placas de 96 orifícios foram sensibilizadas com 10 ug/mL dos diferentes componentes da MEC overnight a 4°C e 1 hora à temperatura ambiente. Após este período, as placas foram lavadas com PBS/Tween-20, 0,05% (PBS-T) e bloqueadas com soro fetal bovino 10% (BSA) por 1 hora a temperatura ambiente e então mais um ciclo de lavagens foi realizado. À monocamada de células e aos componentes da MEC foram então adicionados 25 ug/mL da proteína recombinante CSP e incubadas à 37°C por uma hora. Após esse tratamento, as células e os componentes da MEC foram lavados 3 vezes com PBS-T e então foram inoculados com *P. lutzii* (5×10^6 cels/mL) (Pb01) por 15 horas a 37°C, para o ensaio com os componentes da MEC estes também foram inoculados com *P. brasiliensis* (5×10^6 céls/mL). Após a incubação, as placas foram lavadas novamente com PBS-T, e então se adicionou o anticorpo anti-cell free de *Paracoccidioides* no título de 1:100 em PBS-T e BSA 0,5% por 1 hora a 37°C. Mais um ciclo de lavagens foi realizado e então foi adicionado o anticorpo secundário (Anti-rabbit IgG-HRP) 1:3000 em PBS-T e BSA 0,5% por 1 hora a 37°C. Novamente, lavaram-se as placas com PBS-T. O desenvolvimento da reação colorimétrica foi observado pela adição da solução reveladora (fosfato de sódio/ácido cítrico/ortofenilenodiamino/água oxigenada) por 10 minutos, seguido pela adição de ácido clorídrico 3N. Em seguida foi determinada a absorbância a 490nm e esses valores foram convertidos em % de inibição.

3.4. Caracterização e Identificação de adesinas nas diferentes espécies filogenéticas de *Paracoccidioides* por *Phage Display*

Para a implantação e padronização da técnica BRASIL primeiro foi realizado treinamento no Laboratório de Biologia Vascular da Universidade de São Paulo (campus Cidade Universitária) junto com a pós-doutoranda Dra. Jussara Michaloski sob

a supervisão do Prof. Dr. Ricardo José Giordano. Após o treinamento a técnica foi implantada no laboratório de Micologia Clínica do Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara - UNESP.

3.4.1. Construção de bibliotecas de fagos apresentando peptídeos em sua superfície

As bibliotecas de fagos foram produzidas utilizando-se o vetor fUSE55 e a metodologia desenvolvida por George Smith (Smith e Scott, 1993), com modificações para melhor eficiência e maior número de clones finais (Koivunen, Gay e Ruoslahti, 1993; Koivunen, Arap, *et al.*, 1999). As bibliotecas utilizadas neste estudo foram produzidas e cedidas pelo Prof. Dr. Ricardo José Giordano do Laboratório de Biologia Vascular da Universidade de São Paulo, Departamento de Bioquímica, Cidade Universitária, São Paulo, SP. O vetor fUSE55 contém dois sítios de restrição BglI localizados no início do gene pIII que codifica a proteína III de capsídeo do bacteriófago (fago). A inserção dos sítios BglI altera a fase de leitura do gene III e não traduz uma proteína pIII funcional. Como a proteína pIII é necessária para a infecção do fago na bactéria, bactérias carregando este vetor não produzem fagos infectantes, embora como plasmídeo fUSE55 possa ser propagado devido a presença do gene de resistência a tetraciclina. Os dois sítios de BglI no gene pIII do fUSE55 estão espaçados por 14 nucleotídeos chamados de “stuffer” (Figura 3). A substituição da sequência “stuffer” por um inserto de DNA, sintetizado ou natural, uniformemente divisível por 3 e que não tenha stop códons em fase, restaura a fase de leitura do gene III e, portanto, restaura a capacidade infectiva do fago. Cinco cópias do peptídeo codificado pelo inserto são apresentadas na extremidade do fago em fusão com a proteína pIII do capsídeo, como mostrado na figura 3, passo 4.

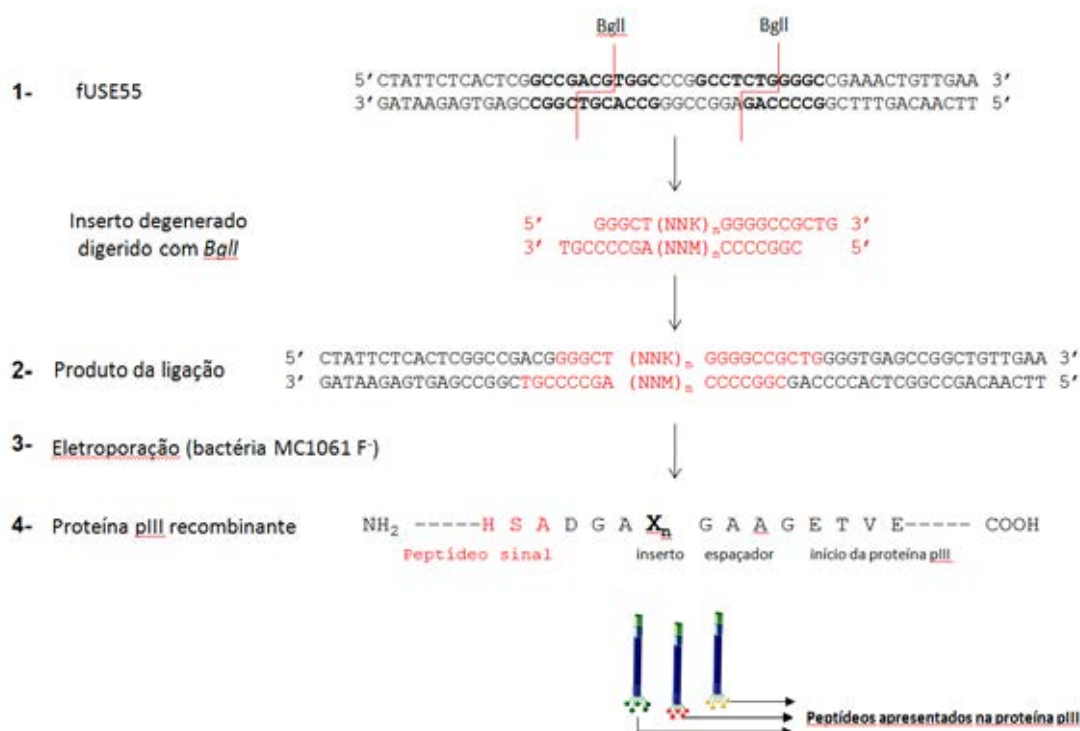


Figura 3. Esquema indicando os passos na construção da biblioteca de fagos. 1) oligonucleotídeos sintéticos (inserto em vermelho) contendo o códon degenerado (NNK)_n (N= qualquer nucleotídeo; K= nucleotídeos T ou G com a finalidade de reduzir o número de possíveis códons de parada e n = número de aminoácidos desejado), digeridos com a enzima de restrição *BglI* foram inseridos na região que codifica o gene da proteína pIII no vetor fUSE5 previamente digerido com *BglI*. O produto da reação de ligação (2) foi transformado na bactéria eletrocompetente *E. coli* cepa MC1061 F- (3) e os fagos produzidos, expressando proteína recombinante pIII (4), foram recuperados por precipitação com PEG/NaCl (Giordano *et al.*, 2001).

3.4.2. Bibliotecas de *Phage Display*

Oligonucleotídeos sintéticos contendo o códon degenerado (NNK)_n (n = número de aminoácidos desejado), flanqueados por sítios de restrição *BglI* foram obtidos comercialmente (Invitrogen). O inserto foi convertido em DNA dupla fita com Klenow DNA polimerase, digerido com *BglI*, ligado com T4 DNA ligase ao vetor fUSE5 previamente tratado com *SfiI*, e transformado por eletroporação (entre 100 e 200 eletroporações individuais por biblioteca) em bactéria *E. coli* cepa MC1061. As bibliotecas construídas foram do tipo X6 e CX8C (X representa qualquer aminoácido e C=cisteínas que permite criar bibliotecas cíclicas). O uso de bibliotecas lineares e cíclicas, e de diferentes tamanhos, foi empregado para aumentar a diversidade de peptídeos disponíveis para os estudos. As bibliotecas X6 e CX8C foram cultivadas por infecção bacteriana, crescimento em meio Luria-Bertani suplementado com kanamicina (100 µg/ml) e tetraciclina (20 µg/ml) e obtidos do sobrenadante da cultura pelo método da precipitação com PEG/NaCl (Smith e Scott, 1993; Giordano *et al.*, 2001), sendo

então titulados por diluição seriada em meio LB, infecção em *E.coli* K91 kan, e semeados em LB-ágar contendo tetraciclina (20 µg/mL) e kanamicina (100 µg/mL). O número de unidades transdutoras de bactéria (TU) foi calculado contando-se as colônias obtidas.

3.4.3. **BRASIL** - Biopanning and rapid analysis of selective interactive ligands

Para a seleção de peptídeos ligantes de *P. brasiliensis* Pb18 (S1) foi utilizada a técnica *BRASIL* (Giordano *et al.*, 2001). Esta técnica consiste na seleção de fagos ligantes a células vivas e utiliza um sistema bifásico para separar células e fagos numa única etapa de centrifugação (Figura 4).

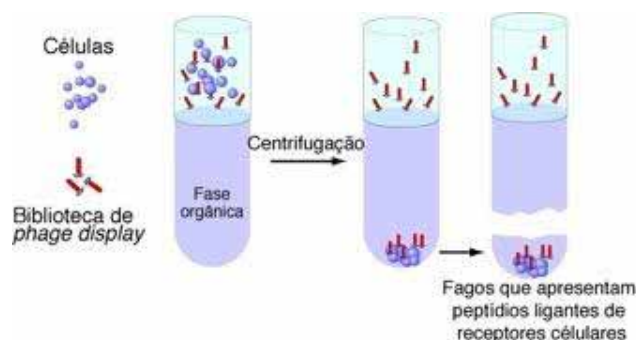


Figura 4. Esquema representativo da técnica BRASIL. A seleção de fagos ligantes da superfície celular de interesse é realizada em apenas uma etapa de centrifugação o que torna o processo mais rápido e eficiente do que os métodos convencionais conhecidos de *biopanning*. Imagem de Ricardo José Giordano disponível no site <http://www2.iq.usp.br/docente/giordano/tecnologia.html>.

A aplicação da técnica *BRASIL* para *P. brasiliensis* foi feita em quatro etapas: *Pré-clearing* e 1º, 2º e 3º rodada.

3.4.3.1. *Pré-clearing* com *Saccharomyces cerevisiae*

Antes da primeira *rodada* foi realizado o *pré-clearing* com a levedura *S. cerevisiae*, no intuito de retirar-se da nossa biblioteca de fagos ligantes de receptores comuns à cepa não patogênica e à cepa patogênica de *P. brasiliensis* que são irrelevantes para a patogênese do fungo já que são compartilhados por cepas patogênicas e não patogênicas.

Para tanto, 10^6 da cultura de *S. cerevisiae*, que cresceu em meio YEPD overnight (37°C/250 rpm), foi incubado junto às bibliotecas (10 uL bibliotecas (10^8 fagos) + 90 uL 1%BSA em PBS) por 3 horas em gelo sendo levemente agitado periodicamente. Após a incubação, as bibliotecas incubadas com a levedura foram transferidos para o tubo *BRASIL* contendo 200 uL de óleo *BRASIL* (dibutil ftalato: ciclohexano (9:1)) e então centrifugados a 10.000 xg por 10 minutos à temperatura ambiente. Após a centrifugação o sobrenadante, formado por fagos não ligantes de *S. cerevisiae*, foi então recuperado e o pellet, formado por células de *S. cerevisiae* carregando fagos ligantes de sua superfície, desprezado sendo este sobrenadante utilizado para os *pannings* com *P. brasiliensis*.

3.4.3.2. 1ª rodada *BRASIL*

O sobrenadante recuperado do *pré-clearing* foi então incubado com um inoculo de 10^6 células de *P. brasiliensis* Pb18 (S1). O preparo do inoculo de *P. brasiliensis* foi realizado da seguinte forma: Quatro dias antes do experimento o fungo sub-cultivado em meio Fava-Netto sólido e incubado a 37°C. Após os dias de crescimento, o fungo foi transferido do meio para um tubo do tipo Falcon estéril contendo PBS e então, como *P. brasiliensis* apresenta o comportamento de formar grumos, o crescimento foi passado por seringa com agulha estéril para desfazer estes grumos. Feito isso, foi acertada a DO para 0.5 em 550 nm onde encontramos 10^6 células de *P. brasiliensis*. Acertada a DO, o inóculo foi lavado por três vezes em PBS estéril e mais uma vez em BSA 1% em PBS, e então incubadas com as bibliotecas de fagos X6 e CX8C.

A incubação das bibliotecas de fagos com *P. brasiliensis* foi realizada em gelo por 3 horas, sendo agitado periodicamente. Após o período de incubação, as bibliotecas incubadas com *P. brasiliensis*, foram transferidas para o tubo *BRASIL* contendo 200 uL de óleo *BRASIL* (dibutil ftalato: ciclohexano (9:1)) e então centrifugados à 10.000 xg por 10 minutos à temperatura ambiente.

Após a centrifugação, o pellet então foi recuperado, em um tubo do tipo Falcon de 50 mL, cortando o fundo do tubo *BRASIL* e ressuspendido em 200 uL de meio LB acrescido de Kanamicina (100 ug/mL) e Tetraciclina (20 ug/mL) e então a este tubo foi adicionado 600 uL da cultura da bactéria K91 que cresceu em meio LB/Kan (100 ug/mL) até atingir a DO necessária (entre 1,5 e 2,0 a 600 nm) e incubado por 30

minutos a temperatura ambiente. Após esta incubação foi então adicionado 20 mL de meio LB/Kan/Tet (100ug/mL; 20ug/mL respectivamente) e incubados a 37°C sob agitação (250 rpm) por 20 horas.

3.4.3.3. Precipitação dos fagos ligantes de *P. brasiliensis* do 1º rodada da técnica **BRASIL**

Após as 20 horas de incubação, as bibliotecas foram precipitadas com PEG/NaCl sendo que ao final, ressuspendeu-se as bibliotecas em 50 uL de PBS estéril. A primeira *rodada* não foi titulado.

3.4.3.4. 2º rodada da técnica **BRASIL**

A 2º *rodada* foi realizada da mesma forma que o primeiro, porém sem o *pre-clearing* e utilizando o produto da precipitação do 1º *rodada* para o *biopanning*. Neste *rodada*, ao final, antes de colocar a incubação de 20 horas, foi coletada uma alíquota que foi diluída seriadamente e então plaqueadas e incubadas *overnight* a 37°C conforme esquema abaixo (Figura 5). Após 20 horas de crescimento, novamente foi realizada a precipitação com PEG/NaCl para a obtenção dos fagos ligantes de *P. brasiliensis*.

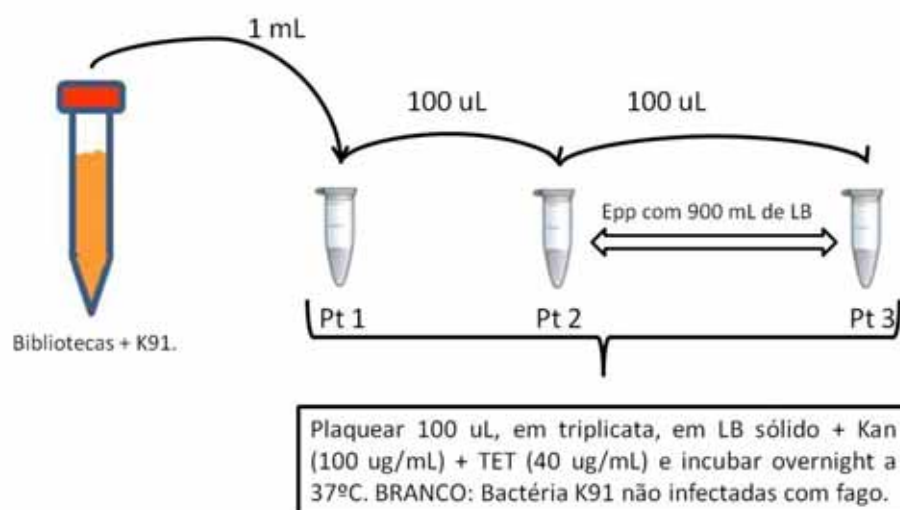


Figura 5. Esquema do plaqueamento para a verificação do número de TU's após a 2º rodada. Pt 1, Pt 2 e Pt 3 representam diferentes diluições da cultura da bactéria K91 infectada com os fagos selecionados durante o *biopanning*.

O plaqueamento foi então realizado seguindo-se contagem obtendo-se assim o número de unidades transdutoras (TU's) refletindo assim a quantidade de fagos que se ligou a *P. brasiliensis*. Após essa contagem, 96 colônias de cada biblioteca foram selecionadas aleatoriamente e foram armazenadas em 100 uL de PBS com glicerol e congeladas para posterior sequenciamento dos peptídeos ligantes de *P. brasiliensis*.

3.3.4.5. 3^o rodada da técnica BRASIL

A 3^o rodada foi realizada da mesma forma que o segundo sendo coletada uma alíquota que foi diluída seriadamente e então plaqueadas e incubadas overnight a 37°C conforme esquema apresentado na segunda rodada (figura 26). Após essa contagem, como no 2^o rodada, 96 colônias de cada biblioteca foram selecionadas aleatoriamente e foram armazenadas em 100 uL de PBS com glicerol e congeladas para posterior sequenciamento dos peptídeos ligantes de *P. brasiliensis*. Da mesma forma que nos 1^o e 2^o rodada a cultura de 20 horas foi precipitada com PEG/NaCl e assim obtidos os fagos ligantes de *P. brasiliensis*.

3.4.4. Titulações e infectividade da bactéria K91

Após todas as rodadas da técnica BRASIL, a infectividade da bactéria K91 foi testada utilizando-se para isso o fago Fd selvagem (sem inserto de peptídeo), controles negativos nos ensaios. A infectividade é testada através da titulação deste fago utilizando-se a bactéria empregada durante as rodadas do ensaio BRASIL. Para isso, diluições em séries do fago Fd foram realizadas e então utilizadas na infecção da bactéria K91, que foram então plaqueadas em meio LB/Kan/Tet e incubadas à 37°C overnight. Após o crescimento das colônias, estas foram contadas e a quantidade de TUs determinadas, sendo que a titulação esperada deve ser entre 10^8 - 10^9 TUs, indicando uma boa infectividade da bactéria K91. Um controle negativo, não infectado com fago foi sempre realizado, plaqueando-se apenas a bactéria K91 em LB/Kan/Tet, que sem o fago, possui a resistência à tetraciclina, não consegue crescer neste meio, garantindo que a cultura de K91 está livre de contaminação de fagos.

A titulação das bibliotecas X6 e CX8C foram também realizadas antes do início dos experimentos e sempre após cada precipitação de cada *rodada*, para garantir que durante os experimentos utilizássemos sempre a mesma quantidade de fagos (10^9).

3.4.5. Seleção de clones, PCR e sequenciamento para a determinação do peptídeo apresentado pelo fago

Ao final dos *biopanning*, os fagos obtidos foram semeados e colônias individuais selecionadas e ressuspendidas em 100 μ L de PBS/Glicerol conforme detalhado nos itens 3.2.5. e 3.2.6. A região do DNA codificante para o inserto de peptídeo foi amplificada a partir de 2,0 μ L desta suspensão em reação de PCR (conforme condições na tabela 1), utilizando-se os oligonucleotídeos específicos (Phage_forward 5'-CATGCC CGGGTA CCTTTC TATTCT C-3' e Phage_reverse 5'-CCCTCATAGTTAGCGTAACGATCT-3'), em termociclador por 35 ciclos (desnaturação (94°C) 15 segundos; anelamento (60°C) 30 segundos, extensão (72°C) 1 minuto). Os produtos de PCR foram verificados em gel de agarose 2% corado com GelRed e então sequenciados no aparelho ABI Prism 3130 DNA Analyzer (Applied Biosystems) utilizando o kit BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) para identificação do peptídeo apresentado por cada fago selecionado.

3.4.6. Caracterização dos peptídeos identificados e seus receptores

Os peptídeos identificados foram então priorizados para: a) identificar o seu respectivo receptor; b) para validar a interação do peptídeo com os receptores identificados. Inicialmente, os peptídeos isolados foram analisados por métodos de bioinformática, utilizando software disponíveis (ClustalW, Blast) em busca de motivos de aminoácidos presentes em mais de um dos peptídeos isolados. Os motivos identificados foram então utilizados para procurar em bancos de dados (Genbank, Eml), peptídeos com similaridade significativa com proteínas conhecidas (similaridade com a estrutura primária).

3.4.7. Ensaios de ligação

Para validar a interação peptídeo-receptor, foram realizados ensaios de ligação (Giordano *et al.*, 2001). Células de *P. brasiliensis* Pb18 (S1) foram novamente incubadas com 10^9 TU dos fagos a serem testados ou de fagos controle (Fd-tet, sem inserto de peptídeo), ambos em 1% BSA em PBS conforme metodologia *BRASIL* descrita anteriormente. Após 2 horas de incubação no gelo as bibliotecas incubadas com *P. brasiliensis*, foram transferidas para o tubo *BRASIL* contendo 200 uL de óleo *BRASIL* (dibutil ftalato: ciclohexano (9:1)) e então centrifugados à 10.000 xg por 10 minutos à temperatura ambiente, o *pellet* foi então recuperado em um tubo do tipo Falcon e então recuperados por infecção com *E.coli* K91 kan que foi cultivada em meio LB/Kan (100 ug/mL até atingir a DO necessária (entre 1,5 e 2,0 a 600 nm). Diluições em série foram semeadas em placas contendo meio LB/Kan/Tet para quantificação do número de fagos ligados a cada receptor.

Este experimento foi realizado também com *S. cerevisiae* para utilizar como controle, já que esta levedura foi utilizada no pré-clearing. Além disso, o experimento também foi realizado com mais dois isolados pertencentes a diferentes espécies filogenéticas do gênero *Paracoccidioides*, Pb02 (PS2) e Pb01 (Pb01-like). Como controle também foi realizado o ensaio de ligação utilizando o fago Fd.

3.4.8. Ensaio de inibição da adesão de *Paracoccidioides* aos componentes da matriz extracelular e pneumócitos A549 pelos peptídeos selecionados através de *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay* (ELISA)

Para verificar a capacidade dos peptídeos selecionados de inibir a adesão de *P. brasiliensis* aos componentes da MEC (laminina, fibronectina, colágeno tipo I e colágeno tipo IV) e à pneumócitos foi realizado o ensaio de inibição desta interação utilizando os quatro peptídeos selecionados que tiveram suas sequências sintetizadas (Chinese Peptides Company, China).

3.4.8.1. Ensaio de inibição da adesão de *Paracoccidioides* aos componentes da matriz extracelular através de ELISA de inibição (ELISA-inib)

Placas de 96 orifícios foram inoculadas com pneumócitos A549 e após a formação da monocamada, as células foram lavadas três vezes com PBS estéril seguido de fixação com paraformaldeído 4% por 30 minutos a temperatura ambiente. Para o ensaio com os componentes da MEC, placas de 96 orifícios foram sensibilizadas com 50 ug/mL dos diferentes componentes da MEC overnight a 4°C e 1 hora à temperatura ambiente. Após este período, as placas foram lavadas com PBS/Tween-20, 0,05% (PBS-T) e bloqueadas com soro albumina bovina 1% (BSA) por 2 horas a 37°C e então mais um ciclo de lavagens foi realizado. Os diferentes inóculos de *Paracoccidioides* (5×10^6 cels/mL) (Pb18, Pb01 e Pb02) foram incubados com 200 ug/mL de cada peptídeo estudado a 37°C sob agitação (250 rpm) por 1 hora. Após este período, estes inóculos foram colocados em contato com a cultura de pneumócitos A549 e com os diferentes componentes da MEC e incubados por 15 horas a 37°C. Após a incubação, as placas foram lavadas novamente com PBS-T, e então se adicionou o anticorpo anti-cell free de *Paracoccidioides* no título de 1:100 em PBS-T e BSA 0,5% por 1 hora a 37°C. Mais um ciclo de lavagens foi realizado e então foi adicionado o anticorpo secundário (Anti-rabbit IgG-HRP) 1:2000 em PBS-T e BSA 0,5% por 1 hora a 37°C. Novamente, lavaram-se as placas com PBS-T. O desenvolvimento da reação colorimétrica foi observado pela adição da solução reveladora (fosfato de sódio/ácido cítrico/ortofenilenodiamino/água oxigenada) por 10 minutos, seguido pela adição de ácido clorídrico 1M. Em seguida foi determinada a absorbância a 490nm e esses valores foram convertidos em % de inibição e analisados comparativamente utilizando o teste ANOVA, através do software Origin Lab 7.5.

3.4.9. Determinação da atividade antifúngica dos peptídeos selecionados

Para determinar a atividade antifúngica dos peptídeos selecionados, a concentração inibitória mínima (CIM) de cada peptídeo foi determinada seguindo o documento M27-A2 (CLSI, 2002) com modificações sugeridas por De Paula e Silva et al. (2013), sendo que as concentrações de peptídeos testadas foram de 120 ug a 0,1 ug

por poço (1,2 ug/uL a 0,001 ug/uL). Como controle foi utilizado o fármaco Anfotericina B (Sigma-Aldrich). Estes ensaios foram realizados para os isolados Pb18, Pb01, Pb02.

3.4.10. Determinação da atividade citotóxica dos peptídeos selecionados por teste de sensibilidade do MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)

A atividade citotóxica dos peptídeos selecionados foi determinada usando as linhagens celulares A549 e HepG2, sendo que as concentrações dos peptídeos para esses testes foram de 100 ug até 0,09 ug por poço (1,2 ug/uL a 0,0009 ug/uL). As soluções foram preparadas a partir de uma solução estoque que foi diluída em meios específicos para as linhagens celulares utilizadas em placas previamente preparadas com as células a serem utilizadas. O meio de cultura foi removido e adicionado 100 uL de cada diluição de cada peptídeo por poço. As placas foram então incubadas a 37°C, 5% CO₂ no escuro por 24 horas. Após esse período as soluções de peptídeos foram removidas e 10uL de solução de MTT foi adicionada a cada poço e então as placas foram incubadas novamente a 37°C por 4 horas, como descrito por Denizot et al. (1986) e Ferrari et al. (1990). Depois da incubação foi observada a formação de um precipitado escuro onde as células estavam vivas. A solução de MTT foi então removida e 100 uL de isopropanol foi adicionado para diluir o precipitado para realizar a leitura espectrofotométrica no espectrofotômetro BioRad 3500 Microplate reading. Como controle positivo do teste foi usado o Peróxido de Hidrogênio. Como controle negativo foram utilizadas células não tratadas com os peptídeos, e os resultados da leitura deste controle foi considerado com 100% de viabilidade. A porcentagem de células viáveis foi calculada usando a seguinte fórmula:

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

3.4.11. Ensaios preliminares *in vivo* usando *Galleria mellonella* como modelo

As larvas de *Galleria mellonella* foram provenientes de criação realizada no Núcleo de Proteômica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – FCFAR UNESP sendo a criação realizada de acordo com Ramarao *et al.* (2012) sendo que as

larvas são alimentadas com cera de abelha e pólen e mantidas a 25°C até atingir o peso necessário para os experimentos.

3.4.11.1. Toxicidade dos peptídeos selecionados em *Galleria mellonella*

A toxicidade dos peptídeos selecionados foi avaliada nas seguintes concentrações: 2, 8, 50, 100, 200 e 400 ug/larva que correspondem a 0.2, 0.4, 0.8, 10.0, 20.0 e 40.0 ug/uL de cada peptídeo separadamente. Para este ensaio, grupos de 16 larvas com peso entre 0,1 e 0,2 g, foram tratadas com 10 uL dos peptídeos nas diferentes concentrações testadas e a sobrevivência foi observada por 7 dias após o tratamento. Como grupo controle, um grupo de larvas foi tratado com PBS.

3.4.11.2. Capacidade dos peptídeos selecionados de evitar a infecção por *Paracoccidioides spp.*

Galleria mellonella em estágio larvário selecionadas com peso entre 0,1 - 0,2 g foram separadas em grupos de 16 larvas e incubadas a 37°C no escuro na noite anterior aos experimentos. Antes dos tratamentos, foi realizada a assepsia das pró-patas com etanol a 70%. Para avaliar a capacidade dos peptídeos em evitar a infecção por *Paracoccidioides spp.* (isolado 01 de *P. lutzii*), os grupos de larvas foram tratadas com 100 ug dos peptídeos separadamente por 3 horas. Após esse período as larvas foram então infectadas com um inóculo de 5×10^6 células do isolado de *Paracoccidioides spp.* e então a sobrevivência das larvas foi observada durante uma semana. O tratamento com os peptídeos e as inoculações dos fungos foram realizadas com auxílio de seringas Hamilton (Hamilton, EUA) de 10 uL. A morte das larvas foi avaliada por inspeção visual da falta de movimento após tocá-las com uma pinça. Como controle, um grupo de larvas tratadas com PBS e infectadas com os fungos foi utilizado, além de controle apenas tratado com PBS sem serem infectadas com os fungos.

3.4.11.3. Determinação da densidade hemocitária

Grupos de dez larvas foram inoculados com 100 ug de cada peptídeo e incubados a 37°C durante 3 horas. Após a incubação, a hemolinfa de cada larva foi

coletada separadamente em tubos Eppendorf e diluída 1:10 em PBS. As células foram então contadas utilizando hemocítômetro. Grupo tratado apenas com PBS foi utilizado como controle.

3.5. Construção da biblioteca de *phage display* de *Paracoccidioides*

A tentativa de construção da biblioteca de fagos foi realizada durante doutorado-sanduíche em parceria com a Dra. Jenifer Coburn do Medical College of Wisconsin.

O sistema de *phage display* utilizado neste estudo foi baseado em fusões à proteína pIII codificada pelo gene III. O vetor utilizado para construir a biblioteca de fagos filamentosos foi derivado do vetor fdDOG (Clackson et al., 1991; Coburn et al., 1999) acrescido de uma região espaçadora que contém *stop codons* nas três janelas de leitura acima do gene III e flanqueados por sítios de restrição da enzima *SfiI* (New England Biolabs, MA, USA). O vetor resultante, fdBUG não pode expressar a proteína pIII, o que é necessário para infectar células de *E. coli* F+, causando uma redução na produção de partículas de fagos infecciosas (Coburn et al., 1999). O vetor fdBUG foi então digerido com a enzima *SfiI* que digere dois sítios removendo assim a região espaçadora, o que deixa uma extremidade 3'-GTG que previne a recircularização do vetor e promove a inserção dos fragmentos de DNA de *Paracoccidioides*.

O DNA genômico de *Paracoccidioides* foi parcialmente digerido por 45 minutos a 37°C usando a enzima de restrição *MseI* (New England Biolabs, MA, USA) o que resultou em uma extremidade 5'-TA nos fragmentos gerados. Aos fragmentos de DNA foram ligados oligonucleotídeos sintéticos pré-anelados a uma razão molar de 2 equimolar da mistura de adaptadores para 1 de DNA genômico utilizando a enzima T4 ligase (New England Biolabs, MA, USA). Os três adaptadores utilizados possuem em uma extremidade 5'-TA, complementar ao DNA parcialmente digerido, e uma extremidade 3'-CAC complementar com a extremidade deixada do vetor digerido com a enzima *SfiI*. O DNA ligado aos adaptadores foi então fracionado em gel de agarose e os fragmentos entre 0.2 e 1 kb foram ligados com excesso de 20 molar do vetor fdBUG desfosforilado digerido pela enzima *SfiI* usando a enzima T4 ligase. Esta ligação foi então eletroporada em bactérias *E. coli* MC1061 e selecionados em meio LB

suplementado com tetraciclina. A presença dos insertos de DNA de *Paracoccidioides* nos transformantes foi verificada através de PCR de 24 colônias escolhidas ao acaso por transformação usando os iniciadores oDOG1 e oDOG5 que amplificam a região flanqueada pelos dois sítios de restrição da enzima *SfiI*.

3.6. Análises estatísticas

As análises estatísticas dos experimentos de adesão, PCR em tempo real, inibição da adesão pela proteína CSP, ensaios de ligação de fagos, inibição de adesão pelos peptídeos selecionados por *phage display*, testes de citotoxicidade dos peptídeos frente à cultura celulares e densidade hemocitária das larvas de *G. mellonella* foram realizadas utilizando-se One-Way ANOVA com pós-teste de Tuckey. Para as curvas de sobrevivência de camundongos C57-BLACK6 e larvas de *G. mellonella*, foi utilizado o teste de Mantel-Cox. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o software GradPad Prism e o valor de p adotado foi $p < 0.05$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Análise dos perfis de adesão e expressão de adesinas nas espécies do gênero *Paracoccidioides* e sua influência na virulência desses fungos.

4.1.1. Avaliação da infecção das diferentes espécies filogenéticas do complexo *Paracoccidioides* à cultura de células A549.

Os resultados dos ensaios de infecção à pneumócitos A549 nas diferentes espécies do gênero *Paracoccidioides* estão apresentados na figura 6.

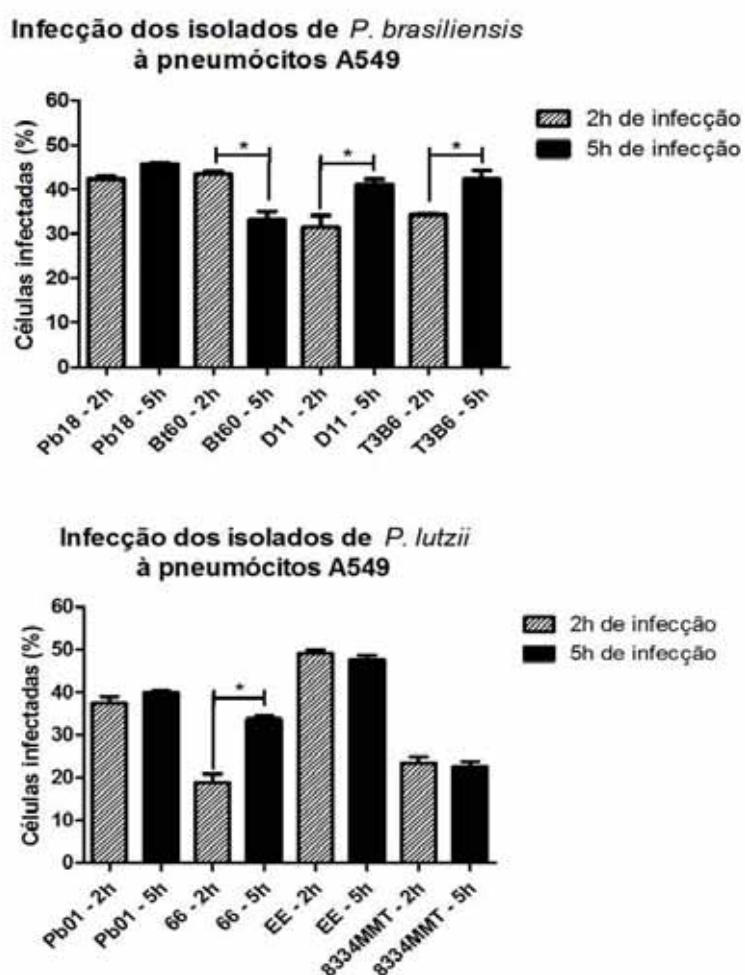


Figura 6. Perfil de adesão de diferentes isolados de *P. brasiliensis* e *P. lutzii* à pneumócitos A549 após 2 e 5 horas de infecção. * indica diferença estatisticamente significativa na taxa de adesão após 2.0 e 5.0 horas, $p < 0.05$.

Os experimentos demonstraram que a infecção não apresenta um padrão estabelecido para cada grupo de espécie filogenética, sendo observados padrões variados dentro de um mesmo grupo. A porcentagem de células infectadas para *P. brasiliensis* variou entre 32 a 60%, já para *P. lutzii* a variação foi entre 25 e 52%. A taxa de infecção pode refletir na virulência de cada isolado já que a adesão é um passo essencial para o sucesso na infecção dos fungos do gênero *Paracoccidioides*.

Quando se calculou a média e a mediana entre os diferentes isolados dentro de cada espécie verificou-se que a infecção foi maior para *P. brasiliensis*, conforme a figura 7, apesar das diferenças não serem significativas.

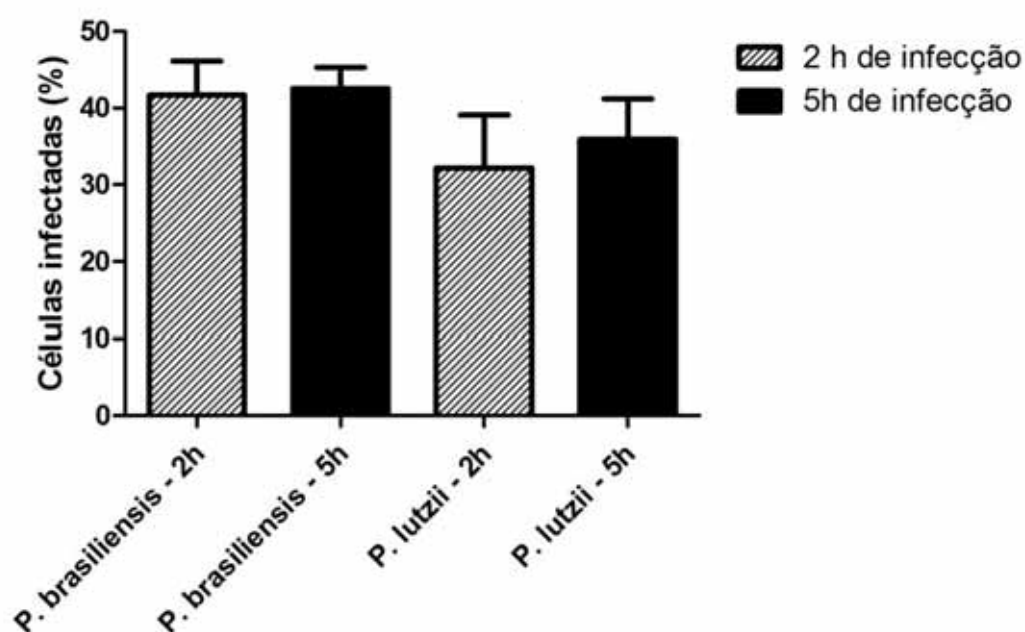


Figura 7. Gráfico com a mediana dos experimentos de infecções entre os isolados de *P. brasiliensis* e *P. lutzii* após 2 e 5 horas de infecção. Após a análise estatística, não foi observada diferença significativa entre as adesões.

Estudos têm demonstrado a capacidade de *P. brasiliensis* para aderir e invadir (Mendes-Giannini *et al.*, 1994), e estas características podem variar dependendo dos isolados (Hanna, Monteiro Da Silva e Giannini, 2000). Estudos anteriores demonstraram que Pb18 é o isolado mais patogênico em animais (Singer-Vermes *et al.*, 1989). Hanna *et al.* estudaram diferentes isolados de *P. brasiliensis* e observaram que o isolado Pb18, foi mais aderente à células Vero. Além disso, após várias subculturas, perdeu a capacidade de adesão, indicando a importante relação entre a virulência e adesão. No entanto, após o reisolamento de animais ou de cultura de células, este fungo

recupera a sua capacidade de aderir e invadir as células epiteliais (Andreotti *et al.*, 2005).

P. brasiliensis não é considerado um agente patogênico intracelular obrigatório, mas pode invadir células epiteliais, *in vitro* e *in vivo* (Mendes-Giannini *et al.*, 1994; Mendes-Giannini *et al.*, 2000; Mendes-Giannini *et al.*, 2004). A internalização de *P. brasiliensis* aumenta durante o curso da infecção, e este processo inicia-se depois de 2 horas de contato do fungo com o hospedeiro.

Neste estudo, observou-se que a taxa de infecção para um dos isolados de *P. brasiliensis* (BT60) diminuiu após 2 horas de infecção, provavelmente indicando o início do processo de invasão. Este processo reflete a virulência das cepas sendo que uma adesão eficiente culmina na rápida invasão das células hospedeiras permitindo assim ao fungo escapar do sistema imune do hospedeiro, estabelecer a infecção e, no caso de *P. brasiliensis*, causar micose sistêmica. Além disso, alguns isolados aumentaram as suas taxas de infecção, após 5 horas de infecção, tal como observado em D11 e T3B6 (*P. brasiliensis*) e 66 (*P. lutzii*) indicando uma menor capacidade de invasão à célula hospedeira, refletindo uma menor virulência para estes isolados. A confirmação da virulência dos diferentes isolados de *Paracoccidioides* é importante porque esta pode estar relacionada à capacidade de causar micose sistêmica, refletindo assim na taxa de doença em uma população. A caracterização detalhada de virulência de microrganismos patogênicos, correlacionando também os isolados e a qual espécie estes pertence, pode conduzir ao desenvolvimento de melhores estratégias terapêuticas e de diagnóstico.

4.1.2. Adesão das diferentes espécies filogenéticas do gênero *Paracoccidioides* aos componentes da MEC laminina, fibronectina, colágeno tipo I e colágeno tipo IV.

Os ensaios de adesão aos componentes da MEC foram realizados com os isolados Pb18 (*P. brasiliensis*) e Pb01 (*P. lutzii*) que foram colocados em contato com os componentes da MEC (Laminina, Fibronectina, Colágenos tipo I e Tipo IV) e a seguir as células aderidas foram removidas e contadas em citômetro de fluxo. Foram realizados três experimentos independentes em triplicata e avaliados estatisticamente (Figura 8).

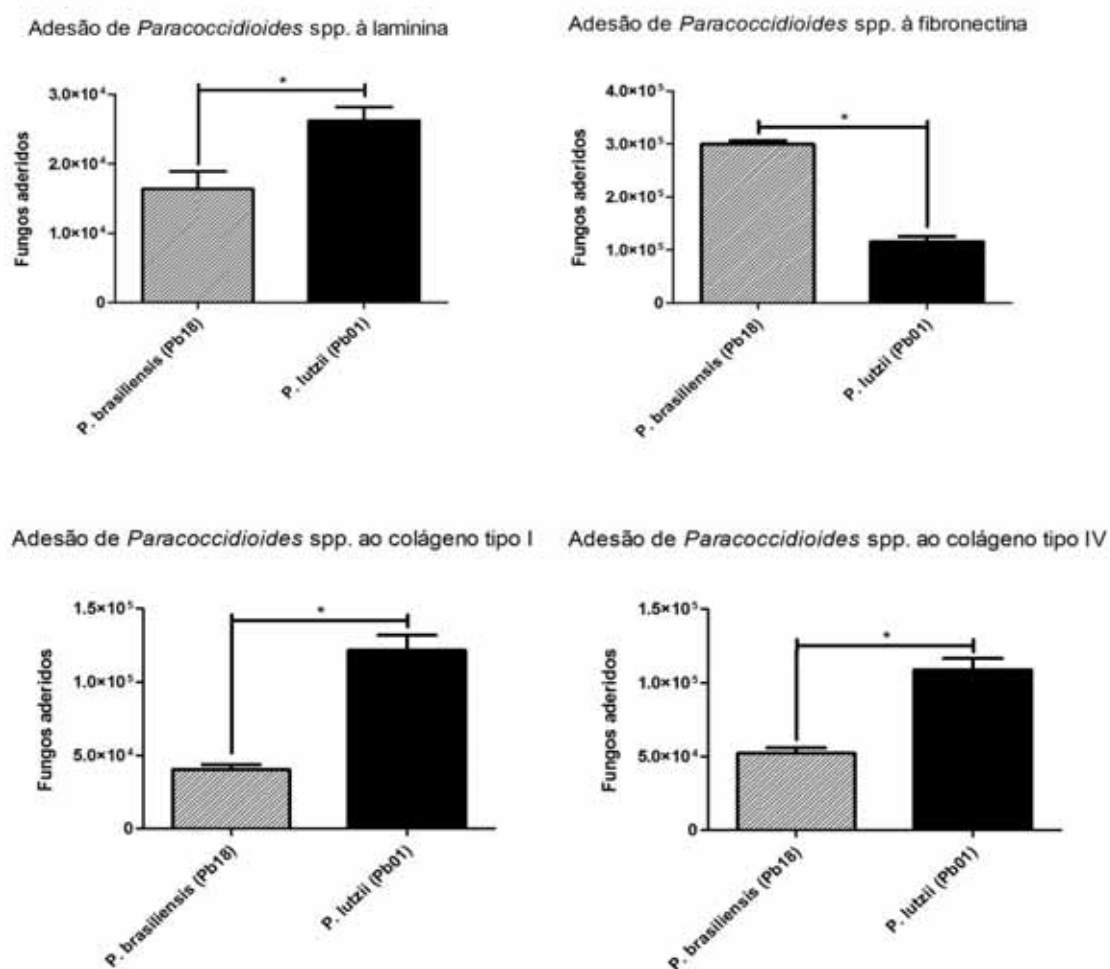


Figura 8. Perfil de adesão das diferentes espécies do gênero *Paracoccidioides* aos componentes da MEC (laminina, fibronectina, colágeno tipo I e colágeno tipo IV) após 2 horas de infecção. * indica diferença estatisticamente significante na taxa de adesão, $p < 0.05$.

Os ensaios de adesão aos componentes da MEC mostraram que cada isolado parece ter uma maior afinidade por determinado componente da matriz. Pode-se observar que Pb18 (*P. brasiliensis*) apresentou uma maior adesão à fibronectina enquanto Pb01 (*P. lutzii*) ao colágeno tipo I. Estas diferenças na adesão encontrada para as diferentes espécies podem refletir nas diferenças de moléculas utilizadas por cada um dos isolados durante a interação com o hospedeiro, utilizando moléculas com maior ou menor afinidade aos diferentes tipos de componentes da MEC, o que também refletirá na virulência de cada isolado e no estabelecimento da micose sistêmica, já que diferentes tipos celulares no organismo do hospedeiro podem produzir cada componente da matriz em quantidades diferenciadas, facilitando a interação do fungo com o

hospedeiro dependendo do sítio de infecção em que o fungo se encontra. A capacidade de um microrganismo para aderir e invadir é reconhecido como um fator importante da sua patogenicidade. A adesão implica que o fungo reconhece ligantes na superfície de células hospedeiras ou de um componente de ECM. No entanto, a adesão é apenas um fator entre muitos que podem promover o desenvolvimento deste processo infeccioso. O mecanismo de adesão tem sido extensivamente estudado em bactérias e fungos patogênicos, tais como *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, *Sporothrix schenckii*, *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum* e *Penicillium marneffei*. Em estudo anterior, nosso grupo demonstrou que *P. brasiliensis* interage com fibronectina humana (Mendes-Giannini, 2006), confirmando os resultados deste trabalho, embora aparentemente houve maior adesão a laminina, porém estes ensaios foram realizados com extratos e neste estudo empregou-se a célula fúngica inteira.

4.1.3. Análise da expressão de adesinas por PCR em Tempo Real durante a infecção das diferentes espécies filogenéticas do complexo *Paracoccidioides* em camundongos BALB/C.

A adesão está relacionada com a expressão de adesinas e várias adesinas já foram descritas em *P. brasiliensis*, principalmente em Pb18 e 01 (Mendes-Giannini *et al.*, 2000; Mendes-Giannini *et al.*, 2008), porém, ultimamente este gênero tem sido intensivamente estudado e classificado em espécies filogenéticas diferentes, além de uma nova espécie também ter sido descrita (Bagagli *et al.*, 2006; Matute *et al.*, 2006); e novos dados sobre a dinâmica de infecção devem ser estudados.

Neste estudo, foi analisada a expressão de adesinas em momentos anteriores (10 minutos e 1 hora) do que aqueles avaliados para estudos de adesão (2 e 5 horas), porque teve como objetivo determinar a expressão de adesinas em resposta ao primeiro contato do fungo com o hospedeiro, já que as adesinas são as moléculas de maior importância durante o contato do fungo com o hospedeiro (camundongos BALB/C infectados), já que as adesinas são as moléculas de maior importância durante o contato do fungo com o hospedeiro.

O aumento da expressão da GP43 foi observado apenas para o isolado Pb18 (*P. brasiliensis*, aproximadamente 1,5 vezes mais expresso em 10 minutos e 2,3 vezes mais expresso em 1 hora, enquanto sua expressão foi reduzida para Pb01 (*P. lutzii*),

aproximadamente 2 vezes menos expresso em 10 minutos e 1 vez em 1 hora, conforme demonstra a figura 9.

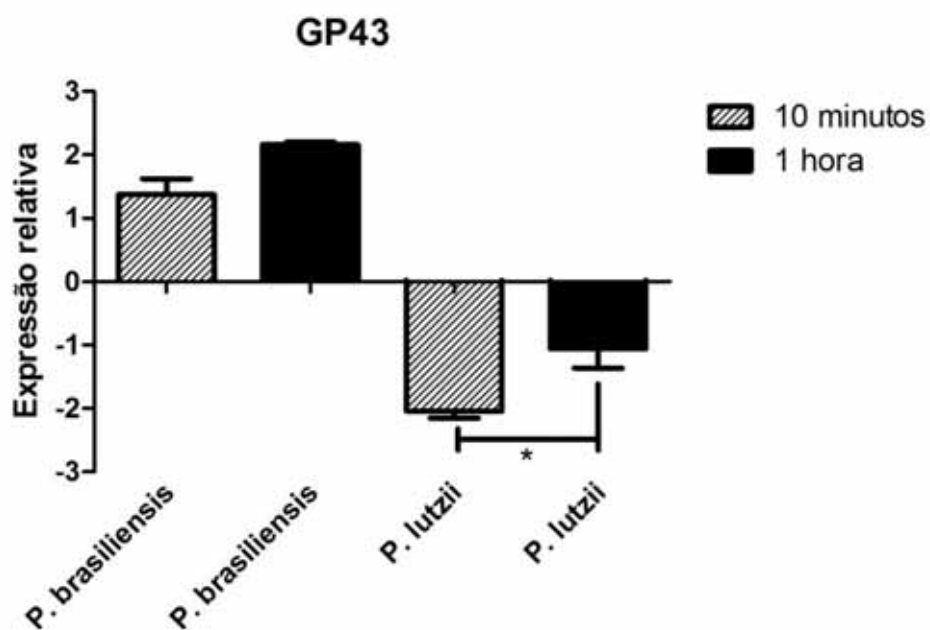


Figura 9. Expressão relativa da adesina GP43 em *P. brasiliensis* e *P. lutzii*. O gráfico indica o aumento ou a diminuição da expressão do gene estudado em relação ao controle de expressão endógena (L34). * $p < 0,05$

Estes dados são extremamente importantes para o estudo da paracoccidiodomicose porque a proteína GP43, além do seu papel como uma adesina, é o principal marcador sorológico para esta doença (Giannini *et al.*, 1990; Puccia e Travassos, 1991). Todos os isolados das diferentes espécies filogenéticas do gênero *Paracoccidioides* são capazes de causar a paracoccidiodomicose, mas níveis baixos ou até a falta da expressão desta proteína pode conduzir a imprecisão no diagnóstico sorológico (Rocha *et al.*, 2009; Rocha, Morais e Puccia, 2009; Batista *et al.*, 2010; Puccia *et al.*, 2011). Este estudo confirma os dados já demonstrados do papel diferenciado da GP43 em *P. lutzii*, não estando envolvida na adesão do fungo nesta espécie, e mostra que novos marcadores sorológicos para a doença devem ser pesquisados para que erros diagnósticos não sejam cometidos quando pacientes estejam infectados com isolados pertencentes as espécies filogenéticas diferentes de S1.

Estudos recentes têm demonstrado a importância da enolase na adesão e virulência do gênero *Paracoccidioides* (Donofrio *et al.*, 2009) e neste estudo pudemos observar a expressão elevada da enolase nas duas espécies do gênero quando em

infecção nos camundongos, conforme mostra a figura 10, em que observamos um aumento de aproximadamente 8 vezes em 10 minutos e aproximadamente 35 vezes após 1 hora de infecção para *P. brasiliensis* e um aumento de aproximadamente 1 vez após 1 hora e aproximadamente 10 vezes após 1 hora de infecção com *P. lutzii*.

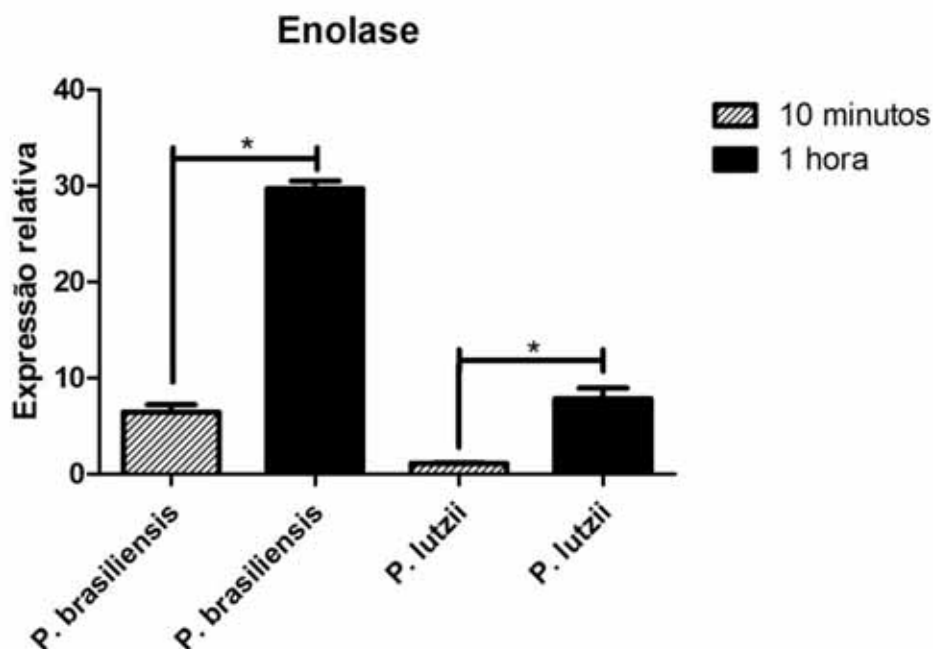


Figura 10. Expressão relativa da adesina enolase em *P. brasiliensis* e *P. lutzii*. O gráfico indica o aumento ou a diminuição da expressão do gene estudado em relação ao controle de expressão endógena (L34). * $p < 0,05$

A enolase foi descrita pela primeira vez por Donofrio et al. (2009), como uma adesina para o isolado Pb18 (*P. brasiliensis*) como ligante de fibronectina, subsequentemente, Nogueira et al. (2010) demonstraram a capacidade desta adesina de se ligar também à laminina e colágeno tipo I, além de fibronectina para o isolado Pb01 (*P. lutzii*) e, além disso, que a enolase expressa na superfície de *P. lutzii* atua como receptor de plasminogênio sendo que através desta ligação o fungo seria capaz de adquirir atividade proteolítica através da plasmina gerada durante essa interação. A plasmina é uma enzima chave do sistema plasminogênio e contribui para a degradação dos constituintes da matriz contribuindo para a patogenicidade de *P. lutzii* por facilitar a invasão tecidual no hospedeiro. Marcos et al. (2012a) mais uma vez demonstraram que a enolase se liga à todas os componentes da MEC e além disso verificaram que a enolase é expressa em níveis elevados na parede celular de *P. brasiliensis*, contribuindo assim na adesão do fungo ao hospedeiro. Nos resultados deste estudo, a expressão da

enolase foi mais elevada nas fases iniciais de interação com o hospedeiro seguida de um aumento significativo da sua expressão após 1 hora de infecção o que pode indicar que esta também está envolvida no processo de invasão do fungo às células do hospedeiro.

A adesina 14-3-3 foi observada tendo sua expressão aumentada no contato inicial de *P. brasiliensis* com o hospedeiro, seguido de um aumento na expressão após uma hora de infecção para todas as duas espécies de *Paracoccidioides*, 12 vezes para *P. brasiliensis* e 6 vezes para *P. lutzii* (figura 11).

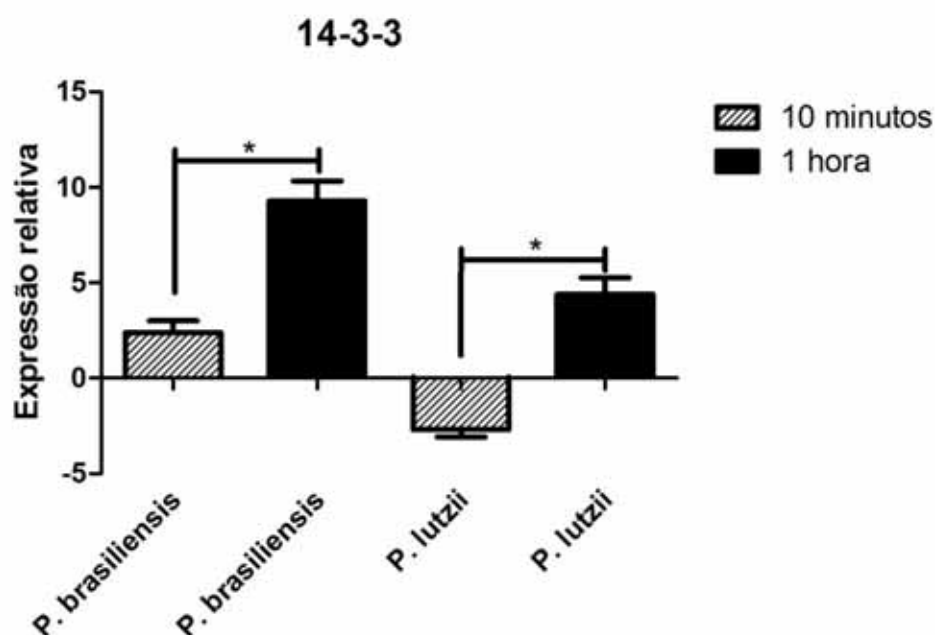


Figura 11. Expressão relativa da adesina 14-3-3 em *P. brasiliensis* e *P. lutzii*. O gráfico indica o aumento ou a diminuição da expressão do gene estudado em relação ao controle de expressão endógena (L34). * $p < 0,05$

Esta proteína foi recentemente identificada como um fator importante na interação entre *Paracoccidioides* e seu hospedeiro. Em um estudo recente, Silva et al., (2013) demonstraram que um aumento significativo desta proteína ocorre na parede celular do patógeno durante a sua interação com células epiteliais A549. Este aumento sugere um papel importante para esta proteína na interação fungo-hospedeiro, que conduz a uma resposta imunitária celular que é importante para o sucesso do fungo no interior das células hospedeiras. Além disso, Vallejo et al. (2011); (2012) verificaram que esta proteína é transportada por vesículas de *P. brasiliensis* e é liberada para o sobrenadante da cultura, o que indica que esta proteína está envolvida na interação *Paracoccidioides*-hospedeiro.

Podemos observar um aumento na expressão triosefosfato isomerase em *P. lutzii* (figura 12), aproximadamente 1 vez mais expressa após 10 minutos e 1 hora. A caracterização desta proteína como uma adesina foi estudada apenas no isolado Pb01 (Pereira *et al.*, 2007), e nunca foi estudado em outros isolados pertencentes à espécie *P. brasiliensis*. Nosso estudo, embora preliminar, demonstra a importância desta adesina para *P. lutzii*, sendo bastante expressa durante o contato inicial, como após um maior contato com o hospedeiro, revelando que além da importância na adesão, esta proteína pode estar relacionada também com o processo de invasão do fungo às células dos hospedeiros.

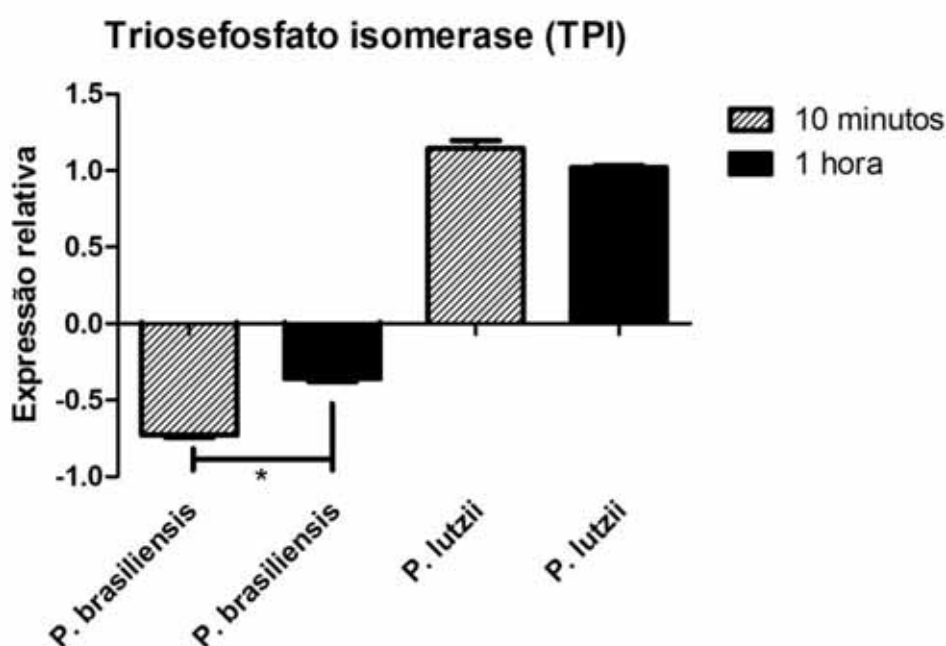


Figura 12. Expressão relativa da adesina TPI em *P. brasiliensis* e *P. lutzii*. O gráfico indica o aumento ou a diminuição da expressão do gene estudado em relação ao controle de expressão endógena (L34). * $p < 0,05$

Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase foi também caracterizado como uma adesina para o isolado Pb01 de *P. lutzii* (Barbosa *et al.*, 2004; Barbosa *et al.*, 2006). Neste estudo, observou-se a expressão desta adesina durante o início da interação entre o fungo e o hospedeiro em *P. brasiliensis* (aumento de cerca de 3,5 vezes), porém não foi detectada a expressão desta no início da interação em *P. lutzii*, sendo que para as duas espécies a expressão é diminuída após uma hora de interação (aproximadamente 0,5 vez menos expressa para *P. brasiliensis* e 2,5 vezes menos expressa para *P. lutzii*), revelando a importância desta proteína no início da infecção de *P. brasiliensis* (figura

13). Embora este dado seja controverso ao observado inicialmente, as condições do estudo podem ter influenciado os resultados. A descrição desta adesina foi realizada *in vitro* e nosso estudo *in vivo*.

Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH)

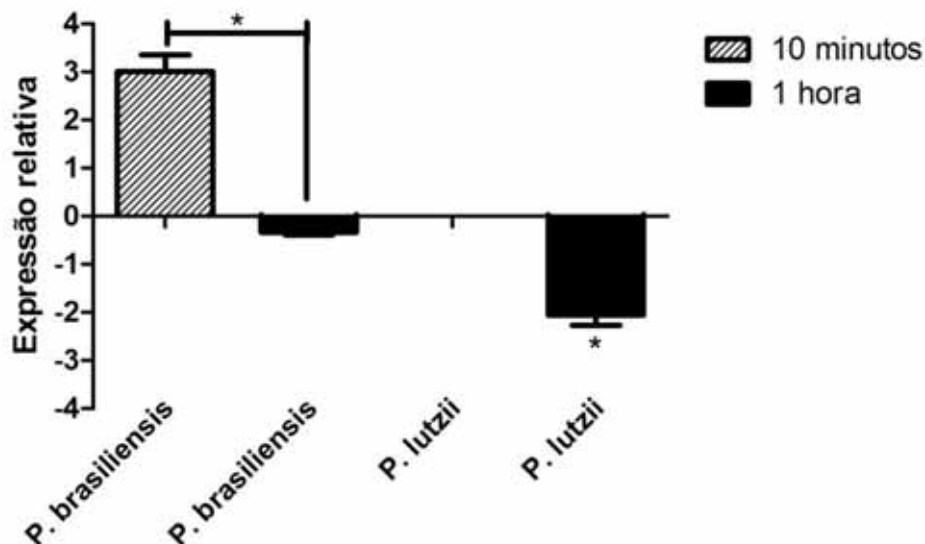


Figura 13. Expressão relativa da adesina GAPDH em *P. brasiliensis* e *P. lutzii*. O gráfico indica o aumento ou a diminuição da expressão do gene estudado em relação ao controle de expressão endógena (L34). * $p < 0,05$

Malato sintetase foi descrita como uma adesina para o isolado Pb01 (Pb01-like) (Da Silva Neto *et al.*, 2009), ligante de fibronectina e colágenos tipo I e IV, além disso, De Oliveira *et al.* (2013) demonstraram que a proteína malato sintetase de *Paracoccidioides* interage com proteínas de diferentes categorias moleculares como transporte celular, biossíntese de proteínas, modificação e degradação de proteínas e transdução de sinal sugerindo que esta proteína desempenha diferentes papéis na célula fúngica. No presente estudo, ela foi menos expressa no início da interação de *P. lutzii* (aproximadamente 2 vezes menos expressa) do que em *P. brasiliensis* (aproximadamente 1,5 vezes mais expressa), porém sua expressão foi aumentada para as duas espécies após uma hora de interação (aproximadamente 4 vezes para *P. brasiliensis* e 3 vezes para *P. lutzii*) (figura 14).

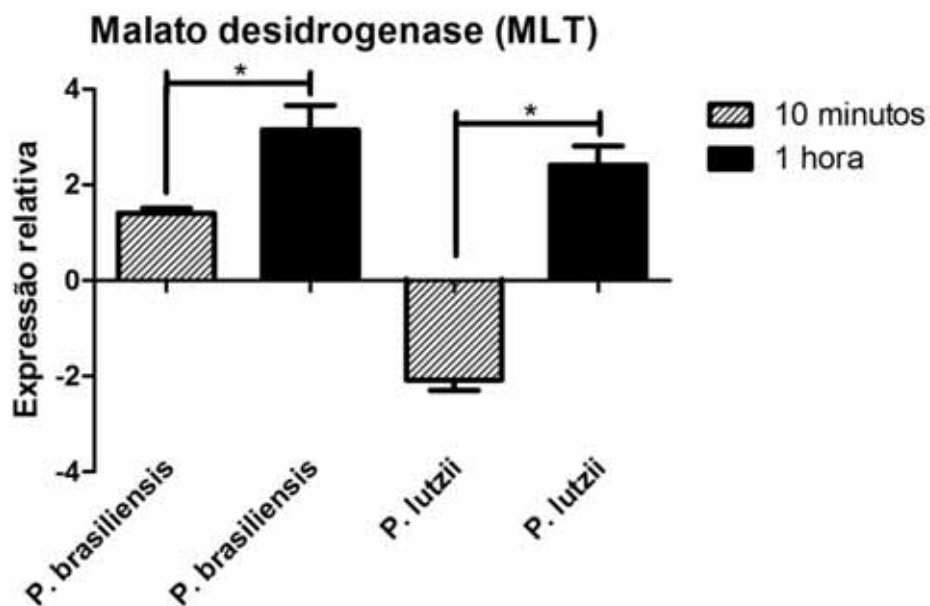


Figura 14. Expressão relativa da adesina MLT em *P. brasiliensis* e *P. lutzii*. O gráfico indica o aumento ou a diminuição da expressão do gene estudado em relação ao controle de expressão endógena (L34). * $p < 0,05$

A expressão de adesinas nas diferentes espécies não foi constante, e uma grande variedade na dinâmica da expressão foi observada entre os isolados, sendo observado desde a superexpressão até a não expressão de adesinas que têm papel crucial na interação com hospedeiros para alguns isolados. Aparentemente, quando se compara a expressão relativa de adesinas, a enolase seguida da 14-3-3 foram as mais expressas. Estudos posteriores como os de *phage display* poderão confirmar estes dados. Observou-se que a expressão de adesinas depende do isolado e do tempo de interação entre o fungo e o hospedeiro. As maiores taxas de expressão de maior parte das adesinas foram observadas em *P. brasiliensis*. Este estudo apresenta uma nova perspectiva sobre a interação do complexo de espécies do gênero *Paracoccidioides* com o hospedeiro e demonstra a importância de se estudar cada uma das espécies e suas características únicas, durante o curso da infecção para entender o arsenal molecular utilizado pelo fungo para garantir o sucesso na interação, sendo esse conhecimento importante para o desenvolvimento de novas terapias baseadas nas particularidades de cada espécie. Além disso, a interação *in vivo* como realizada neste trabalho, assim como o tempo de interação podem ser os fatores diferenciais em relação aos estudos anteriores.

4.1.4. Curva de sobrevivência de camundongos C57-BLACK6 para avaliação da relação adesão/virulência nas espécies do gênero *Paracoccidioides*.

A curva de sobrevivência foi feita para avaliar a relação adesão/virulência das espécies do gênero *Paracoccidioides*. Para tanto, grupos de oito (8) camundongos foram infectados com *P. brasiliensis* e *P. lutzii* (5×10^6 cels/mL) e a sobrevivência foi avaliada pela contagem de camundongos mortos após a infecção durante 200 dias de experimento. Além disso, um grupo controle não infectado, apenas tratado com PBS foi utilizado. A inoculação com o PBS serve também para acompanhar se a cirurgia não afetaria a sobrevivência dos camundongos. A escolha pelo uso dos camundongos C57-BLACK6 foi pela linhagem ser mais sensível a *Paracoccidioides*.

Após 200 dias de infecção uma curva de sobrevivência foi realizada e a partir dela pudemos observar a morte de 04 indivíduos do grupo infectado com *P. brasiliensis* e apenas a morte de 01 indivíduo infectado com *P. lutzii*, refletindo em uma sobrevivência de 50% e 90% respectivamente (figura 15).

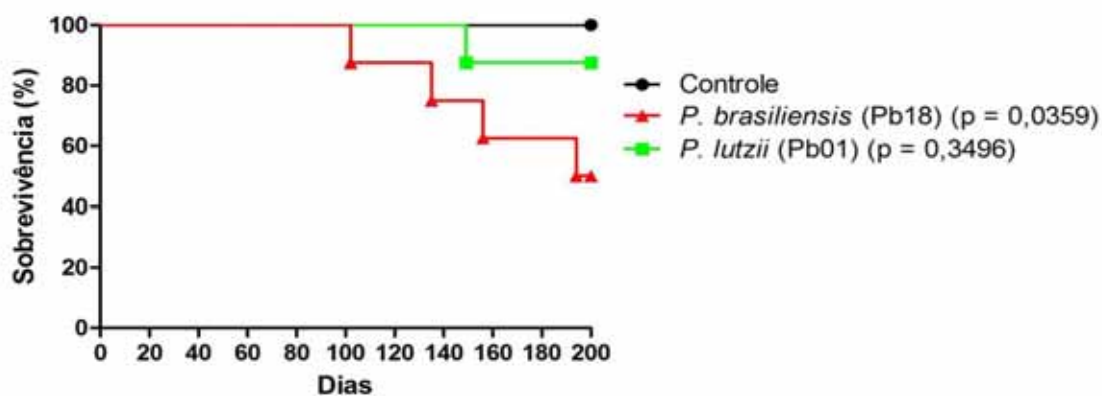


Figura 15. Curva de sobrevivência de camundongos C57-BLACK6 infectados com *P. brasiliensis* e *P. lutzii* avaliada durante 200 dias após a infecção, demonstrando uma maior capacidade de *P. brasiliensis* de matar os camundongos sendo a diferença para o controle significativamente diferente.

Os resultados encontrados demonstraram que existe uma aparente relação entre adesão e virulência no gênero *Paracoccidioides*. Em nossos resultados, a adesão à pneumócitos A549 por *P. brasiliensis* foi mais pronunciada do que em *P. lutzii*. Quando olhamos para a adesão aos componentes da MEC podemos observar que *P. lutzii* foi capaz de aderir com maior eficiência aos três componentes da matriz extracelular, laminina, colágeno tipo I e colágeno tipo IV, porém *P. brasiliensis* aderiu com maior

eficiência à fibronectina, componente da matriz com reconhecida importância nos tecidos pulmonares, sendo este o sítio preferencial de *Paracoccidioides* já que a infecção pelo fungo ocorre por inalação de conídios, sendo os pulmões o primeiro tecido de contato do fungo com o hospedeiro. Além disso, ao olharmos para a expressão de adesinas podemos ver que *P. brasiliensis* exibiu níveis maiores de expressão dessas moléculas quando comparado com *P. lutzii* o que resulta na maior adesão desta espécie. Estes dados quando analisados em relação à curva de sobrevivência nos deixa claro que, a maior capacidade de expressão de adesinas de *P. brasiliensis* levou a uma maior adesão o que, *in vivo*, resulta na maior virulência da espécie tendo maior capacidade de levar os camundongos ao óbito, revelando assim que existe uma clara relação entre a capacidade de adesão/virulência dos fungos do gênero *Paracoccidioides*.

4.2. Clonagem e expressão heteróloga da proteína CS protein que pode estar envolvida na virulência de *Paracoccidioides* spp.

Por ser um fungo de difícil manipulação gênica, o estudo funcional de proteínas dos fungos do gênero *Paracoccidioides* tem que se basear em técnicas diferenciadas que permitam fazer inferências sobre a função destas proteínas no microrganismo. A produção de proteínas recombinantes e o uso das mesmas no entendimento da interação *Paracoccidioides*-hospedeiro têm sido amplamente utilizados. No estudo de caracterização de adesinas, essa técnica têm sido a mais usada já, que a partir da proteína recombinante, testes podem ser feitos mostrando a interferência destas no processo de adesão do fungo permitindo assim entender se determinadas proteínas têm papel de adesina durante a interação do fungo com o hospedeiro. A produção de proteínas recombinantes já foi utilizada na caracterização de diversas proteínas envolvidas na interação de *P. brasiliensis* com o hospedeiro (Albuquerque *et al.*, 2004; Barbosa *et al.*, 2006; Pereira *et al.*, 2007; Silva, 2008; Da Silva Neto *et al.*, 2009; Nogueira *et al.*, 2010; Da Silva *et al.*, 2013), ainda mais pelo fato de *P. brasiliensis* ser um fungo de extrema dificuldade para a realização de modificações genéticas, sendo a construção de mutantes para qualquer gene de interesse de extrema dificuldade.

4.2.1. Características gerais da proteína a ser produzida

A seguir foram introduzidas a sequência da proteína que foi estudada nesta etapa do trabalho.

Cell Surface Protein

Sequência da proteína: 237 aa

MHISAI AVAVSALAVSVSASVPGNYGEQPPYPAPTTSVAPTYP AEPSYPAEPSYPT EPEPTYPAEPSYPT EPEPTYPAEPSYPT EPEPTY PTEPEPSYPT EPEPSYPT EPESSYPTAAPSYPEETIPSYPTGTPSDVPHYPTGTPSAEPSYPVHTPSSYPVDHPKPTYSATPIPPGVSVPPTY PIGTKPPVYPTGTGVYPTGTPVPTYP PGDSGAFSAGVPVGLGLAAALFAAFL*

Massa: 24,596 Da

pI: 3,96

Coding sequence: 714pb

ATGCATATCTCAGCCATCGCCGTTGCTGTCTCGGCTCTTGCCGTGTCGGTCAGTGCCTCTGTTCTGGCAATTACGGTGAACAGC
CACCCCATACCCAGCTCCACACCTCGGTTGCTCCAACCTACCCAGCTGAGCCAAGTTACCCAGCCGAGCCATCTTACCCAAC
GAGCCGAGCCAACCTACCCAGCCGAGCCGCTTACCCAACCGAGCCGAGCCAACCTACCCAGCCGAGCCATCTTACCCAAC
AACCTGAGCCAACCTACCCAACCTGAGCCGAGCCATCTTACCCAACCTGAGCCGAGCCATCTTACCCAACCTGAGCCATC
CTCTACCCAACCTGCCGCCCAAGCTACCCAGAGGAGACTATCCAAGCTACCCAACCTGGCACTCCCTCAGACGTTCTCATTAC
CCAACCGGACCCATCTGCGGAACCCTCGTACCCAGTTACACCCCGTCGAGCTACCCAGTTGACCACCCAAACCAACCTACA
GTGCCACTCCCATCCCTCCCGAAGTGTCTCTCCACATCCTATCGGCACCAAGCCACCAGTTGTCTATCCCACTGGCACTGGT
GTCTACCCAACCTGGCACTCCCGTCCCACTTATCCCTGCTGACTCTGGCGCTTTCTCTGCTGGCGTTCCCGTCGGCCTAGGCCT
CGCTGCTGCTCTCTCGCTGCTTCTCTGTA

4.2.2. Amplificação do cDNA relativo à proteína CS protein de *P. lutzii*

O cDNA com a região completa da proteína alvo do estudo foi amplificado por PCR utilizando iniciadores *sense* e *antisense* desenhados especificamente para esta sequência, resultando em um produto de 710 pb relativo à sequência codificadora da proteína (Figura 16).

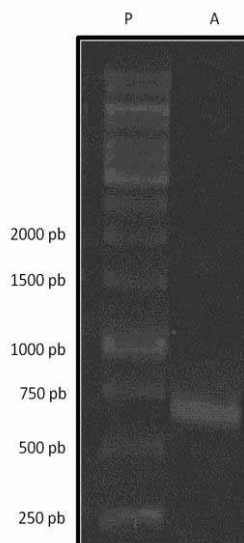


Figura 16. Amplificação do cDNA correspondente à proteína CS protein de *P. lutzii*.

Este produto de PCR foi então purificado utilizando-se o QIAquick PCR Purification kit (Qiagen) e foi utilizado nas clonagens para a obtenção da proteína recombinante CS protein de *P. lutzii*.

4.2.3. Clonagem do cDNA codificante da proteína CS protein no vetor pGEM-T-Easy para expansão do inserto

Com uma proporção molar de 20:1 de inserto e vetor o cDNA codificante da proteína de inserto foi ligado ao vetor pGEM-T-Easy e este então foi transformado em bactérias *E. coli* ultracompetentes DH5B. Após o crescimento overnight em placas contendo ampicilina a uma concentração de 100 ug/mL, 09 colônias foram selecionadas aleatoriamente e PCR de colônia foram realizadas utilizando os iniciadores referente à proteína CS protein foi realizada. Após a amplificação, a banda referente à proteína de interesse pode ser observada através de eletroforese em gel de agarose 0.8%, sendo encontradas 03 colônias positivas, com a amplificação de produto com cerca de 714 pb (figura 17).

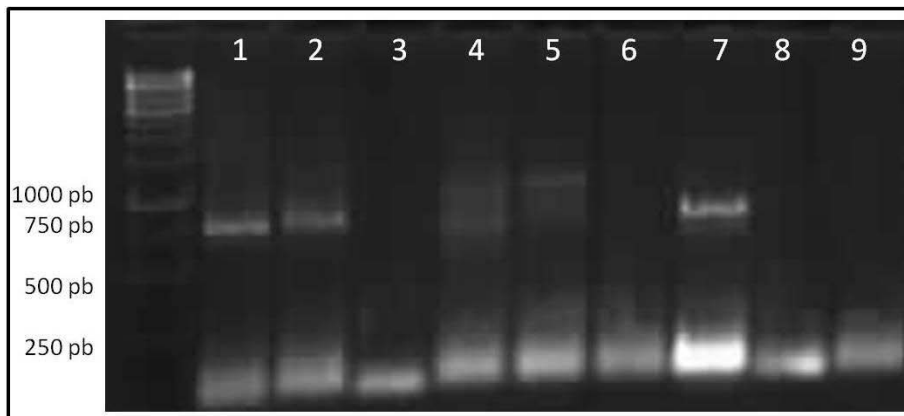


Figura 17. Gel de agarose 1,5% corado com GelRed. Amostras 1-9: Diferentes clones da proteína CS protein sendo positivos apenas os clones 1, 2 e 7.

Os clones positivos foram então expandidos em cultura e então foi realizada a extração da construção pGEM-PbCSp. Para a confirmação da inserção do cDNA correspondente à proteína de interesse, o plasmídeo pGEM-PbCSp foi submetido a seqüenciamento e as seqüências geradas foram analisadas e a partir dos eletroferogramas gerados, determinou-se a qualidade das seqüências. A figura 18 mostra parte do eletroferograma para a seqüência do gene da proteína CSP e na figura 19 a sequência gerada pelo programa onde as bases grifadas em azul demonstram a ótima qualidade da sequência.

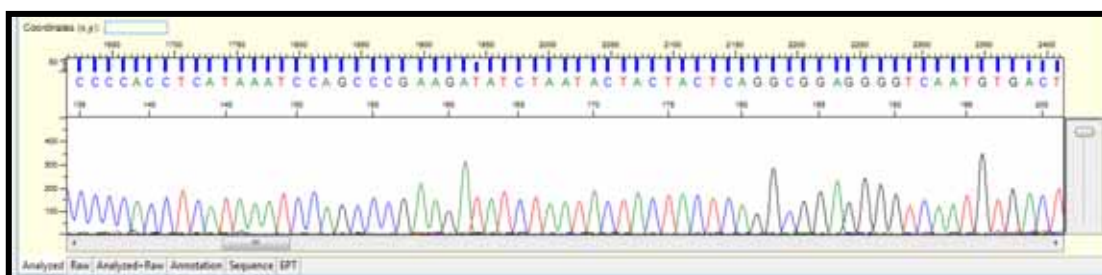


Figura 18. Eletroferograma para o gene CS protein de *P. lutzii*.



Figura 19. Sequência gerada após o sequenciamento do gene CS protein de *P. lutzii*.

As sequências foram então alinhadas junto ao NCBI e ao banco de dados do genoma de *P. brasiliensis* disponível no site do Broad Institute, sendo que o resultado do alinhamento confirmou a correta amplificação do cDNA codificante da proteína de interesse.

A construção pGEM-PbCSp foi então digerida utilizando as enzimas *SacI* e *NcoI* por 1 hora a 37°C e, após visualização da banda correspondente à proteína CS protein, esta foi recortada do gel e purificada utilizando-se o kit QIAquick Gel Extraction kit (Qiagen).

4.2.4. Clonagem do cDNA codificante da proteína CS protein no vetor de expressão pET-32a

Após a purificação do gel, o cDNA codificante da proteína de interesse foi ligado ao vetor pET-32a através de ligação com a enzima T4 DNA ligase, utilizando-se a razão equimolar de 20:1 de inserto e vetor, construindo-se assim o plasmídeo pET-PbCSp. Essa ligação foi então eletroporada em bactérias *E. coli* BL21 (pLYS) que foram plaqueadas em meio seletivo contendo 50 ug/mL de ampicilina. As colônias resistentes à ampicilina foram então verificadas para a presença do inserto de interesse através de PCR de colônia utilizando-se os iniciadores referentes ao inserto. Dez colônias foram selecionadas e, após a amplificação apenas uma colônia foi positiva (figura 20).

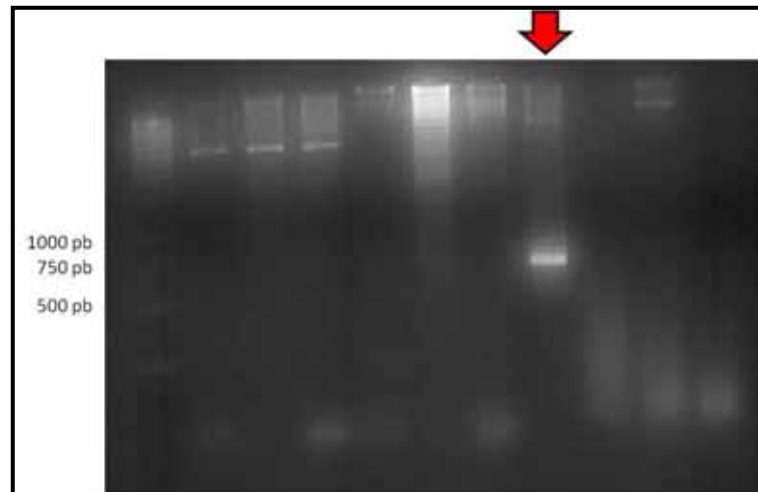


Figura 20. PCR de colônia para verificação do inserto referente à proteína CS protein de *P. lutzii*.

Além da confirmação através da PCR de colônia foi realizada a expansão da colônia e então o DNA plasmidial, contendo a construção pET-PbCSp foi extraída e então submetida à digestão utilizando-se as enzimas de restrição *SacI* e *NcoI* que liberaram um fragmento de tamanho esperado referente à proteína de interesse (figura 21).

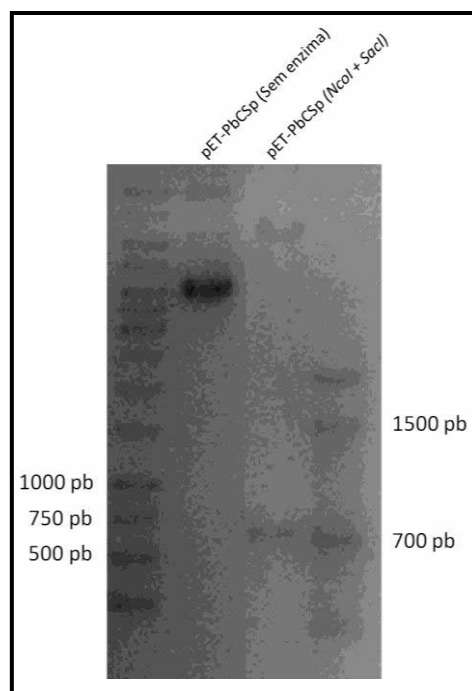


Figura 21. Digestão do plasmídeo pET-PbCSp com as enzimas *NcoI* e *SacI* liberando fragmento de aproximadamente 710 pb referente ao gene da proteína CSP.

Com a confirmação da clonagem a colônia positiva foi então expandida em meio LB acrescido de ampicilina e então estes clones foram utilizados para os ensaios de indução da expressão da proteína recombinante CS protein de *P. lutzii*.

4.2.5. Expressão heteróloga da proteína CS protein

A expressão da proteína foi primeiramente induzida em experimento piloto utilizando-se diferentes concentrações de IPTG 0.4mM, 0.6mM, e 1.0mM por diferentes tempos de indução: 1, 3, 5 e 24 horas na linhagem de bactéria BL21 (pLYS). Após o período de incubação as alíquotas foram analisadas em gel de poliácridamida SDS-PAGE para verificar a expressão da proteína CS protein (Figura 22).

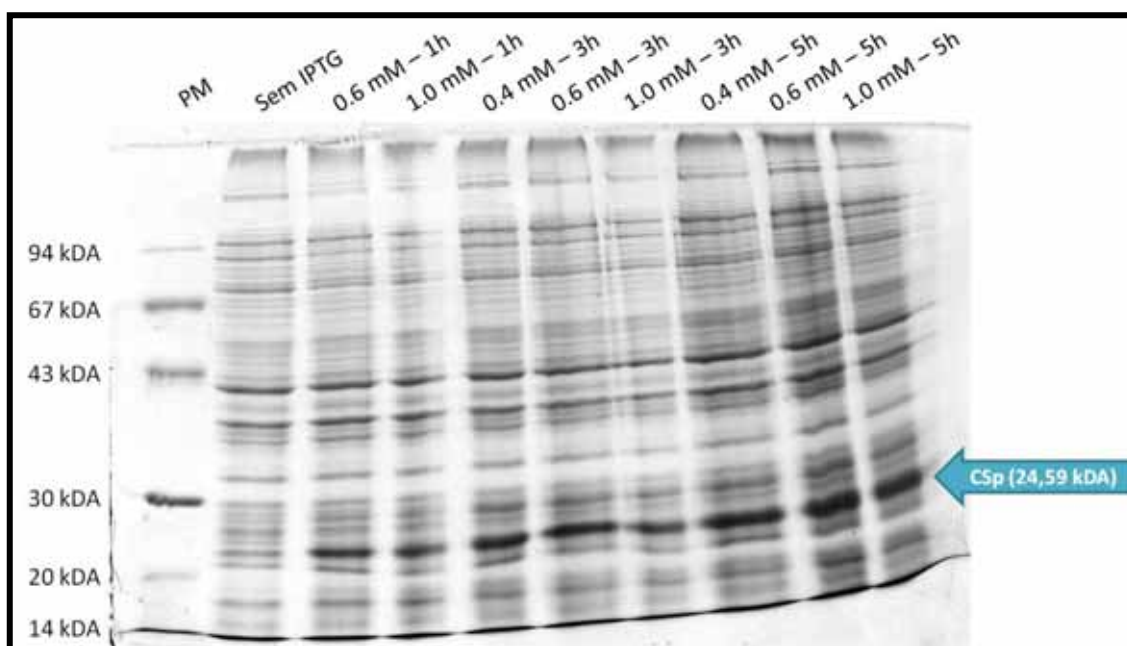


Figura 22. SDS-Page (10%) para verificação da expressão proteína recombinante após a indução da expressão com IPTG, sendo verificada expressão para todos tempos e todas as concentrações de IPTG testadas.

Pode-se observar a indução da proteína de interesse em todos os tempos testados e também em todas as concentrações de IPTG empregadas, porém após 5 horas pode-se observar que houve uma maior expressão da proteína e, portanto, esta foi escolhida para se fazer a macroindução utilizando-se 0.6 mM de IPTG durante 5 horas.

4.2.6. Macroindução e purificação da proteína recombinante CS protein

A macroindução foi realizada para se obter uma grande quantidade desta proteína recombinante para posterior purificação por cromatografia de afinidade. Após o período de indução, a cultura foi sonicada e então se correu um gel para verificar se a proteína encontrava-se no *pellet* celular ou no sobrenadante. Após a corrida do gel observou-se que a proteína encontrava-se no sobrenadante da cultura e este foi então filtrado e submetido à cromatografia utilizando-se o cromatógrafo líquido FPLC AKTA (Amershan) em coluna de níquel HisTrap FF crude. Primeiramente fez-se uma cromatografia utilizando-se gradiente linear de tampão imidazol de 0 a 100% e obteve-se cromatograma, mostrando um pico referente à eluição da proteína apenas com 100% de tampão com imidazol (figura 23).

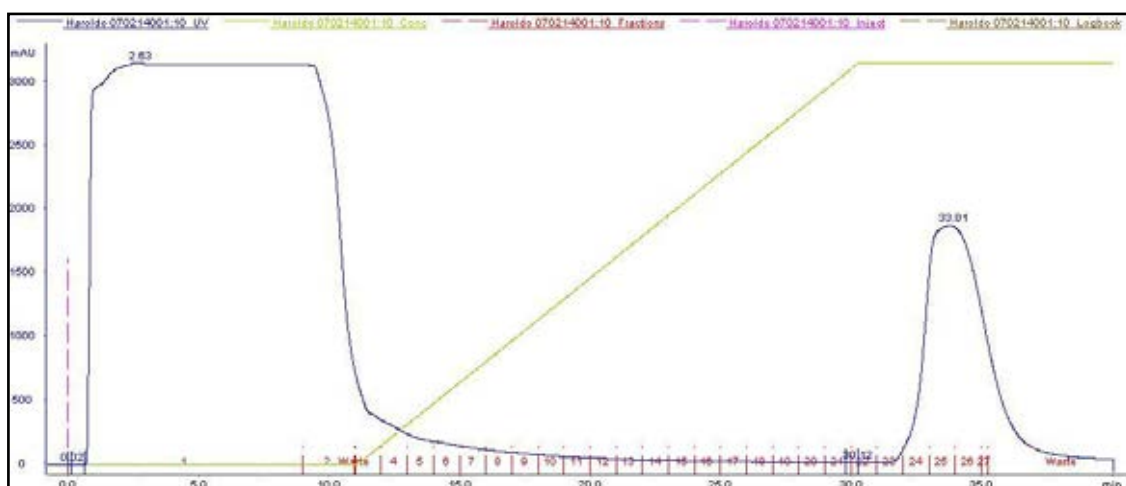


Figura 23. Cromatograma de purificação da proteína CS protein, realizada em cromatógrafo FPLC e eluição com tampão imidazol em concentração crescente de 0 a 100%, sendo observado o pico de eluição da proteína ao final da corrida cromatográfica.

Devido ao pico aparecer apenas com 100% de imidazol optou-se por reuplicar a amostra e realizar nova cromatografia porém fazendo a eluição de todo o volume em 100% de imidazol o que nos deu um cromatograma, em que o pico referente à proteína apareceu logo no início da eluição (figura 24).

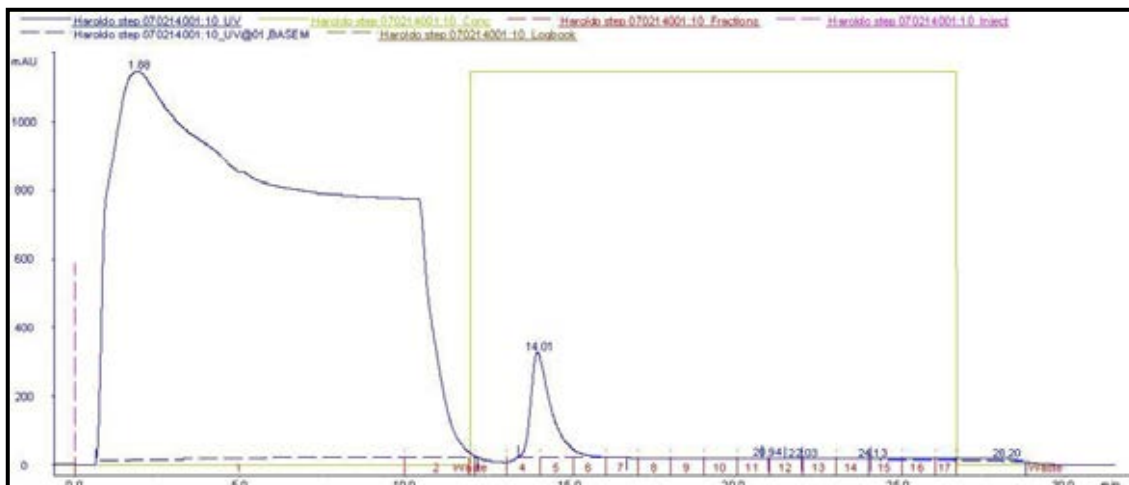


Figura 24. Cromatograma de purificação da proteína CS realizado em cromatografo FPLC e eluição com tampão imidazol 100%, sendo observado o pico de eluição da proteína logo no início da corrida cromatográfica.

Pela cromatografia foram coletadas 07 frações da eluição que foram analisadas em SDS-PAGE e a presença de uma banda de 26 kDa, correspondente à proteína CS protein (figura 13). Para confirmação, esta banda referente à proteína purificada foi enviada para seqüenciamento por espectrometria de massas.

As frações referentes aos picos nas duas cromatografias foram analisadas e a figura 25 mostra os resultados obtidos.

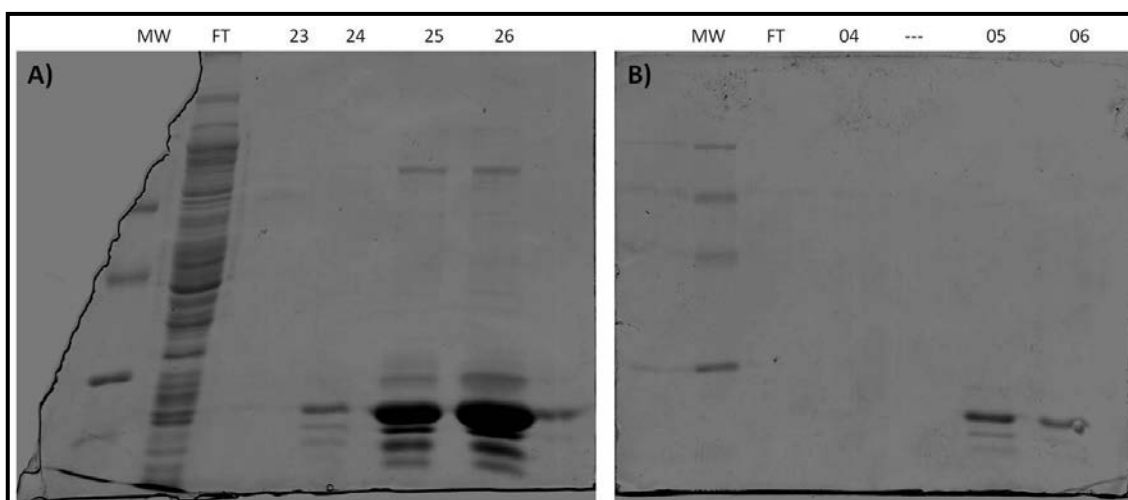


Figura 25. Purificação da proteína CS protein recombinante. A) Primeira cromatografia: FT, Flowthrough; 23-26, diferentes eluições coletadas durante a cromatografia. B) Segunda cromatografia: FT, Flowthrough; 04-06, diferentes eluições coletadas durante a cromatografia. Gel SDS-PAGE 10%.

Apesar da maior quantidade de proteína purificada na primeira cromatografia, podemos observar algumas bandas contaminantes, diferente da segunda onde o número de bandas contaminantes reduz significativamente. Após estas cromatografias, no intuito de melhorar a purificação da proteína recombinante, as frações que continham a proteína eluída foram concentradas e purificadas novamente, sendo então encontrado melhores resultados para a purificação. Primeiramente, as frações recolhidas foram centrifugadas nos filtros de 30 kDA, em que a proteína de interesse passa facilmente.. Após esta centrifugação, a proteína foi concentrada em filtro de 10 kDA, em que a proteína de interesse ficou retida. Abaixo a figura 26 mostra esta purificação em detalhe.

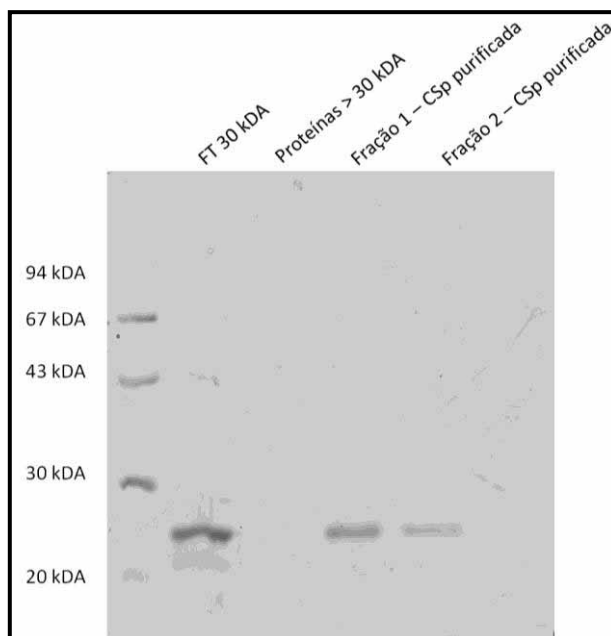


Figura 26. Resultado da purificação da proteína CS protein recombinante em gel de SDS-PAGE 10%.

Para se obter uma maior quantidade de proteínas, a macroindução e a purificação foi repetida 2 vezes. Após a purificação a proteína foi dosada para a realização de ensaios para a avaliação da influência desta proteína na interação *Paracoccidioides*-hospedeiro.

4.2.7. Ensaio de inibição da adesão de *P. lutzii* à pneumócitos A549 pela proteína recombinante CSP através de ELISA de inibição (ELISA-inib)

O ensaio de inibição da adesão nos mostra se a proteína em estudo pode estar envolvida no processo de adesão do fungo *P. lutzii*. Ao tratarmos pneumócitos com a proteína recombinante esperamos que esta se ligue a sítios específicos de ligações bloqueando assim sítios onde o fungo, utilizando essa proteína, se liga durante a interação com o hospedeiro. Por se tratar de um ensaio preliminar, apenas a concentração de 25 ug/mL da proteína recombinante foi utilizada e a adesão foi observada por 15 horas, sendo os resultados apresentados na figura 27.

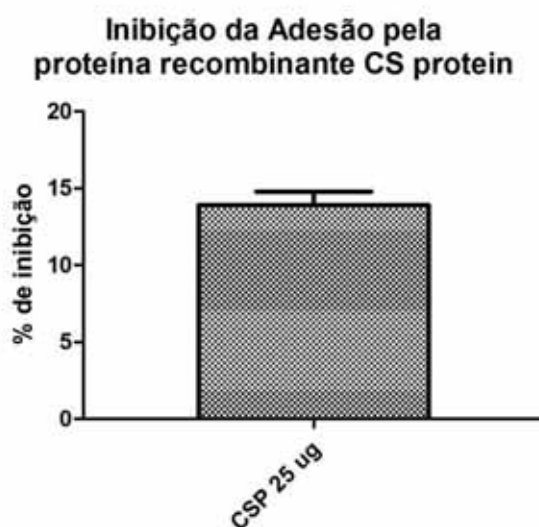


Figura 27. Inibição da adesão de *P. lutzii* a pneumócitos A549 pela proteína recombinante CSP.

A taxa de inibição ficou em torno de 15%, mostrando assim que a proteína CSP recombinante foi capaz de inibir a adesão do fungo aos pneumócitos A549. Este resultado mostra que, esta proteína pode ser caracterizada como uma das moléculas utilizadas pelo fungo para aderir ao hospedeiro.

4.2.8. Ensaio de inibição da adesão de *P. lutzii* e *P. brasiliensis* aos componentes da MEC pela proteína recombinante CSP através de ELISA de inibição (ELISA-inib)

Ao tratarmos os diferentes componentes da MEC com a proteína recombinante esperamos que esta se ligue a sítios específicos de ligações bloqueando assim sítios onde o fungo, utilizando essa proteína, se liga durante a interação com o hospedeiro. Para o ensaio com os componentes da MEC a mesma concentração utilizada para o estudo com a cultura de pneumócitos A549, de 25 ug/mL sendo a adesão também observada por 15 horas (figura 28).

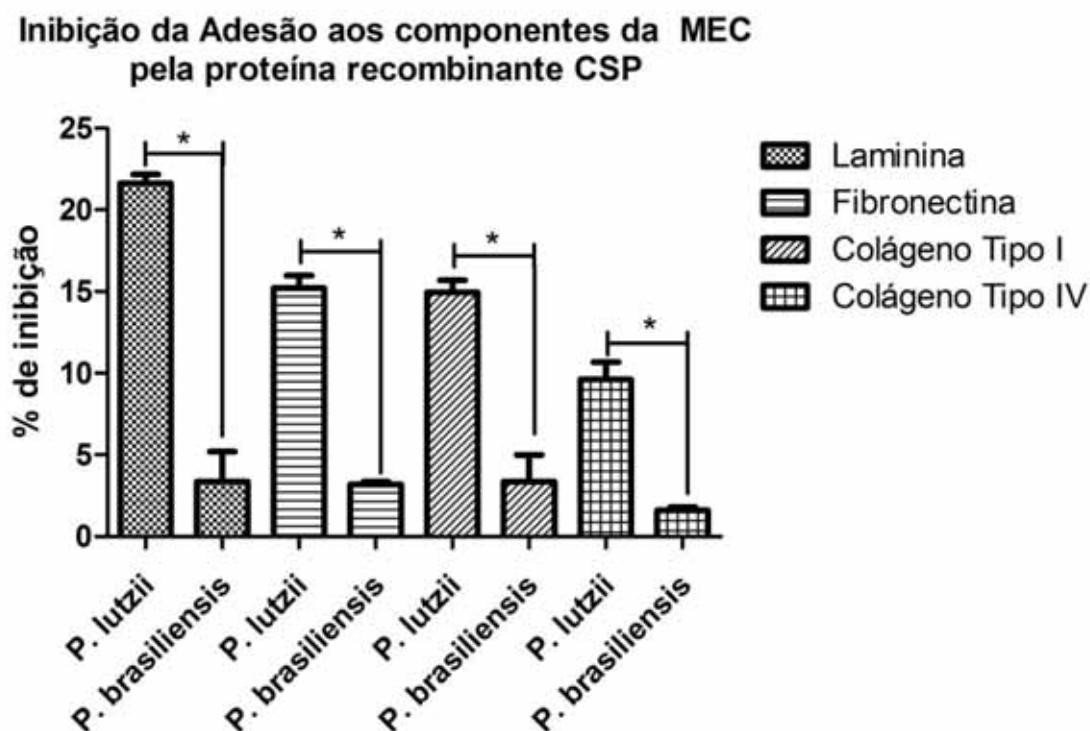


Figura 28. Inibição da adesão de *P. lutzii* e *P. brasiliensis* aos componentes da MEC (laminina, fibronectina, colágeno tipo I e colágeno tipo IV) pela proteína recombinante CSP. * $p < 0,05$.

O tratamento das diferentes matrizes com a proteína CSP levou à uma inibição da adesão de *P. lutzii* significativa frente à todos os componentes da MEC quando comparada com a inibição da adesão de *P. brasiliensis*. Os resultados mostram uma maior inibição da adesão de *P. lutzii* aos componentes Laminina (23%), Fibronectina (17%) e Colágeno I (aproximadamente 16%). A inibição da adesão desta espécie aos componentes da MEC laminina e fibronectina já eram esperados, visto que a primeira vez que esta proteína foi descrita por Oliveira *et al.* (2010), foi durante estudo de

transcriptoma do fungo *P. lutzii* onde o gene correspondente a essa proteína foi expresso durante o contato do fungo com estes dois componentes da MEC. Para *P. brasiliensis* não foi observado uma inibição da adesão significativa, sendo que a inibição para todas as matrizes estudadas ficou em torno de 5%. Estes resultados nos mostra que a CSP pode ser considerada uma adesina para *P. lutzii* e não para *P. brasiliensis*. Estes resultados são importantes já que existem poucas adesinas descritas para *P. lutzii* aumentando assim nosso conhecimento sobre o arsenal molecular utilizado por esta espécie durante sua interação com o hospedeiro.

4.3. Caracterização e identificação de adesinas nas espécies do gênero *Paracoccidioides* por *Phage Display*.

Esta metodologia foi implantada em nosso laboratório e pela primeira vez aplicada à investigação de adesinas de *Paracoccidioides* spp.

4.3.1. Padronização da cultura de *E. coli* K91

4.3.1.1. Testes de Infectividade da Bactéria *E. coli* K91

Antes do início dos experimentos, foram realizadas titulações em diferentes pontos de coleta para assim testar a infectividade da bactéria *E. coli* (K91) em diferentes tempos de crescimento, sendo realizados 10 pontos de coletas distantes em 30 minutos cada, sendo o primeiro em 1h30min e o último em 6h de crescimento. Os resultados estão demonstrados na tabela 4.

Tabela 4. Teste de infectividade da bactéria K91.

Amostra (tempo)	DO	TU
1h30min	0,41	$8,6 \times 10^9$
2h00min	0,71	$2,0 \times 10^{10}$
2h30min	1,16	$1,0 \times 10^{10}$
3h00min	1,52	$6,7 \times 10^9$
3h30min	1,96	$1,7 \times 10^{10}$
4h00min	2,50	$2,2 \times 10^{10}$
4h30min	2,67	$1,2 \times 10^{10}$
5h00min	3,02	$7,7 \times 10^9$
5h30min	3,37	$5,3 \times 10^9$
6h00min	3,57	$8,2 \times 10^9$

Pode-se observar que a partir de 3h00min, a bactéria se encontra em ótimas condições de infectividade com as unidades transdutoras (TU) variando entre 10^9 e 10^{10} e com a DO no valor esperado entre 1.5 e 2.0. Estes testes demonstraram que a bactéria K91 após 3 horas de crescimento já apresenta as características necessárias para a realização da técnica de *Phage Display*.

4.3.2. Técnica *BRASIL* aplicada à *Paracoccidioides brasiliensis* P_b18

4.3.2.1. Titulação das bibliotecas X6 e CX8C

Este experimento foi realizado com as duas bibliotecas de fagos cedidas pelo Prof. Dr. Ricardo Giordano, X6 e CX8C. Como as bibliotecas foram transportadas de São Paulo para Araraquara, antes do início dos *pannings* foi realizada a titulação dessas bibliotecas para verificação das mesmas, sendo os resultados demonstrados na tabela 5 indicando que as bibliotecas, apesar do transporte, continuaram em boas condições para a realização dos experimentos. Após cada *rodada* foi realizada a titulação do fago FD (controle) para verificar se a infectividade da bactéria K91 se mantinha ideal durante todo o experimento.

Tabela 5. Titulação das bibliotecas X6 e CX8C.

Biblioteca	Resultados (TU's)			Branco
	10^8	10^7	10^6	
FD	$4,6 \times 10^9$	$1,5 \times 10^9$	Incontáveis	OK
X6	$1,5 \times 10^9$	$1,6 \times 10^9$	Incontáveis	OK
CX8C	$1,4 \times 10^9$	$4,6 \times 10^8$	$1,0 \times 10^9$	OK

4.3.2.3. Contagem das TUs após 2º e 3º rodadas da técnica *BRASIL*

Conforme descrito anteriormente, após as 2º e 3º rodadas, os fagos ligantes de *P. brasiliensis* foram utilizados para infectar culturas da bactéria K91 e então plaqueadas em meio LB/Kan/Tet para a contagem das unidades transdutoras de colônias. Os resultados estão representados graficamente (Figuras 29 e 30) para o 2º e o 3º rodada, respectivamente abaixo.

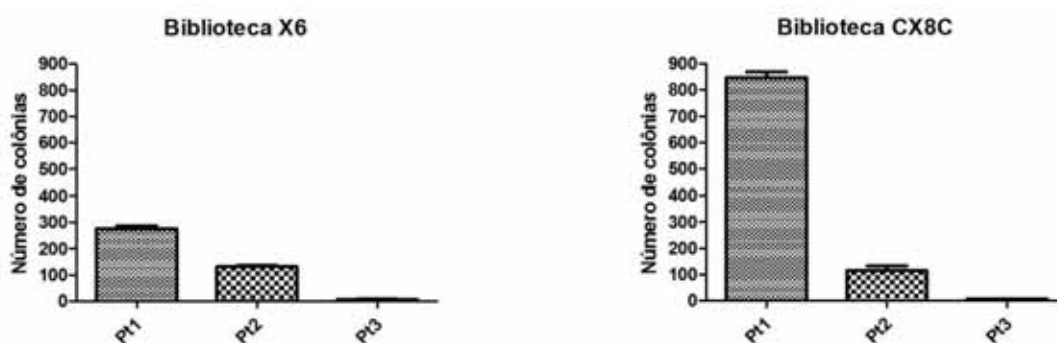


Figura 29. Gráfico representativo do número de unidades transdutoras após a segunda rodada do *phage display*.

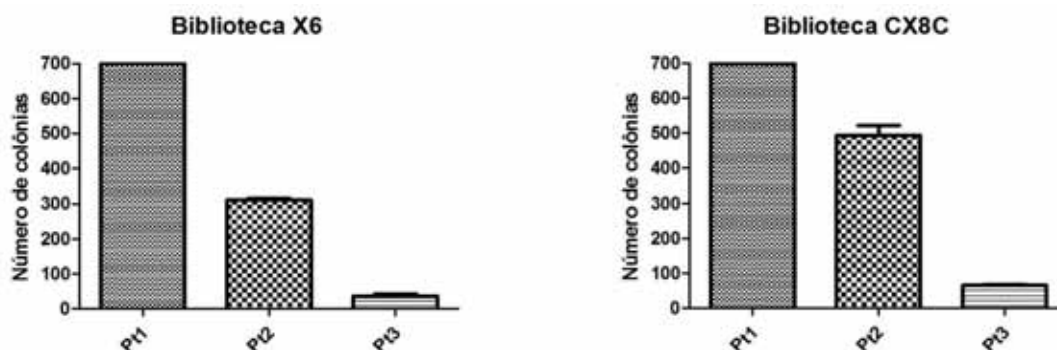


Figura 30. Gráfico representativo do número de unidades transdutoras após a terceira rodada do *phage display*.

As colônias resultantes destes plaqueamentos foram coletadas e armazenadas em 100 uL de PBS/Glicerol e então congeladas à -20°C. Para cada biblioteca foram coletadas 96 colônias.

4.3.2.4. Enriquecimento das bibliotecas após as rodadas

Após a terceira rodada pôde-se observar um enriquecimento das bibliotecas quando comparadas com a segunda rodada (2,3 vezes para a biblioteca X6 e 5 vezes para a biblioteca CX8C), o que era esperado para o experimento, conforme demonstrados nas figuras à seguir onde foi apresentado os resultados para o ponto 2 das duas bibliotecas (figura 31).

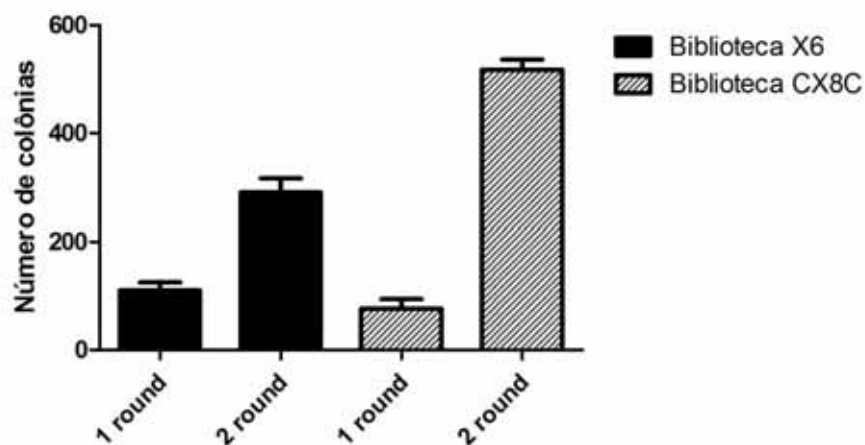


Figura 31. Enriquecimento das bibliotecas X6 e CX8C após as 2ª e 3ª rodadas do *phage display*.

4.3.2.5. Identificação dos fagos ligantes de *P. brasiliensis*

A identificação dos peptídeos expressos pelos fagos foi realizada pelo sequenciamento dos insertos dos fagos, para tanto uma PCR foi realizada conforme item 3.5. Após a PCR, o *amplicon* então foi verificado em gel de agarose 2% corado com GelRed sendo possível a visualização de bandas correspondentes ao tamanho esperado, de aproximadamente 300 pb (Figura 32).

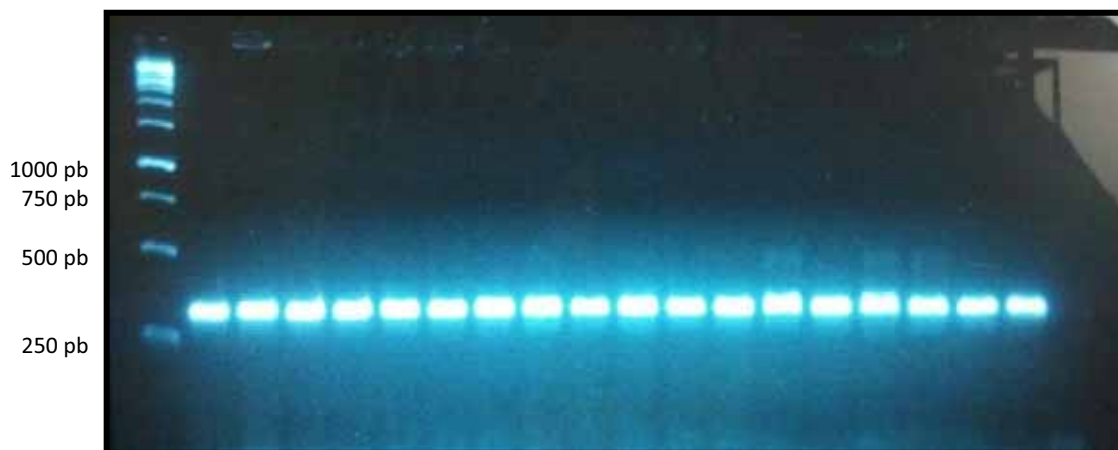


Figura 32. Gel representativo dos resultados da PCR das colônias, em gel de agarose 2% corado com GelRed. Colônias infectadas com o fago recombinante após a PCR devem exibir um produto de 300 pb, e os resultados acima demonstraram positividade para todas as colônias testadas.

4.3.3. Sequenciamento e processamento dos peptídeos ligantes de *P. brasiliensis*

Os produtos da PCR foram então sequenciados e para isso, primeiramente um teste para diferentes diluições das amostras foi realizado para se determinar a melhor quantidade de produto a ser usado na reação de sequenciamento, sendo que as amostras correspondentes ao amplicon sem diluição a amostras diluídas de 1:2 a 1:256 foram estudadas e os melhores resultados foram obtidos nas diluições de 1:4 a 1:64.

A análise das sequências mostrou que a diluição de 1:64 foi a que apresentou melhor resultado, apresentando uma sequência de ótima qualidade. Após o teste, 96 amostras da terceira rodada da técnica BRASIL de cada biblioteca foram então diluídas e sequenciadas no aparelho ABI Prism 3130 da Applied Biosystem seguindo as recomendações do fabricante.

Estas sequências foram primeiramente analisadas no software Sequence Scanner v1.0 (Applied Biosystems), verificando assim a qualidade destas pela análise direta dos eletroferogramas gerados pelo aparelho. As sequências foram então processadas gerando-se o reverso complemento de cada uma utilizando-se o software Reverse Complement (disponível on line http://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html) seguida pela tradução da sequência alvo em peptídeos para posteriores análises pelo software Reverse Translate (disponível on-line http://www.bioinformatics.org/sms2/rev_trans.html). Abaixo está demonstrado dois resultados de sequenciamento e processamento de uma amostra de cada biblioteca

testada. Nas sequências abaixo, o destaque em amarelo mostra a sequência alvo e os destaques em azul e verde mostram as regiões flanqueadoras da sequência alvo (figura 33).

<u>BIBLIOTECA X6</u>	
AMOSTRA D9	CGAAGGGGCGGTCCTTTTCGGACGTTAGTAATGATTTCTGTATGAGGTTTTGCTAAACAACCTTCAACAGTTTCGGCC CCAGCGGCCCCACCAAACCTTAAGATAATAAGCCCGTCGGCCGAGTGAGAAATAGAAAAGGAACAAC TAAAGGAATTG CGAATAATAATTTTCACGTTGAAAAATCCAAAAAAAAGGC TCCAAAAGGAGCCTTTAATGTATCGGTTTATCA GCTTGC
REVERSO COMPLEMENTAR	GCAAGCTGATAAACCGATACAATTAAGGCTCCTTTTGGAGCCTTTTTTTTTGGAGATTTTCAACGTGAAAAAATTATT ATTCGAATTCCTTATGTTTCCTTTCTATTCTACTCGGCCGACGGGGCTTATTAICTTAAAGTTGGTGGGGCCGCTG GGGCCGAAACTGTTGAAAGTTGTTTAGCAAAACCTCATAACAGAAAATCATTACTAACGTCCGAAAAGACCGCCCTT CG
PEPTÍDEO	YYLKFG
<u>BIBLIOTECA CX8C</u>	
AMOSTRA E5	CGTTGGCGTCTTCAGACGTTAGTAATGATTTCTGTATGAGGTTTTGCTAAACAACCTTCAACAGTTTCGGCCCCAGC GGCCCCGCA CGCAAGATTTCCACAACACGCGGGCAAGCCCGTCGGCCGAGTGAGAAATAGAAAAGGAACAAC TAA GGAATTGCGAATAATAATTTTCACGTTGAAAAATCCAAAAAAAAGGC TCCAAAAGGAGCCTTTAATGTATCG TTATCAGCTTG
REVERSO COMPLEMENTO	CAAGCTGATAAACCGATACAATTAAGGCTCCTTTTGGAGCCTTTTTTTTTGGAGATTTTCAACGTGAAAAAATTATTA TTCGAATTCCTTATGTTTCCTTTCTATTCTACTCGGCCGACGGGGCTTGCCCCGCTGTTGTGGAGAAATCTTCGT GCGGGGCGCTGGGGCCGAAACTGTTGAAAGTTGTTTAGCAAAACCTCATAACAGAAAATCATTACTAACGTCTGAAG ACGCCAACG
PEPTÍDEO	CPRVVENLAC

Figura 33. Esquema representativo do processamento de duas sequências de peptídeos ligantes de *P. brasiliensis*.

4.3.4. Caracterização dos peptídeos identificados e seus receptores

As sequências de peptídeos ligantes de *P. brasiliensis* foram então alinhadas utilizando-se o software ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) para então identificar sequências ou *motifs* dentro das sequências que se repetem sendo estas consideradas boas candidatas de moléculas com alta afinidade à parede de *P. brasiliensis*.

Após esta análise quatro peptídeos foram selecionados, sendo três peptídeos provenientes da biblioteca X6 e 1 peptídeo de CX8C. Por tratar-se de moléculas passíveis de patente, a sequência destes peptídeos será protegida e estes serão chamados a partir de agora de Pep1, Pep2, Pep3 e Pep4.

Estas sequências candidatas foram então analisadas pelo software Blast do NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) identificando então possíveis proteínas às quais estas fazem parte, revelando assim possíveis novos alvos para drogas ou então alvos

utilizados pelo fungo durante a interação com o hospedeiro. As análises no Blast foram realizadas alinhando estas sequências com o genoma humano (Tabela 6) buscando assim alvos onde o fungo pode se ligar durante a interação com o hospedeiro.

Tabela 6. Alinhamento das sequências dos peptídeos frente ao genoma humano.

Peptídeo	Resultado BLAST frente ao genoma humano	Número de acesso	Identidade
Pep1	Desmocollin 2	ABM88171.1	100%
	Kinesin family member 7	AAI04045.1	100%
	Tissue transglutaminase homologue	AAB36379.1	100%
Pep2	Collagen, type IV, alpha 3, isoform CRA_c	EAW71105.1	100%
	Leukocyte tyrosine kinase, isoform CRA_g	EAW92501.1	100%
	Thioredoxin reductase 3	AAD39929.1	100%
Pep3	ER membrane protein complex subunit 6	NP_112588.1	88%
	Zinc finger protein 185 isoform 6	NP_001171581.1	100%
	Dynamin, partial	AAA02806.1	100%
Pep4	Transmembrane protein 141	NP_116317.1	100%
	Solute carrier family 40 (iron-regulated transporter), member 1 ou ferroportin	AAH35893.1]	100%
	Endothelial cell-selective adhesion molecule	AAK51065.1	83%
	MBTPS1 membrane-bound transcription factor peptidase, site 1	NP_003782.1	100%

Quando se estudou para o alinhamento das sequências peptídicas frente ao genoma humano, pode-se ver que estes podem ser sequências presentes em algumas proteínas interessantes durante a interação *Paracoccidioides*-hospedeiro e outros patógenos. Um exemplo é o colágeno tipo IV (Pep2), como constituinte da matriz extracelular. Essa proteína é de extrema importância para a infecção de *Paracoccidioides* já que a maioria das adesinas conhecidas para este fungo é ligante de proteínas da MEC. Adesinas conhecidas de *Paracoccidioides* spp. como enolase e malato sintase são adesinas ligantes de colágeno tipo IV (Da Silva Neto *et al.*, 2009; Marcos *et al.*, 2012a).

Pode-se observar o alinhamento do peptídeo 1 com a sequência de uma proteína com domínio transmembrana denominada desmocolina que pode ser um possível alvo ao qual o fungo adere antes de invadir a célula hospedeira. A desmocolina 2 (Pep1). As desmocolinas são moléculas de adesão caderina-like dos desmossomos que atravessam as membranas plasmáticas e atingem espaço entre as células onde se associam

mantendo assim as células firmemente unidas nos tecidos, além disso, no interior das células essas proteínas associam-se aos filamentos de queratina do citoesqueleto, promovendo o firme ancoramento do desmossomo em toda a estrutura celular (Lorimer *et al.*, 1994). A invasão de *Paracoccidioides* afeta a estrutura do citoesqueleto das células epiteliais, interferindo em aspectos morfológicos da actina, tubulina e citoqueratina (Mendes-Giannini *et al.*, 2004). Estudos como o realizado por Monteiro da Silva *et al.* (2007) com células Vero e A549, por Peres da Silva *et al.* (2011) com queratinócitos e por Voltan *et al.* (2013) com macrófagos alveolares demonstram que durante a interação de *Paracoccidioides* com essas células ocorre o desarranjo dos filamentos de actina o que pode facilitar a internalização do fungo na célula hospedeira. A invasão celular pode ocorrer, uma vez que muitos microrganismos patogênicos têm a capacidade de induzir a sua internalização em células epiteliais, ativando mecanismos de fagocitose forçada, onde sinais extracelulares específicos podem estimular o rearranjo do seu citoesqueleto (actina, microtúbulos e citoqueratina), no sítio de contato com o microrganismo (Swanson e Baer, 1995; Swanson e Watts, 1995). Como a desmocolina é uma das proteínas com domínio transmembrana e com interação direta com a actina da célula esta pode ser uma proteína importante para o fungo se associar, causando assim um desarranjo do citoesqueleto celular facilitando assim a infecção. Ainda olhando para a estrutura do citoesqueleto da célula hospedeira, outra possível proteína identificada pelo alinhamento é a kinesina (Pep1) que é uma proteína que promove o transporte de organelas e complexos proteicos através dos microtúbulos do citoesqueleto celular (Miki *et al.*, 2001) e estudos recente mostram essa proteína durante a interação parasita-hospedeiro já que uma toxina produzida por *Pseudomonas aeruginosa*, denominada ExoS, se liga à kinesina de células epiteliais *in vitro* induzindo assim a citotoxicidade, contribuindo para o sucesso do hospedeiro no processo infeccioso (Okuda, Hanabusa e Gotoh, 2014)

Outra proteína que também possui a sequência dos peptídeos encontradas no alinhamento foi a dinamina (Pep3). Avanços recentes no estudo da interação *Paracoccidioides*-hospedeiro, demonstram que durante essa interação o fungo acaba desencadeando a ativação da via endocítica na célula hospedeira (Voltan, 2013) através de proteínas que o fungo tem na sua parede o que acaba levando também ao aumento da expressão de proteínas envolvidas no transporte de vesículas que podem estar carregando para dentro da célula proteínas secretadas pelo fungo que facilitariam sua "estadia" no

interior da célula hospedeira. A dinamina possui papel crítico na fissão da membrana durante o processo de endocitose mediada por clatrininas (McMahon e Boucrot, 2011). Durante a interação de espécies de *Candida* com o hospedeiro o fungo é capaz de induzir a endocitose mediada por clatrininas sendo essa indução realizada através da expressão de invasinas que quando liberadas pelo fungo estimulam o recrutamento de dinamina, além de clatrininas e coractinas para o sítio onde a *Candida* invade as células epiteliais (Yang *et al.*, 2014). Igualmente em *P.brasiliensis* verificou-se que a clatrina pode ter papel fundamental no início da infecção (Voltan, 2012).

Paracoccidioides spp. são considerados fungos intracelulares facultativos (Mendes-Giannini *et al.*, 2000) e por isso a adesão torna-se muito importante, sendo que o fungo além de expressar as adesinas deve se ligar a estruturas e proteínas da célula hospedeira que confirmam certa estabilidade para o fungo. Uma das possíveis proteínas que o fungo pode se ligar também evidenciada pelo alinhamento é a transglutaminase tissular (Pp1). Essa proteína pode ser encontrada tanto no meio intra- quanto no meio extracelular sendo que no meio extracelular ela se liga a proteínas da MEC (Lortat-Jacob *et al.*, 2012), se ligando fortemente a fibronectina (Akimov *et al.*, 2000) contribuindo para a estabilização da MEC, o que a torna uma proteína interessante para o fungo se ligar durante o processo infectivo, já que, além disso, é uma proteína resistente à proteólise por enzimas presentes no meio extracelular (Facchiano, Facchiano e Facchiano, 2006).

Para que ocorra uma colonização bem sucedida do hospedeiro os microrganismos devem inicialmente aderir a tecidos alvos e concomitantemente obter nutrientes essenciais para o seu crescimento, como o ferro, que é requerido para a sobrevivência dos organismos. Dentre os possíveis alvos de ligação do fungo ao hospedeiro encontrado nesse alinhamento pode-se encontrar a proteína *Solute carrier family 40* (iron-regulated transporter), member 1 ou Ferroportina (Pep4), que é uma proteína transmembrana que transporta o ferro do meio intra- para o meio extracelular (Donovan *et al.*, 2000). A infecção por diferentes patógenos como *Leishmania*, *Salmonella enterica*, *Mycobacterium tuberculosis* e *Aspergillus fumigatus*, leva a uma diminuição dos níveis de expressão da ferroportina pelo hospedeiro garantindo assim que ao invadi-lo, o parasita tenha a quantidade necessária de ferro para normalmente se desenvolver e causar a infecção, já que, em macrófagos, o aumento da expressão de ferroportina é uma estratégia para diminuir os teores de ferro intracelular fazendo com

que o parasita não obtenha os níveis necessários de ferro para sua manutenção e assim dificultar o desenvolvimento do fungo conseguindo assim matar o parasita e evitar a infecção (Chlosta *et al.*, 2006; Seifert *et al.*, 2008; Van Zandt *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2013; Ben-Othman *et al.*, 2014). A possibilidade de *Paracoccidioides* se ligar a essa proteína na membrana do hospedeiro pode indicar a tentativa do parasita em obter o ferro exportado do interior da célula do hospedeiro e também a tentativa de degradar essa proteína para que os níveis de ferro no interior das células do hospedeiro sejam *mantidos* e assim, ao invadir as células obter o ferro necessário para sua manutenção e assim causar infecção generalizada.

A análise realizada mostra potenciais alvos ao qual o fungo *Paracoccidioides* se liga durante a interação com o hospedeiro, porém estes potenciais alvos devem ser mais bem estudados.

4.3.5. Ensaios de ligação

Os ensaios de ligação foram realizados para confirmar a capacidade de interação dos peptídeos selecionados a *P. brasiliensis* Pb18 (S1). Ainda este ensaio também foi realizado com outros isolados pertencentes a diferentes espécies filogenéticas, Pb02 (PS2) e Pb01 (Pb01-like). Além disso, o ensaio de ligação foi realizado com fago selvagem Fd frente a Pb18 e também com os peptídeos selecionados frente a *S. cerevisiae* que foi utilizado para fazer o pré-clearing das bibliotecas. A figura 34 mostra o ensaio de ligação do Pep1 frente aos diferentes isolados. Pode-se observar que o Pep1 ligou-se com alta eficiência aos isolados Pb18 e Pb01, também se ligou ao isolado Pb02, porém em menor eficiência. Além disso, os resultados demonstraram uma ligação muito menor do Pep1 à *S. cerevisiae* sendo detectada diferença significativa entre a ligação do controle e dos testes.

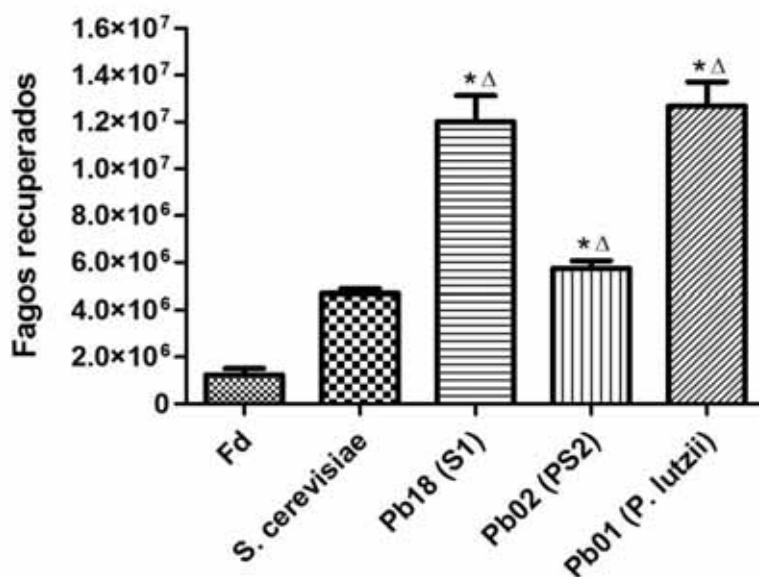


Figura 34. Ensaio de ligação do Pep1 aos diferentes isolados de *S. cerevisiae* e *Paracoccidioides* spp. Fd) Fago selvagem. * diferença estatística em relação à ligação do fago selvagem Fd Δ diferença estatística em relação á ligação do peptídeo à *S. cerevisiae*.

A figura 35 mostra o ensaio de ligação do Pep2 frente aos diferentes isolados. Pode-se observar que o Pep2 se ligou a todos os isolados, porém com alta eficiência a isolado Pb01. Neste caso também foi observada uma menor ligação à *S. cerevisiae*.

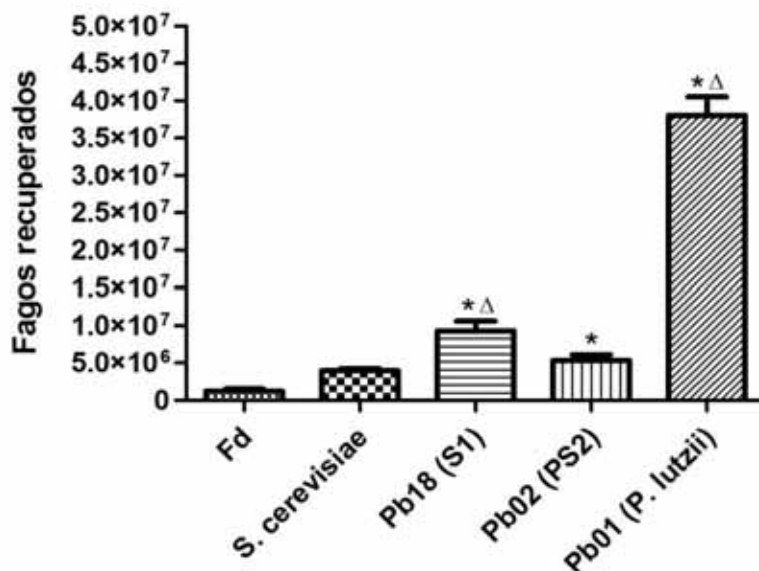


Figura 35. Ensaio de ligação do Pep2 aos diferentes isolados de *S. cerevisiae* e *Paracoccidioides* spp. Fd) Fago selvagem. * diferença estatística em relação à ligação do fago selvagem Fd Δ diferença estatística em relação á ligação do peptídeo à *S. cerevisiae*.

A figura 36 mostra o ensaio de ligação do Pep3 frente aos diferentes isolados. Pode-se observar que o Pep3 se ligou a todos os isolados, porém com alta eficiência ao isolado Pb18. Diferente dos Pep 1 e 2, o Pep3 também se ligou com alta eficiência ao isolado Pb02 e com menor, apesar de alta, eficiência ao isolado Pb01. Neste caso também foi observada uma menor ligação à *S. cerevisiae*.

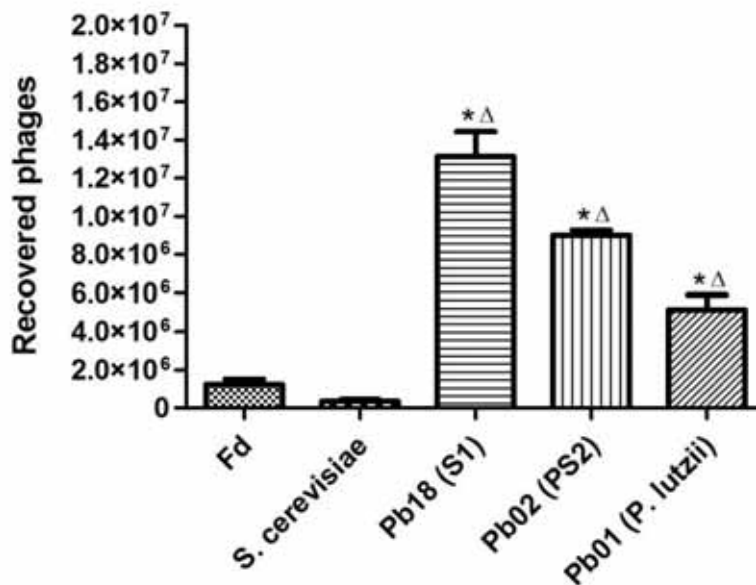


Figura 36. Ensaio de ligação do Pep3 aos diferentes isolados de *S. cerevisiae* e *Paracoccidioides* spp. Fd) Fago selvagem. * diferença estatística em relação à ligação do fago selvagem Fd Δ diferença estatística em relação à ligação do peptídeo à *S. cerevisiae*.

A figura 37 mostra o ensaio de ligação do Pep4 frente aos diferentes isolados. Pode-se observar que o Pep4 se ligou a todos os isolados, porém com alta eficiência ao isolado Pb18, seguido pelo isolado Pb01. Apesar de se ligar com menor eficiência, também se ligou fortemente ao isolado Pb02. Neste caso também foi observada uma menor ligação à *S. cerevisiae*.

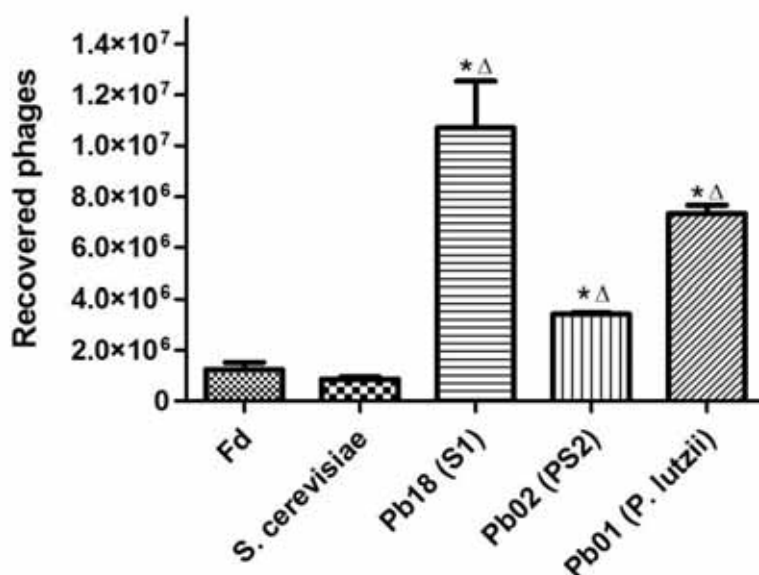


Figura 37. Ensaio de ligação do Pep4 aos diferentes isolados de *S. cerevisiae* e *Paracoccidioides* spp. Fd) Fago selvagem. * diferença estatística em relação à ligação do fago selvagem Fd Δ diferença estatística em relação á ligação do peptídeo à *S. cerevisiae*.

Os resultados obtidos no ensaio de ligação mostram que a técnica de *Phage Display* resultou na seleção de quatro peptídeos que possuem uma eficiência muito grande a parede não só do isolado Pb18, porém também dos isolados Pb02 e Pb01. A técnica se mostrou de grande valia para o uso na prospecção de ligantes da superfície de diferentes espécies filogenéticas do gênero *Paracoccidioides*.

4.3.6. Ensaio de inibição da adesão de *Paracoccidioides* aos componentes da matriz extracelular através do teste de inib-ELISA

Os ensaios de inibição foram realizados para avaliar a capacidade dos peptídeos selecionados de inibir a adesão de *Paracoccidioides* aos componentes da MEC. Os ensaios foram realizados para quatro diferentes componentes da MEC (laminina, fibronectina, colágeno tipo I e colágeno tipo IV) e os resultados estão demonstrados nas figuras 38, 39, 40 e 41 que representam a capacidade de inibição da adesão dos peptídeos 1, 2, 3 e 4, respectivamente.

A figura 38 mostra a inibição da adesão aos componentes da MEC pelo peptídeo 1 por ELISA de inibição. Os resultados demonstram que este peptídeo inibiu a adesão a todos os componentes da MEC. Pode-se destacar a inibição à ligação de todos os

isolados a fibronectina e para os isolados Pb01 e Pb02 houve grande inibição da adesão também à laminina sendo que as taxas de inibição foram superiores a 50%.

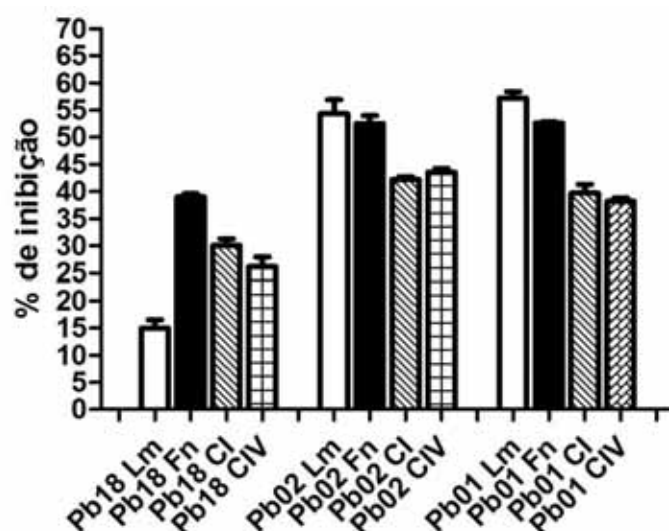


Figura 38. Ensaio de inibição da adesão pelo Pep1 dos diferentes isolados *Paracoccidioides* spp. frente aos componentes da MEC, determinado pelo método de inib-ELISA. Lm-laminina; Fn-fibronectina; CI-colágeno I; CIV-colágeno IV.

A figura 38 mostra a inibição da adesão aos componentes da MEC pelo peptídeo 2. Os resultados demonstram que este peptídeo também inibiu a adesão a todos os componentes da MEC. Pode-se destacar a inibição à ligação de todos os isolados a fibronectina e colágeno tipo I. As taxas de inibição foram superiores a 25% sendo maior que 30% para o isolado Pb18 frente ao colágeno tipo I.

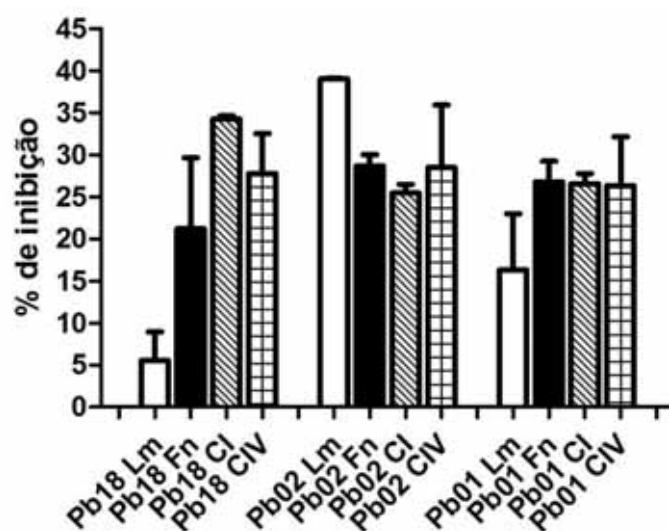


Figura 39. Ensaio de inibição da adesão pelo Pep2 dos diferentes isolados *Paracoccidioides* spp. frente aos componentes da MEC, determinado pelo método de inib-ELISA. Lm-laminina; Fn-fibronectina; CI-colágeno I; CIV-colágeno IV.

A figura 40 mostra a inibição da adesão aos componentes da MEC pelo peptídeo 3. Os resultados demonstram que este peptídeo também inibiu a adesão a todos os componentes da MEC, porém pode-se destacar a inibição à ligação de todos os isolados alaminina que foi maior que 35%.

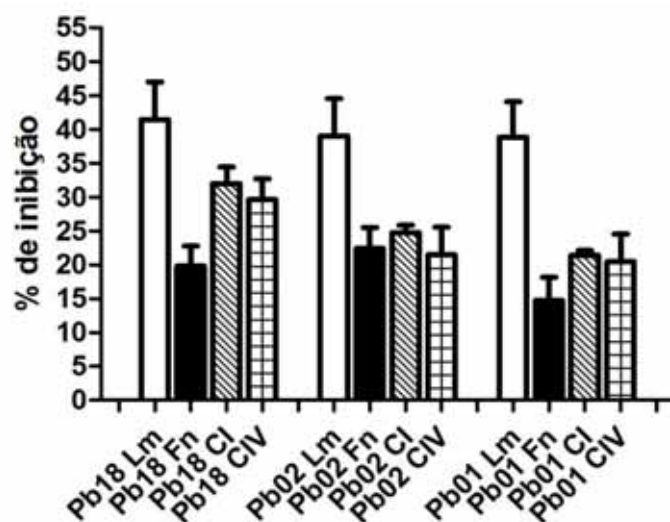


Figura 40. Ensaio de inibição da adesão pelo Pep3 dos diferentes isolados *Paracoccidioides* spp. frente aos componentes da MEC, determinado pelo método de inib-ELISA. Lm-laminina; Fn-fibronectina; CI-colágeno I; CIV-colágeno IV.

A figura 41 mostra a inibição da adesão aos componentes da MEC pelo peptídeo 4. Os resultados demonstram que este peptídeo também inibiu a adesão a todos os componentes da MEC, porém pode-se destacar a inibição à ligação de todos os isolados alaminina que foi maior que 50% para o isolado Pb18 e cerca de 40% para os outros isolados.

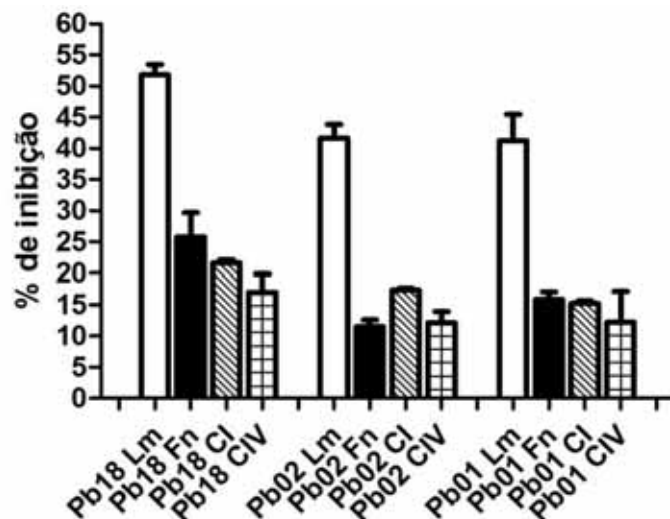


Figura 41. Ensaio de inibição da adesão pelo Pep4 dos diferentes isolados *Paracoccidioides* spp. frente aos componentes da MEC, determinado pelo método de inib-ELISA. Lm-laminina; Fn-fibronectina; CI-colágeno I; CIV-colágeno IV.

4.3.7. Ensaio de inibição da adesão de *Paracoccidioides* à pneumócitos A549

Estes ensaios foram realizados para avaliar a capacidade dos peptídeos selecionados de inibir a adesão de *Paracoccidioides* à pneumócitos A54 e os resultados mostraram que os quatro peptídeos selecionados foram capazes de inibir a adesão dos fungos do gênero *Paracoccidioides*, com valores de inibição acima de 40% (figura 42).

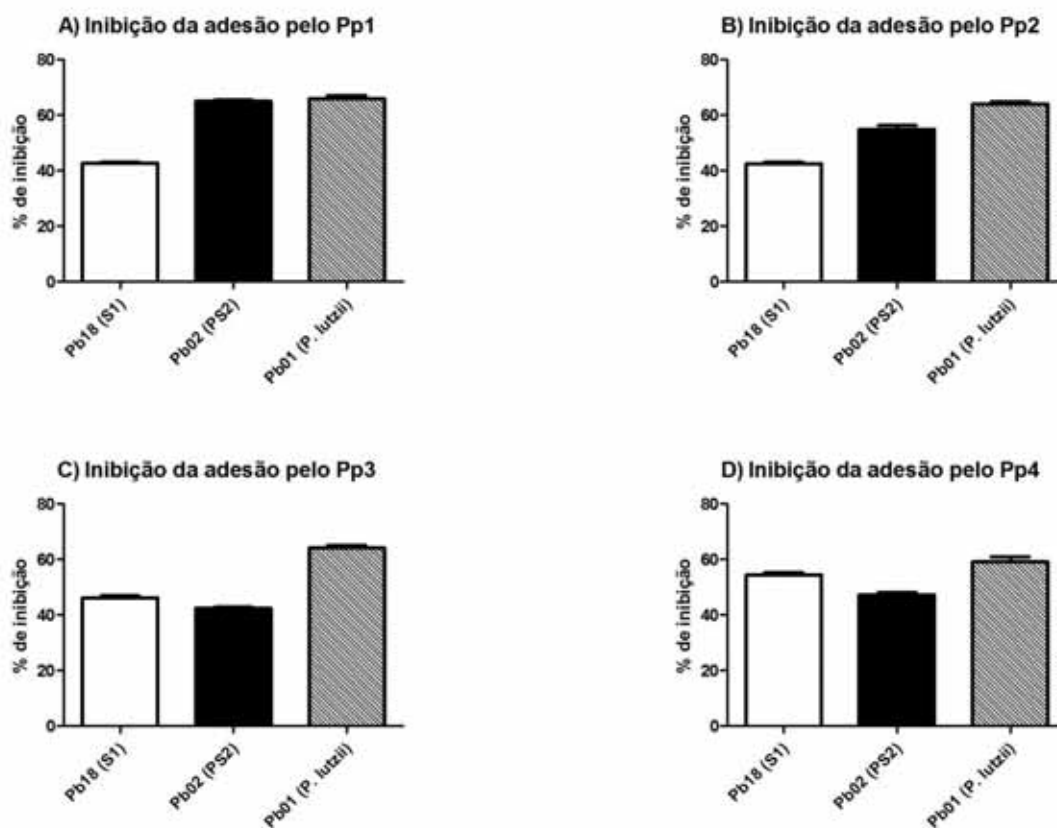


Figura 42. Ensaio de inibição da adesão de *Paracoccidioides* spp. à cultura de pneumócitos A549 pelo método inib-ELISA.

O desenvolvimento de novas terapias antimicrobianas tem se tornado cada vez mais desafiador principalmente pela problemática da sempre crescente resistência crescente, o que leva a uma busca por novos agentes antimicrobianos que possuam mecanismos diferentes dos conhecidos que possam efetivamente combater infecções e não contribuir para a resistência dos patógenos dificultando assim a terapia (Krachler e Orth, 2013). Como já discutido anteriormente, o primeiro passo na infecção por *Paracoccidioides* é a adesão do fungo à célula hospedeira sendo que a habilidade do patógeno em colonizar e invadir os tecidos do hospedeiro é estritamente dependente deste primeiro passo. Neste sentido o uso de moléculas que interferem na adesão dos patógenos, denominada terapia anti-adesiva, surge como uma maneira eficiente para prevenir infecções. Os mecanismos destes potenciais agentes terapêuticos incluem a inibição das adesinas e de seus receptores no hospedeiro, vacinação com adesinas ou análogos, uso de probióticos e suplementos alimentares que interferem na interação receptor-adesina e manipulação de interações hidrofóbicas (Cozens e Read, 2012).

Os peptídeos selecionados através do *Phage Display* (Pp1, Pp2, Pp3 e Pp4) promoveram a inibição da ligação de *Paracoccidioides* (todos os isolados testados) aos diferentes componentes da MEC (laminina, fibronectina, colágeno I e colágeno IV) e à pneumócitos A549. Esses resultados são bastante promissores, pois, através da sequência desses peptídeos, podemos direcionar o estudo para um melhor entendimento da interação patógeno hospedeiro, uma vez que conhecendo as peculiaridades do bloqueio de ligação a cada componente da MEC e à pneumócitos em diferentes isolados de *Paracoccidioides* podemos rastrear moléculas semelhantes aplicáveis à profilaxia e terapêutica da PCM. Até recentemente, tecnologias baseadas na metodologia de phage display foram usadas principalmente para produzir anticorpos monoclonais dirigidos contra diferentes alvos, principalmente, com atividade anti-neoplásica e anti-inflamatória. Hoje, porém, esta ferramenta mostra-se poderosa para a seleção de novos peptídeos e desenvolvimento de anticorpos que se pode ligar a uma grande variedade de antígenos e se constitui em uma nova ferramenta para descoberta de moléculas anti-infecciosas ((Huang, Bishop-Hurley e Cooper, 2012).

4.3.8. Determinação da atividade antifúngica dos peptídeos selecionados

O potencial como antifúngico dos 04 peptídeos selecionados foi avaliado através da determinação da concentração inibitória mínima (CIM). Os resultados demonstraram que os peptídeos selecionados não têm a capacidade de matar ou de inibir o crescimento dos diferentes isolados de *Paracoccidioides* spp. avaliados (Tabela 7).

Tabela 7. Determinação da concentração inibitória mínima-CIM- dos peptídeos desenvolvidos a partir da metodologia de phage display frente a *Paracoccidioides* spp.

Peptides	CIM para os diferentes isolados de <i>Paracoccidioides</i>		
	Pb18	Pb01	Pb02
Pep1	>120 ug (1,2 ug/uL)	>120 ug (1,2 ug/uL)	>120 ug (1,2 ug/uL)
Pep2	>120 ug (1,2 ug/uL)	>120 ug (1,2 ug/uL)	>120 ug (1,2 ug/uL)
Pep3	>120 ug (1,2 ug/uL)	>120 ug (1,2 ug/uL)	>120 ug (1,2 ug/uL)
Pep4	>120 ug (1,2 ug/uL)	>120 ug (1,2 ug/uL)	>120 ug (1,2 ug/uL)

4.3.9. Determinação da atividade citotóxica dos peptídeos selecionados por teste de sensibilidade do MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)

O teste de viabilidade foi realizado para analisar se os peptídeos selecionados têm atividade citotóxica em duas diferentes linhagens celulares: pneumócitos A549 e HepG2 e os resultados estão demonstrados nas figuras 43 e 44, e podemos observar que os peptídeos selecionados têm pouca atividade citotóxica, sendo que a porcentagem de células viáveis se manteve acima de 60% em todas as concentrações testadas.

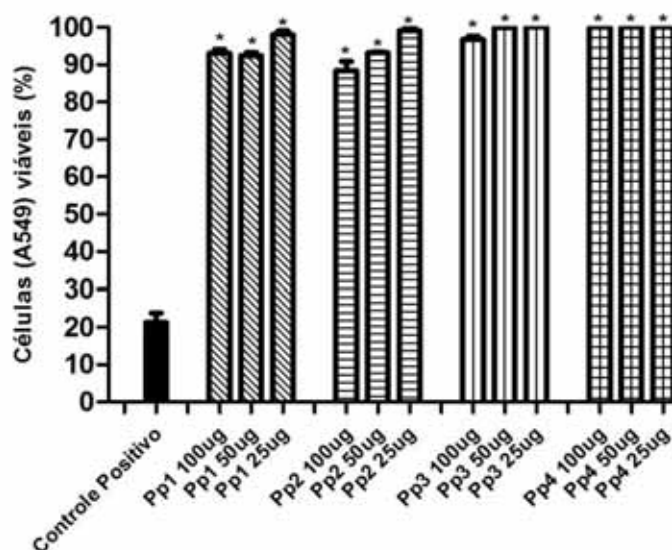


Figura 43. Viabilidade celular após tratamento de pneumócitos A549 com os peptídeos selecionados em diferentes concentrações variando de 25 a 100 µg; controle positivo = * $p < 0,01$.

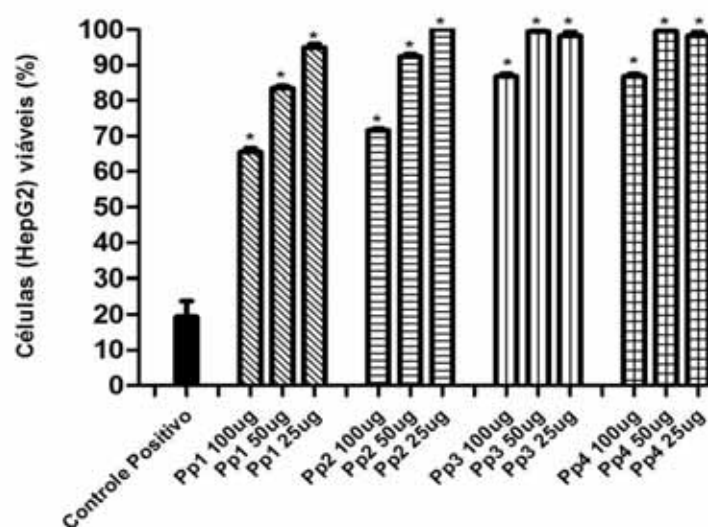


Figura 44. Viabilidade celular após tratamento da linhagem Hep-G2 com os peptídeos selecionados em diferentes concentrações variando de 25 a 100 µg; controle positivo = * $p < 0,01$.

4.3.10. Ensaios preliminares *in vivo* usando *Galleria mellonella* como modelo

Estes ensaios foram realizados com o objetivo de avaliar a capacidade dos peptídeos selecionados em evitar a infecção de *Paracoccidioides* spp. em larvas de *Galleria mellonella*.

As larvas de *G. mellonella* estão sendo crescentemente usadas como um modelo de infecção para o estudo de fatores de virulência e patogênese de muitos patógenos fúngicos e bacterianos (Cook e McArthur, 2013). Modelos murinos ainda são considerados o padrão ouro para o estudo da patogênese, entretanto, considerações econômicas, logísticas e éticas limitam o uso de mamíferos em experimentos de infecção, especialmente quando o experimento requer a análise de um grande número de cepas (Jacobsen, 2014). Além disso, estudos comparativos entre modelo animal murino e *Galleria mellonella* foram realizados demonstrando a correlação entre os modelos, sendo então o emprego de *Gallerias* recomendado como alternativa em estudos de virulência e patogenicidade de patógenos fúngicos (Brennan *et al.*, 2002; Slater *et al.*, 2011). Neste sentido, o modelo de *G. mellonella* é um modelo atrativo, pois pode ser mantido em diferentes temperaturas entre 25°C e 37°C (Fuchs e Mylonakis, 2006), é facilmente inoculada por injeção ou aplicação tópica (Mylonakis *et al.*, 2005;

Scully e Bidochka, 2005), e alguns aspectos do seu sistema imune apresenta homologia com a resposta imune inata de mamíferos (Vilmos e Kurucz, 1998; Kavanagh e Reeves, 2004), onde os patógenos são reconhecidos por receptores de reconhecimento de patógenos e podem ser fagocitados pelos hemócitos, uma função similar aos neutrófilos de mamíferos, e também semelhante aos neutrófilos, os hemócitos usam espécies reativas de oxigênio e enzimas líticas para eliminar os microrganismos (Bergin *et al.*, 2005; Jacobsen, 2014).

A hemolinfa de *Galleria*, é formada por diferentes tipos de hemócitos, atua na defesa contra patógenos fúngicos (Fuchs e Mylonakis, 2006). A densidade hemocitária e a sobrevivência de *Galleria* são indicadores de patogênicidade, sendo que fungos não patogênicos resultam em altos níveis de hemócitos, enquanto patogênicos resultam na redução dos níveis de hemócitos (Bergin, Brennan e Kavanagh, 2003), mostrando um efeito semelhante a uma imunossupressão importante dos fungos patogênicos.

Diversos estudos de patogenicidade, virulência e eficiência de antifúngicos já foram realizados com diversos patógenos fúngicos em *G. mellonella*: *Candida* spp. (Mesa-Arango *et al.*, 2013; Scorzoni *et al.*, 2013; Borghi *et al.*, 2014; Jacobsen, 2014), *Cryptococcus* spp. (Mylonakis *et al.*, 2005; García-Rodas *et al.*, 2011; Lev *et al.*, 2013), *Aspergillus* spp. (Banville *et al.*, 2011; Fallon, Reeves e Kavanagh, 2011; Fallon, Troy e Kavanagh, 2011; Browne, Surlis e Kavanagh, 2014; Gomez-Lopez *et al.*, 2014), *Fusarium* spp. (Coleman *et al.*, 2011; Navarro-Velasco *et al.*, 2011) entre outros.

Apenas um estudo de *Paracoccidioides* spp. em *G. mellonella* foi publicado até o momento. Neste estudo, Thomaz *et al.*, (2013) avaliaram a funcionalidade do modelo para o estudo dos fungos dimórficos *P. lutzii* e *Histoplasma capsulatum* e concluíram que este é um modelo potencialmente útil para o estudo da virulência de fungos dimórficos.

Por todas essas características utilizamos o modelo de *Galleria mellonella* para entender como os quatro peptídeos selecionados no *Phage Display* poderiam interferir na virulência de *Paracoccidioides*.

4.3.11. Toxicidade dos peptídeos selecionados em *Galleria mellonella*

A toxicidade dos peptídeos selecionados foi avaliada também nas larvas de *Galleria mellonella*, sendo testadas diferentes concentrações dos peptídeos (2, 8, 50,

100, 200 e 400 $\mu\text{g/larva}$). Após o tratamento a sobrevivência das larvas foi observada por 07 dias e pôde-se observar que nas concentrações testadas, nenhuma larva morreu, demonstrando que os peptídeos não foram tóxicos para as larvas, nos dando a segurança necessária para a interpretação dos resultados a serem obtidos com o objetivo de avaliar a capacidade destes peptídeos em evitar a infecção de *Paracoccidioides* spp. nas larvas. Além disso, esses resultados somam-se aos testes *in vitro* onde também observamos em que se observou que os peptídeos apresentaram baixa toxicidade para duas linhagens celulares testadas, A549 e HepG2.

4.3.12. Capacidade dos peptídeos selecionados de evitar a infecção por *Paracoccidioides* spp.

Com a constatação de que os peptídeos não eram tóxicos para as larvas de *G. mellonella* passou-se a avaliação da capacidade dos peptídeos evitarem a infecção das larvas por *Paracoccidioides*. Para tanto, as larvas foram tratadas com 100 μg de cada peptídeo separadamente por 03 e 24 horas, seguido da inoculação dos isolados Pb01 (*P. lutzii*) em uma concentração de inóculo de 5×10^6 céls/mL e então a sobrevivência das larvas observadas durante 07 dias (figuras 45 e 46).

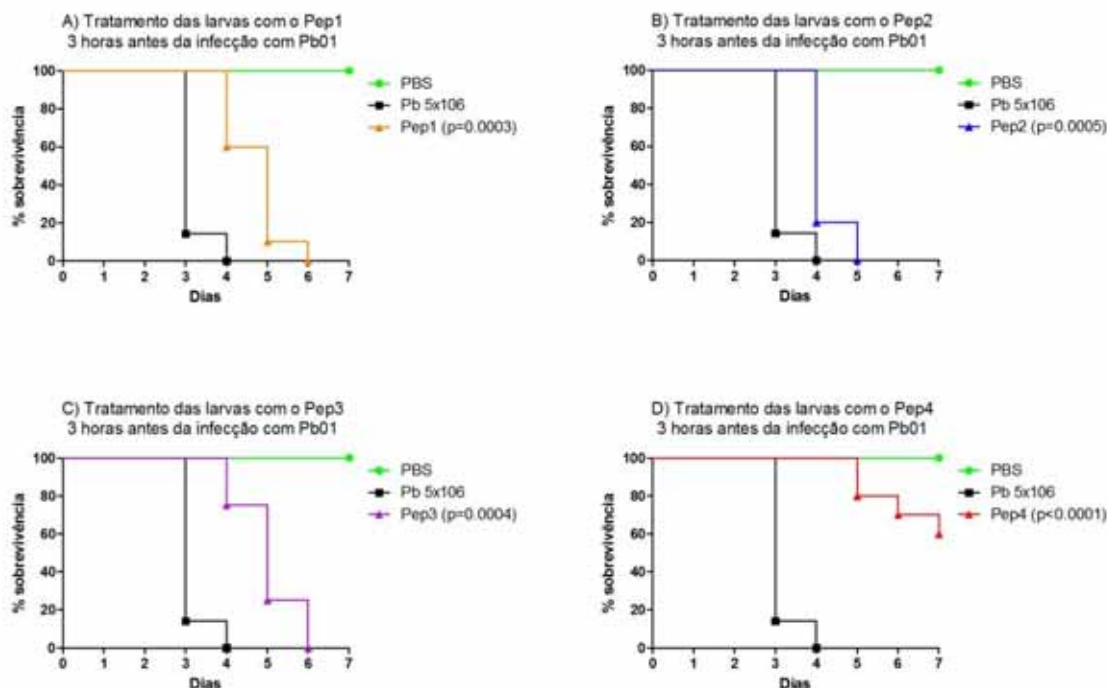


Figura 45. Sobrevivência de larvas de *Galleria mellonella* infectadas com o isolado Pb01 (*P. lutzii*) após tratamento com os diferentes peptídeos selecionados por 3 horas.

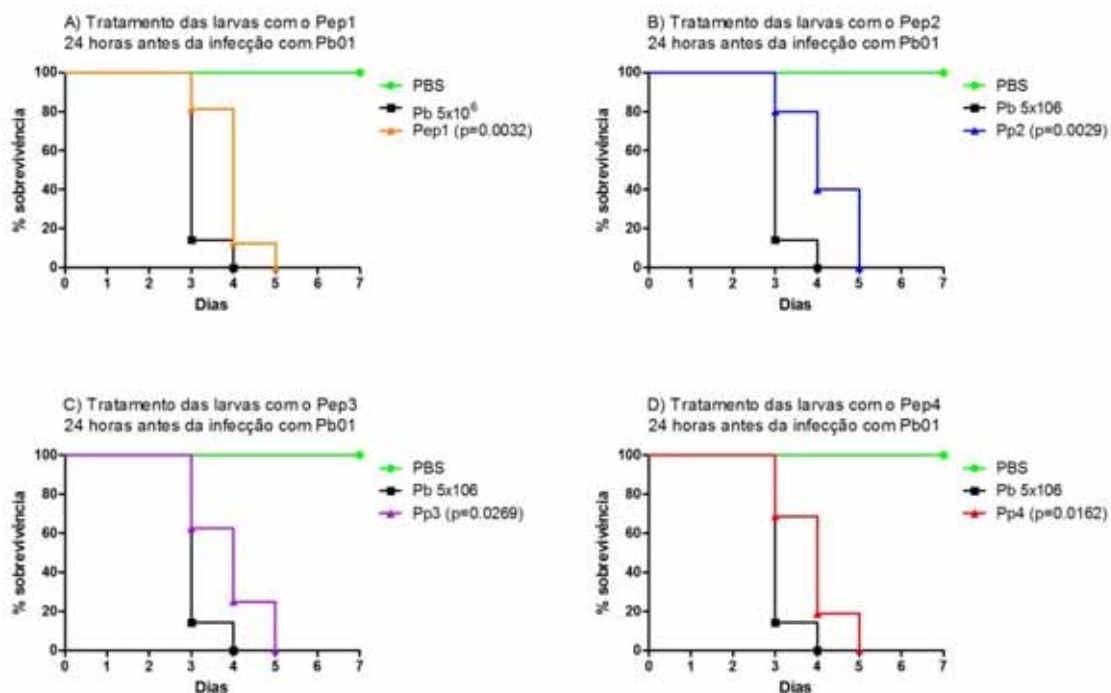


Figura 46. Sobrevivência de larvas de *Galleria mellonella* infectadas com o isolado Pb01 (*P. lutzii*) após tratamento com os diferentes peptídeos selecionados por 24 horas.

Para o tratamento da PCM sugere-se o itraconazol como a opção terapêutica que permitiria o controle das formas leves e moderadas da doença em menor período de tempo, também a combinação sulfametoxazol-trimetoprim é a alternativa mais utilizada na terapêutica ambulatorial dos pacientes com PCM. Pacientes com formas graves, necessitando internação hospitalar, devem receber anfotericina B ou associação sulfametoxazol/trimetoprim por via intravenosa. A duração do tratamento relaciona-se à gravidade da doença e ao tipo de droga utilizada. Usualmente, o tratamento é de longa duração, para permitir o controle das manifestações clínicas da micose e evitar as recaídas, porém as recaídas são comuns na PCM (Shikanai-Yasuda *et al.*, 2006). Além disso, sabe-se da importância na busca por novos agentes antifúngicos desde que o arsenal disponível ainda é limitado e a maioria possui alta toxicidade.

Neste sentido, a busca por novos agentes que inovem o mecanismo de ação são de extrema importância e urgência para o tratamento da PCM assim como para o tratamento das demais micoses sistêmicas.

Como discutido anteriormente, a adesão é um processo de extrema importância para o estabelecimento de *Paracoccidioides* no hospedeiro e em termos inovadores, dificultar a adesão do fungo às células hospedeiras pode ser uma forma eficiente no

auxílio ao combate da infecção, sendo que, impossibilitado de aderir, o fungo ficará impedido de colonizar diferentes tecidos do hospedeiro, a aquisição de nutrientes será dificultada, o que conseqüentemente resultará numa maior facilidade do sistema imune do hospedeiro combater essa infecção. Esse tipo de terapia, denominada terapia anti-adesiva, como discutida anteriormente, pode ser uma forma eficiente de aumentar a eficácia do tratamento da PCM.

Para o isolado Pb01 de *P. lutzii* pudemos observar que quando as larvas foram tratadas com todos os peptídeos, tanto por 03 como 24 horas, a curva de sobrevivência sofreu uma modificação, alterando, de forma significativa o tempo em que as larvas levaram para morrer. Porém quando foi realizado o tratamento por 3 horas antes da infecção pôde-se observar que a morte das larvas começa a ocorrer no quarto dia de infecção, enquanto o tratamento realizado 24 horas antes da infecção começou a observar a morte das larvas no terceiro dia de infecção. Acreditamos que isso ocorra, pois, provavelmente, a disponibilidade destes peptídeos para se ligarem ao fungo durante a infecção deve ser maior quando inoculados 03 horas antes da infecção, e com isso, estes peptídeos livres na larva se ligam à parede do fungo dificultando assim a adesão às células do hospedeiro, o que pode refletir na capacidade deste fungo em causar infecção e levar as larvas à morte, evidenciando assim que estes peptídeos têm potencial como agentes de terapia anti-adesivas e esta relação peptídeos-fungo-hospedeiro deve ser mais bem investigada. Devemos destacar o peptídeo 4, que após 03 horas de tratamento apresentou a taxa de sobrevivência foi de 60% indicando que para esta espécie este peptídeo tem a capacidade de evitar eficazmente a infecção, protegendo assim o hospedeiro.

Apesar do tempo de sobrevivência ser menor nas larvas tratadas com os peptídeos por 24 horas, pode-se observar que há uma diferença significativa na taxa de sobrevivência quando comparada com o controle sem tratamento, indicando que, após as 24 horas de tratamento os peptídeos estão agindo dificultando assim a infecção do fungo.

O uso das larvas de *G. mellonella* nos demonstra uma segurança para a realização destes testes em modelos murinos, já que resultados aqui apresentados, apesar de preliminares, nos sugerem que estes peptídeos são moléculas com potencial capacidade de interferir na interação *Paracoccidioides*-hospedeiro, sendo de uso potencial em novas terapias anti-adesivas ou como adjuvantes às terapias já estabelecida

para a PCM. Neste sentido, esta abordagem é inovadora em se tratando de terapia antifúngica e mesmo anti-infecciosa.

4.3.13. Determinação da densidade hemocitária

Como uma forma de entender o efeito dos peptídeos sobre a fisiologia de *G. mellonella* avaliou-se a densidade hemocitária das larvas que representam as células do sistema imune do hospedeiro. Para tanto, após 03 e 24 horas de tratamento das larvas com os peptídeos, a hemolinfa das larvas foi coletada e então o número de células determinado (figura 47).

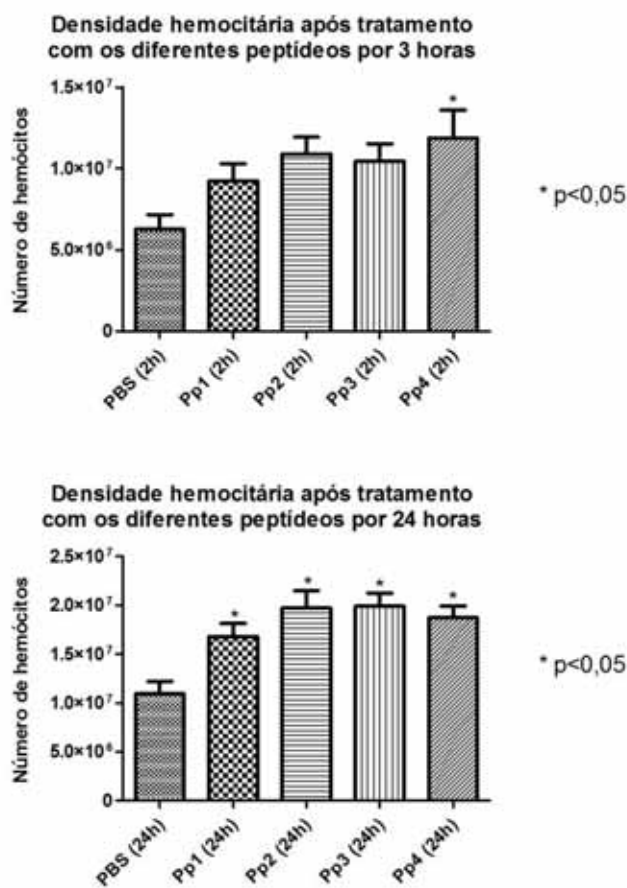


Figura 47. Densidade hemocitária após tratamento das larvas por 3 e 24 horas com os peptídeos advindos de estudo com phage display, sendo observado o aumento do número de hemócitos após o tratamento das larvas com os peptídeos.

A estimulação da resposta imune para evitar efeitos indesejáveis causados pela doença e a redução da carga fúngica são objetivos a ser buscados para um tratamento efetivo de casos severos de PCM (Travassos e Taborda, 2012).

A cavidade corpórea da larva *G. mellonella* contém hemolinfa, que tem função análoga ao sangue nos mamíferos, transportando nutrientes e moléculas de sinalização, além de participar na respiração (Bergin, Brennan e Kavanagh, 2003). Adicionalmente, a hemolinfa contém células (hemócitos) e peptídeos anti-microbianos capazes de imobilizar e matar microrganismos invasores (Cotter, Doyle e Kavanagh, 2000). Em estudo realizado por Bergin et al. (2003) larvas foram infectadas com isolados de alta patogenicidade (isolados capazes de matar >80% de larvas infectadas) resultava em uma significativa redução na densidade hemocitária, por outro lado, larvas infectadas com isolados com baixa patogenicidade (isolados capazes de matar <20% de larvas infectadas) resultava em uma pequena flutuação no número de hemócitos, indicando que a densidade hemocitária esta diretamente relacionada com a patogenicidade dos isolados. Esta mesma observação foi feita por Scorzoni *et al.* (artigo submetido) para diferentes isolados de *Paracoccidioides*.

Os resultados encontrados em nossos experimentos de avaliação da densidade hemocitária das larvas após o tratamento com os diferentes peptídeos nos mostram que de alguma forma estes modulando o sistema imunológico da larva causando uma resposta na maior produção de hemócitos o que parece provocar um efeito protetor no hospedeiro, e isso, pode resultar na proteção contra a infecção de *Paracoccidioides* spp. mostrando que estes peptídeos podem além de funcionar como moléculas anti-adesivas, eles também podem estimular o sistema imune do hospedeiro contra a infecção pelo fungo. Estudos nesse sentido estão em desenvolvimento, eos peptídeos desenvolvidos em nosso estudo têm aparente efeito estimulante, o que também é importante na terapia anti-micótica. Em outros estudos, esta abordagem tem sido empregada, como em vírus e bactérias (Sainath Rao, Mohan e Atreya, 2013; Lü *et al.*, 2014).

Estudos com um peptídeo derivado da gp43 de *P. brasiliensis*, conhecida adesina do fungo, denominado p10, reconhecido por linfócitos T de camundongos e humanos apresenta efeito protetor, sendo que camundongos isogênicos desenvolveram infecção 200 vezes menos intensa quando imunizados com este peptídeo (Taborda *et al.*, 1998). Além disso, a combinação entre a imunização pelo peptídeo p10 com diferentes drogas antifúngicas demonstrou efeito protetor aditivo, sendo observada redução significativa na contagem de CFU após 60 e 120 dias de infecção, além disso, análises histológicas, com poucas ou nenhuma células de *Paracoccidioides* foram detectadas, sendo então recomendado o uso do peptídeo p10 associado com drogas a

fim de melhorar a terapia regular com drogas antifúngicas e diminuir a duração do tratamento (Marques *et al.*, 2006) sendo que este tipo de combinação também é eficiente em camundongos anérgicos, sendo a anergia uma situação comum em pacientes acometidos com as formas agudas e sub-agudas da PCM (Marques *et al.*, 2008). Atualmente estudos com uma vacina de DNA codificadora do p10 têm mostrado resultados satisfatórios, sendo que a vacina administrada um mês antes ou após a infecção dos camundongos induziu a uma redução significativa na carga fúngica nos pulmões indicando que a imunização com esta vacina é um procedimento poderoso para a prevenção e tratamento da PCM (Rittner *et al.*, 2012).

Estes avanços na terapia da PCM indicam que os resultados preliminares encontrados nesse trabalho são animadores e que devemos focar o estudo do papel desses peptídeos na prevenção e tratamento da PCM. Estudos com modelo murino são necessários para se estabelecer o tipo de resposta que a imunização com estes peptídeos pode causar no hospedeiro e qual curso tomará a infecção em camundongos tratados com os diferentes peptídeos e, além disso, estudos focados nos efeitos da imunização com os peptídeos seguido dos tratamentos conhecidos da doença. O estudo com *G. mellonella* mostra de forma preliminar que é válido o investimento nesses estudos já que estes foram capazes de aumentar a taxa de sobrevivência das larvas e ainda provocar um aumento na quantidade de hemócitos demonstrando assim a modulação do sistema imune da larva após o tratamento.

4.4. Construção de biblioteca de *Phage Display* a partir do DNA de *Paracoccidioides spp.*

Esta parte do trabalho foi desenvolvida no Medical College of Wisconsin, na cidade de Milwaukee, WI, USA sob a supervisão da Profa. Dra. Jenifer Coburn, que tem experiência no desenvolvimento de bibliotecas de *Phage Display* com o objetivo de identificar adesinas em bactérias patogênicas. Da mesma forma a ideia foi empregar esta metodologia para ampliar-se o repertório de adesinas de *P. brasiliensis* a partir de biblioteca deste fungo.

4.4.1. Extração de DNA genômico de *P. brasiliensis*

Devido à necessidade de grande quantidade de DNA para a produção da biblioteca, diversas extrações independentes foram realizadas e fez-se então um *pool* de

que foi analisado previamente em nosso laboratório (Figura 48A). As amostras foram quantificadas e tiveram a pureza analisada por espectrofotometria (NanoVue Plus, GE) e para a construção das bibliotecas, apenas amostras que apresentaram a pureza entre os valores 1.8 e 2.0 foram utilizadas. Estas extrações foram realizadas ainda no Brasil devido a impossibilidade de levar o microrganismo para os EUA já que no país não existe o fungo *P. brasiliensis*. Após a extração o DNA foi enviado em gelo seco para o laboratório da Profa. Dra. Jenifer Coburn. Antes de iniciar os experimentos nos EUA, um novo gel de agarose 1% para a verificação do DNA foi realizado para a verificação da integridade da amostra. Ao visualizar o gel, pudemos ver uma grande degradação do material (Figura 48B). Como tínhamos o objetivo de digerir o DNA e trabalhar com ele todo digerido, seguimos com os experimentos mesmo com o material desta forma.

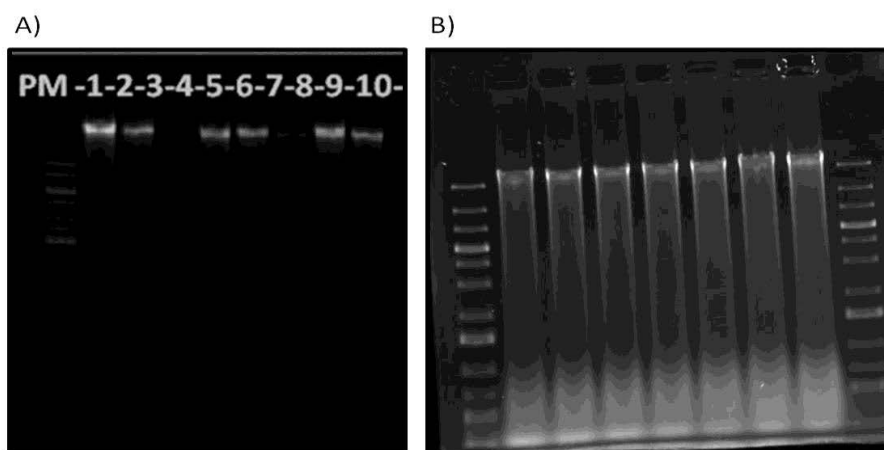


Figura 48. Gel de agarose 1% para visualização das diferentes extrações de DNA de *P. brasiliensis*. A) Logo após a extração; B) Após envio de amostras ao EUA.

4.4.2. Digestão parcial do DNA de *P. brasiliensis* com a enzima *MseI*

Primeiramente diferentes tempos de digestão do DNA (15, 30, 60, 120 e 240 minutos) foram testados. A figura 49 mostra o gel de agarose com a digestão nos diferentes tempos e pôde-se observar que o melhor tempo seria entre 120 e 240 minutos, por isso foi adotado o tempo de 180 minutos de digestão do DNA.

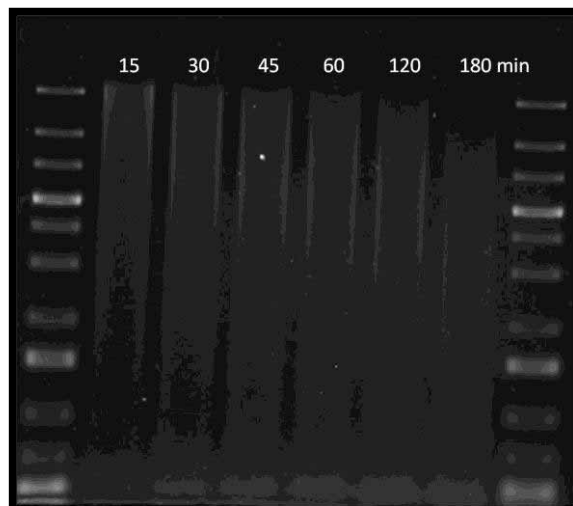


Figura 49. Padronização de tempo de digestão do DNA com a enzima *MseI* por diferentes tempos (15, 30, 45, 60, 120 e 150 minutos) sendo observado a digestão entre 120 e 150 minutos.

Após esta padronização, 1500 ng de DNA foram digeridos utilizando a mesma reação deixando a digestão ocorrer por 150 minutos. Após a digestão a enzima foi inativada por 20 minutos a 65°C.

4.4.3. Ligação dos adaptadores ao DNA de *P. brasiliensis* digerido pela enzima *MseI*

A digestão do DNA pela enzima *MseI* gerou a sequência 5'-TA na extremidade do DNA e a essa extremidade foram ligados adaptadores, que são oligonucleotídeos que geram a extremidade necessária nos fragmentos para fazer a ligação dos fragmentos ao vetor que será utilizado para a clonagem, gerando ainda sítios de restrição para clivagens necessárias em etapas futuras.

Primeiramente os adaptadores foram preparados ligando-se aos pares e estas reações foram incubadas a 37°C por 01 hora seguido de inativação a 70°C por 20 minutos.

Após o preparo dos adaptadores estes foram ligados ao DNA de *P. brasiliensis* digerido por *MseI*. A ligação foi realizada numa razão molar de 1:2:2:2 (PbDNA:Adaptadores). . Esta reação foi então mantida a 16°C em banho-maria por 04 dias.

Após os 04 dias de incubação, foi realizada eletroforese em gel de agarose 6% sendo o gel corrido a 80V em câmara fria. Após a corrida o poço onde foi colocado o

padrão de massa molecular foi retirado do gel e corado com brometo de etídio para verificação da presença no gel de DNA entre 1000 e 200 pb que será a porção utilizada para a construção da biblioteca. Esta porção de DNA que será utilizada para as clonagens foram recuperadas do gel através de extração por Fenol-Clorofórmio. Na figura 50A podemos ver a porção do gel com o padrão de massa molecular corado por brometo de etídio e na figura 50B, observa-se o DNA de *P. brasiliensis* antes e após a seleção da porção de 1000 a 200 pb.

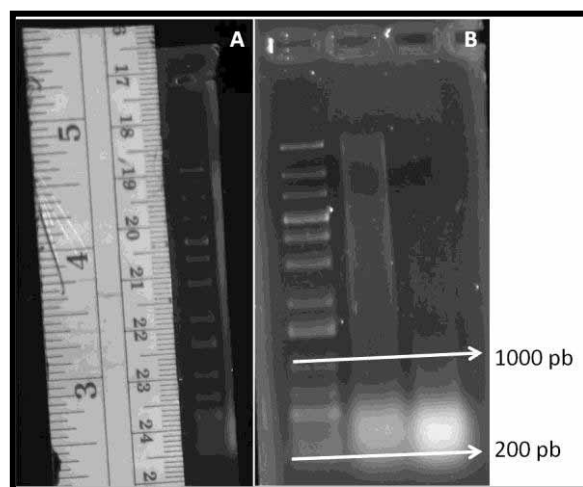


Figura 50. Porção do gel com o peso molecular corado por brometo de etídio; B) DNA de *P. brasiliensis* antes e após a seleção da porção de 1000 a 200 pb.

4.4.4. Verificação da Ligação dos adaptadores ao DNA de *P. brasiliensis*

Após a ligação, uma PCR foi realizada usando como iniciadores os adaptadores ligados ao DNA para verificar se houve a ligação dos adaptadores ao DNA. A reação realizada foi a seguinte: 0.5 mM de MgCl₂, tampão 1X, 0.2 mM de dNTPs, 0.5 uM de primer sense, 0.5 uM de primer anti-sense, 1.25 Unidades de Taq Polimerase e 2ng/uL de amostra.

A reação foi verificada em gel de agarose 0,8% onde se pode verificar que a ligação dos adaptadores funcionou. Na figura 51 pode-se verificar que nos poços 7, e 8 ao 12, a amplificação do produto *que corresponde* aos fragmentos de DNA ligados aos adaptadores. Após essa verificação o material se encontra pronto para a clonagem no vetor fdBUG.

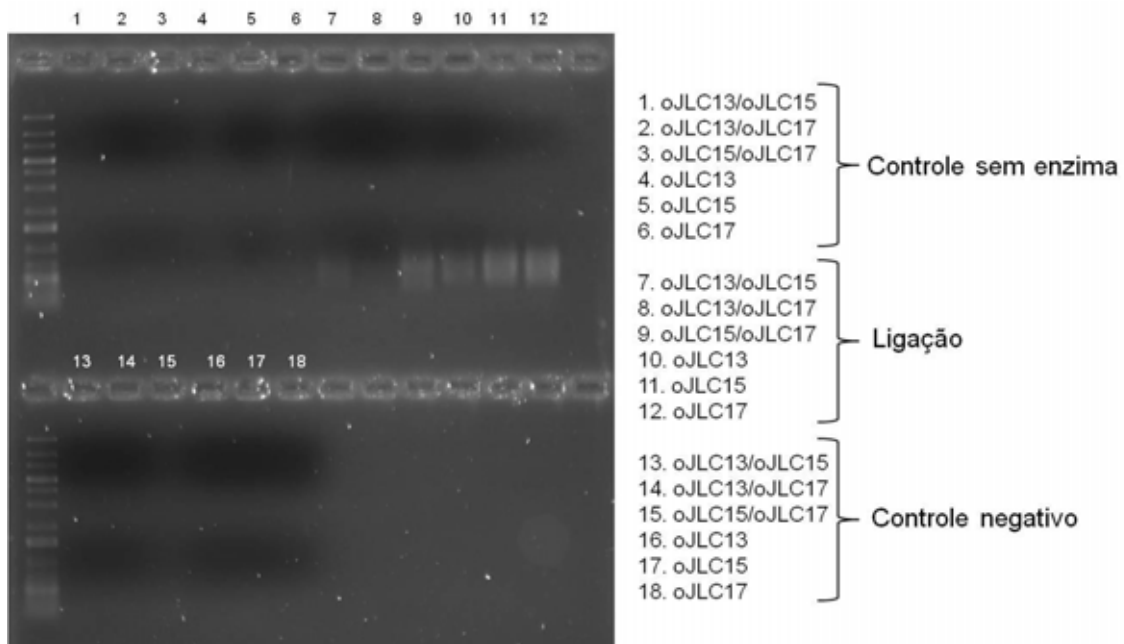


Figura 51. Verificação da ligação do DNA aos adaptadores em gel de agarose 0,8%, sendo observada a amplificação, confirmando assim a ligação dos adaptadores ao DNA de *P. brasiliensis*.

4.4.5. Digestão do vetor fdBUG com a enzima *SfiI*

A digestão do vetor fdBUG foi realizada com a enzima *SfiI* que deixa a extremidade 3'-GTG que previne a recircularização do vetor e promove a ligação dos fragmentos de DNA de *P. brasiliensis*. A digestão foi verificada em gel de agarose 0,8% e a figura 52 mostra este gel.

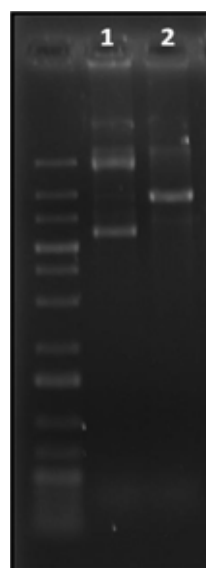


Figura 52. Digestão do vetor com a enzima *SfiI*. 1) Controle sem enzima, 2) Digestão do vetor fdBUG com a enzima.

4.4.6. Tratamento do vetor fdBUG com a enzima fosfatase alcalina (CIP)

O tratamento do vetor digerido com fosfatase alcalina foi realizado com o objetivo de evitar a recircularização do vetor. Após o tratamento o vetor foi submetido a uma ligação teste sem presença de inserto para verificar se o tratamento evitou a sua recircularização e para isso duas reações foram feitas, uma contendo 1uL/20 uL de reação de enzima T4 DNA ligase e outra sem a enzima. Para ambas as ligações, 300 ng de fdBUG foi utilizado. A reação de ligação ocorreu por 03 dias a 16°C em banho-maria. Após o tempo de ligação, foi realizado um gel de agarose 0,8% para ver o perfil das amostras. Este gel está demonstrado na figura 53 e pode-se observar o mesmo perfil nas duas amostras, mostrando a eficiência do tratamento com CIP para evitar a recircularização do vetor fdBUG.

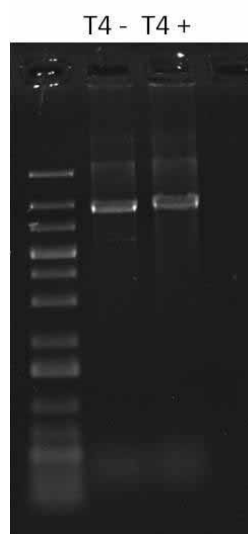


Figura 53. Verificação da eficiência em evitar a recircularização do vetor fdBUG com o tratamento da enzima fosfatase alcalina (CIP) em gel de agarose 0,8%.

4.4.7. Transformação controle do vetor fdBUG em *E. coli* MC1061

Antes de se iniciar a ligação do DNA de *P. brasiliensis* no vetor fdBUG foi realizada uma transformação das ligações realizadas no item 4.4.3 como controle de transformação. Para tanto, 1 uL de cada ligação (T4- e T4+) foi transformado por eletroporação em 50 uL de *E. coli* MC1061. Como reações controle foram também

transformados o vetor não digerido e sem DNA, substituído por H₂O. Após a eletroporação, as células foram recuperadas em 5 mL de meio SOC que foram mantidas a 37°C por 1 hora. Após esse período as células foram plaqueadas em meio com ou sem tetraciclina e então incubadas a 30°C overnight. No dia seguinte, as colônias foram contadas e os resultados estão descritos nas tabelas 8, 9 e 10.

Tabela 8. Placa sem tetraciclina.

Amostras	Vol. plaqueado	Crescimento
Sem DNA (H ₂ O)	250 uL	Incontáveis
fdBUG não digerido	250 uL	Incontáveis
T4 + fdBUG	250 uL	Incontáveis
T4 – fdBUG	250 uL	Incontáveis

Tabela 9. Plaqueamento das amostras de fdBUG não digerido em placa com tetraciclina.

Amostras	Vol. plaqueado	Crescimento
Sem DNA (H ₂ O)	250 uL	0
fdBUG não digerido	20 uL	+++
fdBUG não digerido	50 uL	++++++
fdBUG não digerido	250 uL	+++++++

+ Impossível de contar

Tabela 10. Plaqueamento das amostras de fdBUG T4+ e T4- em placas com tetraciclina.

Amostras	Vol. plaqueado	Crescimento
T4 + fdBUG	20 uL	1
T4 + fdBUG	50 uL	3
T4 + fdBUG	250 uL	12
T4 – fdBUG	20 uL	0
T4 – fdBUG	50 uL	2
T4 – fdBUG	250 uL	15

Os resultados apresentados correspondem ao esperado onde apenas verificou-se crescimento eficiente nos vetores não digeridos, e no caso dos vetores não-ligados pode-se ver que a quantidade de colônias foi muito baixo indicando pouco *background* na clonagem. Com esses resultados prosseguiu-se com as ligações e transformações do DNA de *P. brasiliensis* no vetor fdBUG.

4.4.8. Ligação do DNA de *P. brasiliensis* no vetor fdBUG e transformação em *E. coli* MC1061

Para essa ligação foi utilizada a razão molar de 20:1 (inserto:vetor). Para tanto foi utilizado 54,2 pmol de DNA de *P. brasiliensis* e 2,71 pmol de vetor fdBUG. Para a reação de ligação além do DNA do fungo e do vetor nas concentrações citadas anteriormente, foi utilizado o tampão da enzima T4 DNA ligase (1X) e 1uL/20uL de reação de enzima T4 DNA ligase. Esta reação foi mantida a 16°C por 04 dias. Foi feito um controle onde não foi adicionada a enzima.

Após o período de ligação, 1 uL desta reação foi utilizado para transformação por eletroporação em *E. coli* MC1061. Além das amostras, um controle consistindo de H₂O foi também transformado. A transformação foi realizada da mesma forma descrita no item 4.4.7. As tabelas 11 e 12 mostram os resultados obtidos na transformação.

Tabela 11. Placas sem tetraciclina.

Amostras	Vol. plaqueado	Crescimento
Sem DNA (H ₂ O)	250 uL	Incontáveis
Ligação PbDNA (T4+)	250 uL	Incontáveis
LigaçãoPbDNA (T4 -)	250 uL	Incontáveis

Tabela 12. Plaqueamento das amostras de Ligação PbDNA T4+ e T4- em placas com tetraciclina.

Amostras	Vol. plaqueado	Crescimento
Sem DNA (H ₂ O)	250 uL	0
Ligação PbDNA (T4+)	20 uL	41
Ligação PbDNA (T4+)	50 uL	92
Ligação PbDNA (T4+)	250 uL	352
LigaçãoPbDNA (T4 -)	20 uL	3
LigaçãoPbDNA (T4 -)	50 uL	9
LigaçãoPbDNA (T4 -)	250 uL	23

Após as contagens das colônias pode-se observar que a transformação foi satisfatória, com os controles funcionando da forma esperada.

4.4.9. PCR de colônia para checagem da eficiência da ligação/transformação

A PCR de colônia foi realizada com o intuito de verificar a presença de insertos do DNA de *P. brasiliensis* no vetor fdBUG. Primeiramente 6 colônias da ligação (T4+) mais 1 colônia do vetor não digerido do item 4.4.8 foram transferidas para tubos contendo 20 uL de H₂O e lisadas a 99°C por 10 minutos. Após a lise, 1 uL deste lisado foi utilizado na PCR. Como controle negativo da reação, a amostra foi substituída por 1 uL de H₂O e como controle positivo foi utilizado o vetor fdBUG. Após a reação, o produto foi verificado em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio, e o resultado podemos ver na figura 54.

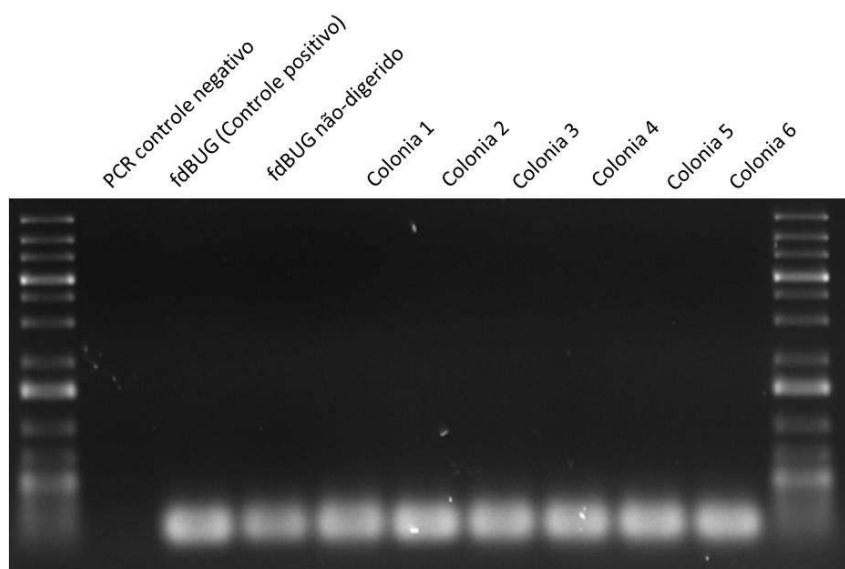


Figura 54. PCR de colônia para verificação da eficiência da ligação do DNA de *P. brasiliensis* ao vetor fdBUG. A corrida foi realizada em gel de agarose 1%.

Os resultados obtidos não foram satisfatórios, pois nenhuma colônia positiva foi detectada indicando que a ligação do DNA de *P. brasiliensis* ao vetor não foi verificada. O número de colônias analisadas foi aumentado, porém mesmo assim não se obteve nenhuma colônia positiva. Com esse resultado a ligação e a transformação foram feitas novamente, porém continuamos sem resultados positivos. Para tentar entender o por que do problema foi realizada uma análise da eficiência da ligação dos adaptadores ao DNA de *P. brasiliensis* pois como o DNA, após o transporte, parecia degradado isso poderia de alguma forma influenciar na ligação dos adaptadores ao DNA.

4.4.10. Verificação da eficiência da ligação dos adaptadores ao DNA de *P. brasiliensis* parcialmente digerido pela enzima *MseI*

Para esta verificação uma PCR usando os adaptadores como iniciadores foi realizada da mesma forma como descrita no item 4.4.4. Porém, a cada 05 ciclos da reação as amostras foram verificadas para ver a eficiência na amplificação. Estas amostras foram analisadas em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio. A figura 55 mostra os resultados obtidos para cada combinação de adaptadores utilizada, sendo que na figura os números representam os ciclos em que as amostras foram coletadas, conforme tabela 13.

Tabela 13. Relação das amostras analisadas no gel de agarose.

Amostra	Ciclo		Amostra	Ciclo
1	0		6	25
2	5		7	30
3	10		8	35
4	15		9	39
5	20		10	Controle negativo

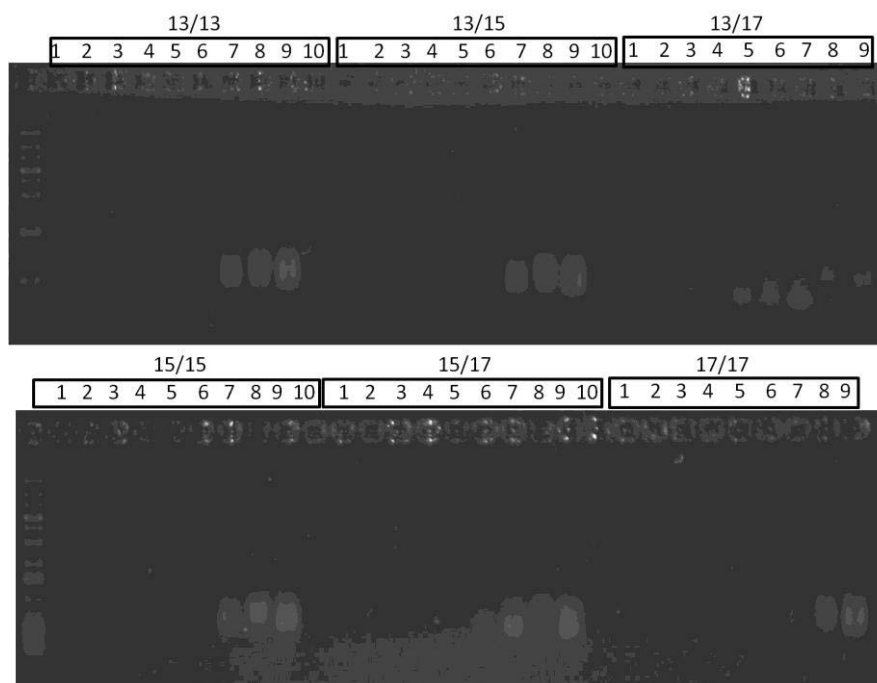


Figura 55. PCR para verificação da eficiência da ligação dos adaptadores. Corrida eletroforetica realizada em gel de agarose 1%.

Esta análise revelou uma ineficiência na ligação dos adaptadores, pois, se a ligação tivesse sido eficiente, ver-se-ia amplificação desde os primeiros ciclos, já que se esperava que toda a população de DNA esteja com os adaptadores ligados à sua extremidade. Para todas combinações de adaptadores testadas pode-se ver a amplificação a partir de 30 ciclos de amplificação. Isso pode ter ocorrido pela degradação inicial do DNA após o transporte.

Novo DNA de *P. brasiliensis* foi enviado do Brasil para os EUA, porém o mesmo ocorreu. O material parecia íntegro após a extração, porém ao chegar aos EUA o material parecia todo degradado. Da mesma forma que na primeira vez, seguimos com os experimentos, porém chegamos ao mesmo resultado, não tendo clones positivos para a ligação do DNA do fungo no vetor fdBUG. Na impossibilidade de obter-se resultados satisfatórios, optou-se por tentar outra estratégia, que é o uso do DNA sonificado sem o uso dos adaptadores que será descrito a seguir.

4.4.11. Sonicação do DNA de *P. brasiliensis*

A sonicação foi realizada no equipamento Misonix e para tanto a amostra foi diluída para uma concentração de 100 ng/uL e alíquotas de 500 uL desse material foi sonificado utilizando-se dois pulsos de 90 segundos com intervalo de 1 min e 45 segundos entre os pulsos. Após a sonicação a amostra foi verificada em gel de agarose 0,8% conforme mostra a figura 56.



Figura 56. Gel de agarose 0,8% para verificação da sonicação do DNA de *P. brasiliensis*.

A sonicação gera no DNA, fragmentos com as extremidades não-coesivas. A clonagem de fragmentos com extremidades não-coesivas é mais difícil, porém com o grau de degradação que as amostras chegaram achou-se viável tentar essa clonagem com as extremidades não-coesivas.

4.4.12. Formação de extremidade não-coesiva no vetor fdBUG

Para conseguirmos ligar os fragmentos de DNA de *P. brasiliensis* foi necessária tornar a extremidade do vetor também em uma extremidade não-coesiva, já que para digerirmos continuamos utilizando a enzima *SfiI*. Para tanto, após a digestão com a enzima *SfiI*, o vetor foi tratado com a enzima T4 Polimerase. Esta reação foi realizada a 12°C por 15 minutos seguindo pela inativação a 75°C por 20 minutos.

4.4.13. Ligação do DNA de *P. brasiliensis* no vetor fdBUG e transformação em *E. coli* MC1061 (Extremidades não-coesivas) e verificação da eficiência

Para essa ligação foi utilizada a razão molar de 3:1 (inserto:vetor). Para tanto foi utilizado 9,33 pmol de DNA de *P. brasiliensis* e 3,11 pmol de vetor fdBUG. Para a reação de ligação além do DNA do fungo e do vetor nas concentrações citadas anteriormente, foi utilizado o tampão da enzima T4 DNA ligase (1X) e 1uL/20uL de reação de enzima T4 DNA ligase. Esta reação foi mantida a 16°C por 04 dias. Foi feito um controle onde não foi adicionada a enzima. A transformação foi realizada da mesma forma descrita no item 4.4.7 e os resultados da contagem das colônias estão nas tabelas 14 e 15 abaixo.

Tabela 14. Placas sem tetraciclina.

Amostras	Vol. plaqueado	Crescimento
Sem DNA (H ₂ O)	250 uL	Incontáveis
Ligação PbDNA (T4+)	250 uL	Incontáveis
Ligação PbDNA (T4 -)	250 uL	Incontáveis

Tabela 15. Plaqueamento das amostras de Ligação PbDNA T4+ e T4- em placas com tetraciclina.

Amostras	Vol. plaqueado	Crescimento
Sem DNA (H ₂ O)	250 uL	0
Ligação PbDNA (T4+)	20 uL	21
Ligação PbDNA (T4+)	50 uL	70
Ligação PbDNA (T4+)	250 uL	524
Ligação PbDNA (T4 -)	20 uL	9
Ligação PbDNA (T4 -)	50 uL	18
Ligação PbDNA (T4 -)	250 uL	137

Mais uma vez os resultados foram satisfatórios e por isso 20 colônias foram selecionadas para a verificação da presença de insertos de DNA de *P. brasiliensis* no vetor fdBUG. Para essa verificação PCR de colônias foram realizadas conforme descrito no item 4.4.9 e o resultado pode ser verificado na figura 57.

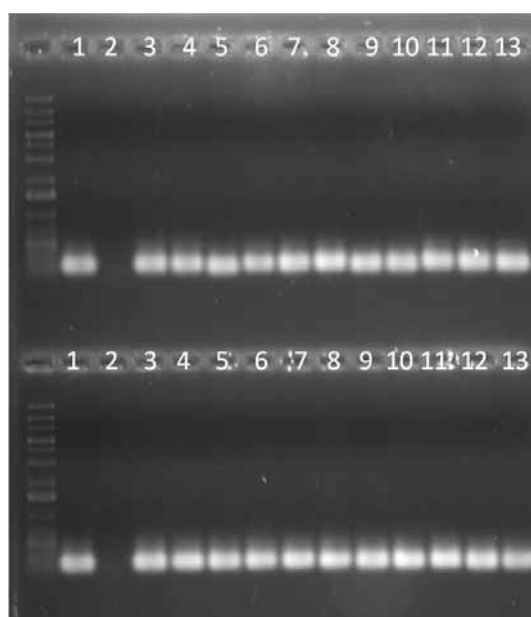


Figura 57. PCR de colônia para verificação da eficiência da ligação do DNA de *P. brasiliensis* ao vetor fdBUG. 1 – Controle positivo; 2 – Controle negativo; 3-13 – diferentes colônias testadas. Gel de agarose 1%.

Mais uma vez não foram detectadas colônias positivas carregando os insertos do DNA de *P. brasiliensis*. Acreditamos que os problemas encontrados estão diretamente relacionados às condições das amostras de DNA. Apesar dos resultados negativos, o estágio foi de grande importância, pois proporcionou o conhecimento de metodologias e de habilidades, junto com o treinamento para a construção de bibliotecas de fagos necessários a realização do estudo proposto, contando ainda, com a colaboração da Dra.

Jenifer Coburn, sendo assim essa biblioteca de fagos será construída futuramente por nosso grupo.

5. CONCLUSÕES

- ⚙ Diferentes espécies filogenéticas de *P. brasiliensis* tiveram maior capacidade de adesão à pneumócitos A549 do que *P. lutzii*;
- ⚙ Frente aos diferentes componentes da MEC, *P. lutzii* demonstrou ter maior capacidade de ligação à laminina, colágeno tipo I e tipo IV, enquanto que *P. brasiliensis* Pb18 teve maior capacidade de adesão à fibronectina;
- ⚙ A análise da expressão de adesinas por PCR em tempo real durante a infecção das espécies de *Paracoccidioides* a camundongos BALB/C demonstrou a expressão diferencial dessas para cada espécie, porém, de modo geral, a expressão relativa das adesinas foi maior em *P. brasiliensis*;
- ⚙ A curva de sobrevivência de camundongos C57-BLACK6 infectados com as espécies de *Paracoccidioides* demonstrou que a espécie *P. brasiliensis* foi mais virulenta, sendo que ao final do experimento, apenas 50% dos camundongos sobreviveram enquanto 90% dos camundongos infectados com *P. lutzii* sobreviveram;
- ⚙ Foi verificada relação entre adesão e virulência para as espécies do gênero *Paracoccidioides*, sendo mais virulenta a espécie com maior capacidade de adesão e expressão das adesinas.
- ⚙ O sistema escolhido para a produção da proteína CS protein recombinante pET32a foi eficiente sendo obtidos clones de *E. coli* BL21 (pLYS) capazes de expressar essa proteína de forma satisfatória;
- ⚙ A proteína CSP recombinante foi capaz de inibir em 15% a adesão do fungo *P. lutzii* à pneumócitos A549 demonstrando o envolvimento desta na interação do fungo com o hospedeiro;
- ⚙ O *Phage Display* se mostrou uma técnica eficaz no isolamento de peptídeos ligantes da parede celular de *Paracoccidioides* spp.;
- ⚙ Através do *Phage Display*, quatro peptídeos ligantes da parede celular do fungo foram identificados, sendo que estes têm a capacidade de inibir a adesão do fungo aos componentes da matriz extracelular (laminina, fibronectina, colágeno tipo I e colágeno tipo IV) e pneumócitos A549;
- ⚙ Os peptídeos selecionados não possuem atividade anti fúngica, o que indica que a inibição da adesão se deve por diferentes mecanismos que não a inviabilidade do

fungo, provavelmente bloqueando proteínas importantes para a sua adesão às estruturas do hospedeiro, tendo características de adesinas;

- ⚙ Não foi detectada atividade citotóxica para esses peptídeos em pneumócitos A549 e células HepG2, sugerindo que estas moléculas podem se constituir em protótipos no uso para profilaxia e/ou tratamento da paracoccidiodomicose;
- ⚙ O modelo *Galleria* mostrou-se eficiente em avaliar a capacidade dos peptídeos em circunscrever a infecção com *Paracoccidioides*;
- ⚙ O peptídeo 4 apresentou potencial em atuar como uma molécula que pode evitar a infecção com o fungo *P. lutzii* em *G. mellonella*;
- ⚙ Através da determinação da densidade hemocitária das larvas de *G. mellonella* pode-se observar que o tratamento da larva com os peptídeos parece ativar seu sistema imune auxiliando na defesa do organismo contra a infecção de *Paracoccidioides* spp.
- ⚙ No conjunto, os peptídeos selecionados tem potencial anti-adesivo e imunoestimulante.

Referências

AKIMOV, S. S. et al. Tissue transglutaminase is an integrin-binding adhesion coreceptor for fibronectin. **J Cell Biol**, v. 148, n. 4, p. 825-38, Feb 2000. ISSN 0021-9525. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10684262> >.

ALBUQUERQUE, P. et al. Pbh1 and Pbh2: two mycelium-specific hydrophobin genes from the dimorphic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **Fungal Genet Biol**, v. 41, n. 5, p. 510-20, May 2004. ISSN 1087-1845. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15050540> >.

ANANDAKUMAR, S. et al. Phage displayed short peptides against cells of *Candida albicans* demonstrate presence of species, morphology and region specific carbohydrate epitopes. **PLoS One**, v. 6, n. 2, p. e16868, 2011. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21364990> >.

ANDREOTTI, P. F. **INTERAÇÃO DE *Paracoccidioides brasiliensis* COM CÉLULAS EPITELIAIS. CARACTERIZAÇÃO DE PROVÁVEIS FATORES DE VIRULÊNCIA.** 2006. 124 (Doctoral). Department of Clinical Analysis, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara FCFAR - UNESP, Araraquara, SP, Brazil.

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> >.

ANTONARA, S. et al. *Borrelia burgdorferi* adhesins identified using in vivo phage display. **Mol Microbiol**, v. 66, n. 1, p. 262-76, Oct 2007. ISSN 0950-382X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17784908> >.

BAGAGLI, E. et al. Phylogenetic and evolutionary aspects of *Paracoccidioides brasiliensis* reveal a long coexistence with animal hosts that explain several biological features of the pathogen. **Infect Genet Evol**, v. 6, n. 5, p. 344-51, Sep 2006. ISSN 1567-1348. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16473563> >.

_____. *Paracoccidioides brasiliensis*: phylogenetic and ecological aspects. **Mycopathologia**, v. 165, n. 4-5, p. 197-207, 2008 Apr-May 2008. ISSN 0301-486X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18777629> >.

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

BANVILLE, N. et al. Disruption of haemocyte function by exposure to cytochalasin b or nocardazole increases the susceptibility of *Galleria mellonella* larvae to infection. **Microbes**

Infect, v. 13, n. 14-15, p. 1191-8, Dec 2011. ISSN 1769-714X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21782965> >.

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> >.

_____. The glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase homologue is differentially regulated in phases of *Paracoccidioides brasiliensis*: molecular and phylogenetic analysis. **Fungal Genet Biol**, v. 41, n. 7, p. 667-75, Jul 2004. ISSN 1087-1845. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15275662> >.

BASTOS, K. P. et al. The transcriptome analysis of early morphogenesis in *Paracoccidioides brasiliensis* mycelium reveals novel and induced genes potentially associated to the dimorphic process. **BMC Microbiol**, v. 7, p. 29, 2007. ISSN 1471-2180. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17425801> >.

BATISTA, J. et al. Is the geographical origin of a *Paracoccidioides brasiliensis* isolate important for antigen production for regional diagnosis of paracoccidioidomycosis? **Mycoses**, v. 53, n. 2, p. 176-80, Mar 2010. ISSN 1439-0507. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19422525> >.

BEN-OTHTMAN, R. et al. Leishmania-mediated inhibition of iron export promotes parasite replication in macrophages. **PLoS Pathog**, v. 10, n. 1, p. e1003901, Jan 2014. ISSN 1553-7374. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24497831> >.

BERGIN, D.; BRENNAN, M.; KAVANAGH, K. Fluctuations in haemocyte density and microbial load may be used as indicators of fungal pathogenicity in larvae of *Galleria mellonella*. **Microbes Infect**, v. 5, n. 15, p. 1389-95, Dec 2003. ISSN 1286-4579. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14670452> >.

BERGIN, D. et al. Superoxide production in *Galleria mellonella* hemocytes: identification of proteins homologous to the NADPH oxidase complex of human neutrophils. **Infect Immun**, v. 73, n. 7, p. 4161-70, Jul 2005. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15972506> >.

BORGHI, E. et al. Correlation between *Candida albicans* biofilm formation and invasion of the invertebrate host *Galleria mellonella*. **Future Microbiol**, v. 9, p. 163-73, Feb 2014. ISSN 1746-0921. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24571071> >.

BOUCHARA, J. P. et al. Laminin receptors on *Candida albicans* germ tubes. **Infect Immun**, v. 58, n. 1, p. 48-54, Jan 1990. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2136734> >.

BRENNAN, M. et al. Correlation between virulence of *Candida albicans* mutants in mice and *Galleria mellonella* larvae. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 34, n. 2, p. 153-7, Oct 2002. ISSN 0928-8244. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12381467> >.

BROMLEY, I. M.; DONALDSON, K. Binding of *Aspergillus fumigatus* spores to lung epithelial cells and basement membrane proteins: relevance to the asthmatic lung. **Thorax**, v. 51, n. 12, p. 1203-9, Dec 1996. ISSN 0040-6376. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8994516> >.

BROWNE, N.; SURLIS, C.; KAVANAGH, K. Thermal and physical stresses induce a short-term immune priming effect in *Galleria mellonella* larvae. **J Insect Physiol**, v. 63C, p. 21-26, Feb 2014. ISSN 1879-1611. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24561359> >.

CALDINI, C. P. et al. Synthetic peptides mimic gp75 from *Paracoccidioides brasiliensis* in the diagnosis of paracoccidioidomycosis. **Mycopathologia**, v. 174, n. 1, p. 1-10, Jul 2012. ISSN 1573-0832. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22249604> >.

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

CASADEVALL, A.; PIROFSKI, L. A. Host-pathogen interactions: redefining the basic concepts of virulence and pathogenicity. **Infect Immun**, v. 67, n. 8, p. 3703-13, Aug 1999. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10417127> >.

CHLOSTA, S. et al. The iron efflux protein ferroportin regulates the intracellular growth of *Salmonella enterica*. **Infect Immun**, v. 74, n. 5, p. 3065-7, May 2006. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16622252> >.

CLOUTIER, S. M. et al. Profiling of proteolytic activities secreted by cancer cells using phage display substrate technology. **Tumour Biol**, v. 25, n. 1-2, p. 24-30, 2004 Jan-Apr 2004. ISSN 1010-4283. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15192309> >.

COBURN, J. et al. Characterization of a candidate *Borrelia burgdorferi* beta3-chain integrin ligand identified using a phage display library. **Mol Microbiol**, v. 34, n. 5, p. 926-40, Dec 1999. ISSN 0950-382X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10594819> >.

COLEMAN, J. J. et al. *Fusarium* pathogenesis investigated using *Galleria mellonella* as a heterologous host. **Fungal Biol**, v. 115, n. 12, p. 1279-89, Dec 2011. ISSN 1878-6146. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22115447> >.

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

COOK, S. M.; MCARTHUR, J. D. Developing *Galleria mellonella* as a model host for human pathogens. **Virulence**, v. 4, n. 5, p. 350-3, Jul 2013. ISSN 2150-5608. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23799664> >.

COTTER, G.; DOYLE, S.; KAVANAGH, K. Development of an insect model for the in vivo pathogenicity testing of yeasts. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 27, n. 2, p. 163-9, Feb 2000. ISSN 0928-8244. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10640612> >.

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> >.

COZENS, D.; READ, R. C. Anti-adhesion methods as novel therapeutics for bacterial infections. **Expert Rev Anti Infect Ther**, v. 10, n. 12, p. 1457-68, Dec 2012. ISSN 1744-8336. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23253323> >.

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 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 OLIVEIRA, K. M. et al. Intermolecular interactions of the malate synthase of *Paracoccidioides* spp. **BMC Microbiol**, v. 13, p. 107, 2013. ISSN 1471-2180. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23672539> >.

DE PAULA E SILVA, A. C. et al. Microplate alamarBlue assay for *Paracoccidioides* susceptibility testing. **J Clin Microbiol**, v. 51, n. 4, p. 1250-2, Apr 2013. ISSN 1098-660X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23345296> >.

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> >.

DONOVAN, A. et al. Positional cloning of zebrafish ferroportin1 identifies a conserved vertebrate iron exporter. **Nature**, v. 403, n. 6771, p. 776-81, Feb 2000. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10693807> >.

FACCHIANO, F.; FACCHIANO, A.; FACCHIANO, A. M. The role of transglutaminase-2 and its substrates in human diseases. **Front Biosci**, v. 11, p. 1758-73, 2006. ISSN 1093-9946. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16368554> >.

FALLON, J. P.; REEVES, E. P.; KAVANAGH, K. The *Aspergillus fumigatus* toxin fumagillin suppresses the immune response of *Galleria mellonella* larvae by inhibiting the action of haemocytes. **Microbiology**, v. 157, n. Pt 5, p. 1481-8, May 2011. ISSN 1465-2080. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21349977> >.

FALLON, J. P.; TROY, N.; KAVANAGH, K. Pre-exposure of *Galleria mellonella* larvae to different doses of *Aspergillus fumigatus* conidia causes differential activation of cellular and humoral immune responses. **Virulence**, v. 2, n. 5, p. 413-21, 2011 Sep-Oct 2011. ISSN 2150-5608. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21921688> >.

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

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

_____. Functional genome of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 45, n. 3, p. 369-81, Sep 2005. ISSN 0928-8244. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16061364> >.

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

FRANCO, M. et al. Chlamydospore formation by *Paracoccidioides brasiliensis* mycelial form. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 31, n. 3, p. 151-7, 1989 May-Jun 1989. ISSN 0036-4665. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2617011> >.

FUCHS, B. B.; MYLONAKIS, E. Using non-mammalian hosts to study fungal virulence and host defense. **Curr Opin Microbiol**, v. 9, n. 4, p. 346-51, Aug 2006. ISSN 1369-5274. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16814595> >.

GANIKO, L. et al. Paracoccin, an N-acetyl-glucosamine-binding lectin of *Paracoccidioides brasiliensis*, is involved in fungal growth. **Microbes Infect**, v. 9, n. 6, p. 695-703, May 2007. ISSN 1286-4579. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17400504> >.

GARCÍA-RODAS, R. et al. *Cryptococcus neoformans* capsular enlargement and cellular gigantism during *Galleria mellonella* infection. **PLoS One**, v. 6, n. 9, p. e24485, 2011. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21915338> >.

GAUR, N. K.; KLOTZ, S. A. Expression, cloning, and characterization of a *Candida albicans* gene, *ALA1*, that confers adherence properties upon *Saccharomyces cerevisiae* for extracellular matrix proteins. **Infect Immun**, v. 65, n. 12, p. 5289-94, Dec 1997. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9393828> >.

GIANNINI, M. J. et al. Antibody response to the 43 kDa glycoprotein of *Paracoccidioides brasiliensis* as a marker for the evaluation of patients under treatment. **Am J Trop Med Hyg**, v. 43, n. 2, p. 200-6, Aug 1990. ISSN 0002-9637. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2389824> >.

GIL, M. L. et al. Binding of extracellular matrix proteins to *Aspergillus fumigatus* conidia. **Infect Immun**, v. 64, n. 12, p. 5239-47, Dec 1996. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8945572> >.

GIORDANO, R. J. et al. Structural basis for the interaction of a vascular endothelial growth factor mimic peptide motif and its corresponding receptors. **Chem Biol**, v. 12, n. 10, p. 1075-83, Oct 2005. ISSN 1074-5521. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16242650> >.

_____. Biopanning and rapid analysis of selective interactive ligands. **Nat Med**, v. 7, n. 11, p. 1249-53, Nov 2001. ISSN 1078-8956. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11689892> >.

_____. Combinatorial ligand-directed lung targeting. **Proc Am Thorac Soc**, v. 6, n. 5, p. 411-5, Aug 2009. ISSN 1943-5665. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19687212> >.

GOMEZ-LOPEZ, A. et al. An invertebrate model to evaluate virulence in *Aspergillus fumigatus*: The role of azole resistance. **Med Mycol**, v. 52, n. 3, p. 311-9, Apr 2014. ISSN 1460-2709. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24577012> >.

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

HAMILTON, A. J. et al. Sialic acid-dependent recognition of laminin by *Penicillium marneffe* conidia. **Infect Immun**, v. 66, n. 12, p. 6024-6, Dec 1998. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9826390> >.

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> >.

HUANG, J. X.; BISHOP-HURLEY, S. L.; COOPER, M. A. Development of anti-infectives using phage display: biological agents against bacteria, viruses, and parasites. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 56, n. 9, p. 4569-82, Sep 2012. ISSN 1098-6596. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22664969> >.

JACOBSEN, I. D. *Galleria mellonella* as a model host to study virulence of *Candida*. **Virulence**, v. 5, n. 2, p. 237-9, Feb 2014. ISSN 2150-5608. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24384470> >.

KAVANAGH, K.; REEVES, E. P. Exploiting the potential of insects for in vivo pathogenicity testing of microbial pathogens. **FEMS Microbiol Rev**, v. 28, n. 1, p. 101-12, Feb 2004. ISSN 0168-6445. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14975532> >.

KIOSHIMA, E. S. et al. A synthetic peptide selectively kills only virulent *Paracoccidioides brasiliensis* yeasts. **Microbes Infect**, v. 13, n. 3, p. 251-60, Mar 2011. ISSN 1769-714X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21070862> >.

KLOTZ, S. A. et al. Adherence of *Candida albicans* to immobilized extracellular matrix proteins is mediated by calcium-dependent surface glycoproteins. **Microb Pathog**, v. 14, n. 2, p. 133-47, Feb 1993. ISSN 0882-4010. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8502162> >.

KOIVUNEN, E. et al. Identification of receptor ligands with phage display peptide libraries. **J Nucl Med**, v. 40, n. 5, p. 883-8, May 1999. ISSN 0161-5505. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10319765> >.

KOIVUNEN, E.; GAY, D. A.; RUOSLAHTI, E. Selection of peptides binding to the alpha 5 beta 1 integrin from phage display library. **J Biol Chem**, v. 268, n. 27, p. 20205-10, Sep 1993. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7690752> >.

KOIVUNEN, E. et al. Integrin-binding peptides derived from phage display libraries. **Methods Mol Biol**, v. 129, p. 3-17, 1999. ISSN 1064-3745. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10494554> >.

KRACHLER, A. M.; ORTH, K. Targeting the bacteria-host interface: strategies in anti-adhesion therapy. **Virulence**, v. 4, n. 4, p. 284-94, May 2013. ISSN 2150-5608. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23799663> >.

LAFORCE-NESBITT, S. S. et al. Inhibition of *Candida albicans* adhesion by recombinant human antibody single-chain variable fragment specific for Als3p. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 54, n. 2, p. 195-202, Nov 2008. ISSN 0928-8244. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18662314> >.

LEV, S. et al. Phospholipase C of *Cryptococcus neoformans* regulates homeostasis and virulence by providing inositol trisphosphate as a substrate for Arg1 kinase. **Infect Immun**, v. 81, n. 4, p. 1245-55, Apr 2013. ISSN 1098-5522. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23381992> >.

LI, W. et al. [Impacts of *Mycobacterium tuberculosis* with different virulence on expressions of ferroportin and ferritin in infected macrophages]. **Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi**, v. 29, n. 7, p. 710-3, Jul 2013. ISSN 1007-8738. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23837981> >.

LIONAKIS, M. S. et al. Development of a ligand-directed approach to study the pathogenesis of invasive aspergillosis. **Infect Immun**, v. 73, n. 11, p. 7747-58, Nov 2005. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16239579> >.

LORIMER, J. E. et al. Cloning, sequence analysis and expression pattern of mouse desmocollin 2 (DSC2), a cadherin-like adhesion molecule. **Mol Membr Biol**, v. 11, n. 4, p. 229-36, 1994 Oct-Dec 1994. ISSN 0968-7688. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7711832> >.

LORTAT-JACOB, H. et al. Transglutaminase-2 interaction with heparin: identification of a heparin binding site that regulates cell adhesion to fibronectin-transglutaminase-2 matrix. **J Biol Chem**, v. 287, n. 22, p. 18005-17, May 2012. ISSN 1083-351X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22442151> >.

LÓPEZ-RIBOT, J. L. et al. Interactions between *Candida albicans* and the human extracellular matrix component tenascin-C. **Mol Cell Biol Res Commun**, v. 2, n. 1, p. 58-63, Jul 1999. ISSN 1522-4724. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10527893> >.

LÓPEZ-RIBOT, J. L.; CHAFFIN, W. L. Binding of the extracellular matrix component entactin to *Candida albicans*. **Infect Immun**, v. 62, n. 10, p. 4564-71, Oct 1994. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7927722> >.

LÜ, X. et al. Identification of peptides that bind hepatitis C virus envelope protein E2 and inhibit viral cellular entry from a phage-display peptide library. **Int J Mol Med**, v. 33, n. 5, p.

1312-8, May 2014. ISSN 1791-244X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24573486> >.

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 2012a. ISSN 1567-1364. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22443156> >.

_____. Surface-expressed enolase contributes to the adhesion of *Paracoccidioides brasiliensis* to host cells. **FEMS Yeast Res**, Mar 2012b. ISSN 1567-1364. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22443156> >.

MARQUES, A. F. et al. Additive effect of P10 immunization and chemotherapy in anergic mice challenged intratracheally with virulent yeasts of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Microbes Infect**, v. 10, n. 12-13, p. 1251-8, Oct 2008. ISSN 1286-4579. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18694844> >.

_____. Peptide immunization as an adjuvant to chemotherapy in mice challenged intratracheally with virulent yeast cells of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 50, n. 8, p. 2814-9, Aug 2006. ISSN 0066-4804. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16870776> >.

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> >.

MCMAHON, H. T.; BOUCROT, E. Molecular mechanism and physiological functions of clathrin-mediated endocytosis. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 12, n. 8, p. 517-33, Aug 2011. ISSN 1471-0080. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21779028> >.

MCMAHON, J. P. et al. Murine laminin binds to *Histoplasma capsulatum*. A possible mechanism of dissemination. **J Clin Invest**, v. 96, n. 2, p. 1010-7, Aug 1995. ISSN 0021-9738. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7635937> >.

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> >.

_____. Interactions of *Paracoccidioides brasiliensis* with host cells: recent advances. **Mycopathologia**, v. 165, n. 4-5, p. 237-48, 2008 Apr-May 2008. ISSN 0301-486X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17940851> >.

_____. Infection and apparent invasion of Vero cells by *Paracoccidioides brasiliensis*. **J Med Vet Mycol**, v. 32, n. 3, p. 189-97, 1994. ISSN 0268-1218. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7965489> >.

_____. 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> >.

MESA-ARANGO, A. C. et al. The non-mammalian host *Galleria mellonella* can be used to study the virulence of the fungal pathogen *Candida tropicalis* and the efficacy of antifungal drugs during infection by this pathogenic yeast. **Med Mycol**, v. 51, n. 5, p. 461-72, Jul 2013. ISSN 1460-2709. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23170962> >.

MIKI, H. et al. All kinesin superfamily protein, KIF, genes in mouse and human. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 98, n. 13, p. 7004-11, Jun 2001. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11416179> >.

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

MULLEN, L. M. et al. Comparative functional genomic analysis of Pasteurellaceae adhesins using phage display. **Vet Microbiol**, v. 122, n. 1-2, p. 123-34, May 2007. ISSN 0378-1135. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17258409> >.

MUÑOZ-PROVENCIO, D.; PÉREZ-MARTÍNEZ, G.; MONEDERO, V. Characterization of a fibronectin-binding protein from *Lactobacillus casei* BL23. **J Appl Microbiol**, v. 108, n. 3, p. 1050-9, Mar 2010. ISSN 1365-2672. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19735320> >.

MYLONAKIS, E. et al. *Galleria mellonella* as a model system to study *Cryptococcus neoformans* pathogenesis. **Infect Immun**, v. 73, n. 7, p. 3842-50, Jul 2005. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15972469> >.

NAVARRO-VELASCO, G. Y. et al. *Galleria mellonella* as model host for the trans-kingdom pathogen *Fusarium oxysporum*. **Fungal Genet Biol**, v. 48, n. 12, p. 1124-9, Dec 2011. ISSN 1096-0937. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21907298> >.

NOBILE, C. J. et al. Complementary adhesin function in *C. albicans* biofilm formation. **Curr Biol**, v. 18, n. 14, p. 1017-24, Jul 2008. ISSN 0960-9822. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18635358> >.

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

OKUDA, J.; HANABUSA, A.; GOTOH, N. ExoS of *Pseudomonas aeruginosa* binds to a human KIF7 to induce cytotoxicity in cultured human bronchial epithelial cells. **J Infect Chemother**, v. 20, n. 2, p. 121-7, Feb 2014. ISSN 1437-7780. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24462444> >.

OLIVEIRA, H. C. **Influência do cobre no padrão de expressão de genes envolvidos na interação de *Paracoccidioides brasiliensis* com a matriz extracelular** 2010. 70 (Master). Departamento de Análises Clínicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara - FCFAr UNESP, Araraquara, SP, Brazil.

PALMEIRO, M.; CHERUBINI, K.; YURGEL, L. S. **Paracoccidioidomicose – Revisão da Literatura** Scientia Medica. Porto Alegre, RS, Brazil: PUCRS. 15: 274-278 p. 2005.

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

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

POSADAS, D. M. et al. BmaC, a novel autotransporter of *Brucella suis*, is involved in bacterial adhesion to host cells. **Cell Microbiol**, v. 14, n. 6, p. 965-82, Jun 2012. ISSN 1462-5822. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22321605> >.

PUCCIA, R.; TRAVASSOS, L. R. 43-kilodalton glycoprotein from *Paracoccidioides brasiliensis*: immunochemical reactions with sera from patients with paracoccidioidomycosis, histoplasmosis, or Jorge Lobo's disease. **J Clin Microbiol**, v. 29, n. 8, p. 1610-5, Aug 1991. ISSN 0095-1137. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1722220> >.

PUCCIA, R. et al. The paracoccidioides cell wall: past and present layers toward understanding interaction with the host. **Front Microbiol**, v. 2, p. 257, 2011. ISSN 1664-302X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22194733> >.

RAMANA, J.; GUPTA, D. FaaPred: a SVM-based prediction method for fungal adhesins and adhesin-like proteins. **PLoS One**, v. 5, n. 3, p. e9695, 2010. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20300572> >.

RAMARAO, N.; NIELSEN-LEROUX, C.; LERECLUS, D. The insect *Galleria mellonella* as a powerful infection model to investigate bacterial pathogenesis. **J Vis Exp**, n. 70, p. e4392, 2012. ISSN 1940-087X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23271509> >.

RITTNER, G. M. et al. Therapeutic DNA vaccine encoding peptide P10 against experimental paracoccidioidomycosis. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 6, n. 2, p. e1519, 2012. ISSN 1935-2735. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22389734> >.

ROCHA, A. A. et al. Transcription regulation of the *Pb*gp43 gene by nitrogen in the human pathogen *Paracoccidioides brasiliensis*. **Fungal Genet Biol**, v. 46, n. 1, p. 85-93, Jan 2009. ISSN 1096-0937. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19013535> >.

ROCHA, A. A.; MORAIS, F. V.; PUCCIA, R. Polymorphism in the flanking regions of the *Pb*GP43 gene from the human pathogen *Paracoccidioides brasiliensis*: search for protein binding sequences and poly(A) cleavage sites. **BMC Microbiol**, v. 9, p. 277, 2009. ISSN 1471-2180. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20042084> >.

SAINATH RAO, S.; MOHAN, K. V.; ATREYA, C. D. A peptide derived from phage display library exhibits antibacterial activity against *E. coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. **PLoS One**, v. 8, n. 2, p. e56081, 2013. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23409125> >.

SAKATA, N.; YAMAZAKI, K.; KOGURE, T. Identification of a 21 kDa laminin-binding component of *Candida albicans*. **Zentralbl Bakteriell**, v. 289, n. 2, p. 217-25, Apr 1999. ISSN 0934-8840. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10360322> >.

SCORZONI, L. et al. Antifungal efficacy during *Candida krusei* infection in non-conventional models correlates with the yeast in vitro susceptibility profile. **PLoS One**, v. 8, n. 3, p. e60047, 2013. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23555877> >.

SCULLY, L. R.; BIDOCHKA, M. J. Serial passage of the opportunistic pathogen *Aspergillus flavus* through an insect host yields decreased saprobic capacity. **Can J Microbiol**, v. 51, n. 2, p. 185-9, Feb 2005. ISSN 0008-4166. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16091778> >.

SEIFERT, M. et al. Effects of the *Aspergillus fumigatus* siderophore systems on the regulation of macrophage immune effector pathways and iron homeostasis. **Immunobiology**, v. 213, n. 9-10, p. 767-78, 2008. ISSN 0171-2985. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18926292> >.

SERGEEVA, A. et al. Display technologies: application for the discovery of drug and gene delivery agents. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 58, n. 15, p. 1622-54, Dec 2006. ISSN 0169-409X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17123658> >.

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> >.

SHKOPOROV, A. N. et al. Search for protein adhesin gene in Bifidobacterium longum genome using surface phage display technology. **Bull Exp Biol Med**, v. 146, n. 6, p. 782-5, Dec 2008. ISSN 1573-8221. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19513383> >.

SILVA, J. D. F. D. **Estudo de diferentes isolados de *Paracoccidioides brasiliensis* quanto ao padrão de adesão e expressão de ligantes da matriz extracelular**. 2008. 72 (Master). Department of Clinical Analysis, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara FCFAr - UNESP, Araraquara, São Paulo, Brazil.

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

SLATER, J. L. et al. Pathogenicity of Aspergillus fumigatus mutants assessed in Galleria mellonella matches that in mice. **Med Mycol**, v. 49 Suppl 1, p. S107-13, Apr 2011. ISSN 1460-2709. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20950221> >.

SMITH, G. P. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. **Science**, v. 228, n. 4705, p. 1315-7, Jun 1985. ISSN 0036-8075. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4001944> >.

SMITH, G. P.; SCOTT, J. K. Libraries of peptides and proteins displayed on filamentous phage. **Methods Enzymol**, v. 217, p. 228-57, 1993. ISSN 0076-6879. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7682645> >.

SVIDZINSKI, T. I. et al. Paracoccidioides brasilienses isolates obtained from patients with acute and chronic disease exhibit morphological differences after animal passage. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 41, n. 5, p. 279-83, 1999 Sep-Oct 1999. ISSN 0036-4665. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10602541> >.

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

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

TABORDA, C. P. et al. Mapping of the T-cell epitope in the major 43-kilodalton glycoprotein of *Paracoccidioides brasiliensis* which induces a Th-1 response protective against fungal infection in BALB/c mice. **Infect Immun**, v. 66, n. 2, p. 786-93, Feb 1998. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9453642> >.

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> >.

THOMAZ, L. et al. *Galleria mellonella* as a model host to study *Paracoccidioides lutzii* and *Histoplasma capsulatum*. **Virulence**, v. 4, n. 2, p. 139-46, Feb 2013. ISSN 2150-5608. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23302787> >.

TRAVASSOS, L. R.; TABORDA, C. P. *Paracoccidioidomycosis* vaccine. **Hum Vaccin Immunother**, v. 8, n. 10, p. 1450-3, Oct 2012. ISSN 2164-554X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22894948> >.

TRONCHIN, G. et al. Interaction between *Aspergillus fumigatus* and basement membrane laminin: binding and substrate degradation. **Biol Cell**, v. 77, n. 2, p. 201-8, 1993. ISSN 0248-4900. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8364400> >.

TSAI, P. W. et al. Characterizing the role of cell-wall β -1,3-exoglucanase Xog1p in *Candida albicans* adhesion by the human antimicrobial peptide LL-37. **PLoS One**, v. 6, n. 6, p. e21394, 2011. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21713010> >.

UNTEREINER, W. A. et al. The Ajellomycetaceae, a new family of vertebrate-associated Onygenales. **Mycologia**, v. 96, n. 4, p. 812-21, 2004 Jul-Aug 2004. ISSN 0027-5514. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21148901> >.

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

_____. 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 ZANDT, K. E. et al. The iron export protein ferroportin 1 is differentially expressed in mouse macrophage populations and is present in the mycobacterial-containing phagosome. **J Leukoc Biol**, v. 84, n. 3, p. 689-700, Sep 2008. ISSN 0741-5400. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18586980> >.

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

VILLA, L. A. et al. Central nervous system paracoccidioidomycosis. Report of a case successfully treated with itraconazol. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 42, n. 4, p. 231-4, 2000 Jul-Aug 2000. ISSN 0036-4665. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10968887> >.

VILMOS, P.; KURUCZ, E. Insect immunity: evolutionary roots of the mammalian innate immune system. **Immunol Lett**, v. 62, n. 2, p. 59-66, Jun 1998. ISSN 0165-2478. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9698099> >.

YANG, W. et al. Fungal invasion of epithelial cells. **Microbiol Res**, Mar 2014. ISSN 1618-0623. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24670964> >.

ZHAO, G. et al. Phage display against corneal epithelial cells produced bioactive peptides that inhibit *Aspergillus* adhesion to the corneas. **PLoS One**, v. 7, n. 3, p. e33578, 2012. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22428072> >.

1. Artigo submetido: Adhesion profiles and the expression of adhesins of different phylogenetic species of the *Paracoccidioides* complex.

Revista: PLOS Neglected Tropical Diseases

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, Department 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.

Author Summary

Paracoccidioidomycosis, caused by *Paracoccidioides brasiliensis* and *P.lutzii*, is a systemic mycosis that had in Brazil the largest number of endemic areas. Currently, *P.brasiliensis* are divided in three different phylogenetic species: S1, PS2, PS3 and the

knowledge of the particularities of each phylogenetic species bring new possibilities for the understanding of their eco-epidemiological relationships with their hosts. These species use molecules, called adhesins, important to guarantee the adhesion of the pathogen to the host cells, the first essential step in the infection process. Several adhesins were identified and its importance in the infection process was widely studied. We aimed to study the pattern of adhesion and the adhesins expression during the interaction with the host of different isolates belonging from each phylogenetic species of the *Paracoccidioides* genus and we could observe that the adhesion behavior varies within the phylogenetic species and different adhesins may play different importance to allow the adhesion of the isolates and cause the infection. These results showed new insights on the interaction process of this genus and its knowledge permit a better understanding of different isolates that can be useful in the therapeutics of this mycosis.

1. Introduction

Paracoccidioides brasiliensis is a dimorphic fungus and is the etiological agent of paracoccidioidomycosis (PCM), a systemic mycosis affecting people in Latin America. Brazil has the largest number of endemic areas for this disease in the world (Franco *et al.*, 1993).

Based on recent phylogenetic analyzes, *P. brasiliensis* is classified into the Order Onygenales, Family Ajellomycetaceae, and forms a monophyletic clade that includes the genera *Blastomyces*, *Emmonsia* and *Histoplasma* (Untereiner *et al.*, 2004b) Matute *et al.* (Matute, Mcewen, *et al.*, 2006b), classified *Paracoccidioides* into three phylogenetic species: S1, PS2 and PS3. These species have different geographic distributions: S1 is a paraphyletic group found in Brazil, Argentina, Paraguay, Peru and Venezuela; PS2 is a monophyletic group found in Brazil and Venezuela; and PS3 is a monophyletic group found only in Colombia. Carrero *et al.* (Carrero *et al.*, 2008b), classified the isolates into two phylogenetic species, S1 and PS3, which were previously described by Matute *et al.* (Matute, Mcewen, *et al.*, 2006b), and also classified the isolate Pb01 as a new phylogenetic species. Teixeira *et al.* (Teixeira *et al.*, 2009b), proposed that the isolate Pb01 was a new species, *P. lutzii*. The correct molecular taxonomy of these fungi has opened new possibilities for the study and understanding of their eco-epidemiological relationships with their hosts (Bagagli *et al.*, 2006b; Teixeira *et al.*, 2009b).

The agents of systemic mycoses have some properties that permit their growth in the adverse conditions of the host and may contribute to the development of disease (Casadevall e Pirofski, 1999b). *Paracoccidioides* spp. have mechanisms that enable them to adhere to and invade barriers imposed by the host's tissues (Mendes-Giannini *et al.*, 1994b). The fungi synthesize several substances that participate directly or indirectly in the parasite-host relationship (Mendes-Giannini *et al.*, 2000b). Therefore, the successful colonization of the host's tissues by the fungus is a complex event, usually involving a pathogen ligand and a host cell receptor (Mendes-Giannini *et al.*, 2006b). The understanding and identification of the molecules involved in the adhesion of microorganisms to different substrates in the host can aid in the discovery of efficient treatments for systemic mycoses.

Several adhesins were described in *P. brasiliensis*, but these characterizations were most often performed using the Pb18 and Pb01 strains, GP43 (Hanna, Monteiro Da Silva e Giannini, 2000b; Mendes-Giannini *et al.*, 2006b), 14-3-3 protein (30 kDa) (Andreotti *et al.*, 2005b), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (Barbosa *et al.*, 2006b), triosephosphate isomerase (TPI) (Pereira *et al.*, 2007b), enolase (Donofrio *et al.*, 2009b; Nogueira *et al.*, 2010b; Marcos *et al.*, 2012b), and malate synthase (Da Silva Neto *et al.*, 2009b). These previous studies demonstrated that these proteins contribute to the adhesion of the fungus behaving as adhesins or adhesins-anchorless. Thus, this study aims to investigate these adhesins in the four phylogenetic species and the two species of the *Paracoccidioides* genus.

2. Materials and methods

2.1. Ethics statement

Animal experiments were performed in strict accordance with the Brazilian Federal Law 11,794 establishing procedures for the scientific use of animals, and the State Law establishing the Animal Protection Code of the State of São Paulo. All efforts were made to minimize suffering, and all animal procedures were approved by the Ethics Committee on Animal Experiments of Faculty of Pharmaceutical Sciences of Araraquara – UNESP (Proc. 10/2011/CEUA/FCF).

2.2. Infection of A549 cells with different phylogenetic species of the *Paracoccidioides* species complex

For this experiment, 14 isolates from different phylogenetic species were used (table 1). The isolates were kindly provided by Dr. Eduardo Bagagli of the Laboratory of Fungal Biology of Microbiology and Immunology, Department of the Institute of Biosciences in Botucatu – UNESP, in the mycelial phase (M). They were then transferred to Fava-Netto medium supplemented with fetal bovine serum to revert to the yeast phase (L) and, after the reversion, were maintained in Fava-Netto medium without any supplements. Consecutive subcultures were generated each week. The isolates were used for experiments after the 4th subculture.

Table 1. Isolates from different *Paracoccidioides* phylogenetic species used in this study.

Phylogenetic species	Isolate	Origin	Isolation
"Pb01-like" <i>P.lutzii</i>	Pb66	Goiânia, Brazil	Human skin
	EE	Mato Grosso, Brazil	Human
	Pb8334MMT	Goiânia, Brazil	Human
S1	Pb01	Goiânia, Brazil	Human lung (acute PCM)
	Bt60	São Paulo, Brazil	Human sputum
	T3B6	São Paulo, Brazil	Armadillo spleen
	D03	São Paulo, Brazil	Human, cutaneous lesion
	D06	São Paulo, Brazil	Human, cutaneous lesion
PS2	D11	São Paulo, Brazil	Human, cutaneous lesion
	Pb02	Venezuela	Human, chronic PCM
	PbDog	Paraná, Brazil	Dog lymph node
PS3	Epm83	Colombia	Human

Cells from the epithelial lineage of A549 (pneumocytes, type II) were grown in 6-well cell plates in HAM F-12 medium supplemented with 10% fetal bovine serum. After monolayer formation, the cells were washed three times with sterile phosphate buffered saline (PBS) and inoculated with a fungal suspension of 5×10^6 cells/mL. The standardized suspension of *P. brasiliensis* in PBS was incubated for 15 minutes at 37°C with 10 μ M of CFSE (5(6)-carboxyfluorescein diacetate N-succinimidyl ester, BioChemika), washed with PBS, resuspended in PBS and then used to infect monolayers in the wells of six-well plates. The infected cells were then incubated for 2 to 5 hours at 36,5°C and 5% CO₂. After the incubations, the cells were removed from the plates using 0.2% ATV-trypsin solution and 0.02% Versene (Adolfo Lutz). The cells were trypsinized, washed in medium containing fetal bovine serum, centrifuged and fixed with 4% paraformaldehyde. The fixed cells were then evaluated by flow cytometry to determine the amount of adhering fungi and thereby distinguish the infecting abilities of the different phylogenetic species of *P. brasiliensis*. Experiments were performed in triplicate with three independent experiments for each isolate. Statistics were performed using one-way ANOVA.

2.3. Expression analysis of the genes encoding adhesins by real-time PCR

The expression of genes encoding seven adhesins, which were previously described in *P. brasiliensis*, was evaluated in the different phylogenetic species. Specific primers for each gene were synthesized (table 2). The L34 gene was used as the housekeeping gene in the analysis.

Male Balb/c mice were infected with the following *Paracoccidioides* isolates: Pb18 (*S1*), Pb02 (*S2*), Epm83 (*PS3*) and Pb01 (*Pb01-like*). The blood of the animals was collected for RNA extraction (Bailão *et al.*, 2006b) after 10 minutes and 1 hour of infection, and gene expression was investigated. These experiments were approved by the Ethics Committee on Animal Experiments of the Faculty of Pharmaceutical Sciences, UNESP, Araraquara, São Paulo, Brazil (Protocol number 28/2011 – CEUA/FCF/Car number 10/2011). The RNA from the fungi recovered from the mouse blood was extracted using the Trizol method (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA). First-strand cDNA synthesis was performed using reverse transcriptase (RevertAid™ H Minus Reverse Transcriptase, Fermentas Life Sciences, Canada) and 1 µg of total RNA.

Table 2. Specific primers for each gene described as a *Paracoccidioides* spp.-specific adhesin

Gene	Primers
GP43	Sense 5'-CTTGTCTGGGCCAAAAACTC-3' Antisense 5'-GCCAGGGTTTGTGGACTGT-3'
GADPH	Sense 5'-AAATGCTGTTGAGCACGATG-3' Antisense 5'-CTGTGCTGGATATCGCCTTT-3'
Enolase	Sense 5'-TAGGCACCCTCACTGAATCC-3' Antisense 5'-GCTCTCAATCCCACAACGAT-3'
Malate synthetase	Sense 5'-GTTCCCTTCATGGATGCCTA-3' Antisense 5'-TCTTTGATGGGGATTTGAGC-3'
Triosephosphato isomerase	Sense 5'-CCTTACGGCAGAATGACGTT-3' Antisense 5'-GCCATTTCCATGTCAGGTCT-3'
Aldolase	Sense 5'-CAAGGCCGAGTTCAAAGAAG-3' Antisense 5'-GGATTCCCAACAGCACTCAT-3'
14-3-3	Sense 5'-GTTTCGCTCTGGAGACAAGC-3' Antisense 5'-AGCAACCTCAGTTGCGTTCT-3'
L34 (housekeeping gene)	Sense 5'-TGTCTACACTGCGCAAGGAC-3' Antisense 5'-ATGTGTTGGTGGGAGAGGAG-3'

The reaction mixtures contained 1 µL of cDNA, 12,5 µL of Maxima® SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X) (Fermentas), and 0.5 µM of each primer, and the volume was brought to 25 µL with nuclease-free water. The reaction program was 50 °C for 2 min, 95 °C for 10 min, and 40 cycles of 95 °C for 15 sec, and the annealing and synthesis occurred at 60°C for 1 min. Following the PCR, melting-curve analysis was performed, which confirmed that the signal corresponded to a single PCR product. Reactions were performed in an Applied Biosystems 7500 cycler. The data were analyzed by the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. The cycle threshold values for the triplicate PCRs of each RNA sample were averaged, and then the $2^{-\Delta\Delta CT}$ values were calculated (L34 was used as the reference). A sample that contained all reagents except *P. brasiliensis* cDNA was used as a negative control. After 40 *rodadas* of amplification, no PCR products were detected in this reaction. Three independent experiments were performed for each sample. As a control experiment, an RNA sample was obtained from the blood of mice not infected with *P. brasiliensis*. Statistics were performed using one-way ANOVA.

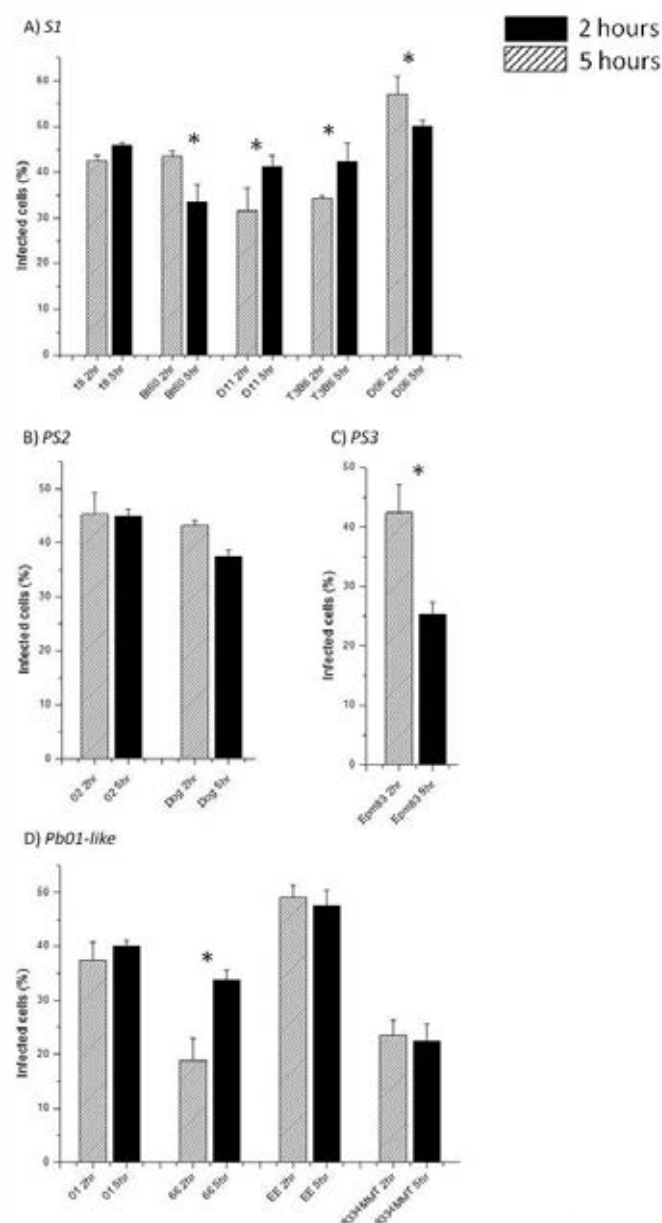
3. Results

3.1. Infection of A549 cells with different phylogenetic species of the *Paracoccidioides* species complex

The results of the infection assay with the different phylogenetic species are presented in figure 1 A (*S1*), B (*PS2*), C (*PS3*) and D (*Pb01-like*). The infection does not establish a pattern for each group of phylogenetic species, and different patterns were observed in the

same group. The percentage of cells infected by the “S1” group varied from 32 to 60%, by the “PS2” group varied from 40 to 50%, by the “PS3” isolate varied from 25 to 47% and the “Pb01-like” group varied from 25 to 52%. The infection rates reflect the virulence of the isolates, which seems to be well pronounced in all isolates.

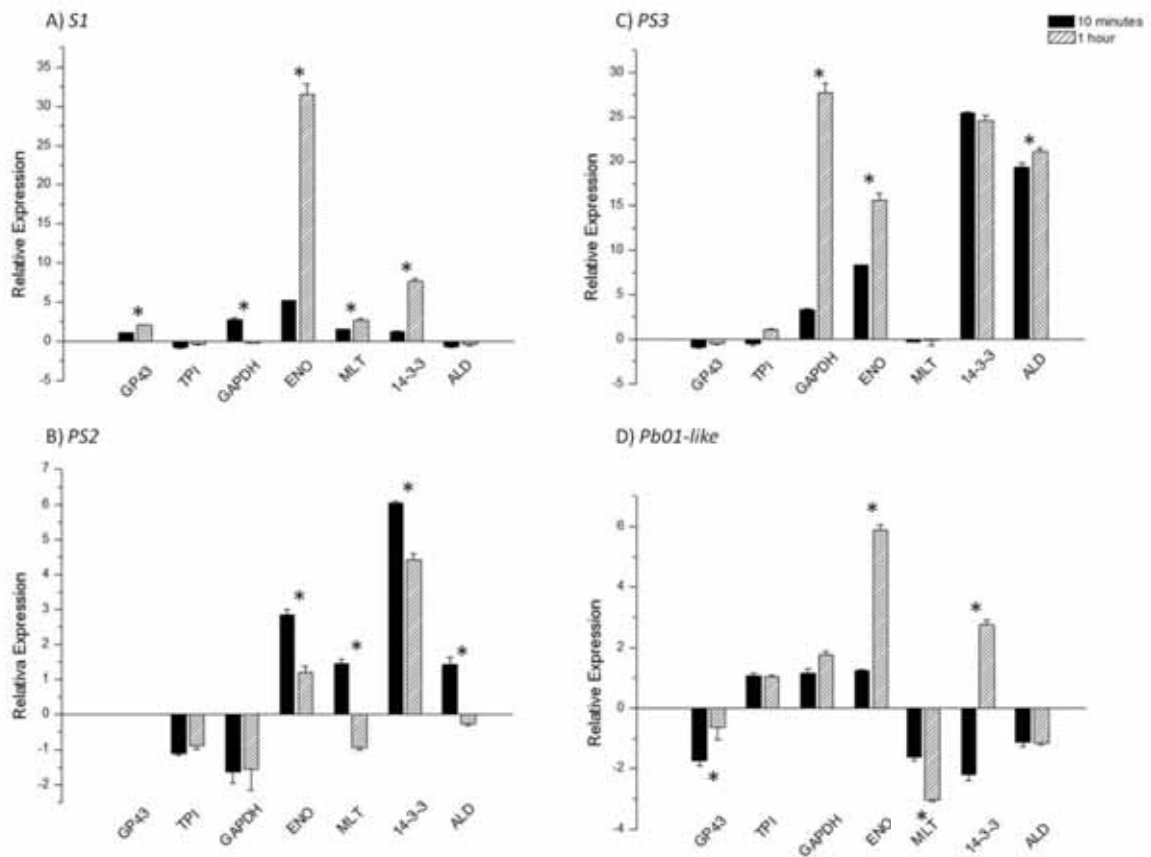
However, we could not observe differences in these rates after 2 hours of infection (no statistically significant differences were observed), and after 5 hours, we only observed differences for the isolate from the PS3 specie, and one isolate of *P.lutzii*, which had a lower median-infection rate after this period.



3.2. Expression analysis of genes encoding adhesins by real-time PCR

The results of the relative expression of different adhesins in the different phylogenetic species are presented in figure 2 A (S1); B (PS2), C (PS3) and D (Pb01-like). The relative expression of adhesins differs depending on the phylogenetic species. Enolase expression increased in S1 after one hour; while GAPDH, 14-3-3 and aldolase expression increased in PS3; 14-3-3 expression increased in PS2; and enolase expression increased in Pb01-like. It is remarkable that the expression of 14-3-3 was upregulated after 10 minutes in PS2 and PS3, and the expression of this gene was downregulated in Pb01-like. No expression of adhesins

genes was detected when we used a sample obtained from the blood of mice not infected with *P. brasiliensis*.



4. Discussion

Studies have demonstrated the ability of *P. brasiliensis* to adhere and invade (Mendes-Giannini *et al.*, 1994b), and these characteristics vary depending on the isolate (Hanna, Monteiro Da Silva e Giannini, 2000b). Previous studies have demonstrated that Pb18 is the most pathogenic in animals (Singer-Vermes *et al.*, 1989b). Hanna *et al.* (Hanna, Monteiro Da Silva e Giannini, 2000b), studied different isolates from *P. brasiliensis* and observed that Pb18, now classified as belonging to the *S1* phylogenetic specie, was more adherent to Vero cells. Additionally, after several subcultures, it lost its adhesion ability, indicating the important relationship between virulence and adhesion. However, upon re-isolation from animals or cell culture, this fungus recovered its ability to adhere to and invade epithelial cells (Andreotti *et al.*, 2005b).

P. brasiliensis is not considered an obligate intracellular pathogen, but it can enter epithelial cells *in vitro* and *in vivo* and can invade non-professional phagocytes (Mendes-Giannini *et al.*, 1994b; Mendes-Giannini *et al.*, 2000b; Mendes-Giannini *et al.*, 2004b). *P. brasiliensis* internalization increases during the course of the infection, and this process begins after 2 to 5 hours.

In our study, we observed that the infection rates decreased after 2 hours of infection, indicating that the invasion process had begun for some isolates: Bt60 and D06 from *S1* phylogenetic species, Dog from *PS2* and Emp83 from *PS3*. This invasion process reflects the virulence of these isolates and efficient adhesion culminates in faster invasion of the host cells to escape from the host immune system, establish infection and, in the case of *P. brasiliensis*, result in systemic mycosis. The infection rates of the isolate Epm83 from *PS3* phylogenetic specie is remarkable because after 5 hours of infection we observed a decay of infection and this feature

is correlate with a great capacity to adhere and invade the hosts cells, as well as the expression of the majority adhesins studied. Additionally, some isolates have increased their infection rates after 5 hours of infection, as observed in D11 and T3B6 of S1 phylogenetic species and 66 of Pb01-like. . The confirmation of the virulence of the different isolates of *P. brasiliensis* is important because it may be related to their disease rates in a population and their capacity to cause systemic mycosis. A detailed characterization of virulence of these pathogens could lead to the development of different therapeutic and diagnostic strategies, depending on the isolates or phylogenetic species.

Adhesion is related to the expression of adhesins, and several adhesins have been described in *P. brasiliensis*, mainly in Pb 18 and Pb 01 (Mendes-Giannini *et al.*, 2000b; Mendes-Giannini *et al.*, 2008b). This genus has been studied and classified into different phylogenetic species; a new specie has also been described (Matute, Sepulveda, *et al.*, 2006; Teixeira *et al.*, 2009b).

In this study, we analyzed the expression of adhesins at earlier times (10 minutes and 1 hour) than those assessed for adhesion studies (2 and 5 hours) because we aimed to determine the fungi response to the host contact as adhesin expression.

The expression of adhesins in the different phylogenetic species was not constant, and a wide range of expression was observed among the isolates, including lack of expression. We observed more expression of certain adhesins depending on the phylogenetic species and the duration of fungal contact. The higher expression of some genes was observed in the S1 and PS3 phylogenetic species especially the last one that had the highest rates of adhesion and adhesins expression, showing the importance of the adhesins participation in the infection process of *Paracoccidioides* species.

GP43 expression was only present in phylogenetic species S1, isolate Pb18; it was not detected in PS2 and was down regulated for the phylogenetic species PS3 and Pb01-like. These data are extremely important for the study of paracoccidioidomycosis because the GP43 protein, aside from its role as an adhesin, is the main serological marker for this disease (Puccia e Travassos, 1991). All phylogenetic species cause paracoccidioidomycosis, but a lack of expression of this protein may lead to inaccuracy in serological diagnosis (Rocha, Morais e Puccia, 2009; Batista *et al.*, 2010; Machado, 2011; Puccia *et al.*, 2011).

Another important finding in our study is related to the increase in the enolase adhesin expression for all phylogenetic species. Recent studies have shown the importance of this protein in *Paracoccidioides* adhesion and virulence (Donofrio *et al.*, 2009b). This one is first demonstrated as a fibronectin adhesin, and Nogueira *et al.* (Nogueira *et al.*, 2010b) subsequently described its binding to laminin and collagen type I in addition to fibronectin. Marcos *et al.* (Marcos *et al.*, 2012b) demonstrated that fibronectin was the major enolase binder, and it was found at high levels in the fungal cell wall, thereby contributing to *P. brasiliensis* adhesion to the host.

In our results, enolase expression was higher in the initial stages of interaction with the host, and in some cases, such as PS1, PS3 and Pb01-like, a significant increase in its expression after 1 hour of infection may help the fungus invade host cells.

A high level of expression of 14-3-3 adhesin was observed in PS2 and PS3, even at the beginning of the interaction between the fungus and the host, revealing that it is the main adhesin for these two phylogenetic species. An increase in the expression of 14-3-3 adhesin was observed after one hour for all phylogenetic species. This protein has recently been identified as an important factor in the interaction between *Paracoccidioides* and its host. In a recent study, Silva *et al.* (submitted) demonstrated that a significant increase in this protein occurs on the pathogen cell wall during its interaction with A549 epithelial cells. This increase suggests an important role for this protein in the fungus-host interaction, leading to a cellular immune response that is important for the success of the fungus in the microenvironment of the host cells. In addition, Vallejo *et al.* (Vallejo *et al.*, 2011b; Vallejo *et al.*, 2012b) verified that this protein is transported by *P. brasiliensis* vesicles and is secreted into the culture supernatant, which indicates that this protein is involved in the *Paracoccidioides*-host interaction.

The expression of triosephosphate isomerase increased in the Pb01-like phylogenetic species. The characterization of this protein as an adhesin was studied only in the Pb01 isolate (Pereira *et al.*, 2007b), and it has never been studied in others species. Our study, although preliminary, demonstrates the importance of studying different phylogenetic species.

Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase was also characterized as an adhesin of the Pb01 isolate (Barbosa *et al.*, 2006b). In our study, we observed a higher expression in PS3 species and, after 1 hour of infection, for the Pb01-like phylogenetic species, revealing the importance of this protein in the course of infection for some species.

Malate synthase was described as an adhesin of the Pb01 isolate from the *Pb01-like* phylogenetic species (Da Silva Neto *et al.*, 2009b); however, in this study, malate synthase was down regulated during interaction with the host (Da Silva Neto *et al.*, 2009b). However, we noted that malate synthase was highly expressed during the early interaction with the host and then decreased during the course of infection for the isolate Pb02 from the “PS2” phylogenetic species, therefore demonstrating its importance as an adhesin for the isolates from this phylogenetic species. Furthermore, we observed a small increase in malate synthase expression in the “S1” phylogenetic species, indicating that it also contributes to adhesion in the isolates from this phylogenetic species.

1-6 bisphosphate aldolase was another molecule studied in this work. This molecule is a protein that was characterized by Carneiro *et al.* (Carneiro *et al.*, 2005) and was later characterized as an adhesin by Silva (2008)(Silva, 2008b); it is transported by *P. brasiliensis* vesicles (Vallejo *et al.*, 2012b). Further studies of this protein as an adhesin should be performed, but in this study, we observed an overexpression of this protein in early interactions and during the course of the infection by “PS3.”and isolate increased expression in early infection for “PS2” isolate. Then, our study showed that each phylogenetic group has an outstanding adhesin and 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*.

This study presents a new perspective on the interaction of the *Paracoccidioides* species complex with its host and demonstrates the importance of studying each phylogenetic species and its unique characteristics during the course of infection.

5. Acknowledgments

The authors are grateful to the Fundação de Amparo Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) and the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico and Tecnológico (CNPq) for their financial support.

5. References

ANDREOTTI, P. F. **INTERAÇÃO DE *Paracoccidioides brasiliensis* COM CÉLULAS EPITELIAIS. CARACTERIZAÇÃO DE PROVÁVEIS FATORES DE VIRULÊNCIA.** 2006. 124 (Doctoral). Department of Clinical Analysis, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara FCFAr - UNESP, Araraquara, SP, Brazil.

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 2005a. ISSN 1286-4579. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15862780> >.

BAGAGLI, E. *et al.* Phylogenetic and evolutionary aspects of *Paracoccidioides brasiliensis* reveal a long coexistence with animal hosts that explain several biological features of the pathogen. **Infect Genet Evol**, v. 6, n. 5, p. 344-51, Sep 2006a. ISSN 1567-1348. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16473563> >.

_____. Paracoccidioides brasiliensis: phylogenetic and ecological aspects. **Mycopathologia**, v. 165, n. 4-5, p. 197-207, 2008 Apr-May 2008. ISSN 0301-486X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18777629> >.

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

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 2006a. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16368993> >.

_____. The glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase homologue is differentially regulated in phases of Paracoccidioides brasiliensis: molecular and phylogenetic analysis. **Fungal Genet Biol**, v. 41, n. 7, p. 667-75, Jul 2004. ISSN 1087-1845. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15275662> >.

BASTOS, K. P. et al. The transcriptome analysis of early morphogenesis in Paracoccidioides brasiliensis mycelium reveals novel and induced genes potentially associated to the dimorphic process. **BMC Microbiol**, v. 7, p. 29, 2007. ISSN 1471-2180. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17425801> >.

BATISTA, J. et al. Is the geographical origin of a Paracoccidioides brasiliensis isolate important for antigen production for regional diagnosis of paracoccidioidomycosis? **Mycoses**, v. 53, n. 2, p. 176-80, Mar 2010. ISSN 1439-0507. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19422525> >.

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

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

CASADEVALL, A.; PIROFSKI, L. A. Host-pathogen interactions: redefining the basic concepts of virulence and pathogenicity. **Infect Immun**, v. 67, n. 8, p. 3703-13, Aug 1999a. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10417127> >.

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

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 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, 2009a. ISSN 1471-2180. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20034376> >.

DE OLIVEIRA, K. M. et al. Intermolecular interactions of the malate synthase of *Paracoccidioides* spp. **BMC Microbiol**, v. 13, p. 107, 2013. ISSN 1471-2180. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23672539> >.

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 2009a. ISSN 0022-2615. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19429745> >.

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

_____. Functional genome of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 45, n. 3, p. 369-81, Sep 2005. ISSN 0928-8244. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16061364> >.

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

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

_____. Chlamydospore formation by *Paracoccidioides brasiliensis* mycelial form. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 31, n. 3, p. 151-7, 1989 May-Jun 1989. ISSN 0036-4665. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2617011> >.

GANIKO, L. et al. Paracoccin, an N-acetyl-glucosamine-binding lectin of *Paracoccidioides brasiliensis*, is involved in fungal growth. **Microbes Infect**, v. 9, n. 6, p. 695-703, May 2007. ISSN 1286-4579. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17400504> >.

GIANNINI, M. J. et al. Antibody response to the 43 kDa glycoprotein of *Paracoccidioides brasiliensis* as a marker for the evaluation of patients under treatment. **Am J Trop Med Hyg**, v. 43, n. 2, p. 200-6, Aug 1990. ISSN 0002-9637. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2389824> >.

GIL, M. L. et al. Binding of extracellular matrix proteins to *Aspergillus fumigatus* conidia. **Infect Immun**, v. 64, n. 12, p. 5239-47, Dec 1996. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8945572> >.

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

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 2000a. ISSN 1286-4579. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10962270> >.

LÓPEZ-RIBOT, J. L. et al. Interactions between *Candida albicans* and the human extracellular matrix component tenascin-C. **Mol Cell Biol Res Commun**, v. 2, n. 1, p. 58-63, Jul 1999. ISSN 1522-4724. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10527893> >.

LÓPEZ-RIBOT, J. L.; CHAFFIN, W. L. Binding of the extracellular matrix component entactin to *Candida albicans*. **Infect Immun**, v. 62, n. 10, p. 4564-71, Oct 1994. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7927722> >.

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 2012a. ISSN 1567-1364. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22443156> >.

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 2006a. ISSN 0737-4038. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16151188> >.

_____. Microsatellite analysis of three phylogenetic species of *Paracoccidioides brasiliensis*. **J Clin Microbiol**, v. 44, n. 6, p. 2153-7, Jun 2006. ISSN 0095-1137. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16757613> >.

MENDES-GIANNINI, M. J. et al. Binding of extracellular matrix proteins to *Paracoccidioides brasiliensis*. **Microbes Infect**, v. 8, n. 6, p. 1550-9, May 2006a. 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 2004a. ISSN 1286-4579. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15310464> >.

_____. Interactions of *Paracoccidioides brasiliensis* with host cells: recent advances. **Mycopathologia**, v. 165, n. 4-5, p. 237-48, 2008 Apr-May 2008a. ISSN 0301-486X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17940851> >.

_____. Infection and apparent invasion of Vero cells by *Paracoccidioides brasiliensis*. **J Med Vet Mycol**, v. 32, n. 3, p. 189-97, 1994a. ISSN 0268-1218. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7965489> >.

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

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

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

PALMEIRO, M.; CHERUBINI, K.; YURGEL, L. S. **Paracoccidioidomicose – Revisão da Literatura Scientia Medica**. Porto Alegre, RS, Brazil: PUCRS. 15: 274-278 p. 2005.

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 2007a. ISSN 1567-1356. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17714474> >.

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

PUCCIA, R. et al. The paracoccidioides cell wall: past and present layers toward understanding interaction with the host. **Front Microbiol**, v. 2, p. 257, 2011. ISSN 1664-302X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22194733> >.

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

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 2009a. ISSN 1095-9513. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19376249> >.

UNTEREINER, W. A. et al. The Ajellomycetaceae, a new family of vertebrate-associated Onygenales. **Mycologia**, v. 96, n. 4, p. 812-21, 2004 Jul-Aug 2004a. ISSN 0027-5514. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21148901> >.

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

_____. 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 2012a. ISSN 1535-3907. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22288420> >.

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

YANG, W. et al. Fungal invasion of epithelial cells. **Microbiol Res**, Mar 2014. ISSN 1618-0623. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24670964> >.

2. Co-autoria em artigos publicados pelo grupo durante período de doutorado

2.1. *Paracoccidioides brasiliensis* 30 kDa Adhesin: Identification as a 14-3-3 Protein, Cloning and Subcellular Localization in Infection Models. Revista: PLOS One

OPEN ACCESS Freely available online



Paracoccidioides brasiliensis 30 kDa Adhesin: Identification as a 14-3-3 Protein, Cloning and Subcellular Localization in Infection Models

Julhiany de Fatima da Silva¹, Haroldo César de Oliveira¹, Caroline Maria Marcos¹, Rosângela Aparecida Moraes da Silva¹, Tania Alves da Costa², Vera Lucia García Calich², Ana Marisa Fusco Almeida¹, Maria José Soares Mendes-Giannini^{1*}

¹ Department of Clinical Analyses, Faculty of Pharmaceutical Sciences, São Paulo State University - University Estadual Paulista Araraquara, São Paulo, Brazil, ² Department of Immunology, Biomedical Institute, São Paulo University, São Paulo, Brazil

Abstract

Paracoccidioides brasiliensis adhesion to lung epithelial cells is considered an essential event for the establishment of infection and different proteins participate in this process. One of these proteins is a 30 kDa adhesin, pI 4.9 that was described as a laminin ligand in previous studies, and it was more highly expressed in more virulent *P. brasiliensis* isolates. This protein may contribute to the virulence of this important fungal pathogen. Using Edman degradation and mass spectrometry analysis, this 30 kDa adhesin was identified as a 14-3-3 protein. These proteins are a conserved group of small acidic proteins involved in a variety of processes in eukaryotic organisms. However, the exact function of these proteins in some processes remains unknown. Thus, the goal of the present study was to characterize the role of this protein during the interaction between the fungus and its host. To achieve this goal, we cloned, expressed the 14-3-3 protein in a heterologous system and determined its subcellular localization in *in vitro* and *in vivo* infection models. Immunocytochemical analysis revealed the ubiquitous distribution of this protein in the yeast form of *P. brasiliensis*, with some concentration in the cytoplasm. Additionally, this 14-3-3 protein was also present in *P. brasiliensis* cells at the sites of infection in C57BL/6 mice intratracheally infected with *P. brasiliensis* yeast cells for 72 h (acute infections) and 30 days (chronic infection). An apparent increase in the levels of the 14-3-3 protein in the cell wall of the fungus was also noted during the interaction between *P. brasiliensis* and A549 cells, suggesting that this protein may be involved in host-parasite interactions, since inhibition assays with the protein and this antibody decreased *P. brasiliensis* adhesion to A549 epithelial cells. Our data may lead to a better understanding of *P. brasiliensis* interactions with host tissues and paracoccidioidomycosis pathogenesis.

Citation: Silva JdFd, Oliveira HCd, Marcos CM, Silva RAMd, Costa TAd, et al. (2013) *Paracoccidioides brasiliensis* 30 kDa Adhesin: Identification as a 14-3-3 Protein, Cloning and Subcellular Localization in Infection Models. PLoS ONE 8(4): e62533. doi:10.1371/journal.pone.0062533

Editor: Ise D. Jacobsen, Leibniz Institute for Natural Products Research and Infection Biology- Hans Knöll Institute, Germany

Received: October 31, 2012; **Accepted:** March 21, 2013; **Published:** April 30, 2013

Copyright: © 2013 Silva et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This investigation was financially supported by the Brazilian Organizations: FAPESP (Process Number 2011/18038-9), National Council for Scientific and Technological Development (Process number 473119/2010-2), PADCFCF-São Paulo State University and the funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. JFS has a fellowship from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: giannini@fca.unesp.br

Introduction

Paracoccidioides brasiliensis is a dimorphic fungus and the etiologic agent of paracoccidioidomycosis (PCM). This disease presents prolonged evolution and may involve several organs [1]. *P. brasiliensis* is considered a facultative intracellular fungus that can adhere to and invade epithelial cells *in vivo* and *in vitro* [2]. The adhesion and invasion abilities of the fungus are dependent on the virulence of the isolate [3], which can be attenuated or lost after subsequent cycles of subculture for long periods [4] and reestablished after passage in animals [5] or in epithelial cell culture. *P. brasiliensis* has multiple mechanisms of pathogenicity, including adherence, colonization, dissemination, survival in hostile environments and escape from immune response mechanisms that allow it to colonize the host and cause disease [6–8]. The fungus also uses a variety of surface molecules to bind to the extracellular matrix of the host cell and establish infection [9]. The molecular mechanisms involved from first contact with the

infectious agent to subsequent stages of the disease remain unknown. A necessary step in the colonization and, ultimately, development of diseases by pathogens is associated with their ability to adhere to the surface of the host. The ability to adhere is a widely distributed biological phenomenon that is shared by many organisms to enable them to colonize their habitats. Successful colonization is usually a complex event and involves surface proteins of the fungus and cellular receptors [10,11]. In this way, PCM development depends on interactions between the fungus and the host cell components.

Fungal virulence is a highly complex event resulting in the expression of multiple genes at different stages of infection, and adhesion and survival of the pathogen within the host appear to be essential in establishing pathogenesis. In this context, important virulence factors of the fungi have been described [2,12–19]. Pathogen adhesion requires the recognition of carbohydrate or protein ligands on the surface of the host cell or proteins of the extracellular matrix (ECM) [20–22]. Studies have characterized

2.2. Microplate alamarBlue Assay for *Paracoccidioides* Susceptibility Testing. Revista: Journal of Clinical Microbiology



Microplate alamarBlue Assay for *Paracoccidioides* Susceptibility Testing

A. C. A. de Paula e Silva, H. C. Oliveira, J. F. Silva, F. Sangalli-Leite, L. Scorzoni, A. M. Fusco-Almeida, M. J. S. Mendes-Giannini

Faculdade de Ciências Farmacéuticas, UNESP—Universidade Estadual Paulista, Araraquara, Departamento de Análises Clínicas, Laboratório de Micologia Clínica, São Paulo, Brazil

CLSI method M27-A3 is not available for use with dimorphic fungi, such as those of the *Paracoccidioides* genus. In this study, we developed a microdilution method and added the alamarBlue reagent to test the responses of *Paracoccidioides brasiliensis* and *Paracoccidioides lutzii* against amphotericin B and itraconazole antifungals. The test proved to be sensitive, practical, and inexpensive and can be used to monitor the activity of low-growth microorganisms and their response to various drugs.

Paracoccidioides brasiliensis and *Paracoccidioides lutzii* are dimorphic fungi and the etiologic agents of paracoccidioidomycosis, a disease with multiple clinical presentations, prolonged evolution, and high rates of mortality and morbidity (1–4). Until now, a lack of routine tests has made it difficult to determine whether patients who did not respond to treatment were infected with resistant strains (5–8). Amphotericin B (AMB) is still the first-choice drug despite its high toxicity, and itraconazole (ITZ) is effective for the mild and moderate forms of the disease (9, 10). A long course of therapy and sometimes even lifelong secondary prophylaxis are required, especially in AIDS patients, who have a high incidence of relapse (11). A more effective drug with a better safety profile than the currently available drugs would greatly improve the treatment of dimorphic fungal infections (10, 12).

CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) document M27-A3 has proposed a method for determining the *in vitro* susceptibility of yeasts to different drugs. However, no standardized method is available for dimorphic fungi because of the difficulty in culturing them. For these reasons, more reliable assays are needed for use with the genus *Paracoccidioides*. The ability to determine the MICs of different compounds would inform clinicians in the choice of an antifungal agent and the management of therapy, as well as facilitating screens of new molecules for their antifungal activity.

However, the microdilution method used today presents diffi-

culties in visually reading the MIC because there is a lack of significant fungal growth. Nevertheless, this test has been used in studies in the literature (12–15). In contrast, the microplate alamarBlue assay (MABA) has been evaluated by several authors in *Aspergillus fumigatus* (16), *Mycobacterium* spp. (17–19), and *Trypanosoma cruzi* (20). Resazurin, the active ingredient in the MABA (alamarBlue Biosource International, Invitrogen's BioSource division), is permeable, blue, and virtually nonfluorescent, but after entry into viable cells, resazurin is continuously reduced by the cells to resorufin, a highly fluorescent red compound.

The aim of our study was to compare the reference broth macrodilution microplate assay (MMA) and microdilution microplate assay (MMI) methods with the MABA to measure the presence of fungi of the *Paracoccidioides* genus and the activity of two drugs, AMB and ITZ.

The MMI and MMA were performed according to docu-

Received 26 September 2012 Returned for modification 4 December 2012

Accepted 10 January 2013

Published ahead of print 23 January 2013

Address correspondence to M. J. S. Giannini, giannini@fcdar.unesp.br.

Copyright © 2013, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/JCM.02914-12

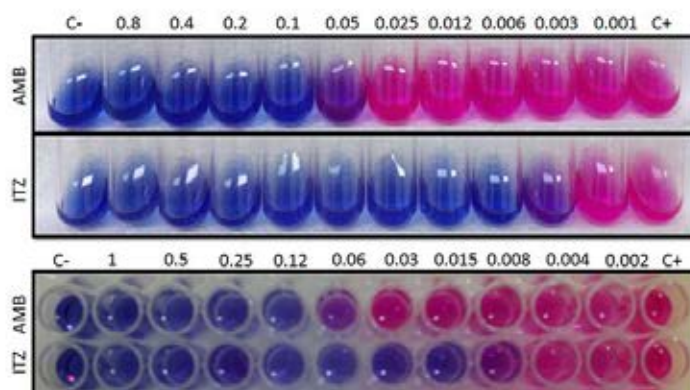


FIG 1 MMA and MMI tests developed with *P. brasiliensis* 18 against AMB and ITZ. The MIC values were determined after the addition of alamarBlue.

2.3. Surface-expressed enolase contributes to the adhesion of *Paracoccidioides brasiliensis* to host cells. Revista: FEMS Yeast Research



RESEARCH ARTICLE

Surface-expressed enolase contributes to the adhesion of *Paracoccidioides brasiliensis* to host cells

Caroline Maria Marcos, Julhiany de Fátima da Silva, Haroldo Cesar de Oliveira, Rosângela Aparecida Moraes da Silva, Maria José Soares Mendes-Giannini & Ana Marisa Fusco-Almeida

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

Correspondence: Ana Marisa Fusco Almeida, Faculty of Pharmaceutical Sciences, UNESP - Univ Estadual Paulista Araraquara, Department of Clinical Analysis, Clinical Mycology Laboratory, R. Expedicionários do Brasil, 1621, Araraquara, São Paulo CEP 14801-902, Brazil.
Tel.: +55 (16) 3301 5715;
fax: +55 (16) 3301 5714;
e-mail: ana.marisa@uol.com.br

Received 29 July 2011; revised 13 February 2012; accepted 21 March 2012.

DOI: 10.1111/j.1567-1364.2012.00806.x

Editor: Richard Calderone

Keywords

Paracoccidioides brasiliensis; enolase; adhesion; extracellular matrix; immunogold.

Abstract

Paracoccidioidomycosis is a systemic mycosis caused by the dimorphic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. Understanding the interactions between *P. brasiliensis* and the host tissue depends on the study of the different steps of the process of colonization, especially adhesion, in which the pathogen recognizes ligands on the surface of host cells. This study aimed to verify the role of enolase in the host cell–fungus interaction and the ability of enolase to bind to extracellular matrix components, to determine its subcellular localization, and to study the *P. brasiliensis* enolase amino acid sequence. The data revealed that fibronectin is the major ligand of enolase. Evaluation of the location of enolase at an ultrastructural level revealed that it is distributed in various cellular compartments, but at a high level in the cell wall. The analysis of the amino acid sequence revealed an internal plasminogen-binding motif ($_{254}\text{FYKADEKKY}_{262}$), which is conserved in most organisms and described as an important interaction site of the enolase with the host cell surface. This suggests that enolase performs additional functions related to the glycolytic pathway and also plays a role of adhesion in *P. brasiliensis*. Therefore, this study increases the knowledge about the characteristics of enolase and its influence on the binding process of *P. brasiliensis*.

Introduction

Fungal infections have come under increasing amounts of attention from the scientific community because of the inefficient treatment of systemic mycoses, which are the most severe forms of these infections. In Brazil, the number of deaths caused by systemic mycoses, such as paracoccidioidomycosis, cryptococcosis, histoplasmosis, candidiasis, aspergillosis, coccidioidomycosis, and zygomycosis, was 3583 between 1996 and 2006, with paracoccidioidomycosis being responsible for 51.2% of these cases (Prado *et al.*, 2009). *Paracoccidioides brasiliensis* is a thermally dimorphic fungus, and it causes infection when the mycelial propagules (conidia) are inhaled and invade airway alveoli and terminal bronchioles, where they transform into yeast cells (San-Blas & Nino-Vegas, 2002).

The ability of *P. brasiliensis* to cause a mycose, with a variety of clinical manifestations from localized forms to the disseminated disease progressing to lethality, probably depends on the relationship between the virulence of the

fungus, its ability to interact with and to invade the surface structures of the host and the immune response of the host (Mendes-Giannini *et al.*, 2000). It is known, however, that a wide spectrum of clinical presentations can occur, ranging from systemic to cutaneous forms, and the fungus can reach many tissues, especially the lung (Franco, 1987). The disease can directly affect the organs; therefore, *P. brasiliensis* may have evolved mechanisms that enable it to adhere, invade, and go beyond barriers imposed by host tissues (Lenzi *et al.*, 2000), and various substances are involved directly or indirectly in the host–fungus relationship.

The ability of cells to interact with each other in an orderly manner depends on multiple interactions that permit the adhesion between cells and with their extracellular environment, which are mediated by cell adhesion molecules (Trojanovsky, 1999). These molecules function as cell surface receptors, which not only hold cells together, but also trigger physical and biochemical signals that regulate a variety of functions such as cell prolifera-

2.4. Antifungal Activity of Maytenin and Pristimerin. Revista: Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine

Hindawi Publishing Corporation
Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine
Volume 2012, Article ID 340787, 6 pages
doi:10.1155/2012/340787

Research Article

Antifungal Activity of Maytenin and Pristimerin

Fernanda P. Gullo,¹ Janaina C. O. Sardi,¹ Vânia A. F. F. M. Santos,²
Fernanda Sangalli-Leite,¹ Nayla S. Pitangui,¹ Suélen A. Rossi,¹
Ana C. A. de Paula e Silva,¹ Luciana A. Soares,¹ Julhiany F. Silva,¹
Haroldo C. Oliveira,¹ Maysa Furlan,² Dulce H. S. Silva,² Vanderlan S. Bolzani,²
Maria José S. Mendes-Giannini,¹ and Ana Marisa Fusco-Almeida¹

¹Laboratory of Clinical Mycology, Department of Clinical Analysis, Faculty of Pharmaceutical Sciences, UNESP, Rua Expedicionários do Brasil 1621, 14801-902 Araraquara, SP, Brazil

²Institute of Chemistry, UNESP, Rua Professor Francisco Degni 55, 14800-900 Araraquara, SP, Brazil

Correspondence should be addressed to Ana Marisa Fusco-Almeida, ana.marisa@uol.com.br

Received 5 January 2012; Revised 17 February 2012; Accepted 23 March 2012

Academic Editor: Guillermo Schmeda-Hirschmann

Copyright © 2012 Fernanda P. Gullo et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Fungal infections in humans have increased alarmingly in recent years, particularly in immunocompromised individuals. Among the infections systemic candidiasis, aspergillosis, cryptococcosis, paracoccidioidomycosis, and histoplasmosis mortality are more prevalent and more severe in humans. The current high incidence of dermatophytosis is in humans, especially as the main etiologic agents *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton mentagrophytes*. Molecules pristimerin and maytenin obtained from the plant *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae) are known to show various pharmacological activities. This study aimed to evaluate the spectrum of antifungal activity of maytenin and pristimerin and their cytotoxicity in human keratinocytes (NOK cells of the oral mucosa). It was concluded that the best spectrum of antifungal activity has been shown to maytenin with MIC varying from 0.12 to 125 mg/L, although it is also active with pristimerin MIC ranging between 0.12 and 250 mg/L. Regarding the toxicity, both showed to have high IC₅₀. The SI showed high pristimerin against some species of fungi, but SI maytenin was above 1.0 for all fungi tested, showing a selective action of fungi. However, when comparing the two substances, maytenin also showed better results. The two molecules can be a possible prototype with a broad spectrum of action for the development of new antifungal agents.

1. Introduction

Fungal infections are mainly caused by opportunistic fungi and are usually associated with immunosuppression [1]. Over the past two decades, invasive fungal infections have emerged as a major threat to immunocompromised patients, since species of *Aspergillus*, *Candida*, *Cryptococcus*, and *Histoplasma* emerging pathogens such as *Fusarium* and *Trichophyton* can cause infection when defenses of host are broken [1]. Paracoccidioidomycosis is a fungal infection that is very important, which affects a large percentage of the rural population of Latin America [2].

There is now a great interest in the discovery of new molecules of natural origin for the treatment of various diseases [3]. Natural products have provided a wide variety of drugs and have become an alternative to large demand

for new antifungal drugs [4]. In Brazil, the use of medicinal plants in traditional medicine has increased considerably in recent years. The wide distribution of natural resources in Brazilian ecosystems and natural diversity of chemical components and provides the country with potential bioactive materials [5].

Maytenus ilicifolia (Celastraceae), popularly known as "espinheira santa," has been used in traditional medicine since the mid-1920s [6]. The secondary metabolites, maytenin and pristimerin (Figure 1), are classified as quinonemethide triterpenoids and mainly isolated from the bark of the roots of mature *M. ilicifolia* plants [7]. Several studies have shown that maytenin exhibits strong antimicrobial activity against Gram-positive and Gram-negative organisms, but there are no studies detailing the effects of these substances on fungi [8].

2.5. Differential gene expression analysis of *Paracoccidioides brasiliensis* during keratinocyte infection. Revista: Journal of Medical Microbiology.

Journal of Medical Microbiology (2011), 60, 269–280

DOI 10.1099/jmm.0.022467-0

Differential gene expression analysis of *Paracoccidioides brasiliensis* during keratinocyte infection

Roberta Peres da Silva, Marcelo Teruyuki Matsumoto, Jaqueline Derissi Braz, Aline Raquel Voltan, Haroldo Cesar de Oliveira, Christiane Pienna Soares and Maria José Soares Mendes Giannini

Departamento de Análises Clínicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, UNESP, Araraquara. CEP 14801-902, São Paulo, Brazil

Correspondence
Maria José Soares Mendes
Giannini
giannini@fctar.unesp.br

Paracoccidioides brasiliensis is the agent of paracoccidioidomycosis, one of the most important systemic fungal diseases in Latin America. This initiates in lung tissue and can subsequently disseminate to other tissues. Clinical manifestations range from localized forms to disseminated disease that can progress to lethality, probably depending on the relationships among the virulence of the fungus, the immune response and the ability to interact with the surface structures and invade epithelial cells and mononuclear cells of the host. It is generally regarded as a multifocal disease, with oral lesions as the prominent feature. The aim of this study was to evaluate *P. brasiliensis* yeast infection in normal oral keratinocytes (NOKs). The differential expression of mRNAs and proteins was also determined when the fungus was placed in contact with the cell in order to characterize differentially expressed genes and proteins during *P. brasiliensis* infection. After contact with NOKs, the fungus appeared to induce alterations in the cells, which showed cellular extensions and cavitations, probably resulting from changes in the actin cytoskeleton seen at 5 and 8 h after infection. Levels of protein expression were higher after reisolation of the fungus from infected NOK culture compared with culture of the fungus in medium. The analysis identified transcripts related to 19 proteins involved in different biological processes. Transcripts were found with multiple functions including induction of cytokines, protein metabolism, alternative carbon metabolism, zinc transport and the stress response during contact with NOKs. The proteins found suggested that the yeast was in a stress situation, as indicated by the presence of RDS1. Nevertheless, the yeast seemed to be proliferating and metabolically active, as shown by the presence of a proteasome, short-chain acetylator, glucosamine-6-phosphate isomerase and ADP/ATP carrier transcripts. Additionally, metabolic pathways may have been activated in order to eliminate toxic substances from the cell as a zinc transporter was detected, which is a potential target for the development of future drugs.

Received 18 May 2010
Accepted 11 November 2010

INTRODUCTION

Paracoccidioides brasiliensis is a thermodimorphic pathogenic fungus, the aetiological agent of paracoccidioidomycosis (PCM), an endemic disease geographically limited to Latin America and one of the most prevalent human deep systemic mycoses found in Brazil, Colombia and Venezuela (San-Blas *et al.*, 2002). The transition from mycelium at 25 °C to yeast at 37 °C is essential for *P. brasiliensis* to establish the disease (Franco *et al.*, 1997). *P. brasiliensis* may be inhaled and, once in the lungs, the fungus initiates a process of morphological transition into the pathogenic yeast form (San-Blas *et al.*, 2002).

PCM has a multiplicity of clinical presentations, from cutaneous to systemic forms, and can attack various tissues, especially the lungs (Benard & Franco, 2007). Oral mucosal lesions are commonly multiple, with a granular, mulberry-like surface and microulcerations, and microscopically are observed as a granulomatous inflammatory reaction and pseudoepitheliomatous hyperplasia that can be mistaken as neoplastic (Kaminagakura *et al.*, 2006; Moscardi-Bacchi *et al.*, 1989; Scully & de Almeida, 1992), which can be a problem clinically as the oral lesions of PCM closely resemble carcinoma (Kaminagakura *et al.*, 2006). The fungus may use a sequence of different mechanisms to become established in the host, from the first contact with host cells until the later stages of the disease. In particular, the mechanisms involved in

Abbreviations: NOK, normal oral keratinocyte; PCM, paracoccidioidomycosis; RDA, representational difference analysis.