

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA

Caroline Maria Marcos

Funcionalidade das proteínas EF-Tu e 14-3-3
na virulência de *Paracoccidioides*
brasiliensis

Araraquara

2015

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA

Caroline Maria Marcos

Funcionalidade das proteínas EF-Tu e 14-3-3
na virulência de *Paracoccidioides*
brasiliensis

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. Ana Marisa Fusco Almeida

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

Araraquara

2015

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

“A mente que se abre a uma nova ideia, jamais voltará ao seu tamanho original.”

ALBERT EINSTEIN

Agradecimentos

Sou profundamente grata à minha orientadora, Profa. Dra. Ana Marisa Fusco Almeida por acreditar em meu trabalho, pela confiança a mim depositada durante toda a realização de meu doutorado. Agradeço por ser sempre tão solícita em todos os momentos, e por ter participado dia-a-dia de meu crescimento profissional, e principalmente por cuidar de nosso grupo não medindo esforços para que tudo esteja fluindo da melhor maneira possível. Muito obrigada pelos ensinamentos, pela força e carinho.

Agradeço também a participação da Profa. Dra. Maria José Soares Mendes Giannini no desenvolvimento deste trabalho, estando sempre de prontidão para o esclarecimento de dúvidas e também emissão de sugestões relevantes para a lapidação deste trabalho. Obrigada pela sua ajuda.

Gostaria de deixar expressa aqui minha gratidão ao Prof. Dr. Juan G. McEwen e Prof. Dr. Orville Hernández Ruiz por todos os ensinamentos transmitidos para a realização de parte fundamental deste trabalho durante meu doutorado sanduíche em Medellín-Colômbia. Agradeço toda a compreensão e principalmente toda hospitalidade despendida a mim nesta etapa tão importante. Junto a vocês estendo meus agradecimentos a todo o grupo da unidade de Biología Celular e Molecular da Corporación para Investigaciones Biológicas, com os quais tive o imenso prazer de compartilhar momentos de intenso aprendizado com muita alegria e animação. Angela Maria Lopez, Diana Patricia Tamayo, Isaura Patricia Torres, Jose Fernando Muñoz Gómez, Luisa Fernanda Gómez Londoño, Ana Maria García Cepero, Ana Maria Carmona Arango, Monica Mejia Ochoa, Oscar Mauricio Gomez, muito obrigada!! Relembro de todos com muitas saudades e espero que um dia possamos nos reencontrar e celebrar a amizade fruto desses momentos. ¡Los echo de menos!

À minha família não há palavras que expressem todo o agradecimento, a meus pais Lourenço e Isabel, irmãos Lourenço e Isabelle e afilhada Bebel, vocês representam toda a força que tive para levar esse objetivo adiante, por vezes o desânimo e as dificuldades apareceram e essa travessia parecia sem fim, mas vocês mesmo estando longe e às vezes sem se darem conta me confortaram, me deram esperança e todo o amor através de gestos e palavras que me impulsionaram a superar mais esse grande desafio de minha

vida. Sou grata por tê-los ao meu lado e sem vocês nada disso teria sido possível, por isto esta conquista também é de vocês. E não me canso de dizer como é grande meu amor por todos.

Dedico agradecimento especial ao meu amor Pedro Balistieri, você mais do que ninguém acompanhou de perto todo o desenrolar dessa história. Companheirismo, amizade, paciência, compreensão, apoio, alegria e amor não faltaram de sua parte e foram imprescindíveis para a conclusão deste trabalho. Nos momentos difíceis foi em você que me apoiei, assim como a cada meta atingida com êxito foi com você a celebração. Aprendeu a dizer *Paracoccidioides brasiliensis*, paracoccidioidomicose e até falar sobre meu trabalho de tanto me ouvir falar, *rsrsrs*. Amor te amo. Aproveito para agradecer também a toda sua família, a qual faço parte também e dizer que todos sempre me apoiaram muito e sou muito grata e feliz por isto.

E eis que chega o momento de agradecer a muitos e tantos “velhos” amigos dessa jornada, já com medo de não conseguir dar conta de expressar tamanha gratidão merecida a vocês. Sem percebermos construímos uma teia de solidariedade, muito afeto e amizade que se perpetuarão pelo tempo. A caminhada igualmente para todos foi difícil ou está sendo, e a todo o momento somos atropelados por diversos percalços, que são amenizados pelo simples fato de estarmos juntos, nos motivando. Somos sim com todo o primor da palavra, pesquisadores, e o que nos impulsiona é a busca por respostas e mais dúvidas por essa mesma resposta, e mais respostas e mais dúvidas, e o ciclo felizmente não se finaliza! com muita paixão, consciência, dedicação extra-carga horária, mas sem esquecer sempre da frase que surgiu recentemente via *internet*: “Viver não cabe no Lattes”!

Amigos que participaram diretamente deste processo e que estão presentes em minha vida mesmo fora do ambiente de trabalho, Haroldo Cesar de Oliveira, Julhiany de Fátima da Silva, Patrícia Akemi Assato, Liliana Scorzoni, Suélen Andréia Rossi, Ana Carolina Alves de Paula e Silva e Rosângela Aparecida da Silva Moraes obrigada por toda a ajuda em todos os sentidos. Sei reconhecer a importância de cada um, mas todos são especiais!!!

Agradeço também ao restante da família Micologia pela ajuda, pela ótima convivência e todos os momentos de descontração, Cláudia, Wan, Mônica, Fernanda Zangalli, Junya, Natália, Tomate, Fer Gullo, Nayla, Kayla, Carol MG, Regina, Jaque, Tati. Obrigada!

Agradeço também a Tatiana Watanabe, Isabel Silva e Deivys Leandro Portuondo Fuentes por toda a solicitude fundamental para o desenvolvimento deste trabalho. Muito obrigada!!

Lembro-me de agradecer também as amigas de longa data por todo o apoio e companheirismo, Cris Seccato e Isabela Manzolli, obrigada!

Sumário

1	INTRODUÇÃO GERAL	7
1.1	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i> : um breve resumo	7
1.2	Patogênese e manifestações clínicas	10
1.3	Termodimorfismo	12
1.4	Ferramentas genéticas para o estudo de <i>P. brasiliensis</i>	14
1.5	Moléculas que participam da adesão de <i>P. brasiliensis</i> ao hospedeiro	16
1.6	Fator de alongação Tu de <i>P. brasiliensis</i>	18
1.7	Proteína 14-3-3 de <i>P. brasiliensis</i>	22
2	OBJETIVOS	26
2.1	Objetivo geral	26
2.2	Objetivos específicos	26
3	MATERIAIS E METODOLOGIAS	27
3.1	Comitê de ética	27
3.2	Cultura de células	27
3.3	Obtenção da proteína PbEF-Tu recombinante e produção do anticorpo anti-PbEF-Tu ...	27
3.3.1	Microrganismo e condições de cultivo	27
3.3.2	Extração de RNA e síntese de cDNA	28
3.3.3	Construção de oligonucleotídeos e amplificação do gene	28
3.3.4	Clonagem do cDNA codificante de EF-Tu em vetor de expressão pET100/D-TOPO	30
3.3.5	Transformação em bactéria <i>Escherichia coli</i> TOP10 com o plasmídeo pET100/D-TOPO-PbEF-Tu	32
3.3.6	Extração de DNA plasmidial, análise por PCR de colônia e sequenciamento dos plasmídeos recombinantes pET100/D-TOPO-PbEF-Tu obtidos na etapa de expansão do inserto em <i>E. coli</i> TOP10	32
3.3.7	Transformação em bactéria <i>E. coli</i> BL21 Star TM (D3) com o plasmídeo recombinante pET100/D-TOPO-PbEF-Tu e análise dos clones	33
3.3.8	Indução da expressão de PbEF-Tu-6xHis	33
3.3.9	Macroindução e purificação da proteína PbEF-Tu-6xHis em coluna de afinidade ...	34
3.3.10	Eletroeluição das frações contendo a proteína PbEF-Tu e confirmação da proteína obtida por espectrometria de massas	35
3.3.11	Produção de anticorpos anti-PbEF-Tu	36
3.3.12	Preparo do extrato total de proteínas de <i>P. brasiliensis</i>	36
3.3.13	Titulação do soro policlonal anti-PbEF-Tu	36

3.3.14	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i> (ELISA) para <i>screening</i> de ligação da proteína PbEF-Tu a componentes da matriz extracelular e plasminogênio	37
3.3.15	Viabilidade celular de <i>P. brasiliensis</i> após o tratamento com o anticorpo anti-PbEF-Tu	38
3.3.16	Ensaio de inibição da interação de <i>P. brasiliensis</i> com pneumócitos após o tratamento do fungo com o anticorpo anti-PbEF-Tu.....	38
3.4	Silenciamento gênico de PbEF-Tu e Pb14-3-3	39
3.4.1	Microrganismos e condições de cultivos utilizados para a etapa de silenciamento gênico	39
3.4.2	Desenho dos oligonucleotídeos utilizados para o silenciamento	40
3.4.3	Vetores utilizados	42
3.4.4	Amplificação dos fragmentos antisentidos a partir de DNA de <i>P. brasiliensis</i>	42
3.4.5	Restrição dos insertos e plasmídeo pCR35 com as enzimas <i>AscI</i> e <i>XhoI</i>	43
3.4.6	Ligação dos insertos no vetor pCR35 e transformação em <i>E. coli</i> DH5 α	44
3.4.7	PCR de colônia para confirmação da clonagem no vetor pCR35	44
3.4.8	PCR confirmatória da clonagem em pCR35	45
3.4.9	Restrição enzimática confirmatória com <i>AscI</i> e <i>XhoI</i> para verificar clonagem no vetor pCR35	45
3.4.10	Obtenção dos insertos <i>CBP-1-EFTu-CAT-B</i> e <i>CBP-1-14-3-3-CAT-B</i>	46
3.4.11	Restrição de <i>CBP-1-EFTu-CAT-B</i> e do plasmídeo pUR5750 com a enzima <i>KpnI</i> ...46	
3.4.12	Ligação dos insertos <i>CBP-1-EFTu-CAT-B</i> e <i>CBP-1-14-3-3-CAT-B</i> no vetor binário pUR5750 e transformação em <i>E. coli</i> TOP10.....	47
3.4.13	PCR de colônia para confirmação da clonagem no vetor pUR5750	48
3.4.14	PCR confirmatória da clonagem em pUR5750	48
3.4.15	Restrição enzimática confirmatória com <i>AscI</i> e <i>XhoI</i> para verificar a clonagem no vetor pUR5750	49
3.4.16	Transformação em <i>Agrobacterium tumefaciens</i> com os plasmídeos PbEF-Tu-pUR5750 e Pb14-3-3-pUR5750.....	49
3.4.17	PCR confirmatória da transformação em <i>A. tumefaciens</i> com iniciadores dos vetores pUR5750 e pCR35, antisentidos e <i>hph</i> (hygromycin resistance)	49
3.4.18	Transformação em <i>P. brasiliensis</i> mediada por <i>A. tumefaciens</i>	50
3.4.19	Extração de DNA de <i>P. brasiliensis</i>	51
3.4.20	PCRs confirmatórias da transformação de <i>P. brasiliensis</i>	52
3.4.21	Análise da expressão gênica das cepas silenciadas por PCR em tempo real	52
3.4.22	Extração de proteínas e <i>immunoblotting</i> para verificar alterações na produção da proteína Pb14-3-3 após o silenciamento gênico.....	53
3.4.23	Curva de crescimento e ensaio de viabilidade.....	53

3.4.24	Microscopia para averiguar a morfologia dos isolados silenciados	54
3.4.25	Adesão dos diferentes isolados à pneumócitos	54
3.4.26	Ligação dos diferentes isolados à MEC	55
3.4.27	Ocorrência de apoptose em pneumócitos infectados com os diferentes isolados pela técnica de TUNEL	55
3.4.28	Avaliação da virulência dos diferentes isolados utilizando modelo de <i>Galleria mellonella</i>	56
3.4.29	Análise estatística	56
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
4.1	Obtenção da proteína EF-Tu recombinante de <i>P. brasiliensis</i> e anticorpo anti-EF-Tu	58
4.1.1	Qualidade do RNA extraído e obtenção do inserto PbEF-Tu	58
4.1.2	Obtenção do plasmídeo <i>PbEF-TU-pET100/D-TOPO</i> pela transformação em <i>E.coli</i> TOP10.....	59
4.1.3	Confirmação da transformação em <i>E. coli</i> BL21 Star TM (D3)	59
4.1.4	Indução da expressão	61
4.1.5	Purificação da proteína <i>PbEF-Tu</i> recombinante	62
4.1.6	Eletroeluição de <i>PbEF-Tu</i> recombinante e sua identificação após sequenciamento por espectrometria de massas	63
4.1.7	Análise do anticorpo anti- <i>PbEF-Tu</i> por <i>Western blot</i>	64
4.1.8	Ligação de <i>PbEF-Tu</i> aos componentes da matrix extracelular	65
4.1.9	Inibição da adesão de <i>P. brasiliensis</i> à pneumócitos utilizando anticorpo anti- <i>PbEF-Tu</i>	67
4.2	Silenciamento gênico de <i>PbEF-Tu</i> e <i>Pb14-3-3</i>	69
4.2.1	Obtenção dos amplicons para utilização no silenciamento	69
4.2.2	Confirmação por PCR da transformação em pCR35	70
4.2.3	Confirmação da clonagem em pCR35 por PCR de colônia	71
4.2.4	Restrição enzimática com <i>XhoI</i> e <i>AscI</i> confirmatória da clonagem no vetor pCR35.....	72
4.2.5	PCR para amplificação dos insertos <i>CBP-1-EFTu-CAT-B</i> e <i>CBP-1-14-3-3-CAT-B</i>	73
4.2.6	Confirmação da clonagem no vetor pUR5750 por PCR de colônia.....	73
4.2.7	PCR confirmatória da clonagem no vetor pUR5750 com iniciadores do vetor pCR35, vetor pUR5750 e antisentido.....	74
4.2.8	Restrição enzimática com <i>XhoI</i> e <i>AscI</i> confirmatória da clonagem no vetor pUR5750	75
4.2.9	Estratégia utilizada para clonar os oligonucleotídeos antisentido nos vetores pCR35 e pUR5750	76

4.2.10	Confirmação da transformação em <i>A. tumefaciens</i>	76
4.2.11	Confirmação da transformação em <i>P. brasiliensis</i>	78
4.2.12	Representação da transformação de <i>P. brasiliensis</i> mediada por <i>A. tumefaciens</i>	79
4.2.13	Análise da expressão gênica dos isolados silenciados	79
4.2.14	<i>Immunoblotting</i>	81
4.2.15	Viabilidade e crescimento dos isolados silenciados.....	81
4.2.16	Morfologia.....	83
4.2.17	Ensaio de afinidade de ligação à matriz extracelular	85
4.2.18	Adesão dos isolados silenciados à pneumócitos	87
4.2.19	Indução de apoptose dos isolados Pb14-3-3-aRNA e PbEF-Tu-aRNA	90
4.2.20	Virulência dos isolados Pb14-3-3-aRNA e PbEF-Tu-aRNA	93
5	CONCLUSÕES.....	99
6	REFERÊNCIAS	101

Lista de Figuras

- Figura 1.** Árvore sem raiz mostrando as divisões encontradas em 65 isolados de *P. brasiliensis*. Baseado na análise de parcimônia e Bayes de oito loci gênicos considerados em conjunto. S1 consiste de um grande grupo de isolados do Brasil, Argentina, Peru e Paraguai, PS2 representa uma espécie filogenética críptica de *P. brasiliensis* (até agora seis isolados de Brasil e Venezuela) e PS3 foram um grupo separado de isolados colombianos. Os valores acima dos ramos representam os valores individuais de cada ramo na seguinte ordem: comprimento dos ramos (reflete a distância genética entre os grupos), valores de *bootstrap* e probabilidade posterior. (Matute *et al.*, 2006)..... 9
- Figura 2.** Mapa mostrando a distribuição da PCM na América Latina..... 10
- Figura 3.** Formas clínicas da paracoccidiodomicose. A) Aguda ou Juvenil (pacientes com lesões muco-cutâneas). B) Crônica ou Adulta (paciente com extenso envolvimento da pele e lesões ulceradas) (Corporación para Investigaciones Biológicas', CIB, arquivos)..... 12
- Figura 4.** Morfologia de *P. brasiliensis*. Características macroscópicas da forma leveduriforme (A) e forma miceliar (B). Características microscópicas do cultivo da forma leveduriforme (C) e miceliar (D). Microscopia eletrônica de conídios (E) e (F), as setas brancas indicam conídios intercalares (Wanke and Londero, 1994; Barros, 2010)..... 13
- Figura 5.** Mecanismo de silenciamento gênico via RNA antisense. (<<http://www.learnonly.com/2013/03/antisense-oligonucleotides-technology.html>>)..... 16
- Figura 6.** Sequência codificadora da ORF EF-Tu de Pb18 (Broad Institute - número de acesso PADG_01949.1). A sequência gênica possui 1559 nucleotídeos sendo que 1326 nucleotídeos codificam para a proteína EF-Tu de Pb18 (sequência sem íntrons). As sequências sublinhadas representam as regiões onde os iniciadores *forward* e *reverse* se alinham. 29
- Figura 7.** A) Representação esquemática do vetor pET100/D-TOPO(Invitrogen) utilizado nas clonagens (5764 pb). B) Representação da clonagem direcional utilizando o kit Champion™ pET Directional TOPO Expression (Invitrogen) (<http://www.molecularinfo.com/MTM/F/F2/F2-7.pdf>). 31
- Figura 8.** Construção de oligonucleotídeos. Esquema geral para construção dos iniciadores para amplificação de várias sequências de RNA antisense a partir de 5' UTR e região codificadora do gene de interesse.(Menino *et al.*, 2012) 40
- Figura 9.** Representação dos vetores pCR35 e pUR5750. (de Groot *et al.*, 1998; Rappleye *et al.*, 2004) 42
- Figura 10.** A) Gel de agarose 1,5% com amostras de RNA extraído de Pb18. Demonstração das unidades 18S e 28S de DNA ribossomal. B) Fragmento referente ao gene EF-Tu. Eletroforese em gel de agarose 0,8 % a 120 V por aproximadamente 2 h e visualização em luz UV. PM corresponde ao padrão de massa molecular de 1 Kb (Fermentas), e a seta corresponde ao gene

EF-Tu de *P. brasiliensis* a ser utilizado na clonagem (aproximadamente 1326 pb). Géis corados com GelRed (Uniscience). 58

Figura 11. PCR de colônia com iniciadores referentes ao gene do estudo. 1-9: Colônias obtidas da transformação em *E. coli* TOP10. A seta indica a banda de tamanho esperado (1326 pb) que confirma a clonagem. PM: corresponde ao padrão de massa molecular de 1 Kb Plus (Fermentas). Gel corado com GelRed (Uniscience). 59

Figura 12. A) PCR de colônia com iniciadores referentes ao gene EF-Tu. 1-9: Colônias obtidas da transformação em *E. coli* BL21 StarTM (D3). A seta indica a banda de tamanho esperado (1326 pb) que confirma a clonagem. B) Confirmação da clonagem por restrição com as enzimas *SalI* e *NdeI*. As setas indicam os fragmentos liberados após a restrição, 653 pb e 6437 pb. PM: corresponde ao padrão de massa molecular de 1 Kb Plus (Fermentas). Géis corados com GelRed (Uniscience). C) Sequenciamento confirmatório. Sequência gerada após o sequenciamento de DNA plasmidial, plasmídeo PbEF-Tu-pET100/D-TOPO com iniciador T7, específico do vetor utilizado. 60

Figura 13. SDS-PAGE da padronização da indução da expressão de EF-Tu. EF-Tu recombinante apresentou expressão diferenciada em ambas as concentrações de IPTG avaliadas (0,5 mM e 1,0 mM) para todos os tempos. kDa: representa o padrão de massa molecular. A seta aponta as bandas referentes à proteína recombinante (51,6 kDa). Coloração com Coomassie Brilliant Blue 350R (GE Healthcare). 61

Figura 14. Cromatograma de purificação da proteína EF-Tu realizado no aparelho AKTA-FPLC. Eluição com tampão imidazol 80-100 %; podem ser observados dois picos de eluição da proteína, o primeiro entre as frações 6 e 9 e outro entre as frações 12 e 14, picos estes que correspondem às frações onde há maior probabilidade de se encontrar a proteína de interesse purificada. 62

Figura 15. Purificação da proteína EF-Tu recombinante. SI: fração sem adição de IPTG da macro-indução; I: fração correspondente à macro-indução nas condições consideradas ótimas; FT, *Flowthrough*; 5-14, diferentes eluições coletadas durante a cromatografia de afinidade. rec: proteína EF-Tu recombinante após passagem da fração 14 em filtro centricon para purificação. Gel SDS-PAGE 10 %, corado com Coomassie Azul. 63

Figura 16. SDS-PAGE para verificar purificação da proteína EF-Tu recombinante por meio da técnica de eletroeluição. Coloração por Coomassie Brilliant Blue R350 (GE Healthcare), kDa: marcador molecular, EE: amostra eletroeluída, a seta indica a proteína PbEF-Tu purificada. .. 63

Figura 17. Verificação da reatividade do soro policlonal anti-PbEF-Tu por *Immunoblotting*. +: reagido com; Anti EF-Tu: anticorpo policlonal anti-PbEF-Tu; PbEF-Tu: proteína PbEF-Tu recombinante; ET: extrato total de Pb18; SNC: soro normal de coelho. Foram testadas duas concentrações do anticorpo anti-EF-Tu obtido, 1:100 e 1:250. 65

Figura 18. Ligação da proteína PbEF-Tu recombinante em diferentes concentrações (5 e 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$) aos componentes da MEC (10 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e plasminogênio (10 $\mu\text{g mL}^{-1}$) por ELISA. Os resultados estão expressos em unidades de absorbância. Teste: EFTu, proteína PbEF-Tu recombinante; Controles: apenas MEC (matriz extracelular) ou PLG (plasminogênio); MEC ou

PLG + Ac2° (anticorpo secundário, anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase); MEC ou PLG + Ac1° (anticorpo anti-PbEF-Tu) + Ac2°; EFTu + Ac1° e Ac 2°. *: absorvância superior (>10 %, estabelecido como *cut-off* da reação) ao controle EFTu + Ac1° e Ac2°, indicando que houve ligação à MEC ou PLG devido à presença da proteína PbEF-Tu..... 66

Figura 19. Ensaio de viabilidade celular de *P. brasiliensis* para verificar alterações referentes ao tratamento com anticorpos anti-PbEF-Tu ou soro normal de coelho (SNC) através do método de XTT. Para todos os tempos avaliados não houve diferença significativa entre todas as amostras. Pb18: *P. brasiliensis* isolado Pb18..... 68

Figura 20. Ensaio de inibição da adesão após o tratamento de *P. brasiliensis* com o anticorpo anti-PbEF-Tu para verificar o envolvimento da proteína PbEF-Tu na interação do fungo com pneumócitos. * $p \leq 0,05$ quando comparados o fungo sem tratamento com o anticorpo e o fungo tratado com o anticorpo anti-PbEF-Tu; SNC: soro normal de coelho. 69

Figura 21. Amplificação dos amplicons a serem utilizados nas transformações iniciais para o silenciamento gênico. MW: Marcador molecular de 100 pb. Gel de agarose 1 %. A seta indica os fragmentos de tamanhos esperados (100-150 pb)..... 70

Figura 22. PCR de colônia com iniciadores do vetor pCR35. Colônias obtidas da transformação com os antisentidos referentes a EF-Tu (A) e 14-3-3 (B). C-: controle negativo, PCR feita com o vetor vazio. Os clones negativos estão marcados com o sinal de menos acima. A seta indica a banda no tamanho esperado de aproximadamente 1800 pb que confirma a clonagem. MW: marcador molecular de 100 pb. 71

Figura 23. PCR confirmatória da clonagem no vetor pCR35. PCR feita com o DNA plasmidial dos clones 2 e 7 da clonagem com o antisentido EF-AS4 no vetor pCR35 (A), e clone 1 e 2 da clonagem de 14-3-3-AS3 (B). C+: controle positivo (não amplificou), C-: controle negativo. MW: peso molecular de 100 pb. Banda de aproximadamente 1800 pb para a confirmação com iniciadores do vetor pCR35 e banda entre 100-150 pb para a confirmação com os iniciadores referentes às moléculas antisentido. 72

Figura 24. Restrição enzimática confirmatória com *XhoI* e *AscI* do DNA plasmidial obtido da clonagem no vetor pCR35. A) Restrição dos clones da clonagem com os antisentidos EF-Tu-AS4, e B) 14-3-3-AS3. As setas apontam os fragmentos de tamanhos esperados: CBP-1 (promotor, 896 pb), CAT-B (terminador, 757 pb), inserto (± 100 pb). MW: peso molecular de 100 pb..... 72

Figura 25. Amplicons *CBP-1-EFTu-CAT-B* e *CBP-1-14-3-3-CAT-B*. PCR com DNA plasmidial dos clones 2 e 7 para PbEF-Tu aRNA (A) e clones 1 e 2 para Pb14-3-3 aRNA (B) utilizando Taq *High Fidelity* e iniciadores do vetor pCR35 para obtenção do inserto a ser utilizado na clonagem no vetor pUR5750. Banda de tamanho esperado de 1.800 pb. MW: peso molecular de 100 pb. 73

Figura 26. PCR de colônia com iniciadores de pUR5750. A) Transformação com o inserto *CBP-1-EF-AS4-CAT-B* e B) *CBP-1-14-3-3-AS3-CAT-B*. C-: controle negativo, banda de 300 pb. C+: controle positivo, banda de 1800 pb. +: clones positivos (aproximadamente 1800 pb). PM: peso molecular de 100 pb)..... 74

Figura 27. PCR confirmatória da clonagem em pUR5750. Clones 16 e 23 da transformação dos insertos *CBP-1-EF-Tu-CAT-B* e *CBP-1-14-3-3-CAT-B*, respectivamente, no plasmídeo pUR5750. MW: peso molecular de 100 pb. AS: PCR realizada com iniciadores dos antisentidos (banda de \pm 100 pb), pUR5750: PCR realizada com iniciadores do vetor pUR5750 (banda de \pm 1800 pb) e pCR35: PCR realizada com os iniciadores do vetor pCR35..... 75

Figura 28. Restrição enzimática confirmatória com *XhoI* e *AscI* do DNA plasmidial obtido da clonagem no vetor pUR5750. Restrição dos clones da clonagem com os antisentidos EF-Tu-AS4 (clone 16), e 14-3-3-AS3 (clone 23). As setas apontam os fragmentos de tamanhos esperados: CBP-1 (promotor, 896 pb), CAT-B (terminador, 757 pb), inserto (\pm 100 pb). MW: peso molecular de 100 pb..... 75

Figura 29. Esquema da estratégia utilizada para obtenção dos plasmídeos recombinantes contendo as moléculas antisentidos (Barros, 2010) com modificações. 76

Figura 30. A) PCR confirmatória da transformação dos plasmídeos *PbEF-Tu-pUR5750* e *PbE14-3-3-pUR5750* em *A. tumefaciens*. C+: controles positivos, C-: controles negativos. MW: peso molecular de 100 pb. B) T-DNAs construídos para o silenciamento via RNA antisense de *PbEF-Tu* e *Pb14-3-3* em *P. brasiliensis* via ATMT. T-DNA contém o gene que confere resistência à higromicina (*HPH*) sob controle do promotor GPDA e terminador TTRCP; oligonucleotídeos antisentidos *Pb14-3-3-aRNA* e *PbEF-Tu-aRNA* sob controle do promotor *CBP-1* e terminador *cat-B*. 77

Figura 31. Confirmação da transformação em *P. brasiliensis*. A) PCR com iniciadores referentes à molécula AS (100-150 pb), iniciadores do vetor pCR35 (aproximadamente 1800 pb), primers do vetor pUR5750 (1800 pb) e B) PCR com iniciadores para *hph* (gene de resistência à higromicina) (900-1000 pb), utilizando-se DNA de *PbEF-Tu-aRNA*, *Pb14-3-3-aRNA*, *PbWT* e *PbEV*. 78

Figura 32. Representação da ATMT (agrotransformação) em células leveduriformes de *P. brasiliensis* (Barros, 2010). 79

Figura 33. Expressão relativa de *Pb14-3-3* e *PbEF-Tu*. A) Nível de expressão gênica de *Pb14-3-3* em *PbWT*, *PbEV* e *Pb14-3-3-aRNA* após um mês da transformação e após 12 meses de subcultivos, sendo possível observar redução da expressão gênica de *Pb14-3-3* no isolado silenciado *Pb14-3-3-aRNA* para ambos os períodos avaliados. B) Nível de expressão gênica de *PbEF-Tu* em *PbWT*, *PbEV* e *PbEF-Tu-aRNA* após um mês da transformação e após 12 meses de subcultivos, sendo possível observar redução da expressão gênica de *PbEF-Tu* no isolado silenciado *PbEF-Tu-aRNA* para ambos os períodos avaliados. Controle da expressão gênica endógena foi realizado com o gene da β -tubulina2. *** $p < 0.0001$ quando comparado com *PbWT* e *PbEV*. 80

Figura 34. *Immunoblotting*. A) *Blot* das proteínas totais de *PbWT* e *Pb14-3-3-aRNA*, membranas coradas com Ponceau S (Sigma); B) e C) *Immunoblotting* de proteínas totais de *PbWT* e *Pb14-3-3-aRNA* com anticorpos anti-*Pb14-3-3* policlonal e monoclonal respectivamente. 81

- Figura 35.** Silenciamento de Pb14-3-3 não altera o crescimento celular e viabilidade de *P. brasiliensis*. PbWT, PbEV e Pb14-3-3-aRNA foram avaliados por (A) ensaio colorimétrico de redução de XTT em diferentes tempos e (B) turbidimetria do cultivo determinada na densidade óptica de 600 nm em diferentes tempos. 82
- Figura 36.** Silenciamento de PbEF-Tu não altera o crescimento celular ou viabilidade de *P. brasiliensis*. PbWT, PbEV e PbEF-Tu-aRNA foram avaliados por (A) ensaio colorimétrico de redução de XTT em diferentes tempos e (B) turbidimetria do cultivo determinada na densidade óptica de 600 nm em diferentes tempos. 83
- Figura 37.** Silenciamento de PbEF-Tu não ocasiona alterações morfológicas em células leveduriformes de *P. brasiliensis*. Microscopia de fluorescência (Calcofluor) de células leveduriformes de PbWT, PbEV e PbEF-Tu-aRNA; aumento de 40 X. As barras brancas correspondem a 5 µm. 84
- Figura 38.** Silenciamento de Pb14-3-3 leva a alterações morfológicas em células leveduriformes de *P. brasiliensis*. Microscopia de fluorescência de células leveduriformes de PbWT, PbEV e Pb14-3-3-aRNA; aumento de 40 X. As barras brancas correspondem a 5 µm. 84
- Figura 39.** Ligação de Pb14-3-3-aRNA à componentes da matriz extracelular é reduzida quando comparada ao isolado PbWT. Ligação de células leveduriformes dos isolados PbWT e Pb14-3-3 aRNA aos componentes da matriz extracelular: laminina, fibronectina, colágenos tipo I e IV ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$). A interação foi realizada através de ELISA. * $p < 0,05$ quando comparado PbWT e Pb14-3-3-aRNA para laminina e fibronectina. 86
- Figura 40.** Interação de células leveduriformes de Pb14-3-3-aRNA com pneumócitos é principalmente afetada em tempos iniciais de infecção. A adesão foi analisada por citometria de fluxo em diferentes tempos. * $p < 0,05$ quando comparado PbWT e PbEV com Pb14-3-3-aRNA para os tempos de 2 h e 5 h de infecção. 88
- Figura 41.** Interação de células leveduriformes de PbEF-Tu-aRNA com pneumócitos é afetada a partir de 8h e se mantém em tempo posterior de infecção. A adesão foi avaliada por citometria de fluxo em diferentes tempos. * $p < 0,05$ quando comparado PbWT e PbEV com PbEF-Tu-aRNA para os tempos 8 h e 24 h de infecção. 88
- Figura 42.** Indução da fase inicial de apoptose de pneumócitos infectados com PbEF-Tu-aRNA e Pb14-3-3-aRNA pela técnica de TUNEL. A) Pneumócitos infectados com os diferentes isolados de *P. brasiliensis* e não infectados pelo período de 5h; B) Pneumócitos infectados com os diferentes isolados de *P. brasiliensis* e não infectados pelo período de 24h; a intensidade de fluorescência nuclear indica a presença de DNA fragmentado e portanto fase inicial de apoptose. *: $p < 0,05$; 90
- Figura 43.** Silenciamento de Pb14-3-3 reduz a virulência de *P. brasiliensis* em modelo de infecção de *Galleria mellonella*. Curva de sobrevivência do experimento de infecção realizado em *G. mellonella* com 5×10^6 células leveduriformes de PbWT, PbEV e Pb14-3-3-aRNA; $p < 0,05$ quando comparado PbWT e PbEV com Pb14-3-3-aRNA. $n=16$ 94

Figura 44. Silenciamento de PbEF-Tu reduz a virulência de *P. brasiliensis* em modelo de infecção de *Galleria mellonella*. Curva de sobrevivência do experimento de infecção realizado em *G. mellonella* com 5×10^6 células leveduriformes de PbWT, PbEV e PbEF-Tu-aRNA; $p < 0.05$ quando comparado PbWT e PbEV com PbEF-Tu-aRNA. n=16. 94

Lista de Tabelas

Tabela 1. Iniciadores utilizados na amplificação da sequência codificante de EF-Tu. Em negrito no iniciador <i>forward</i> está demonstrada a sequência adicional necessária para a clonagem no vetor pET100/D-TOPO.....	29
Tabela 2. Oligonucleotídeos utilizados para amplificação dos diferentes fragmentos (antisentidos) do gene EF-Tu de <i>P. brasiliensis</i>	41
Tabela 3. Oligonucleotídeos utilizados para amplificação dos diferentes fragmentos (antisentidos) do gene 14-3-3 de <i>P. brasiliensis</i>	41
Tabela 4. Reação de clivagem dos fragmentos dos antisentidos.....	43
Tabela 5. Reação de clivagem do vetor pCR35	44
Tabela 6. Oligonucleotídeos complementares ao vetor pCR35	45
Tabela 7. Reação de clivagem de <i>CBP-I-EFTu-CAT-B</i>	47
Tabela 8. Reação de clivagem do vetor pUR5750	47
Tabela 9. Oligonucleotídeos complementares ao vetor pUR5750	48
Tabela 10. Iniciadores utilizados para a análise de expressão dos genes EF-Tu e 14-3-3 de <i>P. brasiliensis</i>	53
Tabela 11. Proteínas identificadas a partir da banda eletroeluída, digerida e submetida ao sequenciamento por espectrometria de massas.	64

Lista de abreviaturas, siglas e estruturas químicas

%: porcentagem

°C: graus Celsius

6xHis: seis resíduos de histidina

μF: microfarad

μL: microlitros

μM: micrômetro

μM: micromolar

β: letra grega que significa “beta”

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

AOX: oxidase

aRNA: RNA antisense

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

ATMT: transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens*

BHI: *brain heart infusion*

BL21 StarTM (D3): *E. coli* eletrocompetentes adequadas para a transformação e expressão de proteínas

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

bp: par de base

BSA: soro albumina bovina

C3b: fragmento maior liberado pela proteólise do componente C3 do sistema complemento

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

cDNA: *complementary Deoxyribonucleic acid* (DNA complementar)

CFSE: carboxyfluorescein succinimidyl ester

CIAP: calf intestinal alkaline phosphatase

cm: centímetro

CR3: receptores para o sistema complemento em diferentes tipos celulares

CTLA-4: linfócito-T citototóxico associado à proteína 4

DAB: diaminobenzidina

DEPC: dicarbonato de dietila

DH5 α : *E. coli* eletrocompetente

DNA: ácido desoxirribonucleico

dNTP: desoxirribonucleotídeos fosfatados

DO: densidade óptica

DTT: ditionitrito

ELISA: *Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay*

EF-Tu: fator de elongação Tu

EF-Ts: fator de troca de nucleotídeos guanina

ET: extrato total de proteínas de *P. brasiliensis*

FKS: gene 1,3- β -D-glucana sintase

GAPDH: glicose-6-fosfato desidrogenase

GDP: guanosina difosfato

gp43: glicoproteína de 43kDa

GTP: guanosina trifosfato

GTPase: enzima que hidrolise GTP

h: horas

HAM F12: *meio de cultivo para pneumócitos*

HPH: gene de resistência à higromicina

HRP: horseradish peroxidase

HSP90: *heat shock protein*

IL: interleucina

IPTG: isopropiltiogalactosídeo

ITS: *internal transcribed spacers*

kb: quilobase

kDa: kilodalton

kV: quilovolt

LB: meio Luria-Bertani

mΩ: miliohm

M: molar

MAPK: *Mitogen-activated protein kinase*

Mb: mega pares de bases

MEC: matriz extracelular

MI: meio de indução

min: minutos

mL: mililitro

mm³: milímetro cúbico

mM: milimolar

mRNA: RNA mensageiro

ng: nanograma

nm: nanômetro

ORF: *open reading frame*

PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida

Pb: *Paracoccidioides brasiliensis*

Pb14-3-3: proteína 14-3-3 de *P. brasiliensis*

Pb-14-3-3-aRNA: isolado de *P. brasiliensis* com redução da na expressão do gene 14-3-3

PbDFG5p: proteína de *P. brasiliensis* defeituosa para o crescimento filamentosos

PbEF-Tu: proteína EF-Tu de *P. brasiliensis*

PbEF-Tu-aRNA: isolado de *P. brasiliensis* com redução na expressão do gene EF-Tu

PbEV: isolado de *P. brasiliensis* transformado com o vetor pUR5750 vazio

PbHAD: hidrolase de *P. brasiliensis*

PBS: solução salina tamponada com fosfatos

PbWT: isolado de *P. brasiliensis* selvagem

PCM: paracoccidiodomicose

PCR: reação da polimerase em cadeia

PLAAC: mistura de inibidores de protease composto de pepstatina, leupeptina, aprotinina, antipaina e quimiostatina

PLG: plasminogênio

pmol: picomol

PMSF: fenil-metil-sulfonil fluoreto

PTK: proteína tirosina quinase

RAPD: *Random Amplified Polymorphic DNA*

RFLP: *Restriction Fragment Length Polymorphism*

rpm: rotações por minuto

RNA: ácido ribonucleico

rRNA: RNA ribossomal

SDS: dodecil sulfato de sódio

T-DNA: DNA de transferência

Ti: *tumor inducing*

TLR: *toll-like receptor*

TOP10: *E. coli* eletrocompetentes adequadas para a transformação e expansão plasmidial

TPI: triose fosfato isomerase

tRNA: RNA transportador

TUNEL: terminal deoxy-transferase mediated X-dUTP nick end labeling

U: unidade

XTT: 2,3-bis (2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-(2H)-tetrazolio-5-carboxanilida

RESUMO

Paracoccidioides brasiliensis é o agente causador da paracoccidioidomicose (PCM), micose sistêmica com ampla distribuição na América Latina. A adesão e invasão de células do hospedeiro são eventos cruciais envolvidos na infecção e disseminação do patógeno. Além disso, estes utilizam suas moléculas de superfície para se ligar aos componentes da matriz extracelular para estabelecer a infecção. O sucesso de colonização dos tecidos do hospedeiro pelo fungo é um evento complexo, geralmente envolvendo um ligante codificado pelo patógeno (adesinas) e um receptor da célula (frequentemente um componente da matriz extracelular). A identificação de mecanismos de adesão, invasão ou evasão imune por *Paracoccidioides* é extremamente relevante e tem sido alvo de pesquisas recentes desenvolvidas por vários grupos. Neste intuito o estudo dos passos envolvidos desde o contato inicial de *P. brasiliensis* até os que culminam com a sua entrada na célula através da caracterização funcional de proteínas de membrana de *P. brasiliensis*, principais alvos de interação com moléculas do hospedeiro, é de grande importância. O Fator de alongação Tu, pertence ao grupo de proteínas denominadas “moonlighting”, tais moléculas possuem a capacidade de exercer mais de uma função e, normalmente, localizam-se em diferentes compartimentos da célula. Há relatos que EF-Tu de agentes patogênicos possa atuar como um fator de virulência. Previamente esta proteína foi identificada em *P. brasiliensis* por análise proteômica, sendo diferencialmente expressa quanto o fungo foi cultivado na presença de sangue de carneiro, porém esta ainda não foi caracterizada sendo interessante então a elucidação do seu papel na interação deste fungo às células epiteliais. O objetivo deste estudo foi produzir a proteína EF-Tu recombinante e seu respectivo anticorpo policlonal, verificar o papel desta na interação do fungo com pneumócitos, componentes da matriz extracelular e plasminogênio. Ainda a fim de caracterizar a proteína EF-Tu o presente estudo teve como objetivo a obtenção de isolado com baixa expressão do gene codificante de EF-Tu e com esta verificar novamente o papel da proteína EF-Tu na interação com pneumócitos, fisiologia, morfologia e virulência de *P. brasiliensis*. A proteína EF-Tu de *P. brasiliensis* foi capaz de se ligar a fibronectina e plasminogênio. Uma observação importante é que o tratamento de *P. brasiliensis* com o anticorpo anti-PbEF-Tu promoveu considerável inibição da adesão de *P. brasiliensis* à pneumócitos cultivados *in vitro*. O isolado de *P. brasiliensis* silenciado para EF-Tu apresentou menor capacidade de aderir e induzir apoptose à pneumócitos e em modelo de infecção *in vivo*, larvas de *Galleria mellonella* infectadas com tal isolado resultou em maior sobrevivência destas larvas. Essas observações indicam que a proteína EF-Tu de *P. brasiliensis* contribui para adesão deste fungo e para a disseminação do mesmo.

Outra proteína descrita por nosso grupo, a proteína 14-3-3, também foi alvo deste estudo e para avaliar o seu papel em *P. brasiliensis* realizamos o silenciamento desta. O isolado de *P. brasiliensis* com redução na produção da proteína 14-3-3 apresentou menor capacidade de aderir e induzir apoptose à pneumócitos e em modelo de infecção *in vivo*, larvas de *Galleria mellonella* infectadas com tal isolado resultou em

maior sobrevivência destas larvas. Foi possível demonstrar que a proteína 14-3-3 exerce papel na regulação da manutenção da forma leveduriforme desse fungo. Em *P. brasiliensis* diversas alterações morfológicas e fenotípicas ocorrem durante o processo de transição da fase micelial para leveduriforme, processo este fundamental inerente à patogenicidade do fungo.

Tais dados contribuem para o maior conhecimento da patogenicidade deste fungo, vislumbrando assim um possível bloqueio dos alvos iniciais envolvidos na interação parasito-hospedeiro.

ABSTRACT

Paracoccidioides brasiliensis is the causative agent of paracoccidioidomycosis (PCM), a systemic mycosis with broad distribution in Latin America. The adhesion and host cell invasion are critical events involved in the infection and dissemination of the pathogen. Furthermore, they use their surface molecules to bind to extracellular matrix components to establish infection. The successful colonization of host tissues by the fungus is a complex event, usually involving a linker encoded by the pathogen (adhesins) and a cell receptor (often an extracellular matrix component). The identification of adhesion mechanisms, invasion or immune evasion by *P. brasiliensis* is extremely important and has been investigated in recent studies developed by several groups. In order to study the steps involved from the initial contact of *P. brasiliensis* until the culminating in its entry into the host cell through the functional characterization of *P. brasiliensis* membrane proteins, the main targets of interaction with host molecules, is of great importance. The elongation factor Tu (EF-Tu) belongs to the group of proteins called "moonlighting" such molecules have the ability to perform more than one function, and typically are located in different compartments of the cell. There are reports that EF-Tu of pathogens can act as a virulence factor. This protein has been previously identified in *P. brasiliensis* by proteomic analysis, but this has not yet been characterized as being interesting then the elucidation of its role in interacting of the fungus with epithelial cells. For this purpose the aim of this study was to produce the recombinant protein and its respective polyclonal antibody, verify your role in the fungus interaction with pneumocytes, extracellular matrix and plasminogen. Also in order to characterize the EF-Tu protein the present study aimed to obtain isolated with low expression of the gene encoding EF-Tu and with this verifies the role of EF-Tu protein in the interacting with pneumocytes, physiology, morphology and virulence of *P. brasiliensis*. The EF-Tu protein of *P. brasiliensis* was able to bind to fibronectin and plasminogen. An important observation is that the treatment of *P. brasiliensis* with anti-PBEF-Tu antibody promoted considerable inhibition of adhesion of *P. brasiliensis* in vitro cultured of pneumocytes. The isolate of *P. brasiliensis* silenced for EF-Tu showed lower ability to adhere to pneumocytes and inducing apoptosis. The in vivo model of infection, *Galleria mellonella* larvae infected with this isolate resulted in longer survival of these larvae. These observations indicate that EF-Tu protein of *P. brasiliensis* contributes to adhesion of this fungus and dissemination of it.

Another protein described by our group, a 14-3-3 protein, was also the target of this study and to evaluate its role in *P. brasiliensis* realized their silencing. The isolate of *P. brasiliensis* with reduced production of the protein 14-3-3 showed lower ability to adhere to pneumocytes and inducing apoptosis, in the in vivo model of infection, *Galleria mellonella* larvae infected with such isolated resulted in longer survival of these larvae. It was possible to show that 14-3-3 protein plays a role in regulating the maintenance of the yeast form of this fungus. In *P. brasiliensis* several morphological

and phenotypic changes occur during the transition phase of mycelial to yeast, a process fundamental inherent in the pathogenicity of the fungus.

These data contribute to a better understanding of the pathogenicity of this fungus, thus envisioning a possible blockage of the initial targets involved in host-parasite interaction.

CAPÍTULO 1-Tese

1 INTRODUÇÃO GERAL

1.1 *Paracoccidioides brasiliensis*: um breve resumo

Fungos são organismos ubíquos que ocorrem em quase todos os ambientes. Enquanto mais de cem mil espécies de fungos são conhecidas até o momento, apenas uma minoria é responsável por causar doenças em mamíferos e, particularmente em humanos. Quando no hospedeiro, transições morfológicas são frequentemente necessárias para expressar certo grau de virulência em alguns fungos. Dentre os importantes fungos patogênicos dimórficos podemos citar *Candida albicans*, *Histoplasma capsulatum* e *Paracoccidioides sp.* cujos processos morfogenéticos são tema de intensos estudos (Momany, 2005; Berman, 2006). *P. brasiliensis* cresce como micélio saprofítico na temperatura do meio ambiente enquanto na temperatura do hospedeiro infectado ocorre uma mudança para a forma leveduriforme patogênica.

Há mais de cem anos, em 1908, Adolpho Lutz (1855-1940) descreveu pela primeira vez em São Paulo, capital do estado brasileiro homônimo, a paracoccidioidomicose (PCM) ao analisar exames histológicos de um de seus pacientes, onde observou a ausência de esférulas com esporos no seu interior o que diferenciava este fungo de outros espécimes característicos de coccidioidomicose, publicando suas observações na revista “Brasil Médico”. Nessa publicação, Lutz afirmava ter obtido o cultivo do parasito a partir de lesões de boca observadas em indivíduos infectados, iniciaram-se então inúmeros registros de casos e tentativas de isolamento do fungo para a sua caracterização (Lacaz *et al.*, 1982). Alguns anos depois, Splendore em diversos trabalhos descreveu novos casos em pacientes da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo, realizando um estudo minucioso da morfologia do fungo, propondo em 1912 a denominação *Zymonema brasiliensis* para designar o microrganismo causador dessa forma de micose profunda. A moléstia passou, então a ser denominada “blastomicose brasileira” e, logo após, “blastomicose sul-americana”, em decorrência dos casos observados em outros países da América do Sul. Outras sinônimas foram criadas, como: granulomatose blastomicoide neotropical, granuloma paracoccidioidico, adenomicose e doença de Lutz (Lacaz *et al.*, 1991). Porém só em 1930, Floriano de Paulo Almeida incluiu um novo gênero dentro do Reino Fungi – o *Paracoccidioides*, revalidando a espécie *brasiliensis* descoberta anteriormente por Splendore. O termo “paracoccidioidomicose” (PCM) foi instituído oficialmente em 1971, durante o primeiro simpósio sobre este tema, sediado na cidade de Medellín (Colômbia) e persiste até hoje como nomenclatura oficial (Lacaz, 1994).

Para entender a fisiopatologia de qualquer agente infeccioso, uma das peças-chave é o conhecimento de seu habitat. No caso de *P. brasiliensis* o seu preciso nicho ecológico permanece indefinido, principalmente devido às dificuldades de isolar a sua

forma miceliar (Montenegro and Franco, 1994). É importante ressaltar que as reserváreas de PCM, isto é, o local onde coincidem habitat e infecção, é influenciado por vários fatores abióticos como a disponibilidade de água (Simões *et al.*, 2004). Estudos epidemiológicos sugerem que áreas endêmicas de PCM estejam localizadas em regiões com certas características ecológicas que favoreçam a presença de *P. brasiliensis* como temperatura entre 17 °C e 24 °C, alta umidade com pluviosidade anual variando entre 500 a 2500 mm³, florestas abundantes e cursos de rios, invernos curtos e verões chuvosos (Brummer *et al.*, 1993; Restrepo-Moreno, 2003).

Portanto o ambiente de *P. brasiliensis* é normalmente definido como exógeno para os seres humanos, com várias evidências apontando para o solo de florestas tropicais e subtropicais úmidas da América Central e Sul como seu provável habitat (Hogan *et al.*, 1996). Consistentemente, *P. brasiliensis* têm sido frequentemente isolado do tatu de nove-faixas, *Dasyopus novemcinctus*, no Brasil (Bagagli *et al.*, 1998; Silva-Vergara *et al.*, 2000; Bagagli *et al.*, 2003) e a partir de tatu-de-rabo-mole, *Cabassous centralis* na Colômbia (Corredor *et al.*, 1999; Restrepo, 2000). Foi encontrado em 75-100% de tatus de áreas hiperendêmicas para PCM (Bagagli *et al.*, 1998; Restrepo, 2000; Bagagli *et al.*, 2003), e foi recuperado de animais jovens e adultos que não apresentavam nenhum sinal de doença (Bagagli *et al.*, 1998; Bagagli *et al.*, 2003). Por possuírem uma baixa temperatura corporal variando entre 32,7 °C e 35,3 °C (Boily, 2002), uma baixa resposta do sistema imunológico (Purtilo *et al.*, 1975) e constante contato com *P. brasiliensis* no solo, os tatus podem adquirir o patógeno repetidamente.

A demonstração da alta incidência de *P. brasiliensis* nesses animais deram novas perspectivas para o entendimento da ecologia e evolução deste patógeno. Está se tornando claro que este grupo de fungos evoluiu para um estilo de vida associado a hospedeiros animais, com a manutenção da fase saprofítica no ambiente (Bagagli *et al.*, 2006).

Embora por muitos anos *P. brasiliensis* tenha sido classificado como um fungo imperfeito pertencente ao filo *Deuteromycota*, classe *Hyphomycetes*, principalmente devido à falta de identificação de estruturas sexuais (San-Blas *et al.*, 2002), recentes avanços de metodologias moleculares (incluindo cariotipagem, eletroforese multi-locus enzimática, RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) entre outros; Bowman *et al.* (1996) com base na tipagem epidemiológica e genética de populações têm se revelado útil na resolução da ambiguidade taxonômica. Comparações filogenéticas com base na subunidade ribossomal rRNA 28S, colocou mais precisamente *P. brasiliensis* como pertencente a ordem *Onygenales*, família *Onygenaceae*, filo *Ascomycota*, em conjunto com outros fungos patogênicos humanos como *Blastomyces dermatitidis*, *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis* (Leclerc *et al.*, 1994; Bagagli *et al.*, 2006). Recentemente com base na análise filogenética de 65 isolados, três espécies filogenéticas diferentes (S1, PS2 e PS3) de *P. brasiliensis* foram reconhecidas através do sequenciamento nucleotídico de 8 loci gênicos de 65 (Matute *et al.*, 2006) (Figura 1).

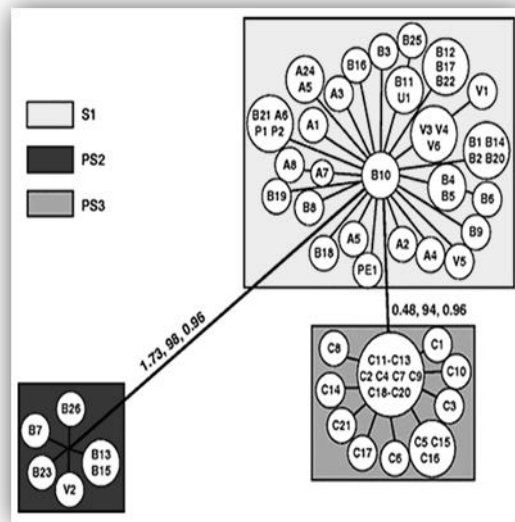


Figura 1. Árvore sem raiz mostrando as divisões encontradas em 65 isolados de *P. brasiliensis*. Baseado na análise de parcimônia e Bayes de oito loci gênicos considerados em conjunto. S1 consiste de um grande grupo de isolados do Brasil, Argentina, Peru e Paraguai, PS2 representa uma espécie filogenética críptica de *P. brasiliensis* (até agora seis isolados de Brasil e Venezuela) e PS3 foram um grupo separado de isolados colombianos. Os valores acima dos ramos representam os valores individuais de cada ramo na seguinte ordem: comprimento dos ramos (reflete a distância genética entre os grupos), valores de *bootstrap* e probabilidade posterior. (Matute *et al.*, 2006).

O fungo até então era considerado uma espécie única de seu gênero até se propor a existência de três espécies filogenéticas: PS3 um grupo geograficamente restrito à Colômbia; PS2 encontrado predominantemente no Brasil, nos Estados de São Paulo e Minas Gerais e também Venezuela; S1 está distribuída no Brasil, Argentina, Paraguai, Peru e Venezuela (Matute *et al.*, 2006). Posteriormente Carrero e colaboradores (2008) mostraram por meio de análises das regiões codificantes e não codificantes de vários genes, bem como a região ITS (*internal transcribed spacers*), que com exceção dos genes FKS 1 e catalase A, o isolado Pb01 ficou distante de todos os outros isolados de *Paracoccidioides* spp. utilizados neste estudo, sugerindo a possibilidade de mais do que três espécies filogenéticas de *Paracoccidioides*, onde o isolado Pb01 seria uma nova espécie dentro do gênero (Carrero *et al.*, 2008; Theodoro *et al.*, 2008).

A PCM considerada uma micose endêmica, já foi encontrada em 14 países da América Latina, com alta taxa de incidência no Brasil (80 %) seguido de Venezuela e Colômbia (Figura 2). Estima-se que mais de 10 milhões de pessoas estejam infectadas por este fungo, mas apenas 2 % virão a desenvolver a doença (McEwen *et al.*, 1995).

No entanto, principalmente devido à globalização e intensa conexão migratória, a PCM também tem sido relatada em outras áreas, como América do Norte, Ásia e Europa (Gushulak and MacPherson, 2000). No Brasil, a maior incidência ocorre nos estados de São Paulo, Rio de Janeiro e Minas Gerais. Nas últimas décadas houve muitas alterações da frequência e na distribuição geográfica da doença chegando a atingir até a região Norte do país, sobretudo a Amazônia devido à expansão das fronteiras agrícolas.

A PCM é apontada como a 8ª causa de morte no Brasil, considerando as doenças infecciosas e parasitárias, predominantemente crônicas (Coutinho *et al.*, 2002). Todas as raças são suscetíveis. Fatores genéticos podem estar associados, bem como má nutrição e alcoolismo. É possível que atividades relacionadas à agropecuária e a melhoria dos testes diagnósticos expliquem estas alterações (Shikanai-Yasuda *et al.*, 2006). Os casos relatados fora da área endêmica são de pacientes que visitaram ou residiram por algum tempo em um país latino-americano (Bicalho *et al.*, 2001; Paniago *et al.*, 2003). O conhecimento sobre a epidemiologia da infecção baseia-se em inquéritos com a reação intradérmica de leitura tardia, que é considerada uma estratégia simples, adequada e de baixo custo para avaliar a prevalência regional do patógeno (Mangiaterra *et al.*, 1996). Embora existam relatos mostrando a dificuldade de comparar resultados desse exame, face à heterogeneidade dos antígenos, há dados que mostram estes testes positivos nas formas subclínicas e crônicas e negativos nas formas agudas e subagudas (tipo juvenil).

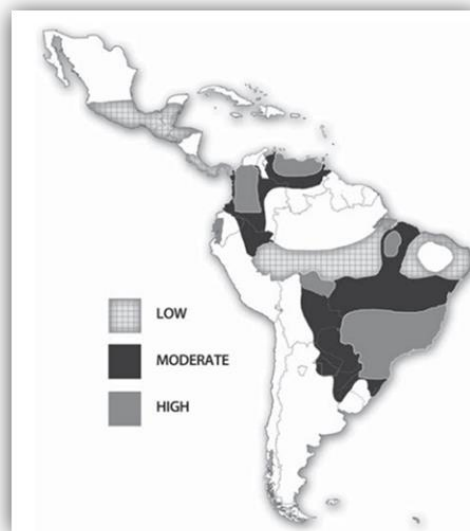


Figura 2. Mapa mostrando a distribuição da PCM na América Latina.

1.2 Patogênese e manifestações clínicas

O longo período de latência da PCM, bem como a falta de surtos epidêmicos e o fato de ser uma doença que não possui notificação compulsória criam dificuldades na

determinação das circunstâncias em que a infecção primária ocorreu (Franco *et al.*, 2000). No entanto o acúmulo de dados epidemiológicos junto às evidências experimentais e clínicas levam a crer que o processo patogênico ocorre através da inalação de propágulos fúngicos presentes no ar (como fragmentos de micélio ou conídios). Uma vez dentro do hospedeiro os propágulos atingem o epitélio alveolar pulmonar e transformam-se na forma leveduriforme parasitária (Franco, 1987; McEwen *et al.*, 1987; Brummer *et al.*, 1993) e que podem levar a diversas manifestações clínicas (Montenegro and Franco, 1994).

A PCM é uma doença infecciosa, granulomatosa, crônica e sistêmica. A principal rota de infecção ocorre pela inalação dos conídios produzidos pela forma miceliana do fungo, que ao atingirem os pulmões podem converter-se para a forma patogênica de levedura, sendo este processo considerado um passo fundamental para o estabelecimento bem sucedido da infecção (Franco, 1987) sendo a fase inicial da interação parasito-hospedeiro (de Camargo and de Franco, 2000). A doença é caracterizada pelo polimorfismo das lesões (de Almeida, 2005), formação de grânulos epiteliais com áreas de necrose central, um halo de linfomononuclear e fibrose (de Camargo and de Franco, 2000). Não existe relato de transmissão inter-humana (Brummer *et al.*, 1993).

Dependendo de fatores do hospedeiro, grau de virulência do isolado, condições ambientais, um grande espectro de manifestações clínicas e patológicas podem ser observados nesses pacientes (Montenegro and Franco, 1994), onde a grande maioria (mais de 60 % em áreas endêmicas) desenvolvem apenas a forma assintomática ou subclínica da PCM (Souza *et al.*, 2000), o qual algumas vezes progride para a doença de fato com diversas formas clínicas. A doença apresenta duas formas clínicas principais: a forma aguda ou subaguda (tipo juvenil), e a forma crônica (tipo adulto) (Franco, 1987; Lacaz, 1994) (Figura 3).

A forma aguda ou subaguda afeta principalmente crianças e adultos jovens de ambos os sexos, representando apenas 3-5 % de todos os casos. É caracterizada por uma evolução rápida e severa (semanas a meses) com disseminação para o sistema retículo-endotelial levando a um marcante envolvimento e hipertrofia de baço, fígado, nódulos linfáticos, podendo acometer inclusive a medula óssea.

Por outro lado, a forma crônica ocorre principalmente em adultos do sexo masculino (aproximadamente 80-90 %) e pode ser restrita a apenas um órgão ou disseminar-se para vários órgãos e tecidos, ocorrendo mais frequentemente o envolvimento pulmonar, da mucosa oral e da laringe, pele, gânglios linfáticos, glândulas supra-renais, com curso de evolução mais lento (meses a anos). Além disso, enquanto a forma aguda ou sub-aguda da PCM resulta em uma taxa de mortalidade significativa, a forma crônica conduz a uma considerável morbidade do paciente (Brummer *et al.*, 1993). No entanto, outros contextos clínicos têm sido recentemente mais frequentes, como exemplo o envolvimento do sistema nervoso central como alvo na PCM

(neuroparacoccidioidomicose) (Tristano *et al.*, 2004; Fagundes-Pereyra *et al.*, 2006; Pedroso *et al.*, 2009; Alves *et al.*, 2011).

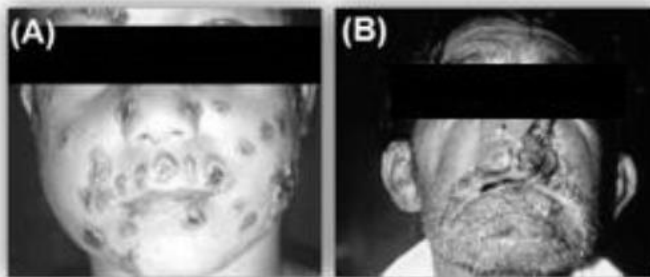


Figura 3. Formas clínicas da paracoccidioidomicose. A) Aguda ou Juvenil (pacientes com lesões muco-cutâneas). B) Crônica ou Adulta (paciente com extenso envolvimento da pele e lesões ulceradas) (Corporación para Investigaciones Biológicas, CIB, arquivos).

Uma importante característica desta micose é sua marcante incidência em homens, em uma relação homem/mulher estimada em aproximadamente 48:1 (Restrepo *et al.*, 1984). Vários estudos apontam para esta predileção pelo sexo masculino, sugerindo que o mecanismo básico deste processo envolva a regulação hormonal. A exposição de *P. brasiliensis* a hormônios femininos, tais como estrógeno, bloqueia a transição de conídios ou micélios a leveduras (Restrepo *et al.*, 1984; Salazar *et al.*, 1988; Clemons *et al.*, 1989), provavelmente via proteínas citosólicas ligantes de esteróides (Loose *et al.*, 1983), e isso contribui para uma baixa porcentagem de mulheres infectadas (Aristizabal *et al.*, 1998).

1.3 Termodimorfismo

Uma característica importante de vários fungos patogênicos é a sua habilidade inerente em assumir cada uma, forma filamentosa ou morfologia unicelular em resposta a condições do meio ambiente ou quando estão em contato com tecidos do hospedeiro infectado (San-Blas *et al.*, 2002). Este processo em geral referido como dimorfismo, é uma propriedade genética intrínseca de certos fungos, e parece estar relacionada à patogenicidade, uma vez que cepas incapazes de realizar a transição morfológica são em sua maioria avirulentas (Maresca and Kobayashi, 2000).

Temperatura, fatores nutricionais, ou ambos, são geralmente os agentes que ativam a mudança morfológica (San-Blas *et al.*, 2002). Entretanto em *P. brasiliensis* a capacidade em conduzir uma transição entre forma leveduriforme e miceliar é dependente apenas da temperatura tornando-se propício o estudo de eventos bioquímicos e moleculares que regulem este fenômeno (Szaniszlo *et al.*, 1983).

A mudança morfológica em *P. brasiliensis* é acompanhada por extensas modificações na composição da membrana e parede celular (San Blas and Centeno, 1977; San-Blas *et al.*, 1994). Em relação à composição da parede celular, a transição micélio-levedura é acompanhada pela modificação do polissacarídeo prevalente de β -1-3 glucana (fase micelial) para α -1-3-glucana (fase leveduriforme), não apenas a quantidade, mas também o arranjo espacial desses polissacarídeos (San-Blas and San-Blas, 1977; San-Blas *et al.*, 1994). Além disso, a mudança na composição lipídica da membrana celular, particularmente glicosíngolipídios (Toledo *et al.*, 1995).

P. brasiliensis cresce na forma leveduriforme a 37 °C nos tecidos do hospedeiro e em meios de cultivo tais como BHI (*Brain Heart Infusion*), Fava-Netto e Sabouraud. Colônias leveduriformes são visíveis em 3 a 7 dias de incubação a 36 °C (dependendo do isolado), possuem aspecto cerebriforme e coloração creme (Figura 4A). Microscopicamente, as células leveduriformes são multinucleadas, de tamanho variado (4-35 μ M), geralmente ovais a alongadas, parede celular espessa e birrefringente e citoplasma contendo gotículas lipídicas proeminentes (Restrepo and Jiménez, 1980) (Figura 4C).

O micélio de *P. brasiliensis* é cultivado geralmente em meio sintético modificado, McVeigh Morton a temperaturas variando entre 19 °C e 28 °C, produzindo dentro de 15-30 dias pequenas colônias brancas, irregulares e algodonosas (Figura 4B). Microscopicamente as hifas são finas (1-3 μ M), filamentosas, septadas e capazes de formar diferentes tipos de conídios como clamidoconídios, conídios terminais e arthroconídios, sendo estes últimos os propágulos infectantes produzidos em condições de privação nutricional. Estes conídios são uninucleados, de forma arredondada medindo menos de 5 μ M de diâmetro (Figura 4E-F), e respondem a mudanças de temperatura transformando-se em leveduras a 36 °C ou produzindo hifas a temperaturas mais baixas (Barros, 2010).

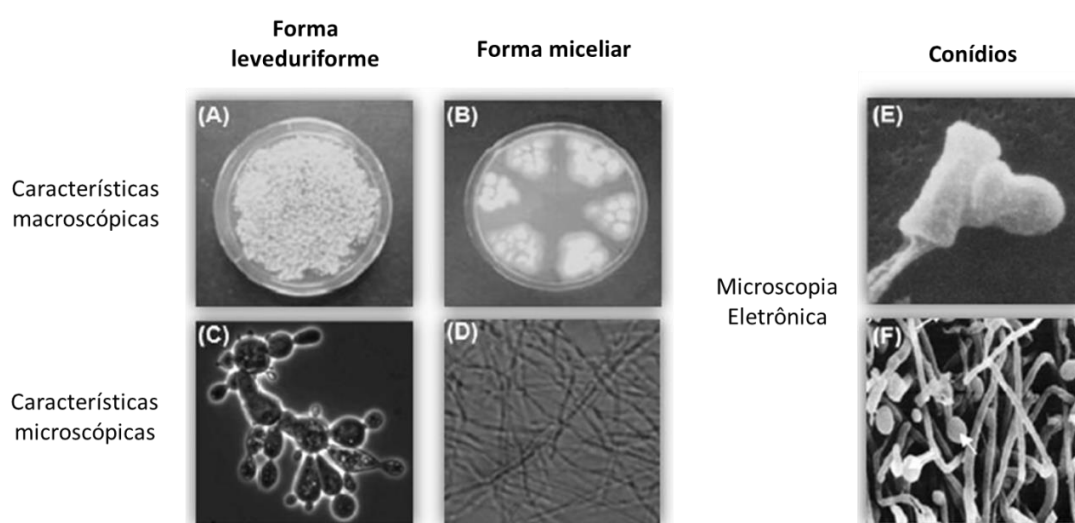


Figura 4. Morfologia de *P. brasiliensis*. Características macroscópicas da forma leveduriforme (A) e forma micelial (B). Características microscópicas do cultivo da forma leveduriforme (C) e

miceliar (D). Microscopia eletrônica de conídios (E) e (F), as setas brancas indicam conídios intercalares (Wanke and Londero, 1994; Barros, 2010).

1.4 Ferramentas genéticas para o estudo de *P. brasiliensis*

O desenvolvimento de sistemas eficientes de transformação genética para fungos têm sido crucial para o estabelecimento da ligação entre análises de DNA *in vitro* e sua função *in vivo* (Magee *et al.*, 2003). Ferramentas clássicas de genética como eletroporação, protoplasto, e permeabilização celular com acetato de lítio foram desenvolvidas inicialmente para a transformação de fungos não-patogênicos (Ruiz-Díez, 2002). Métodos alternativos tais como biobalística e transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens* (ATMT) proporcionaram a expansão da variedade de espécies fúngicas que podem ser transformadas (Beijersbergen *et al.*, 1992; Bundock *et al.*, 1995). A metodologia de transformação que faz o uso da bactéria *A. tumefaciens* vem sendo empregada há muitos anos para transformar plantas superiores. Mais recentemente foi demonstrada a capacidade dessa bactéria em transferir DNA para leveduras (Bundock *et al.*, 1995), fungos filamentosos (de Groot *et al.*, 1998), *Streptomyces lividans* (Kelly and Kado, 2002) e células humanas (Hela) (Kunik *et al.*, 2001).

A. tumefaciens é um bacilo Gram-negativo aeróbico, flagelado, encontrado no solo. Pertence ao gênero de bactérias fixadoras de nitrogênio (Lipp-Nissinen, 1993). *A. tumefaciens* apresenta o plasmídeo Ti (*tumor inducing*), que confere à bactéria capacidade para alterar o metabolismo e desenvolvimento de células vegetais, resultando na doença conhecida como “galha da coroa”. O processo de colonização da planta requer a transferência de genes dos plasmídeos para o genoma da planta, resultando no desenvolvimento de um tumor na planta. Este processo representa um mecanismo de engenharia genética natural, de transferência de genes entre reinos diferentes (Gelvin, 2003).

Em condições naturais, a bactéria transfere parte de seu plasmídeo Ti para a célula vegetal infectada. Esta sequência de DNA que é transferida (T-DNA) é capaz de se integrar eficientemente no genoma da planta hospedeira. O fragmento T-DNA contém genes que codificam enzimas envolvidas na síntese de opinas, fitohormônios e oncogen (Rossi *et al.*, 1996; Nam *et al.*, 1997), responsáveis pelo desenvolvimento do tumor e sobrevivência da bactéria.

As linhagens de *A. tumefaciens* são divididas em três grupos principais, que variam entre si quanto às espécies de plantas hospedeiras, características metabólicas e estrutura genômica, sendo que o grupo da linhagem C58 é o mais estudado. Seu genoma é formado basicamente por um cromossomo circular (2,84 Mb), um cromossomo linear (2,07 Mb), e dois megaplasmídeos : pATC58 (542,8 kb) e pTiC58 (214,2 kb). Os genes envolvidos na transformação e na gênese do tumor estão localizados nos quatro elementos genéticos (Wood *et al.*, 2001). O plasmídeo Ti pode

ser dividido em duas regiões principais: a região de virulência (*vir*) e a região T-DNA (“*Transferred DNA*”).

Extensas modificações do plasmídeo Ti proporcionaram o desenvolvimento de vetores binários com um marcador gênico para a seleção de células hospedeiras transformadas, e pode então ser utilizado para a clonagem em *Escherichia coli* (Hellens *et al.*, 2000). A transformação em fungos por ATMT apresenta vantagens quando comparada a outros métodos devido a sua alta eficiência e simplicidade, sendo obtido em menor tempo sem o uso de algum equipamento específico, bem como pelo fato de conduzir à integração de uma cópia única de T-DNA (Michielse, Arentshorst, *et al.*, 2005; Michielse, Hooykaas, *et al.*, 2005). Esta técnica tem sido aplicada a uma grande diversidade de amostras fúngicas como células leveduriformes, hifas, conídios e protoplastos fornecendo uma valiosa ferramenta para o estudo de fungos patogênicos dimórficos como *Coccidioides immitis*, *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum* (Abuodeh *et al.*, 2000; Sullivan *et al.*, 2002; McClelland *et al.*, 2005; Almeida, Matute, *et al.*, 2007).

P. brasiliensis é susceptível a ambos, eletroporação e ATMT (Leal *et al.*, 2004; Soares *et al.*, 2005). Embora estes autores tenham demonstrado que transformantes podem ser obtidos através da inserção do DNA externo em células leveduriformes multinucleadas, os métodos apresentaram baixa eficiência na transformação ou estabilidade mitótica reduzida, prejudicando a aplicação desta metodologia para a mutagênese insercional ou transformação do gene alvo em *P. brasiliensis*.

Uma alternativa de aprimoramento do silenciamento gênico aplicado a *P. brasiliensis* é a conciliação da técnica de RNA antisense e ATMT. O silenciamento de genes por RNA antisense tem sido utilizado com sucesso em fungos e em um grande número de outras aplicações (Zheng *et al.*, 2001). RNA antisense (aRNA) é uma fita simples de RNA complementar a um RNA mensageiro (mRNA) transcrito no interior de uma célula. O aRNA uma vez introduzido em uma célula pode inibir a tradução do mRNA complementar por emparelhamento de bases obstruindo fisicamente a maquinaria de tradução, outros mecanismos propostos incluem a formação de tríplex, bloqueio do splicing do RNA, prevenção do transporte do complexo de mRNA para o citoplasma, aumento na degradação do RNA alvo, esta abordagem é utilizada quando o gene alvo está presente em múltiplas cópias no genoma ou quando a completa disrupção da função do gene é letal ou gera um fenótipo indesejável (Weiss *et al.*, 1999) (Figura 5).

Os oligonucleotídeos antisense são relativamente pequenos (geralmente 15-25 bp), fitas simples de deoxiribonucleotídeos, os quais são desenhados para serem complementares à regiões discretas de um específico mRNA alvo formando um híbrido DNA:RNA. A ligação do agente antisense ao transcrito, se efetiva, inibindo a tradução (Weiss *et al.*, 1999).

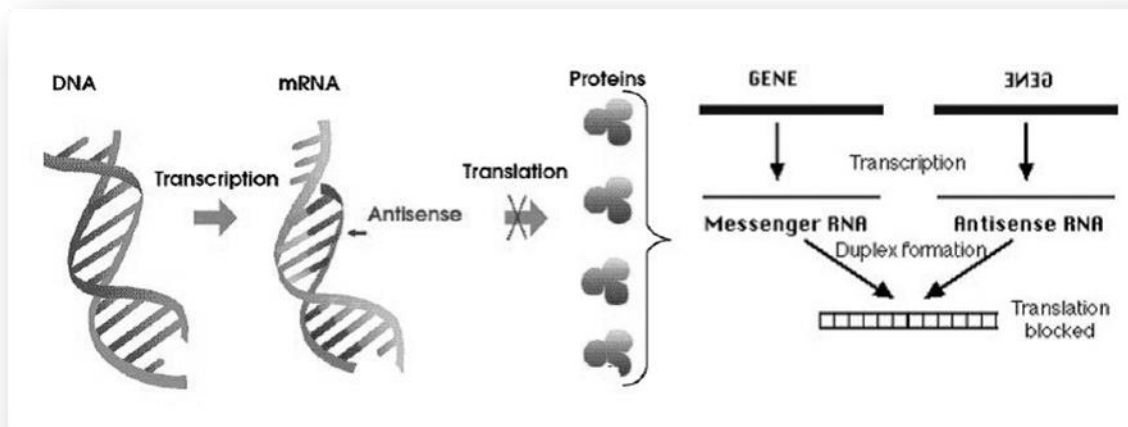


Figura 5. Mecanismo de silenciamento gênico via RNA antisense.

(<<http://www.learnonly.com/2013/03/antisense-oligonucleotides-technology.html>>)

Conciliando estas duas metodologias, ATMT e RNA antisense, foi possível a obtenção da expressão gênica reduzida de *PbHAD* hidrolase, onde células leveduriformes de *P. brasiliensis* com a expressão reduzida de *PbHAD* apresentaram diminuição significativa da capacidade de adesão à células epiteliais, além disso cepas silenciadas apresentaram decréscimo da virulência em modelos de infecção em camundongos (Hernández *et al.*, 2010). Outras proteínas silenciadas da mesma maneira foram, Cdc42 Rho-like GTPase em dois isolados diferentes de *P. brasiliensis* (Almeida, Carmona, *et al.*, 2007), uma oxidase AOX (Hernández *et al.*, 2011), a proteína p27 (Torres, Hernandez, Tamayo, Muñoz, García, *et al.*, 2013), gp43 (Torres, Hernandez, Tamayo, Muñoz, Leitão, *et al.*, 2013) e uma proteína de choque térmico HSP90 (Tamayo *et al.*, 2013).

1.5 Moléculas que participam da adesão de *P. brasiliensis* ao hospedeiro

Os agentes de micoses sistêmicas possuem alguns fatores que permitem o seu crescimento nas condições adversas proporcionadas pelo hospedeiro, e que podem contribuir para o desenvolvimento da doença (Casadevall and Pirofski, 1999). A interação entre os determinantes de virulência do agente e os mecanismos de defesa do hospedeiro resulta num processo complexo cujo conhecimento permite melhor entendimento da patogênese das micoses sistêmicas.

A interação fungo-hospedeiro é complexa e dinâmica (Rappleye and Goldman, 2006). Muitos fungos patogênicos como *P. brasiliensis* tem múltiplos fatores que podem causar danos ao hospedeiro e que podem contribuir para o fenótipo de virulência destes organismos. A aderência, a colonização, a disseminação e as características desenvolvidas pelo próprio fungo que o levam a resistir aos ambientes hostis e escapar

dos mecanismos de resposta imune do hospedeiro estão correlacionadas ao desenvolvimento da doença (Mendes-Giannini *et al.*, 2005; Filler and Sheppard, 2006).

P. brasiliensis tem capacidade de aderir, extravasar e invadir barreiras impostas pelos tecidos do hospedeiro (LENZI *et al.*, 2000), sintetizando várias substâncias que participam direta ou indiretamente da relação parasito-hospedeiro. Este fungo pode desenvolver vários fenótipos (crescimento, invasão e metástase) dependendo do isolado fúngico, do hospedeiro e outros fatores (Mendes-Giannini *et al.*, 2000). *P. brasiliensis* tem capacidade de aderir e invadir células epiteliais (Mendes-Giannini *et al.*, 1994), e o fenômeno de aderência é dependente da virulência do isolado (Hanna *et al.*, 2000).

Uma faceta importante na interação entre *P. brasiliensis* e seu hospedeiro é a habilidade do fungo aderir aos componentes de matriz extracelular (MEC), e esta interação tem sido correlacionada com a habilidade de adesão e invasão. A MEC é formada por compostos como colágeno, laminina, fibronectina, vibronectina e proteoglicanos que participam da regulamentação de processos fisiológicos como migração e sinalização celular e do transporte de solutos através de barreiras celulares (Hynes, 2009). A MEC circunda células epiteliais, endoteliais, tecido conjuntivo, estando presentes em diversos órgãos e tecidos do hospedeiro humano. O trato respiratório foco primário da PCM, possui tecidos ricos em MEC, como laminina e vários tipos de colágenos. Nos pulmões encontram-se fibroblastos alveolares que secretam componentes da matriz extracelular (Amenta *et al.*, 1988; Herzog *et al.*, 2008; Schwartz, 2010; Geiger and Yamada, 2011).

Estudos sugerem que para colonizar e disseminar-se *P. brasiliensis* faz o uso de uma gama extensa de estratégias, incluindo as adesinas, que são proteínas de superfície dos patógenos que contribuem para o processo de adesão às células e moléculas do hospedeiro (Mendes-Giannini *et al.*, 2006) (Vanlaere and Libert, 2009; Ramana and Gupta, 2010). Algumas proteases secretadas por microrganismos também são capazes de degradar componentes da MEC e assim também exercem um papel importante na relação parasito-hospedeiro (Monod *et al.*, 1991; Lee and Kolattukudy, 1995; Gil *et al.*, 1996; Dos Santos and Soares, 2005).

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.

Em *P. brasiliensis* são descritas diversas proteínas que interagem com componentes do hospedeiro favorecendo o processo infeccioso. Uma glicoproteína de 43 kDa (gp43) presente na superfície de *P. brasiliensis* atua como uma molécula potencialmente mediadora da ligação do fungo à laminina e fibronectina, participando da invasão e inibição de macrófagos (Vicentini *et al.*, 1994; Almeida *et al.*, 1998; Flavia Popi *et al.*, 2002; Barbosa *et al.*, 2004; Barbosa *et al.*, 2006; Konno *et al.*, 2012).

Coltri *et al.* (2006) e Ganiko *et al.* (2007) descreveram a paracoccina, como uma lecitina ligante de N-acetil-glucosamina de *P. brasiliensis*. A proteína

gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase (GAPDH) e a triose fosfato isomerase (TPI) do fungo são capazes de ligar à laminina, colágeno I e fibronectina (Barbosa *et al.*, 2006; Pereira *et al.*, 2007).

P. brasiliensis possui ainda duas proteínas de superfície, uma de 32 kDa e outra de 19 kDa, que interagem com a laminina, fibronectina e fibrinogênio (González *et al.*, 2005; González *et al.*, 2008). A proteína de 32 kDa também foi descrita em outros trabalhos como uma hidrolase de aderência que promove o aumento no potencial do fungo em invadir células do hospedeiro (Hernández *et al.*, 2010).

Da Silva Castro *et al.*, (2008) descreveram uma proteína defeituosa para o crescimento filamentosos (*PbDFG5p*) que está presente na parede de *Paracoccidioides* e que também pode se ligar a componentes da MEC, podendo ser relevante para as etapas iniciais que conduzem à fixação e colonização do fungo nos tecidos do hospedeiro.

A malato sintase foi caracterizada como adesina por mediar à adesão do fungo aos tecidos hospedeiros e a disseminação da infecção (da Silva Neto *et al.*, 2009).

A proteína de 30 kDa, pertencente a família 14-3-3 de proteínas foi descrita como adesina devido a sua capacidade de aderir a componentes da MEC, além de estar localizada em maior quantidade na parede de *P. brasiliensis* durante o contato com as células do hospedeiro (Hanna *et al.*, 2000; Mendes-Giannini *et al.*, 2004a; Andreotti *et al.*, 2005; da Silva *et al.*, 2013).

Donofrio *et al.*, (2009) descreveram a proteína enolase como uma adesina ligante de fibronectina, e também está localizada na parede celular deste fungo em maior quantidade quando interagindo com células A549 (Marcos *et al.*, 2012).

1.6 Fator de alongação Tu de *P. brasiliensis*

Em estudo realizado recentemente por nosso grupo, uma proteína cujo valor predito de massa molecular de 48,6 kDa foi identificada através de análise proteômica com extrato total de *Paracoccidioides brasiliensis* e apresentou identidade com o fator de alongação Tu de *P. brasiliensis* (GenBank EEH 45799- NCBI). Esta proteína foi mais expressa quando o fungo foi cultivado em meio enriquecido com sangue de carneiro. Esta proteína ainda não foi caracterizada para *P. brasiliensis* e o único relato para fungo patogênicos é que em *Candida albicans* possui capacidade de se ligar a plasminogênio (Crowe *et al.*, 2003). Há relato da sua identificação através de análise transcricional de células leveduriformes de *P. brasiliensis* quando em contato com o plasma humano (mimetizando sítios de infecção ou inflamação), o transcrito EF-Tu de *P. brasiliensis* foi superexpresso na condição de incubação deste fungo com plasma humano (Bailão *et al.*, 2007).

O fator de alongação EF-Tu é uma GTPase que atua na ligação do aminoacil-tRNA ao complexo mRNA-ribossomo durante a etapa de alongação da tradução, ou seja

é responsável pelo alongamento da cadeia polipeptídica durante a síntese proteica. EF-Tu apresenta-se na forma ativa quando complexado com GTP, que fornece a energia necessária para a ligação do aminoacil-RNA_t no sítio A (aminoacil) ribossomal, no momento do reconhecimento códon-anticódon, ao ser hidrolisado em GDP. Após a hidrólise, o complexo EF-Tu-GDP é liberado do ribossomo. A reciclagem de EF-Tu/GDP em GTP é feita graças ao fator EF-Ts (fator de troca de nucleotídeos guanina), o qual forma um complexo intermediário EF-Tu-GDP-EF-Ts. EF-Tu/GDP é reciclado pelo fator de troca de nucleotídeos guanina EF-Ts (Miller and Weissbach, 1977).

O fator de alongação é uma proteína abundante em bactérias (Jacobson and Rosenbusch, 1976) onde atua na síntese de proteínas quando se encontra associado à GTP (Krab and Parmeggiani, 1998). Em adição ao seu papel na síntese de proteínas, ela tem sido caracterizada com papéis “*moonlighting*”, grupo de proteínas que exibem funções biológicas inusitadas, além daquelas já bem definidas e caracterizadas na literatura, incluindo atividade de proteína dissulfeto-isomerase, facilitando o arranjo das ligações dissulfeto de proteínas e as estabilizando (Richarme, 1998), propriedade de chaperonina (Caldas *et al.*, 1998), influencia na iniciação da replicação pela Q β replicase através da modulação dos níveis de GTP (Blumenthal and Hill, 1980), e sua expressão pode ser regulada pelo ferro, podendo ter papel na resposta do organismo às condições de privação de ferro (Wong *et al.*, 1999). Também foi demonstrado ter atividade de ligação aos filamentos de actina e microtúbulos (Gross and Kinzy, 2005), influenciando na montagem e estabilidade de polímeros do citoesqueleto.

Em *Saccharomyces cerevisiae*, EF-Tu, corresponde a proteína de 47 kDa (Rosenthal and Bodley, 1987). Mutações nos genes mitocondriais ligados a tRNA podem produzir alterações na síntese de proteínas mitocondriais e em consequência defeitos respiratórios. Em humanos tais defeitos geram doenças neurodegenerativas e em leveduras esta deficiência não afeta a viabilidade (De Luca *et al.*, 2006).

A sua localização na membrana de procariotos tem sido observada e é atribuída a modificações pós-traducionais, em *Escherichia coli*. EF-Tu é translocada do citoplasma para o periplasma durante o choque osmótico (Berrier *et al.*, 2000) e para a membrana durante condições de privação nutricional, quando então se encontra na forma metilada (Young and Bernlohr, 1991). Em *Mycoplasma pneumoniae*, 17% do total de EF-Tu foi encontrada associada à membrana (Dallo *et al.*, 2002), e tem capacidade de se ligar à fibronectina, o que fornece evidências para a sua versatilidade biológica reforçada através de estudos em *Lactobacillus johnsonii*, *Streptococcus gordonii*, *Listeria monocytogenes* e *Francisella tularensis* onde também está localizada na membrana, mediando à ligação a mucina (Granato *et al.*, 2004; Kesimer *et al.*, 2009), fibrinogênio (Schaumburg *et al.*, 2004), e nucleolina (Barel *et al.*, 2008), respectivamente.

Recentemente, foi reportado em *Pseudomonas aeruginosa* que uma das proteínas ligadas ao fator H corresponde ao fator Tu (Tuf) e esta interage com o plasminogênio (Kunert *et al.*, 2007). Adicionalmente em *P. aeruginosa*, EF-Tu foi

identificada como uma proteína de superfície com capacidade de ligação ao plasminogênio (PLG), atribuindo atividade proteolítica a este patógeno através da conversão do precursor inativo PLG à plasmina (forma proteoliticamente ativa), aumentando a capacidade de interação com a matriz extracelular e a degradação da mesma, sendo, portanto relacionada à invasão tecidual (Kunert *et al.*, 2007). Assim, na superfície bacteriana, Tu age como um fator de virulência e liga-se a componentes do sistema complemento e plasminogênio.

P. aeruginosa explora múltiplas estratégias para a evasão do sistema imune (Buret and Cripps, 1993). O patógeno pode secretar enzimas proteolíticas que degradam o produto da ativação do complemento C3b depositado sobre a superfície bacteriana (Hong and Ghebrehiwet, 1992; Schmidtchen *et al.*, 2003). A evasão do sistema imune é particularmente importante durante a fase inicial de inúmeras infecções, quando o patógeno está em contato com os fluídos corporais do hospedeiro. Nesta fase a via alternativa de ativação do sistema complemento é central para o reconhecimento imune (Mueller-Ortiz *et al.*, 2004). Este tipo de evasão do sistema imune já foi mostrado em *Borrelia burgdorferi* (Kraiczy *et al.*, 2001; Kurtenbach *et al.*, 2002), *Neisseria gonorrhoea* (Ram *et al.*, 1998), *Streptococcus pneumoniae* (Janulczyk *et al.*, 2000; Dave *et al.*, 2001), *Streptococcus pyogenes* (Johnsson *et al.*, 1998), *Candida albicans* (Meri *et al.*, 2002) e outros.

Em *M. pneumoniae*, a capacidade de ligação de EF-Tu à fibronectina e a sua localização na membrana deste patógeno sugere que esta proteína seja utilizada na colonização de tecidos do hospedeiro por micoplasmas e na invasão do ambiente intracelular (Baseman and Tully, 1997; Dallo and Baseman, 2000; Dallo *et al.*, 2002; Balasubramanian *et al.*, 2008).

Em *Bacillus anthracis* foram identificadas três proteínas em ordem de afinidade de ligação ao PLG: enolase > fator de alongação-Tu > chaperonina-60 kDa. Enolase e EF-Tu de *B. anthracis* localizados na superfície deste patógeno se ligam ao PLG convertendo-o em sua forma ativa, a plasmina, que resulta em degradação da MEC e redução da deposição de C3b sobre os esporos desta bactéria, facilitando a evasão da resposta imune (Chung *et al.*, 2011).

A versatilidade biológica dessa proteína revela-se em sua capacidade de interagir com proteínas da matriz extracelular, moléculas da cascata de coagulação, reguladores solúveis do sistema complemento e outras glicoproteínas (Wolff *et al.*, 2013).

Em *P. brasiliensis*, a enolase já foi caracterizada como uma adesina ligante de PLG localizada na superfície deste patógeno durante a sua interação com células epiteliais pulmonares, porém a função do fator de alongação EF-Tu ainda não foi avaliada. A enolase, com propriedades já descritas, junto com EF-Tu, possivelmente fazem parte de um conjunto de proteínas superficiais importantes para a virulência de *P. brasiliensis* que se liga a outras proteínas e fatores presentes no plasma do hospedeiro para a invasão tecidual e evasão do sistema imune, mais especificamente através da formação de plasmina que possui atividade de serina-protease degradando componentes

da matriz extracelular e decréscimo da deposição de C3b sobre a superfície do patógeno, ligação esta que confere propriedades anti-opsonizantes ao patógeno.

Portanto, EF-Tu pode ser associada ao grupo de enzimas, incluindo enolase (Bergmann *et al.*, 2001) e gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (Pancholi and Fischetti, 1992; Alvarez *et al.*, 2003) que exibem funções biológicas inesperadas em adição às suas funções enzimáticas bem definidas.

Estudos *in vitro* demonstram que o sistema complemento é um importante componente na resistência inata às infecções fúngicas. A ativação do sistema complemento é importante no controle da proliferação fúngica em vários tecidos (Romani, 2004).

A imunidade inata tem sido definida como a primeira fase da resposta imune e está baseada na pré-existência de elementos do sistema imune que interagem diretamente com todos os tipos de micróbios levando a sua destruição ou inibição de seu crescimento. Ela não é específica para cada patógeno e é mediada por barreiras físicas, elementos químicos e componentes celulares do sistema imune (Calich *et al.*, 2008). Vários mecanismos da imunidade inata tais como a ativação de proteínas do sistema complemento, atividade microbicida de células *natural killer* e fagócitos, produção de citocinas inflamatórias e quimiocinas entre outras tem mostrado ter importante papel na resposta do hospedeiro ao patógeno (Beutler, 2004).

A resposta imune inata contra *P. brasiliensis*, *Coccidioides immitis*, *Blastomyces dermatitidis* e *Histoplasma capsulatum*, fungos patogênicos dos quais infectam o hospedeiro através do trato respiratório, ocorre nos pulmões. A resposta imune nos pulmões contra a infecção é iniciada pela secreção de várias proteínas microbicidas pelo epitélio pulmonar e a atividade fagocítica de macrófagos alveolares. Embora a maioria dos estudos em PCM humana tenham se dedicado a compreender a resposta celular e humoral, a resposta inata ainda permanece fracamente elucidada, porém isto é facilmente compreensível uma vez que a doença PCM seja reconhecida em períodos posteriores a infecção inicial, dificultando a análise dos eventos primários ocorridos nesta micose, o que torna relevante os estudos que visem os eventos iniciais que governam a interação de *P. brasiliensis* com o hospedeiro (Janeway, 1992; Janeway and Medzhitov, 2002; Romani, 2004).

Adesinas e adesina-*like* proteínas são componentes da superfície celular e/ou do metabolismo que conferem aos microrganismos capacidade de fixação às células, tecidos e/ou superfícies abióticas. Adesinas correspondem às primeiras moléculas de contato do patógeno para posterior invasão à 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 *P. brasiliensis*-hospedeiro.

Em *P. brasiliensis*, apesar da proteína EF-Tu já ter sido encontrada no genoma do fungo, sua função ainda é desconhecida. Esta proteína apresenta similaridade superior a 50 % com todos os microrganismos citados. Assim sendo o objetivo deste estudo foi caracterizar esta proteína de *P. brasiliensis*, no que diz respeito à localização celular e avaliação de sua interação com componentes da MEC, reguladores do sistema complemento e adesão. A caracterização desta proteína possivelmente envolvida na adesão e invasão de *P. brasiliensis*, bem como na evasão do sistema imune pode ser um alvo interessante para o entendimento da patogênese e conseqüentemente para o desenvolvimento de estratégias de terapias pelo bloqueio de receptores.

1.7 Proteína 14-3-3 de *P. brasiliensis*

Inicialmente em nosso grupo de pesquisa, Andreotti *et al.*(2005) isolaram uma proteína de 30 kDa em estudos de eletroforese bidimensional comparando-se o isolado 18 de *P. brasiliensis* antes e após a infecção em camundongo. Já foi comprovado que a virulência deste fungo pode ser atenuada ou perdida após longos períodos de repiques contínuos, e que a mesma é reestabelecida após a inoculação em animal. No trabalho anteriormente citado, a proteína de 30 kDa demonstrou-se mais evidente no isolado recém recuperado após a infecção de camundongos com *P. brasiliensis*. Após sequenciamento por espectrometria de massas esta foi identificada como pertencente à família 14-3-3 de proteínas (da Silva *et al.*, 2013). Adicionalmente foi constatado que esta proteína é capaz de se ligar à laminina, e o pré-tratamento de pneumócitos com a mesma resultou em inibição significativa da adesão do fungo a estas células (Andreotti *et al.*, 2005).

Posteriormente dando continuidade ao estudo de Andreotti *et al.* (2005), da Silva *et al* (2013) obteve a proteína 14-3-3 recombinante em modelo de expressão heteróloga em bactérias e com esta foi produzido o respectivo anticorpo policlonal em coelhos. Sua presença na parede celular de *P. brasiliensis* foi evidenciada por imunoeletromicroscopia, bem como no antígeno de filtrado de cultura, sugerindo que ela possa ser secretada pelo fungo. Tal análise imunocitoquímica demonstrou na forma leveduriforme de *P. brasiliensis* predileção pela localização citoplasmática da proteína 14-3-3, e o interessante foi que durante a condição de interação com pneumócitos e na infecção em camundongos, tal distribuição de sua localização foi alterada, pela maior quantidade da proteína na parede celular do fungo, sugerindo importante papel na interação patógeno-hospedeiro. Complementando tais evidências de sua importância, por ensaios de inibição da adesão a pneumócitos, ambos, tratamento de pneumócitos com a proteína 14-3-3 recombinante e tratamento de *P. brasiliensis* com o anticorpo anti-14-3-3, foram capazes de reduzir o processo de adesão (da Silva *et al.*, 2013).

As proteínas da família 14-3-3 são proteínas ácidas, diméricas, de pequeno peso molecular, presentes em diferentes isoformas, estas proteínas possuem alto grau de conservação (> 60 %) em diferentes espécies, sugerindo, portanto possível manutenção

da sua função (Wang and Shakes, 1996). São proteínas de uma família de moléculas regulatórias que interagem com outras proteínas de maneira dependente de fosforilação (Obsilova *et al.*, 2005). As proteínas 14-3-3 interagem com um grande número de outras proteínas, o que faz com que a mesma apresente múltiplas funções (van Heusden, 2005).

Há uma literatura vasta para as diferentes funções da proteína 14-3-3, entre essas: papel de proteínas acessórias em diferentes processos celulares, determinante específico de alteração da localização celular de seus ligantes, regulação enzimática direta, entre outros (Kraus *et al.*, 2002). Já foi observado o seu envolvimento na apoptose, transdução de sinais, regulação de ciclo celular e transcrição, porém os mecanismos que desencadeiam tais processos permanecem desconhecidos (Fu *et al.*, 2000). Outra função relacionada a esta proteína é o seu envolvimento na regulação e organização do citoesqueleto celular através da ativação de Rho GTPases (Jin *et al.*, 2004), como mediadora nas mudanças do citoesqueleto celular via integrinas, com importante papel na ativação de Rac e Cdc42 (Bialkowska *et al.*, 2003).

As leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *Schizosaccharomyes pombe* possuem dois genes que codificam proteínas 14-3-3, *BMH1* e *BMH2* e *rad24* e *rad25*, respectivamente. Tais proteínas são essenciais para estas leveduras, e a disrupção simultânea de ambos os genes é letal para *S. cerevisiae* (van Heusden and Steensma, 2006).

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

Além disso, o fungo filamentosso *Aspergillus nidulans* possui uma proteína com região conservada de alta homologia com 14-3-3 (*artA*) que previne a formação de septo. Entretanto, em vez de bloquear a septação, o aumento da expressão de *artA* causa grande demora na polarização dos conidióforos, sugerindo que essas proteínas tenham um importante papel na morfogênese da hifa (Kraus *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2011). A proteína 14-3-3 também exerce um papel fundamental na infecção de *Escherichia coli* enteropatogênica, uma vez que este patógeno secreta uma adesina denominada intimina que recruta componentes das células hospedeiras para modificar a arquitetura celular e assim conseguir invadir estas células e se multiplicar dentro delas. Tir é a principal proteína efetora que é recrutada para a membrana plasmática das células eucarióticas onde esta atua como receptor para a adesina bacteriana. Entre as proteínas recrutadas para o local da adesão, também estão proteínas do citoesqueleto que contribuem para a formação de um pedestal. Foi demonstrado que uma proteína 14-3-3 se liga

especificamente à Tir de maneira independente de fosforilação, e que a interação ocorre durante o processo de infecção (Patel *et al.*, 2006).

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

A invasão de *P. brasiliensis* afeta a estrutura do citoesqueleto das células epiteliais pulmonares e também de queratinócitos, interferindo em aspectos morfológicos da actina, tubulina e citoqueratina (Mendes-Giannini *et al.*, 2004b; Peres da Silva *et al.*, 2011). Também foi verificado que a proteína 14-3-3 de *P. brasiliensis* (proteína 14-3-3) causa modificação estrutural de microfilamentos polimerizados de actina e citoqueratina, além de induzir apoptose durante o processo de interação às células epiteliais, mas o exato mecanismo de como esse processo acontece permanece desconhecido (Andreotti, 2005; Mendes-Giannini *et al.*, 2006; Monteiro da Silva *et al.*, 2007).

A família das proteínas Rho GTPase é conhecida por regular a dinâmica de organização do citoesqueleto e tráfego de membrana de processos fisiológicos como a proliferação celular, motilidade, polaridade, e crescimento (Sinha and Yang, 2008). Cdc42 foi caracterizado como um ponto de convergência na transdução de sinal e está envolvido em múltiplas vias de sinalização incluindo os receptores tirosina quinase e de citocinas, as proteínas G heterodiméricas e ao stress físico e químico. Cada vez mais efetores de Cdc42 são identificados e o maior desafio é o entendimento da especificidade desta via de sinalização (Sinha and Yang, 2008). Cdc42p foi primeiramente descoberto em leveduras sendo essencial para a formação do broto. A sinalização envolvida na polaridade celular, bem como no processo de reprodução é regulada por Cdc42p e isto está bem caracterizado neste modelo (Etienne-Manneville, 2004). Recentemente, o papel de Cdc42p foi descrito em *P. brasiliensis* como uma importante molécula para o controle de crescimento deste fungo na fase leveduriforme. Uma análise detalhada dos mecanismos moleculares ainda não caracterizados de PbCdc42p é de extrema importância para o entendimento da interação parasita-hospedeiro além de fornecer mais informações sobre a regulação do crescimento celular e patogênese, não só de *P. brasiliensis*, mas também de outros fungos patogênicos humanos (Almeida *et al.*, 2009). Além disso, e como demonstrado para outros fungos dimórficos, Cdc42p pode também desempenhar um papel importante durante a transição morfológica (Honing *et al.*, 2004; Lin *et al.*, 2009; Barros, 2010).

A ativação dos receptores tirosina quinase estimulam Rho GTPase que por sua vez ativa as vias de Ras e MAPKs, mas ainda não é sabido como o mecanismo específico é determinado (Sinha and Yang, 2008). Em nosso laboratório, significativa

inibição na invasão do fungo foi observada após pré-tratamento das células epiteliais com genisteína, que é um inibidor específico de proteínas tirosina-quinase (PTK) localizadas na membrana plasmática das células epiteliais. Esses resultados sugerem que a inibição de PTK é importante na transdução de sinal durante os eventos iniciais nos processos de adesão e invasão de *P. brasiliensis* em células epiteliais de mamíferos, estimulando ainda mais a procura do mecanismo desta via (Monteiro da Silva *et al.*, 2007).

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

Os estudos presentes até o momento para a proteína 14-3-3 de *P. brasiliensis* são limitados à utilização da proteína 14-3-3 recombinante e seu respectivo anticorpo, e, portanto exploram de maneira indireta a função desta proteína, portanto neste trabalho resolvemos através de manipulação genética silenciar o gene 14-3-3 deste fungo e averiguar o seu papel na patogênese de *P. brasiliensis* bem como investigar envolvimento em funções biológicas e virulência, ainda não realizados.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O intuito deste estudo foi avaliar o papel das proteínas Fator de alongação Tu e 14-3-3 de *Paracoccidioides brasiliensis* na sua fisiologia e virulência.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliação da influência de PbEF-Tu na adesão à pneumócitos.
- Avaliação da interação de PbEF-Tu com alguns componentes da matriz extracelular e plasminogênio.
- Obtenção de isolado de *P. brasiliensis* silenciado para o gene codificante da proteína PbEF-Tu.
- Verificar influência de PbEF-Tu na morfologia, viabilidade e crescimento celular de *P. brasiliensis* com o isolado silenciado para EF-Tu.
- Averiguar influência de PbEF-Tu na adesão e apoptose a pneumócitos, e virulência em modelo *in vivo* de *Galleria mellonella* com o isolado silenciado para EF-Tu.
- Obtenção de isolado de *P. brasiliensis* silenciado para o gene codificante da proteína Pb14-3-3.
- Verificar a influência de Pb14-3-3 na morfologia, vitalidade e crescimento celular de *P. brasiliensis* com o isolado silenciado para 14-3-3.
- Averiguar a influência de Pb14-3-3 na adesão e apoptose a pneumócitos, interação com componentes da matriz extracelular e virulência em modelo *in vivo* de *Galleria mellonella* com o isolado silenciado para 14-3-3.

3 MATERIAIS E METODOLOGIAS

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 este estudo foram utilizados coelhos 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 Cultura de células

Neste estudo, foi utilizada a linhagem contínua A549, de células epiteliais respiratórias - pneumócitos tipo I, (obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro – CR039). As células foram cultivadas em meio HAM F-12 suplementado com 10 % de soro fetal bovino e mantidas a temperatura de 36.5 °C e 5 % de CO₂. Decorridos 3 a 4 dias, as garrafas de células foram submetidas à tripsinização. Essa linhagem foi utilizada para o ensaio de adesão e indução de apoptose dos isolados de *P. brasiliensis* com baixa expressão de Pb14-3-3 e PbEF-Tu, para o ensaio de inibição da adesão, bem como na imunolocalização da proteína PbEF-Tu durante a infecção afim de elucidar o papel destas proteínas no processo de interação de *P. brasiliensis* às células epiteliais.

3.3 Obtenção da proteína PbEF-Tu recombinante e produção do anticorpo anti-PbEF-Tu

3.3.1 Microrganismo e condições de cultivo

Foi utilizado o isolado Pb18 de *Paracoccidioides brasiliensis* na fase leveduriforme, mantido regularmente em meio BHI (HiMedia®) sólido em estufa a 37 °C, repicado a cada 7 dias. Para realização dos experimentos o cultivo foi realizado em meio BHI líquido com 1 % de glicose (Beckton Dickinson and Company, Sparks, MD), a 37 °C, sob agitação de 150 rpm, por três dias (fase exponencial de crescimento).

3.3.2 Extração de RNA e síntese de cDNA

O RNA foi extraído utilizando-se Trizol (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA). 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 reação de primeira fita de cDNA foi realizada utilizando-se a transcriptase reversa (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA), neste processo foi utilizado 1 µg de RNA total da forma leveduriforme de Pb18. A essa quantidade de RNA total foi adicionado 2 µL de iniciador dT₁₂₋₁₈ (10 pmolL⁻¹), sendo a mistura incubada a 72 °C por 2 minutos. Em seguida foram adicionados os seguintes reagentes: 2 µL de oligonucleotídeo iniciador CDS (10 pmolL⁻¹), 4 µL tampão da transcriptase reversa 5 X (Tris-HCl 250 mM, KCl 375 mM, MgCl₂ 15mM), 2 µL DTT 100 mM; 2 µL dNTPs (10 mM); 2 µL de RiboLock RNase inhibitor (40 UµL⁻¹); 1,2 µL de MgCl₂ (50 mM); 2 µL da enzima transcriptase reversa (200 UµL⁻¹), após a adição de cada um desses reagentes, aqueceu-se a mistura a 42 °C por 1,5 h. Após esta incubação, adicionou-se 80 µL de TE (10 mM Tris/1 mM EDTA) e a mistura foi aquecida a 72 °C durante 7 minutos.

3.3.3 Construção de oligonucleotídeos e amplificação do gene

A sequência nucleotídica da ORF que codifica a proteína EF-Tu de *P. brasiliensis* (PbEF-Tu) foi amplificada através da reação de polimerase em cadeia (PCR). A figura 6 demonstra a sequência codificadora da proteína EF-Tu de Pb18, e também os sítios de anelamento dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados.

Pb18 (PADG_01949.2)

TCTAATATTTCAAGATCGGTCAAAGGCCCTGCTGCAGACTAGCAGGCTTGCTCTGCAAAGACCCCGAGGTGTCAACCCGATTACCATG
 TCCTCCTTCAAGACCGCATAGCCTTCAGAGGCATGGCGACCGTTTTTCAGAGAGAACGAAGCCTCACGTTAACGTCGGTACCATTGGCC
 ATGTCGATCACGGAAAGACTACATTGACGGCCGCATCACAAACGTCAAGCGGAGAAGGGATTGGCAAATTCCTGGAATATGGG
 GCGATTGATAAGGCTCCTGAGGAGCGGAAGCGTGGTATCACCATCTCTACCTCTCACATCGAATATTCGACCGACAAACGACATTACG
 CCCACGTCGACTGCCCCGGACACGCTGATTATATCAAGAACATGATTACTGGTGTGCGAACATGGATGGTGTATCGTCGTTGTTGCT
 GCCTCTGACGGCCAAATGCCCAAACACGCGAGCATCTGCTTCTTCCAGACAAGTCGGTGTTCAGAAAATCGTTGTTTTTCGTCACA
 AGGTCGATGCTGTAGAGGATAAGGAGATGTTGGAGCTTGTCGAATTGGAGATGAGAGAGCTTTGACCACTATGGGTTTCGAGGGT
 GAGAAGACACCTATCATCTTTGTTCTGCGCTCTGTGCTATGGAGGGCCGTCAGCCCGAGTTGGGAGAGCAGAAAATTGATGAATTA
 CTCGAGGCTGTGGATACTTGGATCCCTACGCCACAGCGTGATACCGACAAGCCCTTCCTGATGTCATTGAGGAGGTGTTCTCTATCTC
 TGGACGAGGAACCGTTGCCTCCGGCCGCTTGAGCGTGGTATCCTCAAGAAGGACTCCGAAGTTGAAATTATTGGCGGCGGTGTTCC
 CCACAATCCTGACCAAGGTGACTGATATCGAAACCTTCAAGAAGTCTTGCACGAGTCCAGAGCCGGGACAACCTCCGGCCTCTGTT
 GCGCGGTGTCAAGCGTGAGGATATCCGCCGTGGTATGGTTCGAGTTCGCCGAAGCGTCAAAGCACATGACAGATTCTTGGTGTC
 GATGTACGTTCTGACCGAGGCTGAGGGTGGTCGCCGCACTGGCTTCGGTCAGAATATCGTCTCAAATGTTTCATCCGCACAGCTGAC
 GAGGCTGCTGAACCTCAGCTGGCCTGATGGAGACGACGAGAAGCCAAAATGGTTCATGCCGGTGACAATGTTGAAATGTTCTGAAAGTC
 ACACCGCCCGGTGGCCGCTGAGGCTGGACAGCGATTCAATATTCGTGAGGGAGGCCGGACTGTCGCTACTGGGCTCGTAACCCGTG
 TCCTCGAGGAATAG

Figura 6. Sequência codificadora da ORF EF-Tu de Pb18 (Broad Institute - número de acesso PADG_01949.1). A sequência gênica possui 1559 nucleotídeos sendo que 1326 nucleotídeos codificam para a proteína EF-Tu de Pb18 (sequência sem íntrons). As sequências sublinhadas representam as regiões onde os iniciadores *forward* e *reverse* se alinham.

Para a estratégia escolhida foram utilizados iniciadores para a inserção do fragmento no vetor pET100/D-TOPO (Invitrogen), para isto o desenho dos oligonucleotídeos foi realizado conforme instruções do fabricante, adicionando-se uma modificação no iniciador *forward* pela adição *upstream* da sequência CACC na extremidade 5' do iniciador. A tabela 1 indica os oligonucleotídeos utilizados para a amplificação da sequência referente ao gene EF-Tu de *P. brasiliensis*.

Tabela 1. Iniciadores utilizados na amplificação da sequência codificante de EF-Tu. Em negrito no iniciador *forward* está demonstrada a sequência adicional necessária para a clonagem no vetor pET100/D-TOPO.

Oligonucleotídeos	EF-Tu
<i>Forward</i>	5' CACC TCTAATATTTCAAGATCGGTCAA 3'
<i>Reverse</i>	5' CTATTCCTCGAGGACACG 3'

A amplificação foi realizada em termociclador empregando-se um volume final de 50 μL constituído de 2 μL do cDNA ($2,6 \mu\text{g}\mu\text{L}^{-1}$), 0,2 μM de cada iniciador, 1,25 U

de Platinum® Taq DNA *polymerase High Fidelity* (Invitrogen), 2 mM de MgSO₄, 5 µL de tampão de reação 10X [Tris-SO₄ 600 mM, (NH₄)₂SO₄ 180 mM], 0,2 mM de cada dNTP,

As condições de amplificação compreenderam uma desnaturação inicial de 94 °C por 5 min, seguida de 40 ciclos constituídos de desnaturação a 94 °C por 30 s, hibridização (*annealing*) através de *touchdown* PCR variando de 65 °C a 55 °C por 45 s por 10 ciclos, diminuindo 1 °C a cada ciclo, seguidos de 30 ciclos a 68 °C por 2 min e extensão dos iniciadores a 68 °C por 10 min. Ao final da reação a mesma foi interrompida por resfriamento a 4 °C. O produto da amplificação foi analisado aplicando-se uma mistura de 5 µL da amostra e 1 µL de tampão de amostra contendo GelRed (Uniscience) em gel de agarose 0,8 % em tampão 1 X TBE (108 g Tris, 55 g ácido bórico, 9,3 g EDTA, ácido etilenodiamino tetra-acético, dissolvidos em 1 litro de água) e em seguida foi submetido a uma tensão de 80 V por 2 h. As bandas obtidas foram visualizadas em luz ultravioleta (UV) após a migração. 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 realizada a quantificação e avaliação da pureza.

3.3.4 Clonagem do cDNA codificante de EF-Tu em vetor de expressão pET100/D-TOPO

A clonagem do fragmento foi realizada utilizando-se o kit Champion™ pET Directional TOPO Expression (Invitrogen), utilizando-se o vetor pET100/D-TOPO® (Invitrogen), este vetor possui o promotor T7 que permite alto nível de expressão para proteínas recombinantes em *Escherichia coli* competentes. No sistema TOPO® os produtos de PCR *blunt-end* são clonados direcionalmente pela adição de quatro bases no oligonucleotídeo *forward* (CACC) que se hibridiza com as bases de uma das extremidades do vetor (GTGG) estabilizando o produto de PCR para o direcionamento da clonagem na orientação correta. Este vetor ainda possibilita que a proteína seja expressa com uma cauda de histidina (seis histidinas) fusionada na porção N-terminal, e que será utilizada na etapa de purificação. Através de cromatografia por afinidade, somente proteínas recombinantes com His-Tag ligam-se à coluna de níquel, sendo separada (purificada) das demais proteínas da bactéria usada na expressão (Novagen, 2006).

O kit Champion™ pET Directional TOPO Expression possui uma DNA topoisomerase I o qual funciona como enzima de restrição e ligase (seu papel biológico é a clivagem de DNA durante a replicação), mas aproveitando dessas outras funções, este kit fornece o vetor linearizado contendo sítios de reconhecimento da topoisomerase ao grupamento fosfato disponível na extremidade 3', e que permite com que esse vetor se ligue facilmente a fragmentos de DNA contendo extremidades compatíveis (CACC),

a ligação ocorre em 5 minutos a temperatura ambiente sem a necessidade de adição de ligase. A figura 7A demonstra o mapa do vetor utilizado, e na figura 7B temos a demonstração de como ocorre a clonagem utilizando o *kit* citado.

A sequência codificante do gene de interesse amplificada foi inserida no vetor pET100/D-TOPO através de uma reação de ligação. A ligação foi preparada empregando-se um volume final de 6 μL constituídos de 1,6 μL do produto de PCR ($29,3 \text{ ng}\mu\text{L}^{-1}$), 1 μL do vetor pET100/D-TOPO ($20 \text{ ng}\mu\text{L}^{-1}$), 1 μL de *salt solution* (50 mM NaCl, 2,5 mM MgCl_2) e 3,4 μL de H_2O tratada com DEPC (0,1 % dicarbonato de dietila) para completar o volume total. Esta reação foi mantida a temperatura ambiente ($22 \text{ }^\circ\text{C}$) por 40 minutos. A transformação foi realizada em *E.coli* TOP10 eletrocompetente, utilizando-se 3 μL da ligação. O plasmídeo obtido foi denominado de pET100/D-TOPO-PbEF-Tu.

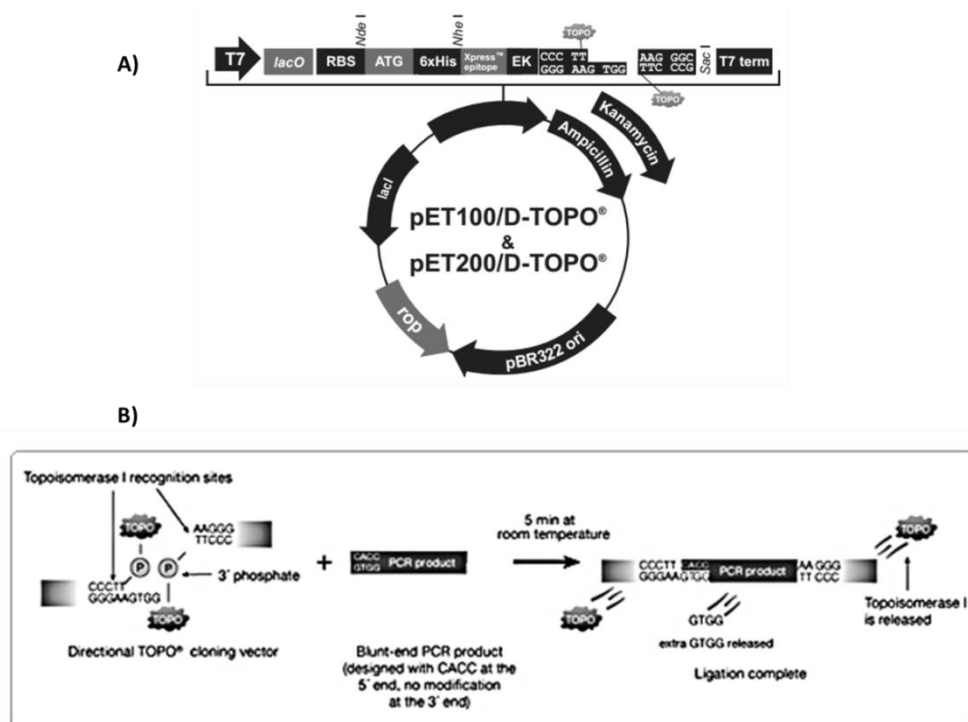


Figura 7. A) Representação esquemática do vetor pET100/D-TOPO(Invitrogen) utilizado nas clonagens (5764 pb). B) Representação da clonagem direcional utilizando o kit ChampionTM pET Directional TOPO Expression (Invitrogen) (<http://www.molecularinfo.com/MTM/F/F2/F2-7.pdf>).

3.3.5 Transformação em bactéria *Escherichia coli* TOP10 com o plasmídeo pET100/D-TOPO-PbEF-Tu

Alíquotas de 40 μL de células eletrocompetentes foram descongeladas em gelo. A cada tubo foi adicionado 3 μL da ligação. A suspensão de células foi transferida para a cubeta de eletroporação gelada, colocada em câmara do eletroporador GenePulser XCell® (BioRad) e o pulso elétrico foi aplicado. Após o pulso a cubeta foi retirada da câmara e as células coletadas com 900 μL de meio Luria Bertani (LB) (peptona 1 %, extrato de levedura 0,5 %, NaCl 1%) suplementado com 1 % de glicose. A suspensão foi transferida para um tubo novo e incubada a 37 °C por 1 h, sob agitação e então plaqueada em meio LB sólido contendo ampicilina a 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e incubadas a 37 °C *overnight*, esta etapa foi realizada para a expansão plasmidial.

3.3.6 Extração de DNA plasmidial, análise por PCR de colônia e sequenciamento dos plasmídeos recombinantes pET100/D-TOPO-PbEF-Tu obtidos na etapa de expansão do inserto em *E. coli* TOP10

Após o período de incubação, algumas colônias resistentes (possíveis clones positivos) foram selecionadas e avaliadas para verificar a presença do plasmídeo recombinante através de PCR. Para isto foram adicionados 0,4 μL dos respectivos iniciadores *forward* e *reverse* (10 mM), 2 μL de 10 X tampão (Tris-HCl 100 mM, KCl 500 mM, 0,8% v/v Nonidet P40) 0,4 μL de dNTPs (10 mM), 0,8 μL de MgCl_2 (500 mM), 0,3 μL de Taq DNA Polimerase (5 $\text{U}\mu\text{L}^{-1}$) (Fermentas), 15,7 μL de água e uma pequena quantidade de cada colônia. As reações foram incubadas a 94 °C por 10 minutos, seguida de 39 ciclos de 94 °C por 1 minuto, 55 °C por 1 minuto e 72 °C por 2 minutos. Por último, as reações foram mantidas a 72 °C por 10 minutos, sendo após resfriadas a 4 °C e armazenadas a -20 °C. As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1 %. Colônias que apresentaram-se positivas na PCR foram selecionadas e então expandidas em 5 mL de meio LB líquido contendo ampicilina (50 $\mu\text{g mL}^{-1}$) sob incubação a 37 °C por 12 h e agitação de 250 rpm. A seguir, as células tiveram seus DNAs plasmidiais extraídos através do *kit* MiniPrep-QIAprep®Spin (QIAGEN) de acordo com instruções do fabricante para a análise destes DNAs por sequenciamento e obtenção do plasmídeo a ser utilizado na transformação em *E. coli* BL21 Star™ (D3) para a expressão.

Além disso, a confirmação destes clones foi realizada por sequenciamento automático de DNA, utilizando-se o método de didesoxinucleotídeo marcado em sequenciador automático ABI Prism 3130 (Applied Biosystem), seguindo o protocolo do fabricante. Os DNA-moldes foram marcados utilizando-se 3,2 pmol dos iniciadores T7 sense (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3') e T7 reverse (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3') (iniciadores que anelam no plasmídeo), 2 μL do reagente BigDye Terminator em um volume final de 10 μL . Após o sequenciamento,

para verificar a integridade da sequência obtida, esta foi submetida a uma busca em bancos de dados públicos como NCBI através da ferramenta BLAST demonstrando 95 % de similaridade ao gene codificante da proteína EF-Tu (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

3.3.7 Transformação em bactéria *E. coli* BL21 StarTM (D3) com o plasmídeo recombinante pET100/D-TOPO-PbEF-Tu e análise dos clones

Após a confirmação da transformação em *E. coli* TOP10, o DNA plasmidial foi utilizado para a transformação em BL21 StarTM (D3), linhagem esta que será utilizada na etapa de expressão da proteína. Para esta, 10 ng do DNA plasmidial obtido na etapa anterior foi utilizado na transformação em bactérias BL21 StarTM (D3) eletrocompetentes como descrito no item 3.3.5. Do mesmo modo as colônias obtidas foram avaliadas por PCR de colônia, digestão com enzimas que cortam sítios únicos no vetor e inserto, e sequenciamento. A confirmação por PCR de colônia foi realizada como descrito anteriormente. Colônias positivas na PCR anterior foram selecionadas para a extração de seus DNAs plasmidiais como descrito no item anterior.

Para o diagnóstico por restrição foram utilizadas as enzimas *SalI* e *NdeI* (New England), a enzima *SalI* corta unicamente o inserto na posição 358, e a enzima *NdeI* corta apenas no vetor na posição 295, portanto espera-se que os fragmentos liberados tenham 653 pares de base (pb) e 6437 pb. A restrição do plasmídeo recombinante pET100/D-TOPO-EF-Tu foi feita em uma única reação, empregando-se o volume final de 50 μ L constituídos 1 μ g do DNA plasmidial, 1 U de *SalI*, 1 U de *NdeI*, 5 μ L de tampão de enzima 3.1 (10 X) (NaCl 100 mM, Tris-HCl 50 mM, MgCl₂ 10 mM, BSA 100 μ g mL⁻¹). 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.

A seleção definitiva dos plasmídeos recombinantes foi realizada através de sequenciamento de DNA como no item 3.3.6.

3.3.8 Indução da expressão de PbEF-Tu-6xHis

Os clones transformantes obtidos na etapa anterior foram expandidos em 10 mL de meio LB líquido com a concentração de antibiótico necessária (ampicilina, 50 μ g mL⁻¹) e cultivados por 12 horas sob agitação a 37 °C. Este pré-inóculo (1 mL) foi então adicionado a 100 mL de meio LB com ampicilina (50 μ g mL⁻¹), sob agitação, 250 rpm, 37 °C. O crescimento do cultivo foi realizado até atingir a densidade óptica (DO) em 600 nm de aproximadamente 0,6 (absorbância da cultura/absorbância do meio). Para realizar a indução da expressão, alíquotas de 10 mL do cultivo foram divididas em tubos Falcon

e então adicionou-se IPTG (isopropiltiogalactosídeo, um indutor de expressão de genes com promotor *lacT7*, Sigma) nas concentrações de 0,5 mM e 1,0 mM. Uma vez adicionado o agente indutor, a expressão da T7 polimerase, assim como do seu gene heterólogo são ativadas. O pLysS, presente na célula hospedeira (bactéria), possui o gene da T7 lisozima que inativa a T7 RNA polimerase impedindo a expressão do gene, mas quando o IPTG é adicionado, a quantidade de T7 lisozima é inferior a da T7 RNA polimerase produzida, conseqüentemente esta polimerase se liga ao T7 promotor presente no vetor pET, ativando a expressão do gene heterólogo. A indução foi realizada em diferentes tempos, 1 h, 3 h, 5 h e 24 h, e a sua análise realizada através de eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE (10%) comparando-se ao crescimento sem adição de IPTG.

Para cada tempo avaliado, foi retirada uma alíquota de 1 mL de cultura, que foi então centrifugada por 1 min a 12.000 rpm. As células foram ressuspendidas no mesmo volume de tampão fosfato-salino (PBS) pH 7,4, e analisadas por eletroforese em gel SDS-PAGE segundo o método de Laemmli (LAEMMLI *et al.*, 1970). No sistema eletroforético foi utilizado gel de empilhamento 5 % contendo bis-acrilamida:acrilamida na proporção 0,8:30 (m/v) em Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8 e SDS 0,1 % e gel de separação de 12,5 % contendo bis-acrilamida:acrilamida na mesma proporção em Tris-HCl 1,0 M pH 8,8 e SDS 0,1 %. Um volume de 20 µL de tampão de amostra contendo β-mercaptoetanol 5 % (v/v), SDS 2 % e azul de bromofenol a 0,001 % foi adicionado a 20 µL das amostras e então submetidas à eletroforese. As soluções foram aquecidas a 100 °C por 3 min e aplicadas nos poços. A eletroforese foi efetuada sob uma tensão de 120 V para a separação das amostras durante a migração no gel de empilhamento e resolução. Após a separação eletroforética, as bandas proteicas foram detectadas com a imersão dos géis numa solução de corante *Comassie Brilliant Blue 350 R* (GE Healthcare) por 1 h seguida da descoloração com solução de 57 % de metanol e 3 % ácido acético.

3.3.9 Macroindução e purificação da proteína PbEF-Tu-6xHis em coluna de afinidade

Após a determinação das melhores condições de indução, temperatura de 37 °C, concentração de 1 mM de IPTG e tempo de 6 h de indução, a mesma foi realizada novamente, porém em volumes maiores para posterior purificação por cromatografia de afinidade utilizando a coluna HisTrap FF Crude (GE Healthcare). Este sistema é específico para a purificação de proteínas recombinantes fusionadas com a *His-Tag* e são baseados na alta afinidade e seletividade por proteínas fusionadas com cauda de poli-histidina. A coluna de purificação é constituída de níquel ligado ao ácido nitriloacético, associada a uma matriz de agarose. Devido a características intrínsecas de cada proteína recombinante produzida, o fabricante recomenda adaptação dos protocolos de purificação para melhor eficiência do processo. A cultura bacteriana

expressando a proteína recombinante foi centrifugada por 20 minutos, 10.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* submetido à lise celular. As células foram ressuspendidas em tampão de lise contendo inibidores de proteases [50 mM Na₂H₂PO₄, pH 8,0; 20 mM imidazol; 200 mM NaCl; 1 mM DTT (ditiotretol), 1 mM PLAAC (pepstatina, leupeptina, aprotinina, antipaína, quimiostatina) e 1 mM PMSF (fenil metil sulfonil) e submetidas à lise física por sonicação (3 pulsos de 4,4 segundos com intervalos de 9,9 segundos e 60 % de amplitude).

O material lisado foi centrifugado por 20 minutos a 20.000 rpm para a clarificação, e com o sobrenadante procedeu-se à purificação da proteína por cromatografia de afinidade utilizando a coluna His-Trap FF Crude. O processo foi realizado no aparelho AKTA FPLC (*Fast protein liquid chromatography*) (GE Healthcare) com os seguintes tampões: lavagem (50 mM fosfato de sódio, 20 mM imidazol, 300 mM NaCl) e eluição (50 mM fosfato de sódio, 250 mM imidazol, 300 mM NaCl). Primeiramente fez-se a cromatografia utilizando-se gradiente crescente de 0 a 100 % e variação de 80 a 100 % do tampão imidazol. As frações obtidas foram analisadas por SDS-PAGE. As amostras também foram purificadas para a remoção de proteínas contaminantes utilizando-se para isto filtros centricon (Millipore).

3.3.10 Eletroeluição das frações contendo a proteína PbEF-Tu e confirmação da proteína obtida por espectrometria de massas

Para a completa purificação da proteína EF-Tu foi empregada a técnica de eletroeluição, para isso as frações ricas em PbEF-Tu obtidas na cromatografia de afinidade foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida como descrito no item 3.3.8. Após a corrida os géis foram corados com Comassie Azul Brilhante G-250, segundo Neuhoff *et al.* (1988), e a banda correspondente foi removida e eletroluída em tampão glicina (192 mM glicina, 25 mM Tris base, 0,1 % SDS), em membrana de diálise a 10 mA, por 4 h a 4 °C. Para verificar a purificação da proteína por eletroeluição foi realizada novamente SDS-PAGE.

Ainda para confirmar que a proteína recombinante obtida e purificada tratava-se realmente da proteína EF-Tu de *P. brasiliensis* a banda isolada de 51,6 kDa obtida em gel de poliacrilamida após a purificação utilizando eletroeluição foi recortada e submetida à digestão trípica utilizando 10 ngmL⁻¹ de Tripsina Gold (Promega), ao final da digestão, os fragmentos trípticos foram submetidos ao sequenciamento por espectrometria de massas utilizando-se MALDI Synapt G2 HDMS (Waters®) e analisados usando o *software* ProteinLynx, as sequências encontradas foram pesquisadas no SwissProt Databank.

3.3.11 Produção de anticorpos anti-PbEF-Tu

Com a proteína purificada através de eletroeluição foi produzido o anticorpo policlonal em coelho. Para isto $1,0 \text{ mgmL}^{-1}$ da proteína foi inoculada por via intradérmica em coelhos machos albino provenientes do Biotério Central da UNESP-Botucatu, intercalando as inoculações a cada 7 dias, sendo que na primeira inoculação, a proteína foi emulsificada com adjuvante completo de Freund (Sigma) e nas seguintes com o adjuvante incompleto de Freund (Sigma). Decorridos 15 dias da última inoculação foi realizada uma sangria de prova e a avaliação do título de anticorpos produzidos foi feita através da técnica de *immunoblot* (utilizando como amostra o extrato total de Pb18 e a proteína EF-Tu recombinante. Quando obtido o título superior a 1:100 foi realizada a sangria total e o soro obtido foi precipitado com sulfato de amônio $1,56 \text{ M}$, pH 6,5, e novamente titulado, dividido em alíquotas e estocado a -20°C .

3.3.12 Preparo do extrato total de proteínas de *P. brasiliensis*

Foi realizada a extração de proteínas, centrifugando-se por 5 min a 4°C , 50 mL do cultivo de três dias, realizado em BHI líquido com 1 % de glicose, para o isolado Pb18 de *P. brasiliensis*. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuscitado em água estéril à baixa temperatura. Realizaram-se então duas lavagens com água estéril nas mesmas condições. O *pellet* foi ressuscitado em TrisHCl 10 mM , pH 8,8, contendo $1 \mu\text{MmL}^{-1}$ de uma mistura contendo inibidores de proteases (pepstatina, leupeptina, aprotinina, antipaina, quimiostatina (PLAAC) e $10 \mu\text{gmL}^{-1}$ de fenil metil sufonil fluoreto (PMSF). A essa suspensão foram adicionadas quantidades equivalentes de pérolas de vidro, e tal amostra foi submetida a alternância entre banho de nitrogênio líquido e vórtex por 15 min (alternando em gelo para evitar possível aquecimento). Realizaram-se centrifugações a 5000 rpm por 15 min até se observar que a suspensão não encontra-se mais opaca (livre de carboidratos). O sobrenadante foi então quantificado pelo método de Bradford, e foi submetido a eletroforese SDS-PAGE, para posterior transferência para membrana de nitrocelulose.

3.3.13 Titulação do soro policlonal anti-PbEF-Tu

O extrato total do isolado Pb18 e a proteína PbEF-Tu recombinante foram submetidos à SDS-PAGE e transferidos eletroforéticamente do gel para membranas de nitrocelulose conforme descrito por Towbin *et al.* (1979). Após a eletroforese, os géis foram apostos sobre membranas de nitrocelulose recobertos com papel de filtro e

comprimidos com esponjas de poliuretano. Todos os materiais foram previamente embebidos em tampão de transferência bicarbonato de sódio e metanol, pH 9,9, e em seguida encaixados em placas acrílicas perfuradas e mergulhadas na câmara de transferência contendo o mesmo tampão. A transferência foi realizada *overnight* à amperagem constante de 0,4 mA. A membrana foi então corada com Ponceau S (0,5 % w/v em 5 % v/v de ácido acético) para a visualização das bandas proteicas transferidas. Após lavagem de 15 minutos as membranas contendo os antígenos foram cortadas em tiras, incubadas em solução bloqueadora (5 % leite desnatado em PBS) por 4 horas. Os soros anti-PbEF-Tu e soro normal de coelho (controle negativo) foram colocados em diferentes diluições, 1:100 e 1:250 (em solução de 2 % de leite desnatado), sobre as tiras e deixados em contato, sob agitação *overnight*, a temperatura ambiente.

A seguir, as tiras foram lavadas com PBS (0,01 M, pH 7,2) três vezes, com trocas a cada 10 minutos para a retirada do excesso de soro. As tiras foram então incubadas nas mesmas condições anteriores por 2 horas com o anticorpo secundário, anti-IgG de coelho (Sigma) marcado com peroxidase na diluição de 1:1000, o excesso deste anticorpo foi retirado com novas lavagens. Para a revelação dos complexos antígeno-anticorpo formados foi adicionado substrato cromogênico contendo 0,012 g de diaminobenzidina (DAB-Sigma) diluída em 30 mL de PBS acrescido de 150 μ L de peróxido de hidrogênio, a reação foi interrompida com adição de água.

3.3.14 *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay* (ELISA) para *screening* de ligação da proteína PbEF-Tu a componentes da matriz extracelular e plasminogênio

A capacidade de ligação a diferentes componentes da MEC e plasminogênio foi avaliada pela técnica de ELISA. Para tanto, placas de 96 orifícios (Corning®) foram sensibilizadas com 10 μ g mL⁻¹ de cada componente da MEC: laminina, fibronectina, fibrinogênio, colágeno IV, e também plasminogênio, isoladamente, em tampão carbonato pH 9,6, a temperatura ambiente por 1 h. Após este período, as placas foram lavadas com PBS-Tween 20 (PBS-T, 0,05 %) e bloqueadas com soro albumina bovina 1 % (BSA) por 2 horas a 37 °C. Novo ciclo de lavagens foi realizado e então adicionou-se a proteína PbEF-Tu recombinante em duas concentrações 5 μ g mL⁻¹ e 25 μ g mL⁻¹ por 15 h a 37 °C.

Após esta incubação, as placas foram lavadas com PBS-T, e então se adicionou o anticorpo anti-PbEF-Tu no título de 1:100 em PBS-T e BSA 0,5 %, por 1 h a 37 °C. Mais um ciclo de lavagens foi realizado e então o anticorpo secundário, anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase (anti-rabbit IgG-HRP) em PBS-T e BSA 0,5 % no título de 1:2000 foi adicionado e incubado por 1 h a 37 °C. A reação foi revelada com solução reveladora contendo fosfato de sódio, ácido cítrico, ortofenilenodiamino e peróxido de hidrogênio. A leitura foi realizada a 490 nm.

Foram realizados diferentes controles para comprovar que a ligação aos componentes avaliados ocorreu devido à presença da proteína PbEF-Tu e não devido à ligação dos anticorpos ou da proteína recombinante à placa, C1: proteína PbEF-Tu e anticorpos anti-PbEF-Tu (anticorpo primário) e secundário (sem MEC), C2: MEC e anticorpos primários e secundários, C3: MEC e anticorpo secundário e C4: apenas MEC. As absorbâncias destes controles devem ser inferiores à do teste (com a presença da proteína do estudo), e considerou-se que houve ligação para os valores superiores (>10 %) ao controle C1.

3.3.15 Viabilidade celular de *P. brasiliensis* após o tratamento com o anticorpo anti-PbEF-Tu

Para verificar se o tratamento com os anticorpos anti-PbEF-Tu ou soro normal de coelho alteram a viabilidade de *P. brasiliensis* foi realizado o ensaio de XTT, após o tratamento de suspensões de *P. brasiliensis* (10^6 células mL⁻¹) com estes anticorpos nos tempos de 2 h, 5 h, 8 h e 24 h mantidas em meio BHI líquido a 37°C sob agitação.

A viabilidade foi avaliada pela medida da atividade metabólica através de ensaio de redução utilizando 2,3-bis (2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-(2H)-tetrazolio-5-carboxanilida (XTT). Para isto a 200 µL dos inóculos após o tratamento com os anticorpos foram adicionados 50 µL de solução de XTT (1 mg mL⁻¹, diluído em PBS e filtrado; Sigma) contendo 4 µL de solução de menadiona (1 mM em acetona, Sigma) em microplacas, que foram então incubadas por 5 h a 37 °C. A atividade da desidrogenase mitocondrial de fungos viáveis é capaz de metabolizar o XTT-tetrazólio, causando a sua redução que leva a formação de cristais de formazana, que leva a mudança colorimétrica da solução. A leitura colorimétrica foi realizada em comprimento de onda de 492 nm. Foi realizado um controle contendo células mortas de *P. brasiliensis* e apenas o meio utilizado para o ensaio (Meshulam *et al.*, 1995). Quanto maior o número de células viáveis, maior a metabolização e, portanto mais intensa a coloração. A porcentagem de células viáveis foi estabelecida pelo cálculo abaixo:

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

3.3.16 Ensaio de inibição da interação de *P. brasiliensis* com pneumócitos após o tratamento do fungo com o anticorpo anti-PbEF-Tu

O ensaio de inibição da infecção foi realizado em placas de 96 orifícios. Para isto, monocamadas de pneumócitos A549 foram formadas por aproximadamente 24 h em meio HAM-F12 (Cultilab). Suspensões de *P. brasiliensis* (10^6 células mL⁻¹) foram tratadas por meia hora a 37 °C com CFSE 100 µM mL⁻¹ (carboxyfluorescein

succinimidyl ester, BioChemika, o qual realiza a marcação da parede fúngica), após esta marcação as suspensões foram lavadas e então incubadas com o anticorpo anti-PbEF-Tu, e como controle foi realizado o tratamento das leveduras com soro normal de coelho, ambos tratamentos por 1 h a 37 °C e no título de 1:100. Após este tratamento as células fúngicas foram lavadas com PBS e ressuspensas em meio HAM (meio de cultivo de pneumócitos) com o volume inicial para reestabelecer a concentração dos inóculos, a seguir foi realizada a infecção na monocamada de celular e as células infectadas foram incubadas por 2, 5, 8 e 24 horas a 36,5 °C e 5 % de CO₂. As células após os períodos de incubação foram lavadas com PBS estéril cuidadosamente para a remoção de fungos não aderidos. As placas foram dispostas em um aparato gelado e 200 µL de PBS gelado foram adicionados por poço (Bernardino et al., 2013). Com ajuda da ponta de uma ponteira o fundo dos poços foi raspado cuidadosamente, e as suspensões foram diluídas em FACS e submetidas à análise por citometria de fluxo (BD Facs Canto).

O índice de adesão foi determinado por citometria de fluxo, no aparelho FACsCantoTM (Becton Dickinson); células não infectadas, leveduras não marcadas e marcadas foram utilizados como controle para definir os “*gates*” (populações celulares) e avaliar presença de autofluorescência. Os dados foram processados no software FacsDiva. Tal ensaio foi realizado para verificar a influência da proteína PbEF-Tu na interação de *P. brasiliensis* à pneumócitos.

3.4 Silenciamento gênico de PbEF-Tu e Pb14-3-3

Esta etapa de obtenção das cepas silenciadas foi desenvolvida durante o Doutorado Sanduíche realizado através da Universidad de Antioquia, Medellín-Colômbia sob a supervisão dos co-orientadores estrangeiros Prof. Dr. Juan McEwen e Prof. Dr. Orville Hernández Ruiz, pelo Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior (PDSE), CAPES.

3.4.1 Microrganismos e condições de cultivos utilizados para a etapa de silenciamento gênico

Foi utilizado o isolado Pb18 de *Paracoccidioides brasiliensis* na fase leveduriforme, mantido regularmente em meio sólido BHI em estufa a 35 °C, repicado a cada 7 dias. Com este isolado foi realizada a extração de DNA utilizando-se pérolas de vidro segundo protocolo descrito por van Burik et al.,(1998)

A linhagem *A. tumefaciens* LBA1100 (C58C1 com plasmídeo pTiB6 tipo-octopina desarmado) foi utilizada como recipiente para os vetores binários. *A. tumefaciens* foi mantido a 28 °C em meio LC (1 % triptona, 0,5 % extrato de levedura,

0,8 % NaCl) contendo rifampicina 20 mgmL⁻¹. Para propostas de seleção, kanamicina a 100 mgmL⁻¹ foi empregada. Durante a transformação mediada por *Agrobacterium* (ATMT), *A. tumefaciens* contendo o vetor binário pUR5750 (confere resistência a kanamicina em *A. tumefaciens* e *E. coli*) foi utilizada.

3.4.2 Desenho dos oligonucleotídeos utilizados para o silenciamento

Os oligonucleotídeos iniciadores para a amplificação das moléculas denominadas de antisentidos dos genes EF-Tu e 14-3-3 foram elaborados baseado na sequência do genoma do isolado 18 de *P. brasiliensis*, disponíveis no Broad Institute (número de acesso: PADG 01949) e GenBank (número de acesso: AY462124), respectivamente. Os oligonucleotídeos foram construídos tendo como base os éxons (90-150 pb) de cada sequência.

Para a metodologia foram utilizadas os vetores pCR35 e pUR5750 e para a digestão dos mesmos foram utilizadas as enzimas *AscI* (GGCGCGCC) e *XhoI* (CCGCTCGAGCGG) para pCR35 e *KpnI* para pUR5750.

Nos iniciadores foram adicionados sítios de restrição para *AscI* (*reverse*) e *XhoI* (*forward*) de modo que o amplicon (molécula antisentido) fosse inserido no vetor na posição oposta, como indicado na figura 8. Nas tabelas 2 e 3 estão demonstrados os pares de oligonucleotídeos utilizados para o silenciamento, de acordo com o éxon referente aos genes PbEF-Tu e Pb14-3-3 respectivamente.

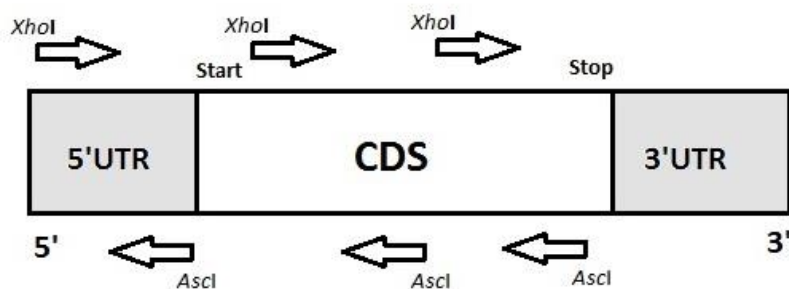


Figura 8. Construção de oligonucleotídeos. Esquema geral para construção dos iniciadores para amplificação de várias sequências de RNA antisense a partir de 5' UTR e região codificadora do gene de interesse. (Menino *et al.*, 2012)

Tabela 2. Oligonucleotídeos utilizados para amplificação dos diferentes fragmentos (antisentidos) do gene EF-Tu de *P. brasiliensis*.

<i>P. brasiliensis</i> Pb18: PADG_01949 - elongation factor Tu	
<p>EXON 1 TCTAATATTTCAAGATCGGTCAAGGCCCTGCTGCAGACTAGCAGGCTTGCTCTGCAAAGACCCGAGGTGTCAACCCGATTCACCATGTCCTCCTTC AAGACCGCATAGCCTTCAGAGGCATGGCGACCGTTTTTCGAGAGAACGAAGCCTCACGTTAACGTCGG</p> <p>EXON 3 ACTACATTGACGGCCGCATCAACAAACGTC AAGCGGAG AAGGGATTGGCAAACCTCTGGAATATGGGGCGATTGATAAGGCTCTGAGGAGCG GAAGCGTGGTATCACCATCTCTACCTCTCACATCGAATATTGACCGACAAACGACATTACGCCACGTCGACTGCCCGGACACGCTGATTATATCA AGAACATGATTACTGGTGTGCTGCGAACATGGATGGTCTATCTGCTTGTGCTGCTCTGACGGCCAAAT</p>	
<i>Forward</i>	
<i>Reverse</i>	
E1AS1	5' CCGCTCGAGCGG TCTAATATTTCAAGATCGG 3' 5' GGCGCGCC GTCTTGAAGGAGGACATGG 3'
E1AS2	5' CCGCTCGAGCGG AGGTGTCAACCCGATTAC 3' 5' GGCGCGCC CCGACGTTAACGTGAGGCTT 3'
E3AS3	5' CCGCTCGAGCGG ACTACATTGACGGCCGCA 3' 5' GGCGCGCC AGAGATGGTGATACCACGTC 3'
E3AS4	5' CCGCTCGAGCGG TAAGGCTCTGAGGAGCGG 3' 5' GGCGCGCC CATCAGCGTGTCGGGGCAGT 3'

*Em vermelho está destacado sítio para a enzima *Xho*I e em verde sítio para *Asc*I.

Tabela 3. Oligonucleotídeos utilizados para amplificação dos diferentes fragmentos (antisentidos) do gene 14-3-3 de *P. brasiliensis*.

<i>P. brasiliensis</i> Pb18: AY462124 -14-3-3-like protein	
<p>EXON 1 ATGGTGGAAAAATGAAGATTGGCTTTCGAGACAAGGAGCTATCCGTCGAGGAGCGCAATCTGCTTCCGTTGCCTATAAAGAACGTGATTGGC GCCCCAGCTGCCTCGTGGAGAATCGTTACTTCGATCGAACAAAAGGAGGAGTTCGAAAGGCAACGAGGCGCAGGTTGCTCTTATCAAGGAGTACC GCCAAAACATCGAGACTGAGTTGGCCAAGATCTGTGAGGATATCTTGGATGTGCTTGACAAGCACCTTATCGCCTCTGCGGAAACGGAGAATCCA AGGTTTTTACCACAAGA</p> <p>EXON 2 AAGGGGGACTACCACCGTATCTCGCCGAGTTCGCTCTTGGAGACAAGCGCAAAGACTCTGCTGATAAGTCGCTGGAGGCTTACAAGAATGCAAC TGAGGTTGCTCAGACCGATCTTCCCCATCCACCCATCCGCTAGGCTTGTCTCTCAACTTCTCCGCTTCTACTATGAAATCCTGAATTTCCACAGA CCAGGCTTCCACCTCGCCAAACAAGCTTTCGATGACGCTATTGCTG</p>	
<i>Forward</i>	
<i>Reverse</i>	
E1AS1	5' CCGCTCGAGCGG ATGGTGGAAAAATGAAGA 3' 5' GGCGCGCC CACGTCGGGCGCCAATCACG 3'
E1AS2	5' CCGCTCGAGCGG GCCTATAAAGAACGTGATTG 3' 5' GGCGCGCC CTCCTTATAAGAGCAACCT 3'
E2AS3	5' CCGCTCGAGCGG AAGGGGGACTACCACCGCT 3' 5' GGCGCGCC CTGAGCAACCTCAGTTGCAT 3'

*Em vermelho está destacado sítio para a enzima *Xho*I e em verde sítio para *Asc*I.

3.4.3 Vetores utilizados

3.4.3.1 pCR35

O plasmídeo pCR35 é um vetor de 6823 pb que contém o gene GFP *downstream* à região promotora, *calcium-binding-protein* (CBP1). Adicionalmente contém o gene neomicina fosfotransferase II (*nptII*) que confere resistência à kanamicina, e portanto utilizado como marcador de seleção quando transformado em *E. coli* (Figura 9).

3.4.3.2 pUR5750

O plasmídeo pUR5750 é um vetor binário de 15731 pb. Este vetor contém: o DNA a ser transferido (T-DNA), repetições da borda direita e esquerda (como no plasmídeo Ti), gene da higromicina-fosfotransferase (*HPH*, útil na seleção dos fungos transformantes) sob controle do promotor GPD (gliceraldeído 3-fosfato) e terminador transcripcional (TRPC). Adicionalmente contém o gene *nptII*, para a seleção de bactérias transformantes com o uso de kanamicina (Figura 9).

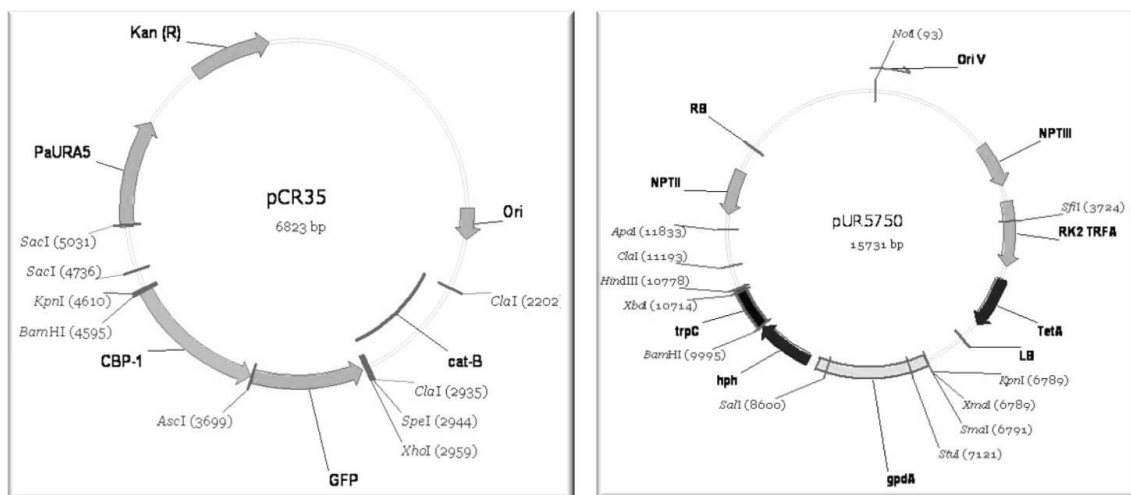


Figura 9. Representação dos vetores pCR35 e pUR5750. (de Groot *et al.*, 1998; Rappleye *et al.*, 2004)

3.4.4 Amplificação dos fragmentos antisentidos a partir de DNA de *P. brasiliensis*

Para a amplificação de cada fragmento foram utilizados 2 μL de DNA de Pb18 ($200 \text{ ng}\mu\text{L}^{-1}$), às amostras foram adicionados 1 μL dos respectivos iniciadores *forward* e *reverse* (10 mM), 5 μL de 10 X Buffer, 1 μL de dNTPs (10 mM), 2 μL de MgSO_4 (500

mM), 0,2 μ L de Taq Platinum *High Fidelity* (Invitrogen) e 37,8 μ L de água. As reações foram incubadas a 94 °C por 4 minutos, seguida de 35 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 68 °C por 50 segundos e 72 °C por 30 segundos. Por último, as reações foram mantidas a 72 °C por 10 minutos, sendo após resfriadas a 4 °C e armazenadas a -20 °C. Após a amplificação os fragmentos obtidos foram submetidos à purificação utilizando o kit de purificação de produtos de PCR, QIAquick (Qiagen).

3.4.5 Restrição dos insertos e plasmídeo pCR35 com as enzimas *AscI* e *XhoI*

Os amplicons purificados e o plasmídeo pCR35 foram submetidos ao tratamento com endonucleases de restrição, com 1 U de *AscI* e 1 U de *XhoI* (Fermentas) (como demonstrado nas tabelas 4 e 5) assim é garantido que ambos, inserto e vetor, tenham extremidades coesivas para a perfeita ligação entre eles. A reação ocorreu durante 18 h a 37 °C. Após este período os tubos foram aquecidos a 80 °C por 5 minutos, para a inativação das enzimas de restrição. Os amplicons digeridos foram submetidos à purificação com kit QIAquick (Qiagen). O plasmídeo digerido foi submetido a uma eletroforese em gel de agarose (Low Melting) a 1 % com tampão TAE 0,5 X (Tris-acetato-EDTA), corrida realizada a 40 V por duas horas. Após a eletroforese, a banda referente ao vetor foi recortada e submetida à purificação. E após a obtenção do amplicon digerido e vetor linearizado foram então realizadas as reações de ligação de ambos.

Tabela 4. Reação de clivagem dos fragmentos dos antisentidos

Reagente	Volume (em μ L)
Amplicon	40
Fast Digest Buffer 10X	5
<i>AscI</i>	1
<i>XhoI</i>	1
H ₂ O DEPC	3
Total	50

Tabela 5. Reação de clivagem do vetor pCR35

Reagente	Volume (em μL)
pCR35 vetor	30
Fast Digest Buffer 10X	4
<i>Ascl</i>	1
<i>XhoI</i>	1
H ₂ O DEPC	4
Total	40

3.4.6 Ligação dos insertos no vetor pCR35 e transformação em *E. coli* DH5 α

A reação de ligação foi realizada adicionando-se 3 μL do vetor pCR35 linearizado, 14 μL do inserto, 2 μL de tampão de ligação 10 X e 1 μL da enzima T4 DNA ligase (Fermentas). A reação ocorreu a 24 °C por 18 horas. Foram utilizados 5 μL da ligação para transformar *E. coli* DH5 α eletrocompetentes.

Alíquotas de 40 μL de células eletrocompetentes foram descongeladas em gelo. A cada tubo foram adicionados 5 μL da ligação. As constantes elétricas utilizadas para a eletroporação (cubetas de 0,2 cm) foram: capacitância, 25 μF , resistor, 200 $\text{m}\Omega$, e voltagem 2,5 kV. A suspensão de células foi transferida para a cubeta de eletroporação gelada, colocada em câmara do eletroporador GenePulser XCell® (BioRad) e o pulso elétrico foi gerado. Após o pulso a cubeta foi retirada da câmara e as células coletadas com 900 μL de meio SOC (triptona 2 %, extrato de levedura 0,5 %, NaCl, 10 mM, KCl 2,5 mM, MgSO₄ 10 mM, MgCl₂ 10 mM). A suspensão foi transferida para um tubo novo e incubado a 37 °C por 1 h, sob agitação e então plaqueada em meio LB sólido contendo kanamicina a 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e incubadas a 37°C.

3.4.7 PCR de colônia para confirmação da clonagem no vetor pCR35

Para verificar a presença do plasmídeo de interesse foi realizada a PCR de algumas colônias obtidas, utilizando-se os iniciadores do vetor pCR35 (Tabela 6). Para isto foram adicionados: 0,4 μL dos respectivos iniciadores *forward* e *reverse* (10 μM), 2 μL de tampão 10 X, 0,4 μL de dNTPs (10 mM), 0,8 μL de MgCl₂ (500 mM), 0,3 μL de Tucan Taq DNA Polimerase (Corpogen), 15,7 μL de água e uma pequena quantidade de cada colônia. Como controle negativo, foi realizada a mesma reação porém a colônia utilizada foi obtida de transformação com o vetor pCR35 vazio. As reações foram incubadas a 94 °C por 10 minutos, seguida de 39 ciclos de 94 °C por 1 minuto,

57 °C por 1 minuto e 72 °C por 2 minutos. Por último, as reações foram mantidas a 72 °C por 10 minutos, sendo após resfriadas a 4 °C e armazenadas a -20 °C. As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1 %. As colônias positivas foram colocadas para crescer *overnight* em 3 mL de LB líquido com kanamicina a 50 µgmL⁻¹, sob agitação a 37 °C, após, o crescimento foi submetido a centrifugação e com o *pellet* foi realizada a extração do plasmídeo utilizando-se o kit MiniPrep-QIAprep®Spin, QIAGEN.

Tabela 6. Oligonucleotídeos complementares ao vetor pCR35

Iniciadores para pCR35	
P1 <i>Forward</i>	5'GGGGTACCCCG CGGATCACGGTATCGATGA 3'
P2 <i>Reverse</i>	5'GGGGTACCCCG GTACCTAGGTGGATCCAAT 3'

*em vermelho estão os sítios de restrição para a enzimas *Kpn*1

3.4.8 PCR confirmatória da clonagem em pCR35

Com os DNAs plasmidiais extraídos foram realizadas PCRs utilizando os iniciadores referentes ao vetor pCR35 e iniciadores respectivos de cada antisenso. Para isto foram adicionados: 0,4 µL dos respectivos iniciadores *forward* e *reverse* (10 mM), 2 µL de 10 X Buffer, 0,4 µL de dNTPs (10 mM), 0,8 µL de MgCl₂ (500 mM), 0,3 µL de Tucan Taq DNA Polimerase (Corpogen), 14,2 µL e 1,5 µL do DNA plasmidial. Como controle negativo, foi utilizado o DNA plasmidial dos transformantes obtidos da transformação com o vetor pCR35 vazio (banda esperada acima de 1800 pb). As reações foram incubadas a 94 °C por 4 minutos, seguida de 35 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 60 °C por 60 segundos e 72 °C por 2 minutos. Por último, as reações foram mantidas a 72 °C por 10 minutos, sendo após resfriadas a 4 °C e armazenadas a -20 °C. As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1 %, visualização de amplificação para ambas as PCRs indica a obtenção de clones recombinantes.

3.4.9 Restrição enzimática confirmatória com *Asc*I e *Xho*I para verificar clonagem no vetor pCR35

Adicionalmente também foi feita a restrição, utilizando o produto anteriormente obtido da PCR realizada com os iniciadores de pCR35 para confirmar o sucesso da clonagem. Para isto foram adicionados 1 µL de cada enzima de restrição *Asc*I (1 U) e

*Xho*I (1 U), 2 µL de tampão de enzima 10 X, 10 µL do produto da PCR e 6 µL de água, a reação ocorreu a 37 °C por 1 hora, seguida da inativação a 80 °C por 5 minutos. A restrição foi avaliada por gel de agarose 2 %, e os clones positivos deveriam apresentar 3 bandas com os respectivos tamanhos: 896 pb (referente ao CBP-1, promotor do vetor), 757 pb (CAT-B, terminador do vetor) e uma banda de tamanho referente ao antisentido, aproximadamente 100 pb.

3.4.10 Obtenção dos insertos *CBP-1-EFTu-CAT-B* e *CBP-1-14-3-3-CAT-B*

Depois de confirmada a clonagem no vetor pCR35, os plasmídeos recombinantes foram utilizados na reação de PCR com os iniciadores do vetor pCR35, os quais adicionaram sítios de restrição para *Kpn*I nos insertos. Para isto foram utilizados: 2 µL de DNA plasmidial, às amostras foram adicionados 1 µL dos respectivos iniciadores *forward* e *reverse* (10 mM), 5 µL de tampão 10 X, 1 µL de dNTPs (10 mM), 2 µL de MgSO₄ (500 mM), 0,2 µL de Taq Platinum *High Fidelity* (Invitrogen) e 37,8 µL de água. As reações foram incubadas a 94 °C por 4 minutos, seguida de 35 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 60 °C por 1 minuto e 68 °C por 2 minutos. Por último, as reações foram mantidas a 68 °C por 10 minutos, sendo após resfriadas a 4 °C e armazenadas a -20 °C. Após a amplificação os fragmentos obtidos foram submetidos à purificação utilizando o kit de purificação de produtos de PCR, QIAquick (Qiagen).

3.4.11 Restrição de *CBP-1-EFTu-CAT-B* e do plasmídeo pUR5750 com a enzima *Kpn*I

Os amplicons purificados e o plasmídeo pUR5750 foram submetidos ao tratamento com endonuclease de restrição *Kpn*I (Fermentas) (Tabela 7 e 8). A reação ocorreu durante 18 h a 37 °C. Após este período os tubos foram aquecidos a 80 °C por 5 minutos, para a inativação das enzimas de restrição. Os amplicons digeridos foram submetidos à purificação com kit QIAquick *PCR Purification Kit* (Qiagen) e vetor digerido foi submetido à desfosforilação.

Tabela 7. Reação de clivagem de *CBP-1-EFTu-CAT-B*

Reagente	Volume (em μL)
Amplicon	30
Fast Digest Buffer 10X	4
<i>KpnI</i>	3
H ₂ O DEPC	3
Total	40

Tabela 8. Reação de clivagem do vetor pUR5750

Reagente	Volume (em μL)
pUR5750 vetor	50
Fast Digest Buffer 10X	6
<i>KpnI</i>	3
H ₂ O DEPC	1
Total	60

Com o vetor linearizado foi feita a sua desfosforilação, para evitar que as extremidades se liguem, a mesma foi realizada com 30 μL do vetor pUR5750, 0,5 μL de CIAP (Calf Intestinal Alkaline Phosphatase, Invitrogen), 6 μL de tampão 10 X e 3,5 μL de água, a 37 °C por 1 hora, logo foi agregado 1 mM EDTA, seguida da incubação a 65 °C por 15 minutos. Após a desfosforilação do vetor foi realizada a sua limpeza através de uma extração realizada com uma mistura de fenol e clorofórmio:álcool isoamílico.

3.4.12 Ligação dos insertos *CBP-1-EFTu-CAT-B* e *CBP-1-14-3-3-CAT-B* no vetor binário pUR5750 e transformação em *E. coli* TOP10

A reação de ligação foi realizada adicionando-se 0,32 μL do vetor pUR5750 linearizado, 1 μL do inserto, 1 μL de tampão de ligase 10 X e 0,5 μL da enzima T4 DNA ligase (Fermentas). A reação ocorreu a 24 °C por 18 horas. Foram utilizados 5 μL da ligação para transformar *E. coli* TOP10 eletrocompetentes nas mesmas condições descritas no item 3.4.6.

3.4.13 PCR de colônia para confirmação da clonagem no vetor pUR5750

Para verificar a presença de plasmídeo recombinante foi realizada a PCR de algumas colônias obtidas, utilizando-se os iniciadores de pUR5750 (Tabela 7). Para isto foram adicionados: 0,4 µL dos respectivos iniciadores *forward* e *reverse* (10 mM), 2 µL de 10 X Buffer, 0,4 µL de dNTPs (10 mM), 0,8 µL de MgCl₂ (500 mM), 0,3 µL de Tucan Taq DNA Polimerase (Corpogen), 15,7 µL de água e uma pequena quantidade de cada colônia. Como controle negativo, foi realizada a mesma reação porém a colônia utilizada foi obtida da transformação com o vetor pUR5750 vazio e como controle positivo colônias transformados com hsp90 (proteína de choque térmico descrita pelo grupo, com o qual já foi realizado o silenciamento e portanto uma colônia contendo inserto). As reações foram incubadas a 94 °C por 10 minutos, seguida de 39 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 63 °C por 1 minuto e 72 °C por 2 minutos. Por último, as reações foram mantidas a 72 °C por 10 minutos, sendo após resfriadas a 4 °C e armazenadas a -20 °C. As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1 %. As colônias positivas foram crescidas *overnight* em 3 mL de LB líquido com kanamicina a 50 µg mL⁻¹, sob agitação, a 37 °C, o crescimento foi submetido a centrifugação e com o *pellet* foi realizada a extração do plasmídeo utilizando-se o kit MiniPrep-QIAprep®Spin, QIAGEN.

Tabela 9. Oligonucleotídeos complementares ao vetor pUR5750

P3 (<i>forward</i>)	5' GATCGGTGCGGGCCTCTTCG 3'
P4 (<i>reverse</i>)	5' CATGACGGCCATCATGCCAA 3'

3.4.14 PCR confirmatória da clonagem em pUR5750

Para confirmar a obtenção do plasmídeo recombinante, o DNA plasmidial extraído foi submetido a PCR utilizando os iniciadores de pCR35 e iniciadores respectivos de cada antisenso, de acordo com o descrito no item 3.4.8., e também foi realizada a PCR com os iniciadores de pUR5750, para isto foram adicionados: 0,4 µL dos respectivos iniciadores *forward* e *reverse* (10 mM), 2 µL de 10 X Buffer, 0,4 µL de dNTPs (10 mM), 0,8 µL de MgCl₂ (500 mM), 0,3 µL de Tucan Taq DNA Polimerase (Corpogen), 14,2 µL e 1,5 µL do DNA plasmidial. As reações foram incubadas a 94 °C por 4 minutos, seguida de 35 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 60 °C por 1 minuto e 72 °C por 2 minutos. Por último, as reações foram mantidas a 72 °C por 10 minutos, sendo

após resfriadas a 4 °C e armazenadas a -20 °C. As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1 %.

3.4.15 Restrição enzimática confirmatória com *AscI* e *XhoI* para verificar a clonagem no vetor pUR5750

Com os amplicons obtidos das PCRs confirmatórias obtidas anteriormente com os iniciadores do vetor pCR35, foram realizadas restrições confirmatórias como descrito no item 3.4.9.

3.4.16 Transformação em *Agrobacterium tumefaciens* com os plasmídeos PbEF-Tu-pUR5750 e Pb14-3-3-pUR5750

Alíquotas de 40 µL de células eletrocompetentes (*A. tumefaciens* LBA 1100) foram descongeladas em gelo. A cada tubo foram adicionados 5 µL da miniprep anterior. As constantes elétricas utilizadas para a eletroporação (cubetas de 0,2 cm) foram: capacitância, 25 µF, resistor, 200 mΩ, e voltagem 2,5 kV. A suspensão de células foi transferida para a cubeta de eletroporação gelada, colocada em câmara do eletroporador GenePulser XCell® (BioRad) e o pulso elétrico foi gerado.

Após o pulso a cubeta foi retirada da câmara e as células coletadas com 900 µL de meio SOC (triptona 2 %, extrato de levedura 0,5 %, NaCl 10mM, KCl 2,5 mM, MgSO₄ 10 mM, MgCl₂ 10mM). A suspensão foi transferida para um tubo novo e incubado a temperatura ambiente por 1,5 h sob agitação e então plaqueada em meio LC sólido contendo kanamicina a 100 µgmL⁻¹ e incubadas a 28 °C.

Foram selecionadas algumas colônias para a confirmação da transformação, estas foram colocadas para crescer *overnight* em 3 mL de meio LC líquido com kanamicina a 100 µgmL⁻¹ sob agitação, o crescimento foi submetido a centrifugação e com o *pellet* foi realizada a extração dos plasmídeos através de miniprep (MiniPrep-QIAprep®Spin, QIAGEN). As mesmas colônias selecionadas foram passadas para uma nova placa de meio LC sólido, com kanamicina a 100 µgmL⁻¹ e rifampicina a 30 µgmL⁻¹ para a manutenção destas colônias que serão utilizadas na transformação em *P. brasiliensis* após a confirmação da presença do inserto.

3.4.17 PCR confirmatória da transformação em *A. tumefaciens* com iniciadores dos vetores pUR5750 e pCR35, antisentidos e *hph* (hygromycin resistance)

Para confirmar a presença do plasmídeo recombinante em *A. tumefaciens*, o DNA plasmidial obtido anteriormente foi submetido a PCR utilizando os iniciadores de

pCR35, iniciadores respectivos de cada antisentido de acordo com o descrito no item 3.4.8, e também foi realizada a PCR com os iniciadores de pUR5750, e *hph* para isto foram adicionados: 0,4 µL dos respectivos iniciadores *forward* e *reverse* (10 mM), 2 µL de tampão 10X, 0,4 µL de dNTPs (10 mM), 0,8 µL de MgCl₂ (500 mM), 0,3 µL de Tucan Taq DNA Polimerase (Corpogen), 14,2 µL e 1,5 µL do DNA plasmidial. As reações foram incubadas a 94 °C por 4 minutos, seguida de 35 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 60 °C (para pUR5750) e 68 °C para *hph* por 1 minuto e 72 °C por 2 minutos. Por último, as reações foram mantidas a 72 °C por 10 minutos, sendo após resfriadas a 4 °C e armazenadas a -20 °C. As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1 %. Colônias de *A. tumefaciens* positivas para todas as PCRs foram utilizadas na transformação de *P. brasiliensis*.

Iniciadores para *hph*: *forward* (5'-AACTCACCGCGACGTCTGTCTCGA-3') e *reverse* (5'-CTACACAGCCATCGGTCCAGA-3').

3.4.18 Transformação em *P. brasiliensis* mediada por *A. tumefaciens*

Primeiramente foi realizado um inóculo com *P. brasiliensis* (WT) em 200 mL de BHI 1 % glicose líquido, este foi incubado a 37 °C sob agitação de 220 rpm durante 48 h.

As *A. tumefaciens* transformantes foram repicadas em meio LC com kanamicina a 100 µg mL⁻¹ e rifampicina a 20 µg mL⁻¹ e deixadas a 28 °C por 72 h, o mesmo foi realizado com *A. tumefaciens* transformado com o vetor pUR5750 vazio, e que será utilizado como controle na transformação posterior. Após este período de incubação estas foram inoculadas em 10 mL de meio LC líquido contendo kanamicina e rifampicina nas mesmas concentrações citadas, e deixadas sob agitação de 170 rpm a 25 °C por 24 horas.

Após o crescimento de *A. tumefaciens* e *P. brasiliensis*, 1,5 mL do cultivo de *A. tumefaciens* foram centrifugados por 5 minutos a 2400 g a temperatura ambiente, os sobrenadantes foram descartados e os *pellets* lavados com 250 µL de meio de indução (MI) (Gelvin, 2006), contendo entre outros componentes a acetoseringona, e então centrifugados novamente nas mesmas condições, e os *pellets* foram ressuspensos gentilmente em 200 µL de MI, adicionados a 5 mL de MI e incubados a 25 °C, sob agitação de 100 rpm por 4-5 h, até atingir a DO₆₆₀ de 0,8.

Para a lavagem dos blastoconídeos de *P. brasiliensis* 50 mL do cultivo foram centrifugados a 3.000 rpm, por 5 minutos a temperatura ambiente e lavados com 10 mL de MI, novamente foi realizada nova centrifugação e os *pellets* ressuspensos em 2 mL de MI. Após a lavagem estes foram passados por seringa (15 vezes) para separação dos grumos celulares para a contagem e uma alíquota deste foi semeado em BHI apenas para assegurar que as leveduras continuaram vivas após este procedimento. Foram então

realizadas duas diluições de 1:10 e 1:100 e contagem em câmara de Newbauer para então realizar os ajustes necessários para que a concentração esteja a 1×10^8 células mL^{-1} .

Foram realizadas duas relações entre as quantidades de *P. brasiliensis*/*A. tumefaciens*, 1:10 e 1:20. Estas quantidades foram adicionadas em um tubo, centrifugadas a 300 rpm por 5 minutos os *pellets* foram então ressuspendidos em 200 μL de MI e aplicados sob membranas de nitrocelulose *N-hybond* colocadas sobre MI sólido, as placas foram deixadas no fluxo para a secagem por 20 minutos e depois incubadas a 28 °C por 3 dias.

Passados os três dias de incubação, as membranas foram colocadas em tubos falcon contendo 3 mL de BHI 1 % glicose com cefotaxime a 300 $\mu\text{g mL}^{-1}$, para isto realizou-se a raspagem das células contidas nas membranas utilizando-se uma alça estéril, estas foram incubadas a 37 °C por 48 h sob agitação de 200 rpm para a eliminação das células de *A. tumefaciens* (pela seleção através do cefotaxime) e manutenção apenas das leveduras de *P. brasiliensis*. Depois de 48 h os cultivos, foram centrifugados a 300 rpm por 5 minutos, os sobrenadantes foram removidos e os *pellets* semeados em meio BHI 1 % glicose sólido com higromicina a 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$, as placas foram deixadas por 30 minutos em fluxo para a secagem e então incubadas a 37 °C por 15-20 dias, foram semeados também o PbWT para assegurar que este não esteja crescendo no meio seletivo com higromicina, podendo indicar que o droga não está agindo ou alguma resistência natural à mesma.

Para assegurar o alcance da estabilidade mitótica as colônias obtidas foram repicadas em BHI com higromicina a cada cinco dias por cinco semanas.

3.4.19 Extração de DNA de *P. brasiliensis*

Algumas colônias de *P. brasiliensis* foram selecionadas para a confirmação da transformação extraíndo-se primeiramente o DNA. Para a extração de DNA cerca de três alçadas do crescimento dos isolado de *P. brasiliensis*, PbWT, PbEV, Pb14-3-3-aRNA e PbEF-Tu-aRNA, foram depositadas em tubos contendo pérolas de vidro umedecidas, adicionou-se tampão de lise seguida da agitação em vórtex por 1 minuto e resfriamento em gelo por 1 minuto, este procedimento foi realizado várias vezes para a completa lise celular. Após esta lise, as células foram deixadas em banho de gelo por 15 minutos. Realizou-se a separação dos sobrenadantes, e estes foram então submetidos a aquecimento a 65 °C por 1 hora. Iniciou-se então a extração com fenol-clorofórmio-álcool-isoamílico até não se observar mais as interfases (fase aquosa, onde temos RNA e DNA, fase intermediária, contendo proteínas e fase orgânica onde se encontra resquícios de fenol). Quando não se observou mais a existência de interfases, adicionou-se clorofórmio-álcool-isoamílico, centrifugou-se e aos sobrenadantes foi adicionado acetato de sódio 3 M para a precipitação do DNA, e incubaram-se estes a -80 °C

overnight. Após esta incubação foi realizada a centrifugação e lavagens com etanol 70 %, seguida da evaporação para se obter o *pellet*. Ao *pellet* foram adicionados 12 μ L RNase ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$) e incubou-se por 1 hora a 37 °C. O volume foi completado com água para 400 μ L e então nova extração como descrita acima. Os *pellets* secos foram ressuspensos em 100 μ L de água DEPC e submetidos então às PCRs confirmatórias com todos os iniciadores utilizados no estudo.

3.4.20 PCRs confirmatórias da transformação de *P. brasiliensis*

Foram realizadas diferentes PCRs com todos os iniciadores utilizados anteriormente (pCR35, pUR5750, antissentido e hph) de acordo como descrito no item 3.4.8., para confirmar o sucesso na transformação.

3.4.21 Análise da expressão gênica das cepas silenciadas por PCR em tempo real

Foram realizadas extrações de RNA dos isolados: selvagem (PbWT), transformado com o vetor vazio (PbEV), silenciado para a proteína 14-3-3 (Pb14-3-3-aRNA) e silenciado para a proteína EF-Tu (PbEF-Tu-aRNA), utilizando-se o reagente Trizol® (Invitrogen) como já descrito anteriormente no item 3.3.2. Com o RNA foi realizada a síntese de cDNA como descrito no item 3.3.2. Para as reações de PCR em tempo real foram utilizados 1 μ L do cDNA, 12,5 μ L de Maxima® SYBR Green/Rox qPCR Master Mix (2 X) (Fermentas), 0,5 μ M de cada iniciador (Tabela 10) e água até atingir o volume de 25 μ L. As reações foram realizadas com a 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. Foram realizadas análises das curvas de *melting* obtidas 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 $2^{-\Delta\Delta CT}$, onde ΔCT é a diferença entre os valores do gene alvo e o gene de referência. Para os valores obtidos para as amostras em triplicata foram calculados a média e então o valor $2^{-\Delta\Delta CT}$ (sendo o gene β -tubulina utilizado como referência) em seguida os valores para as amostras foram normalizados a partir da amostra de RNA extraído do fungo selvagem. Como controle negativo foi utilizada uma reação na qual continha todos os reagentes exceto a amostra de cDNA.

Tabela 10. Iniciadores utilizados para a análise de expressão dos genes EF-Tu e 14-3-3 de *P. brasiliensis*.

Gene	Iniciadores
Pb14-3-3	Forward: 5' AATCTGCTTTCCGTTGCCTA 3'
	Reverse: 5'GTTTTGGCGGTACTCCTTGA 3'
PbEF-Tu	Forward: 5' TATTCGACCGACAAACGACA 3'
	Reverse: 5' TGTTTCGCAGCACCAGTAATC 3'
β -tubulina	Forward: 5' GTGGACCAGGTGATCGATGT 3'
	Reverse: 5' ACCCTGGAGGCAGTCACA 3'

3.4.22 Extração de proteínas e *immunoblotting* para verificar alterações na produção da proteína Pb14-3-3 após o silenciamento gênico

Foi realizada a extração de proteínas dos isolados PbWT e Pb14-3-3 aRNA, segundo descrito no item 3.3.12. As suspensões de proteínas foram então quantificadas pelo método de Bradford, e as mesmas quantidades de proteínas foram submetidas a eletroforese SDS-PAGE.

O gel da eletroforese foi transferido para membrana de nitrocelulose (Hybond-C extra, Amersham Biosciences®) como descrito por Sambrook *et al.*(1998). Após incubação com solução de bloqueio (5 % leite desnatado e 1 % soro fetal bovino) as membranas foram lavadas e então se realizou a reação com anticorpo anti-Pb14-3-3 policlonal (da Silva *et al.*, 2013) diluído 1:100 e monoclonal (Imuny®, diluído 1:500). Após a incubação com os anticopos primários adicionou-se anticorpo secundário anti-IgG de coelho, para a reação com o anticorpo policlonal (que foi produzido em coelho) e anti-IgG de camundongo, para a reação com o anticorpo monoclonal (produzido em camundongo), ambos conjugados com peroxidase. A reação foi revelada com o substrato cromogênico, consistindo de 0,005 g de diaminobenzidina (DAB) diluído em 30 mL de PBS acrescido de 150 μ L de água oxigenada.

3.4.23 Curva de crescimento e ensaio de viabilidade

Para verificar se o silenciamento das proteínas PbEF-Tu e Pb14-3-3 afetou a viabilidade de *P. brasiliensis* foi realizada a curva de crescimento e ensaio de viabilidade. Na curva de crescimento os isolados PbWT, PbEV, Pb14-3-3-aRNA e PbEF-Tu-aRNA foram cultivados em meio BHI líquido com 1 % de glicose por 48 h, o crescimento foi centrifugado e lavado, e inóculos contendo 1×10^8 leveduras de cada

isolado foram adicionados a 100 mL de meio BHI líquido, a densidade celular foi medida em triplicata em espectrofotômetro, na absorbância de 600 nm, em diferentes tempos, 3, 6, 12, 24, 48, 72, 120 e 144 h (Tamayo *et al.*, 2013; Torres, Hernandez, Tamayo, Muñoz, Leitão, *et al.*, 2013).

A viabilidade dos isolados PbWT, PbEV, Pb14-3-3-aRNA e PbEF-Tu-aRNA foi realizado pela medida da atividade metabólica através de ensaio de redução utilizando 2,3-bis (2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-(2H)-tetrazolio-5-carboxanilida (XTT). Para isto aos inóculos de diferentes tempos de cultivo (contendo 10^6 células mL^{-1}) foram adicionados 50 μL de solução de XTT (1 mgmL^{-1} , diluído em PBS e filtrado; Sigma) contendo 4 μL de solução de menadiona (1 mM em acetona, Sigma) em microplacas, que foram então incubadas por 5 h a 37 °C, e a reação avaliada como descrito anteriormente no item 3.3.15.

3.4.24 Microscopia para averiguar a morfologia dos isolados silenciados

Células leveduriformes de PbWT, PbEV, Pb14-3-3-aRNA e PbEF-Tu-aRNA cresceram em meio BHI líquido por 72 h, e as células foram centrifugadas, lavadas com PBS, e ressuscendidas em 5 μL de solução de Calcofluor White M2R® (Life Technologies), e então observadas em microscópio de fluorescência Leica DMLB, utilizando câmera DFC350FX para capturar as imagens.

3.4.25 Adesão dos diferentes isolados à pneumócitos

Este ensaio foi realizado de acordo com Andreotti (2005). Após a formação da monocamada em placas de 24 poços, as células foram lavadas três vezes com PBS estéril para remoção de células não aderidas e então estas foram inoculadas com as respectivas suspensões fúngicas contendo 10^5 células mL^{-1} (relação pneumócito : Pb, 1:1) dos isolados PbWT, PbEV, Pb14-3-3-aRNA e PbEF-Tu-aRNA. Para a preparação dos inóculos, as suspensões padronizadas de fungos em PBS foram incubadas por meia hora à 37°C com CFSE (5(6)-Carboxyfluorescein diacetate N-succinimidyl Ester, BioChemika) na concentração de 100 μMmL^{-1} , e após este período de incubação lavadas com PBS e, novamente, os fungos foram ressuscendidos em meio HAM com o volume inicial para reestabelecer a concentração dos inóculos, a seguir foi realizada a infecção na monocamada de celular. Cada poço foi inoculado com 500 μL da suspensões fúngicas marcadas com CFSE. A seguir, as células infectadas foram incubadas por 2, 5, 8 e 24 horas a 36,5 °C e 5 % de CO_2 . As células foram lavadas com PBS para remoção de fungos não aderidos, seguida da tripsinização e neutralização com soro fetal bovino. As células foram removidas das placas, centrifugadas e fixadas em paraformaldeído 4 %. O índice de adesão foi determinado por citometria de fluxo, no

aparelho FACsCanto™ (Becton Dickinson); células não infectadas, leveduras não marcadas e marcadas foram utilizados como controle para definir os “*gates*” (populações celulares) e avaliar presença de autofluorescência. Os dados foram processados no software FACS Diva. Tal ensaio foi realizado para verificar a quantidade de fungos aderidos, possibilitando a diferenciação da capacidade de infecção de cada isolado avaliado.

3.4.26 Ligação dos diferentes isolados à MEC

Para determinar a capacidade do isolado Pb14-3-3-aRNA de interagir com os componentes da MEC, placas de 96 orifícios foram sensibilizadas com $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ de alguns componentes da matriz extracelular: laminina, fibronectina, fibrinogênio, colágenos tipo I e IV isoladamente, diluídos em tampão carbonato pH 9,6 a temperatura ambiente por 1 h. Após este período as placas foram lavadas com PBS e 0,05 % Tween 20. Foram adicionados inóculos contendo 5×10^6 células mL^{-1} dos isolados PbWT e Pb14-3-3 aRNA por 15 h a 37°C . Após esta incubação, as células foram lavadas e então adicionou-se anticorpo anti-*cell-free* de *P. brasiliensis* (anticorpo produzido em coelho capaz de reconhecer antígenos presentes na superfície do fungo) na diluição de 1:100 em BSA 0,5 % e PBS-Tween 0,05 %, por 1 h a 37°C . Mais um ciclo de lavagens foi realizado e então o anticorpo secundário, anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase (anti-IgG-HRP) na diluição de 1:2000 foi adicionado, e deixado por 1 h a 37°C . Novamente as placas foram lavadas, e a reação revelada através da adição de solução reveladora (tampão citrato pH 4,9 contendo o substrato cromogênico ortofenilenodiamino e água oxigenada). Controles negativos foram realizados como descrito 3.3.14. A absorbância foi lida em densidade óptica de 490 nm.

3.4.27 Ocorrência de apoptose em pneumócitos infectados com os diferentes isolados pela técnica de TUNEL

A técnica do “TUNEL” (Terminal deoxy-transferase mediated X-dUTP Nick End Labeling) tem como princípio a marcação específica de sequências de DNA oriundas da fragmentação do processo de apoptose celular. Para tanto, placas de 96 poços, contendo monocamada de pneumócitos A549, foram infectadas com 10^6 células mL^{-1} de cada isolado de *P. brasiliensis*, PbWT, Pb14-3-3-aRNA e PbEF-Tu-aRNA, e como controle negativo células tratadas com PBS, sendo os períodos de infecção avaliados, 5 e 24 h (incubação a 37°C). Em seguida, a placa foi lavada 3 vezes com PBS gelado, e então adicionou-se paraformaldeído 4 %, deixando a temperatura ambiente por 30 minutos. Realizou-se novo ciclo de lavagens com PBS gelado, e adicionou-se aos poços solução de bloqueio (3 % soro albumina bovina, 20 % soro fetal bovino em PBS), incubando a placa a 37°C por 1 hora.

Após lavagem com PBS gelado, os pneumócitos foram incubados com a mistura dos componentes do “TUNEL” (In Situ Cell Death Detection, Roche®), contendo transferase terminal (TdT) e a sonda marcada com fluoresceína (d-UTP fluoresceína), por 1 hora a 37 °C. Tal processo, incorporou nucleotídeos marcados com fluoresceína, pela ação da transferase terminal à extremidade 3' dos fragmentos apoptóticos de DNA. Realizou-se a lavagem dos poços com PBS gelado três vezes, fixando com paraformaldeído a 1 % e então a análise foi realizada no InCell Analyzer 2000 (GE Healthcare).

3.4.28 Avaliação da virulência dos diferentes isolados utilizando modelo de *Galleria mellonella*

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.

Larvas de *G. mellonella* (n=16) com peso variando entre 0,1 a 0,2 g foram selecionadas e utilizadas para o ensaio de virulência. O crescimento exponencial de PbWT, PbEV, Pb14-3-3 aRNA e PbEF-Tu aRNA em meio BHI líquido suplementado com 1 % de glicose foram centrifugados e lavados várias vezes com PBS, após estas lavagens as leveduras foram passadas em seringa para eliminar a presença de grumos celulares. Após a assepsia das pró-patas traseiras com etanol 70%, as larvas foram infectadas com os inóculos contendo 5×10^6 células (em PBS) dos diferentes isolados com o auxílio de seringas Hamilton (Hamilton, EUA) de 10 µL. As larvas foram incubadas em placas Petri a 37 °C por 7 dias, e a morte das larvas foi avaliada diariamente através da constatação visual de falta de movimento após tocá-las com uma pinça. Os experimentos foram realizados em triplicata. Um grupo adicional de larvas foi inoculado com o mesmo PBS utilizado para o preparo dos inóculos para monitorar efeitos como injúria física ocasionada pela inoculação, alimentação e temperatura, e outro grupo foi utilizado como controle não tratado. (Scorzoni *et al.*, 2013; Thomaz *et al.*, 2013).

3.4.29 Análise estatística

One-way ANOVA com coeficiente de Tukey foram utilizados para analisar os resultados obtidos neste estudo. Os resultados da análise estatística foram considerados significantes quando o valor de p foi <0,05. As análises e os gráficos foram feitos utilizando o *software* Prism 5 (GraphPad Software Inc.). Para a curva de sobrevivência,

análises estatísticas dos resultados de três experimentos independentes foram realizadas utilizando o teste Mantel-Cox, do software GraphPad Prism com valor de $p < 0,05$.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Obtenção da proteína EF-Tu recombinante de *P. brasiliensis* e anticorpo anti-EF-Tu

4.1.1 Qualidade do RNA extraído e obtenção do inserto PbEF-Tu

A integridade do RNA extraído foi checada em gel de agarose 1,5 % (Figura 10A). A dosagem do RNA e a determinação da pureza foram feitas em espectrofotômetro (leituras em 260 nm, 280 nm). Sendo a concentração de $4 \mu\text{g}\mu\text{L}^{-1}$, e a pureza 1,8. Após a extração do RNA, este foi utilizado para a síntese de cDNA através de reação de RT-PCR utilizando iniciadores de oligoDT.

O cDNA obtido foi então utilizado para a obtenção do gene codificante para a região completa de PbEF-Tu (inserto). O inserto foi amplificado por PCR utilizando oligonucleotídeos específicos, a confirmação foi realizada em gel de agarose 0,8 %. Uma vez confirmado o tamanho correto do fragmento de DNA obtido através de eletroforese em gel de agarose, Figura 10B, o produto de PCR foi purificado utilizando-se o QIAquick PCR Purification KIT (QIAGEN), de acordo com as instruções do fabricante e em seguida foi quantificado ($366,23 \text{ ng}\mu\text{L}^{-1}$) e avaliado a pureza (1,9). O inserto obtido foi utilizado na clonagem em vetor pET100/D-TOPO.

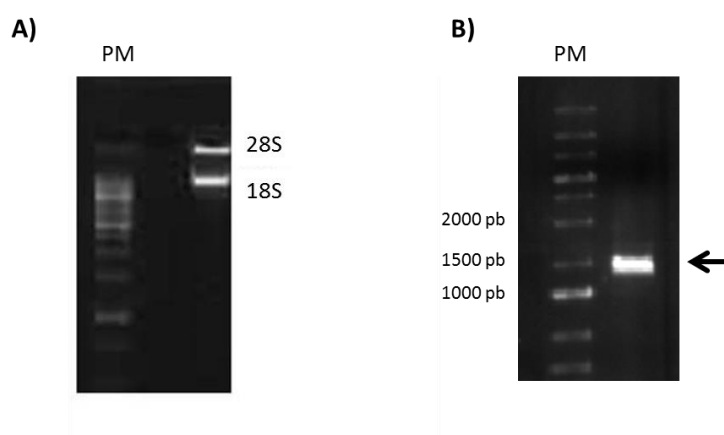


Figura 10. A) Gel de agarose 1,5% com amostras de RNA extraído de Pb18. Demonstração das unidades 18S e 28S de DNA ribossomal. **B) Fragmento referente ao gene EF-Tu.** Eletroforese em gel de agarose 0,8 % a 120 V por aproximadamente 2 h e visualização em luz UV. PM corresponde ao padrão de massa molecular de 1 Kb (Fermentas), e a seta corresponde ao gene EF-Tu de *P. brasiliensis* a ser utilizado na clonagem (aproximadamente 1326 pb). Géis corados com GelRed (Uniscience).

4.1.2 Obtenção do plasmídeo *PbEF-TU-pET100/D-TOPO* pela transformação em *E. coli* TOP10

Após a obtenção do inserto este foi utilizado na clonagem em vetor pET100/D-TOPO (Invitrogen) e transformação em *E. coli* TOP10 para a expansão plasmidial. Através de análise por PCR de algumas colônias resistentes após a transformação, foi possível confirmar a existência de vários clones positivos (Figura 11), tais transformantes positivos foram então selecionadas para a realização de extração plasmidial. Com o DNA plasmidial extraído realizou-se o sequenciamento utilizando-se o iniciador T7 complementar ao vetor pET100/D-TOPO para nova confirmação da clonagem, bem como averiguar a correta orientação do inserto (dado não mostrado). Com o plasmídeo recombinante obtido desta etapa realizou-se a transformação em *E. coli* BL21 StarTM (D3), linhagem esta selecionada para a realização da indução da expressão.

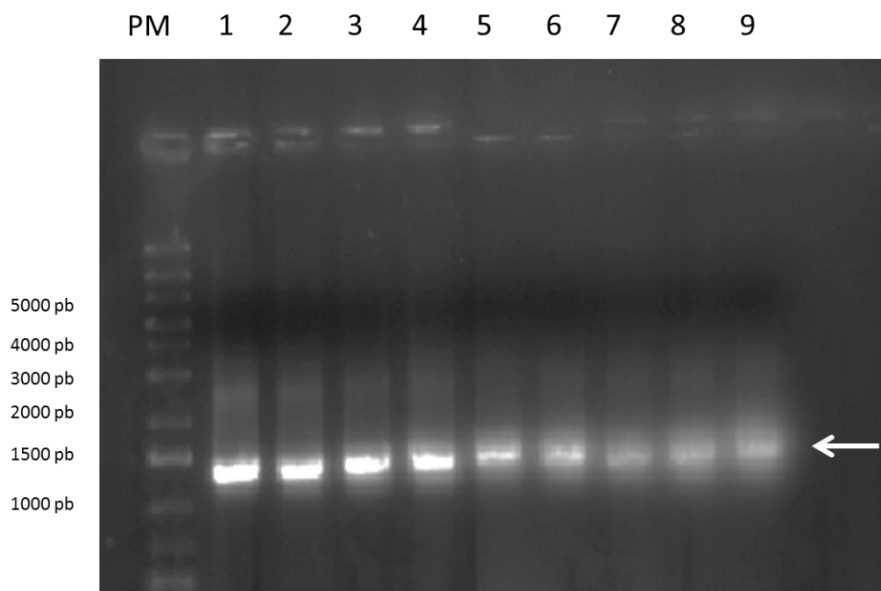


Figura 11. PCR de colônia com iniciadores referentes ao gene do estudo. 1-9: Colônias obtidas da transformação em *E. coli* TOP10. A seta indica a banda de tamanho esperado (1326 pb) que confirma a clonagem. PM: corresponde ao padrão de massa molecular de 1 Kb Plus (Fermentas). Gel corado com GelRed (Uniscience).

4.1.3 Confirmação da transformação em *E. coli* BL21 StarTM (D3)

Após a transformação em *E. coli* BL21 (D3) nove colônias foram selecionadas e avaliadas por PCR de colônia (oligonucleotídeos especificados na tabela 1), restrição com enzimas direcionadas para o corte em um sítio encontrado no inserto e outro no vetor e também sequenciamento. Pela PCR todas as colônias avaliadas se demonstraram

ser de transformantes positivos, o que pode ser constatado pela amplificação de inserto de tamanho esperado, 1326 pb (Figura 12A).

Pela restrição com *SalI* (corta o inserto) e *NdeI* (corta o vetor) foi possível observar duas bandas de tamanhos esperados 653 pb e 6437 pb (Figura 12B). A confirmação definitiva foi feita através de sequenciamento automático, a reação de sequenciamento foi realizada com oligonucleotídeos específicos do vetor pET100/D-TOPO, a sequência gerada foi analisada no software Sequence Scanner V 1.0 (Applied Biosystems) a partir do eletroferograma que também demonstra a qualidade da sequência obtida. A figura 12C mostra a sequência gerada pelo programa onde as bases destacadas em azul demonstram a ótima qualidade da sequência, tal sequência apresentou homologia superior a 95 % em relação ao gene de EF-Tu de *P. brasiliensis*.

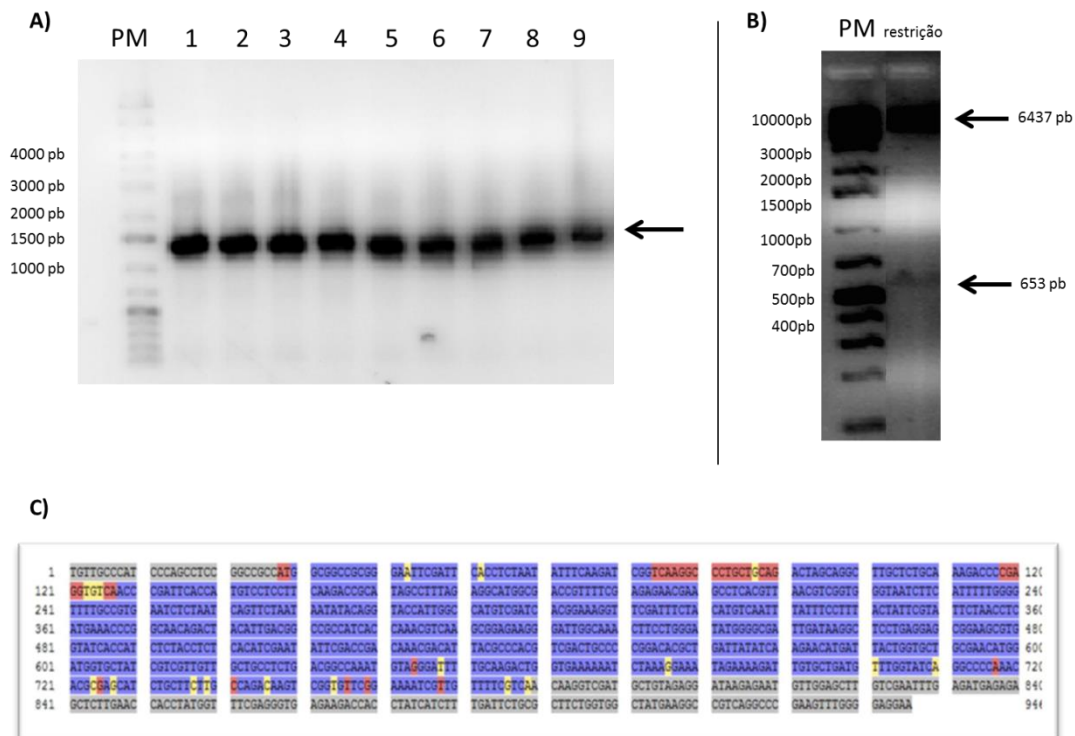


Figura 12. A) PCR de colônia com iniciadores referentes ao gene EF-Tu. 1-9: Colônias obtidas da transformação em *E. coli* BL21 StarTM (D3). A seta indica a banda de tamanho esperado (1326 pb) que confirma a clonagem. **B) Confirmação da clonagem por restrição com as enzimas *SalI* e *NdeI*.** As setas indicam os fragmentos liberados após a restrição, 653 pb e 6437 pb. PM: corresponde ao padrão de massa molecular de 1 Kb Plus (Fermentas). Géis corados com GelRed (Uniscience). **C) Sequenciamento confirmatório.** Sequência gerada após o sequenciamento de DNA plasmidial, plasmídeo PbEF-Tu-pET100/D-TOPO com iniciador T7, específico do vetor utilizado.

4.1.4 Indução da expressão

A figura 13 refere-se à padronização inicial da indução. Nesta foram avaliadas duas concentrações de IPTG 0,5 mM e 1,0 mM por diferentes tempos. A cada hora, uma alíquota foi recolhida e ao final da indução (24 h) todas as amostras obtidas foram avaliadas por SDS-PAGE. Foi possível verificar que aparentemente a concentração de 1,0 mM, tempo de 6 h apresentou maior indução. Assim, a macro-indução foi realizada com IPTG 1,0 mM por 6 h, condições estas consideradas ótimas para a indução da expressão da proteína EF-Tu recombinante. A proteína EF-Tu possui o peso de 48,6 kDa, porém na estratégia de clonagem utilizada, devido a adição de *tag* de histidina ocorre um aumento esperado de 3 kDa, e portanto a proteína foi expressa com o tamanho de 51,6 kDa.

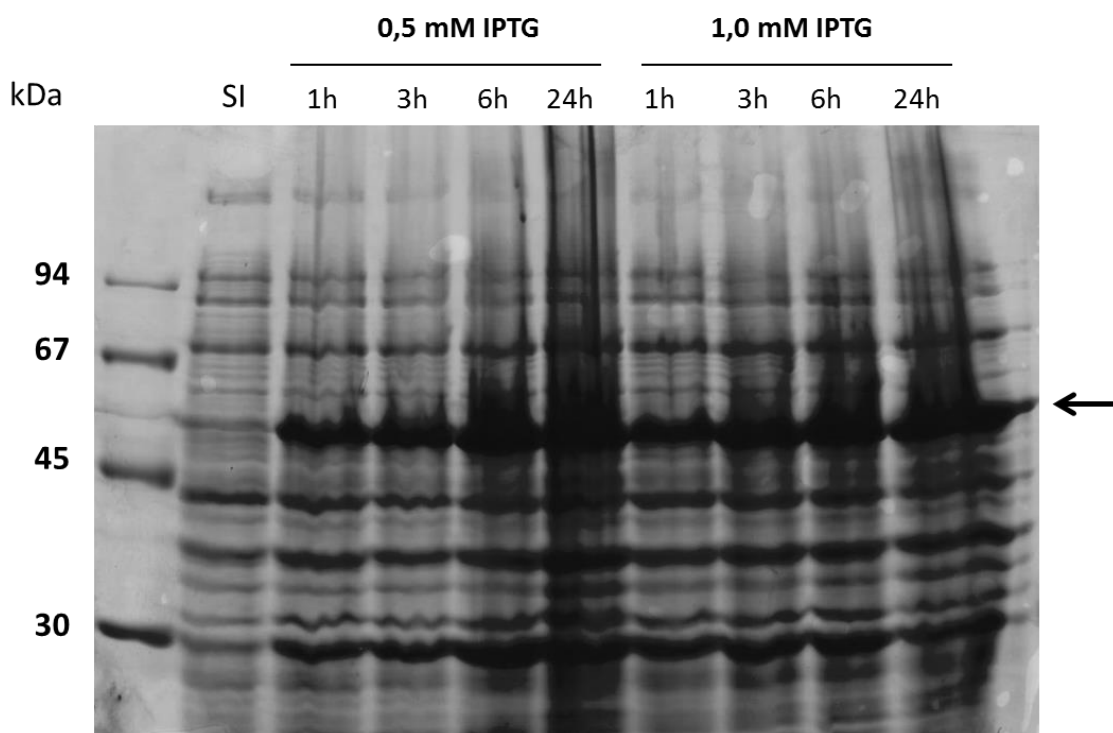


Figura 13. SDS-PAGE da padronização da indução da expressão de EF-Tu. EF-Tu recombinante apresentou expressão diferenciada em ambas as concentrações de IPTG avaliadas (0,5 mM e 1,0 mM) para todos os tempos. kDa: representa o padrão de massa molecular. A seta aponta as bandas referentes à proteína recombinante (51,6 kDa). Coloração com Comassie Brilliant Blue 350R (GE Healthcare).

4.1.5 Purificação da proteína *PbEF-Tu* recombinante

Após a macroindução em 1 litro de cultivo da bactéria transformante, seguida de lise celular, o sobrenadante (fração solúvel) foi purificado através de cromatografia de afinidade. A cromatografia de afinidade utilizando metais imobilizados possibilita explorar a capacidade de ligação de resíduos de histidina em série (geralmente seis) a determinados metais acoplados a matrizes amorfas. Pela cromatografia foram selecionadas 08 frações da eluição referentes aos picos gerados no cromatograma, e estas foram analisadas em SDS-PAGE. O resultado da purificação está representado no cromatograma da Figura 14. Por SDS-PAGE, pôde ser detectada a presença de uma banda de 51,6 kDa, correspondente à proteína *PbEF-Tu* (figura 15), as frações apresentaram grau variado de purificação, sendo que algumas continham outras proteínas, provavelmente proteínas da própria bactéria que apresentam histidina. A fração 14 contendo pequenas quantidades de contaminantes (proteínas com 30 kDa ou abaixo desse valor) foi submetida à purificação utilizando filtro centricon de 30.000 MW (Millipore). Após este procedimento foi possível a obtenção da proteína *PbEF-Tu* recombinante (Figura 15, canaleta **rec**).

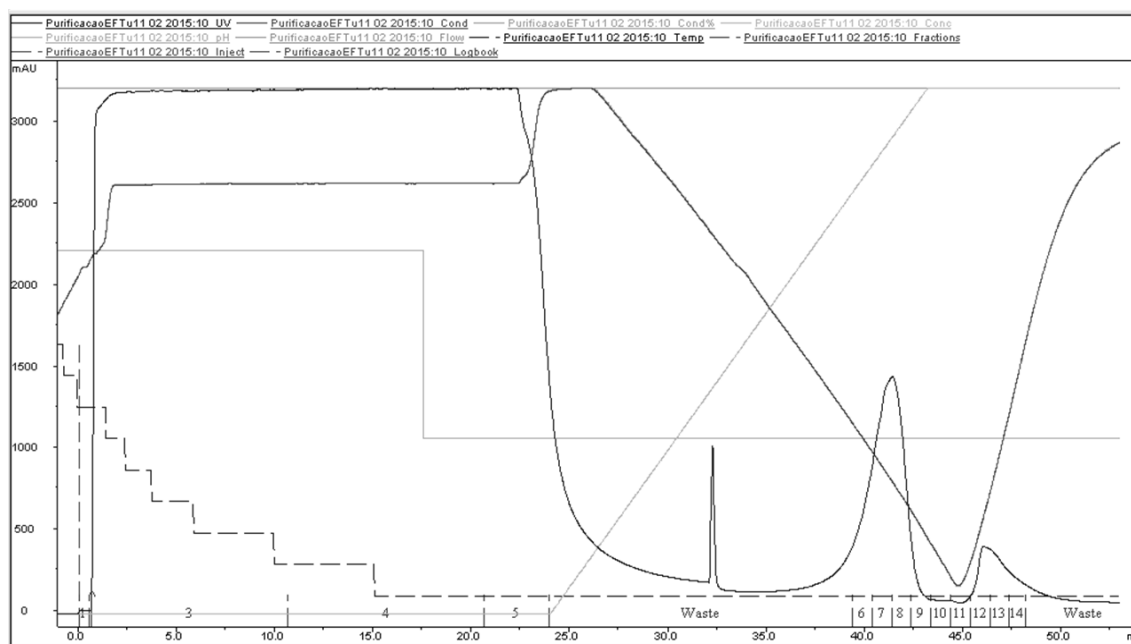


Figura 14. Cromatograma de purificação da proteína EF-Tu realizado no aparelho AKTA-FPLC. Eluição com tampão imidazol 80-100 %; podem ser observados dois picos de eluição da proteína, o primeiro entre as frações 6 e 9 e outro entre as frações 12 e 14, picos estes que correspondem às frações onde há maior probabilidade de se encontrar a proteína de interesse purificada.

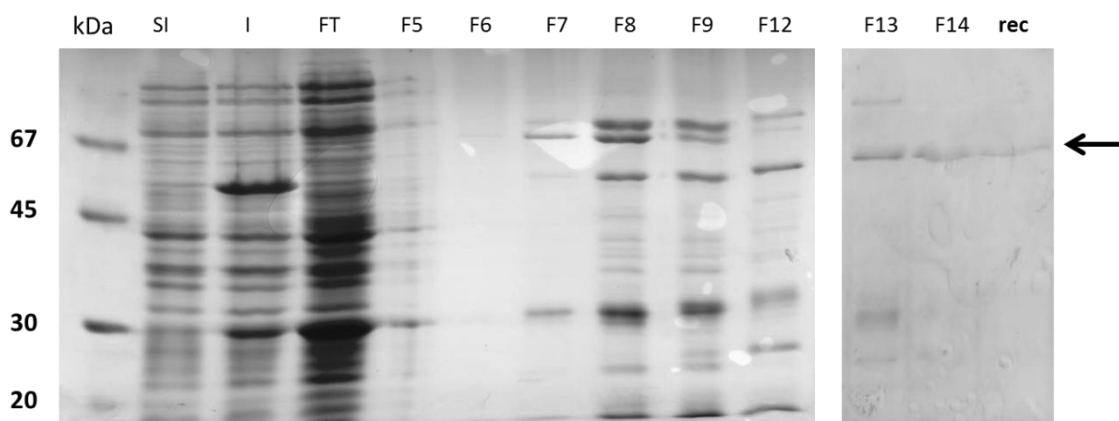


Figura 15. Purificação da proteína EF-Tu recombinante. SI: fração sem adição de IPTG da macro-indução; I: fração correspondente à macro-indução nas condições consideradas ótimas; FT, *Flowthrough*; 5-14, diferentes eluições coletadas durante a cromatografia de afinidade. rec: proteína EF-Tu recombinante após passagem da fração 14 em filtro centricon para purificação. Gel SDS-PAGE 10 %, corado com Coomassie Azul.

4.1.6 Eletroeluição de PbEF-Tu recombinante e sua identificação após sequenciamento por espectrometria de massas

A técnica de eletroeluição foi empregada para a obtenção de uma maior quantidade de proteína completamente purificada que foi utilizada na produção do anticorpo anti-EF-Tu policlonal. Para isso, a banda correspondente a proteína EF-Tu (51,6 kDa) foi excisada do gel e eletroeluída em tampão glicina utilizando membrana de diálise. Após a eletroeluição, a presença da proteína foi avaliada novamente por SDS-PAGE, sendo possível observar banda única referente à proteína PbEF-Tu no tamanho esperado, 51,6 kDa (Figura 16).

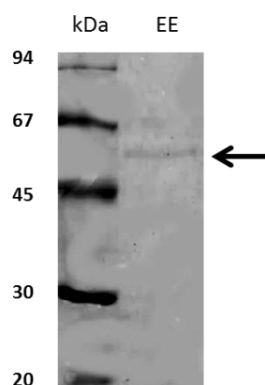


Figura 16. SDS-PAGE para verificar purificação da proteína EF-Tu recombinante por meio da técnica de eletroeluição. Coloração por Coomassie Brilliant Blue R350 (GE

Healthcare), kDa: marcador molecular, EE: amostra eletroeluída, a seta indica a proteína PbEF-Tu purificada.

Tabela 11. Proteínas identificadas a partir da banda eletroeluída, digerida e submetida ao sequenciamento por espectrometria de massas.

Peptídeo identificado	Protein Score	Massa (kDa)	Score	Proteína identificada/ID
IDELLEAVDTWIPTPQR	25.240.380	48,7	60%	Translation elongation factor Tu <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> Pb18 (XP_010757650.1)
KDSEVEIIGGGVPTILTK	25.240.380	48,7	57,9%	Translation elongation factor Tu <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> Pb18 (XP_010757650.1)
GLANFLEYGAIDKAPEER	25.240.380	48,7	57,9%	Translation elongation factor Tu <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> Pb18 (XP_010757650.1)
QPELGEQKIDELLEAVDTWIPTPQR	25.240.380	48,7	85,5%	Translation elongation factor Tu <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> Pb18 (XP_010757650.1)
DTDKPFLMSIEEVFSISGR	25.240.380	48,7	64,7%	Translation elongation factor Tu <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> Pb18 (XP_010757650.1)
NMITGAANMDGAIVVVAASDGMPQTR	25.240.380	48,7	88,9%	Translation elongation factor Tu <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> Pb18 (XP_010757650.1)

4.1.7 Análise do anticorpo anti-PbEF-Tu por *Western blot*

Foi realizada a transferência do extrato total de proteínas de *P. brasiliensis* e da proteína PbEF-Tu recombinante para membranas de nitrocelulose, e com estas realizou-se o *immunoblot*. O soro policlonal obtido em coelho foi avaliado pela técnica de *immunoblot*. Observou-se reatividade para ambos os títulos avaliados, 1:100 e 1:250. O soro foi capaz de reconhecer a proteína PbEF-Tu recombinante, e também demonstrou reatividade frente ao extrato total de *P. brasiliensis*. Como pôde ser observado o anticorpo produzido, anti-PbEF-Tu foi capaz de reconhecer a proteína PbEF-Tu independente da amostra avaliada (Figura 17). Adicionalmente por imunodifusão foi possível demonstrar reatividade entre a proteína EF-Tu purificada e soro controle de paciente com PCM (dado não mostrado).

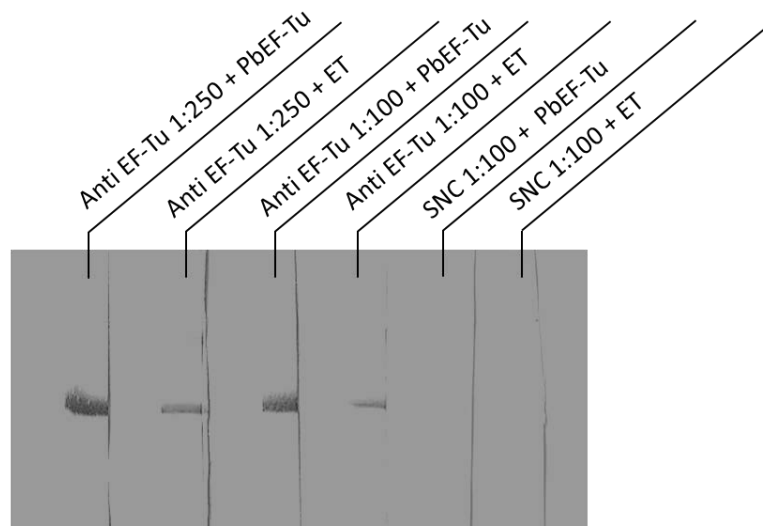


Figura 17. Verificação da reatividade do soro policlonal anti-PbEF-Tu por *Immunoblotting*. +: reagido com; Anti EF-Tu: anticorpo policlonal anti-PbEF-Tu; PbEF-Tu: proteína PbEF-Tu recombinante; ET: extrato total de Pb18; SNC: soro normal de coelho. Foram testadas duas concentrações do anticorpo anti-EF-Tu obtido, 1:100 e 1:250.

4.1.8 Ligação de PbEF-Tu aos componentes da matrix extracelular

A capacidade da proteína PbEF-Tu de se ligar aos componentes da matriz extracelular e plasminogênio foi determinada através de ensaio de ELISA. Os resultados demonstraram que a proteína PbEF-Tu recombinante foi capaz de se ligar à fibronectina e plasminogênio em ambas concentrações avaliadas, 5 e 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Figura 18A e 18B), o mesmo não foi observado para outros componentes avaliados (laminina, fibrinogênio e colágeno IV, dado não mostrado) controles foram realizados: 1 (proteína PbEF-Tu e anticorpos anti-PbEF-Tu e secundário sem presença de MEC ou PLG), 2 (MEC ou PLG e ambos anticorpos), 3 (MEC ou PLG e anticorpo secundário) e 4 (apenas MEC), sendo que todos apresentaram absorvâncias inferiores ao teste para fibronectina e plasminogênio concluindo que a ligação a esses componentes ocorreu devido a presença da proteína PbEF-Tu (Figura 18A e 18B).

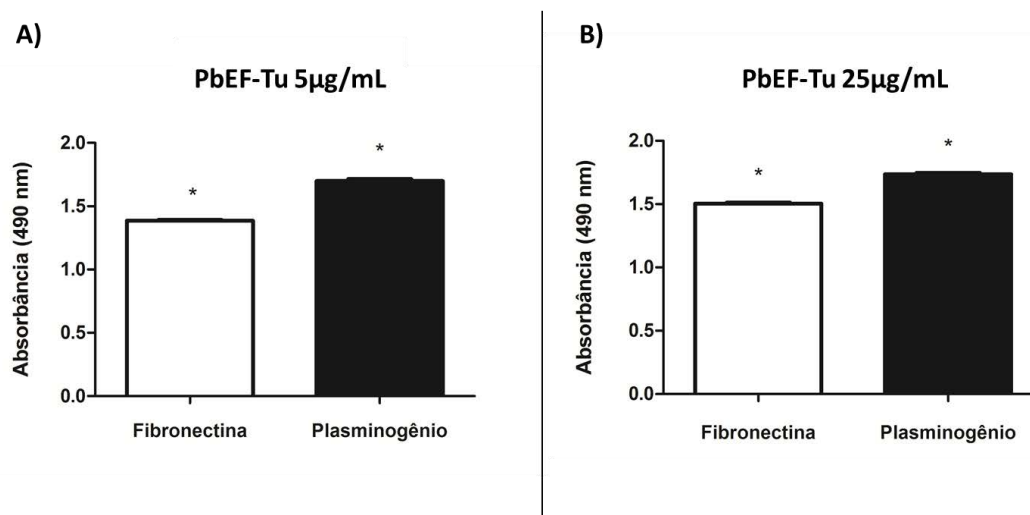


Figura 18. Ligação da proteína PbEF-Tu recombinante em diferentes concentrações (5 e 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$) à fibronectina (10 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e plasminogênio (10 $\mu\text{g mL}^{-1}$) por ELISA. Os resultados estão expressos em unidades de absorbância. *: absorbância superior (>10 %, estabelecido como *cut-off* da reação) ao controle EFTu + Ac1° e Ac2°, indicando que houve ligação à MEC ou PLG devido à presença da proteína PbEF-Tu.

A habilidade de *P. brasiliensis* colonizar tecidos do hospedeiro pode ser facilitada por proteínas presentes em sua superfície celular que apresentam afinidade aos componentes da MEC, e o resultado de tal colonização depende amplamente da interação entre receptores e ligantes do hospedeiro e fungo. A infecção inicial de *P. brasiliensis* origina-se nos pulmões através da inalação dos conídios, a capacidade em iniciar o processo de infecção ocorre devido à adesão às células do epitélio pulmonar e moléculas da MEC. A proteína EF-Tu pode estar envolvida na interação de *P. brasiliensis* com o componente fibronectina da MEC. Alguns microrganismos são capazes de degradar os componentes da MEC através da produção ou requisição de proteases do hospedeiro (Singh *et al.*, 2012). Um exemplo de protease que é capaz de degradar componentes da MEC é o plasminogênio, sendo que uma grande variedade de patógenos aumenta sua capacidade de invasão e disseminação através da ligação ao plasminogênio (Bergmann *et al.*, 2001; Bhattacharya *et al.*, 2012; Nomura, 2012).

O plasminogênio é uma pró-enzima abundante no plasma e fluidos extracelulares, ele pode ser convertido em sua forma proteolítica, a plasmina, através de ativadores fisiológicos do tipo tecidual e do tipo uroquinase (Castellino and Ploplis, 2005) A plasmina por sua vez tem papel na degradação de polímeros de fibrina além de dissociar componentes da MEC (Chapman, 1997). Diferentes patógenos incluindo fungos como *Pneumocystis carinii* (Fox and Smulian, 2001), *Aspergillus fumigatus* (Behnsen *et al.*, 2008; Zaas *et al.*, 2008), *C. albicans* (Crowe *et al.*, 2003), *Cryptococcus neoformans* (Stie and Fox, 2012) e *P. brasiliensis* (Donofrio *et al.*, 2009; Nogueira *et al.*, 2010; Marcos *et al.*, 2012), são capazes de utilizar o plasminogênio do hospedeiro através de receptores presentes em sua superfície, o plasminogênio uma vez associado à

superfície do patógeno pode ser ativado pelos ativadores do hospedeiro ou mesmo por proteínas produzidas pelo próprio patógeno, resultando na formação sobre ele de um revestimento com capacidade fibrinolítica, facilitando a penetração através de barreiras proteicas (Chaves et al., 2015) constituindo importante aspecto para a disseminação pelo hospedeiro e conseqüentemente para o processo infeccioso.

Em *Leptospira interrogans* (Wolff et al., 2013) foi demonstrado que a proteína EF-Tu possui capacidade de ligação ao plasminogênio de maneira dose-dependente, e que resíduos de lisina foram críticos para essa interação, a EF-Tu uma vez ligada ao plasminogênio foi capaz de convertê-lo à sua forma proteolítica, plasmina, e clivar o substrato C3b e fibrinogênio, contribuindo para a inativação do sistema complemento e disseminação. Adicionalmente, em outros patógenos também já foi demonstrada sua capacidade de ligação ao plasminogênio, *Listeria monocytogenes* (Schaumburg et al., 2004), *Pseudomonas aeruginosa* (Kunert et al., 2007), *Streptococcus pneumoniae* (Mohan et al., 2014), *Bacillus anthracis* (Chung et al., 2011) e *C. albicans* (Crowe et al., 2003).

Em relação à ligação de EF-Tu a fibronectina presente na MEC, e portanto envolvimento na interação com células epiteliais do hospedeiro, há relatos para *Acinetobacter baumannii* (Dallo et al., 2012), *Mycoplasma pneumoniae* (Dallo et al., 2002; Balasubramanian et al., 2008) e *Mycobacterium avium* (Viale et al., 2014), nos quais foi descrita como proteína envolvida na relação patógeno-hospedeiro, sendo, portanto considerada nestes microrganismos como um fator de virulência. A fibronectina é um alvo para os patógenos altamente disponível (Schwarz-Linek et al., 2004) encontrado na forma solúvel nos fluídos do sangue e plasma e na sua forma fibrilar na matriz extracelular, os patógenos possuem fácil acesso à MEC (Yamada et al., 1980) através de algumas de suas proteínas (adesinas) e que podem levar ao dano de células epiteliais.

Neste trabalho demonstramos que a proteína EF-Tu de *P. brasiliensis* foi capaz de interagir com fibronectina e plasminogênio, e por isto sugerimos que esta seja importante na adesão às células hospedeiras, interação e degradação de componentes da MEC e provavelmente na disseminação.

4.1.9 Inibição da adesão de *P. brasiliensis* à pneumócitos utilizando anticorpo anti-PbEF-Tu

Antes da realização do ensaio de inibição da adesão, foi verificado se o tratamento de *P. brasiliensis* com o anticorpo anti-PbEF-Tu e soro normal de coelho para todos os tempos utilizados no ensaio de inibição da adesão (2 h, 5 h, 8 h e 24 h) proporciona alterações na viabilidade do fungo, isto para confirmar que os dados obtidos na adesão foram devidos ao bloqueio da proteína PbEF-Tu pelo tratamento do fungo com o respectivo anticorpo, e não devido a uma variação na viabilidade fúngica.

O ensaio de viabilidade celular foi realizado pelo método do XTT, os dados obtidos demonstraram que o tratamento com ambos os anticorpos (anti-PbEF-Tu e soro normal de coelho) não alteraram a viabilidade de *P. brasiliensis* nos tempos de 2 h, 5 h, 8 h e 24 h quando comparado ao fungo sem tratamento com anticorpo (Figura 19).

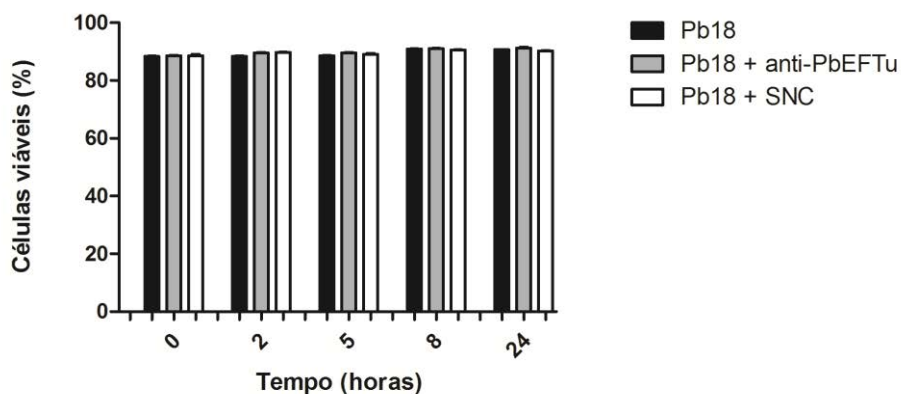


Figura 19. Ensaio de viabilidade celular de *P. brasiliensis* para verificar alterações referentes ao tratamento com anticorpos anti-PbEF-Tu ou soro normal de coelho (SNC) através do método de XTT. Para todos os tempos avaliados não houve diferença significativa entre todas as amostras. Pb18: *P. brasiliensis* isolado Pb18.

Com o anticorpo anti-PbEF-Tu foi realizada também a verificação do envolvimento da proteína PbEF-Tu na interação fungo-hospedeiro através de ensaio de inibição da adesão do fungo à pneumócitos. Os dados obtidos demonstraram que o contato prévio de *P. brasiliensis* com o anticorpo reduziu significativamente ($p \leq 0,05$) a adesão à pneumócitos nos tempos de 8 h e 24 h, com uma diminuição de 35 % e 40 % (Figura 20) respectivamente, quando comparado ao fungo sem tratamento com anticorpos, e para os tempos de 2 h e 5 h não foram observadas alterações significativas do índice de adesão. Como controle foi realizado o tratamento prévio de *P. brasiliensis* com soro normal de coelho, porém este não apresentou diferenças significativas em relação à adesão quando comparado ao fungo sem tratamento para todos os tempos de infecção (Figura 20).

A infecção de *P. brasiliensis* no hospedeiro é iniciada primeiramente pela aderência deste fungo à superfície de células epiteliais pulmonares, sítio este preferencial deste fungo, uma vez que o tecido pulmonar é o primeiro com o qual este patógeno entra em contato após a inalação dos conídios pelo hospedeiro, e posteriormente invasão e disseminação para diferentes locais. A adesão é mediada por componentes superficiais da célula fúngica chamados de adesinas, os quais frequentemente se ligam aos componentes da MEC. A adesão de *P. brasiliensis* à pneumócitos após o bloqueio da proteína PbEF-Tu foi significativamente reduzida em

tempos mais tardios de infecção (8 h e 24 h) apontando para a importância desta proteína no processo infeccioso de *P. brasiliensis*.

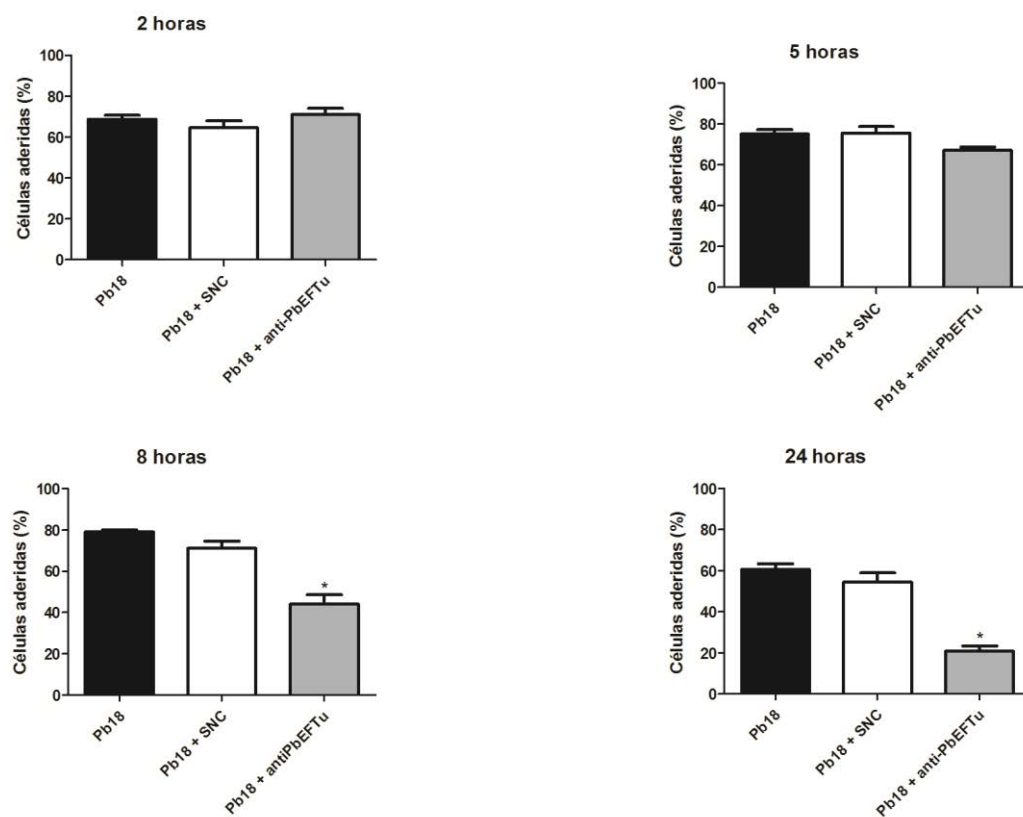


Figura 20. Ensaio de inibição da adesão após o tratamento de *P. brasiliensis* com o anticorpo anti-PbEF-Tu para verificar o envolvimento da proteína PbEF-Tu na interação do fungo com pneumócitos. * $p \leq 0,05$ quando comparados o fungo sem tratamento com o anticorpo e o fungo tratado com o anticorpo anti-PbEF-Tu; SNC: soro normal de coelho.

4.2 Silenciamento gênico de PbEF-Tu e Pb14-3-3

4.2.1 Obtenção dos amplicons para utilização no silenciamento

Através de PCR com a amostra de DNA de *P. brasiliensis* Pb18 foi possível a obtenção de todos os amplicons necessários para os próximos passos, como pode ser observado na Figura 21, os fragmentos são pequenos contendo de 100-150pb.

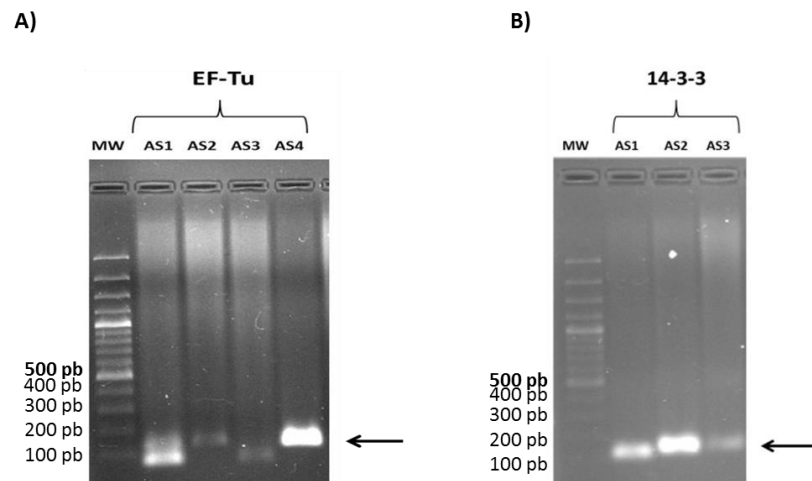


Figura 21. Amplificação dos amplicons a serem utilizados nas transformações iniciais para o silenciamento gênico. MW: Marcador molecular de 100 pb. Gel de agarose 1 %. A seta indica os fragmentos de tamanhos esperados (100-150 pb).

4.2.2 Confirmação por PCR da transformação em pCR35

Após a obtenção dos amplicons esses foram purificados e submetidos à restrição com *AscI* e *XhoI*, assim como o vetor pCR35 (para a linearização e retirada da sequência GFP). Realizou-se a ligação e estes foram então transformados em *E. coli* DH5 α por eletroporação. Foram obtidos vários clones desta primeira transformação para todos os amplicons utilizados. A figura 22A demonstra a amplificação da PCR de colônia da transformação em vetor pCR35 com o amplicon referente à EFTu, e na figura 22B referente à 14-3-3. Clones positivos apresentam amplificação de fragmento próximo a 1800 pb. Algumas colônias positivas foram selecionadas para realização da extração plasmidial.

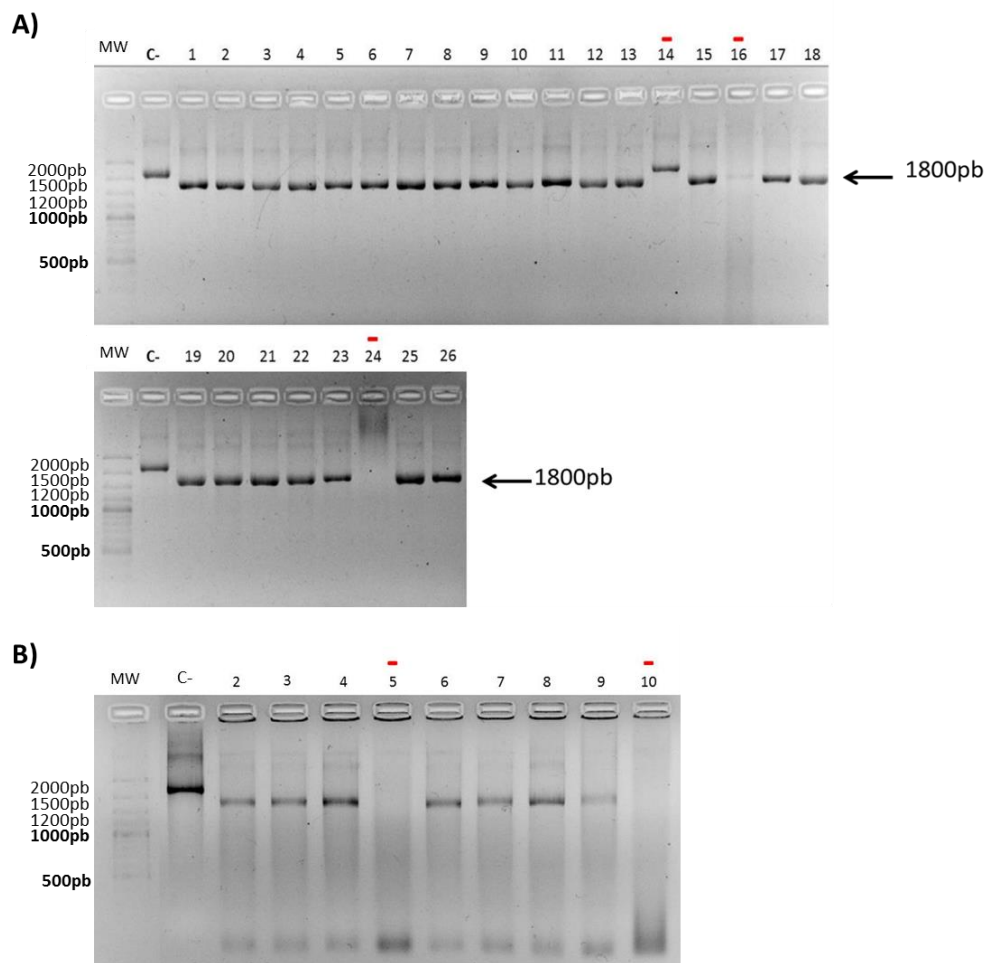


Figura 22. PCR de colônia com iniciadores do vetor pCR35. Colônias obtidas da transformação com os antisentidos referentes a EF-Tu (A) e 14-3-3 (B). C-: controle negativo, PCR feita com o vetor vazio. Os clones negativos estão marcados com o sinal de menos acima. A seta indica a banda no tamanho esperado de aproximadamente 1800 pb que confirma a clonagem. MW: marcador molecular de 100 pb.

4.2.3 Confirmação da clonagem em pCR35 por PCR de colônia

Através da PCR utilizando-se como amostras o DNA plasmidial dos clones positivos obtidos da clonagem no vetor pCR35, e oligonucleotídeos específicos tanto do vetor pCR35 como do antisentido foi possível realizar novamente a confirmação desta transformação. Foram obtidos clones positivos para todas as moléculas antisentidos avaliadas, porém aqui demonstramos somente as PCRs com os plasmídeos recombinantes dos clones da transformação com os antisentidos EFTu-AS4 (Figura 23A) e 14-3-3-AS3 (Figura 23B). Os amplicons obtidos da PCR com os iniciadores do vetor pCR35 foram submetidos à restrição confirmatória para seleção definitiva dos clones transformantes.

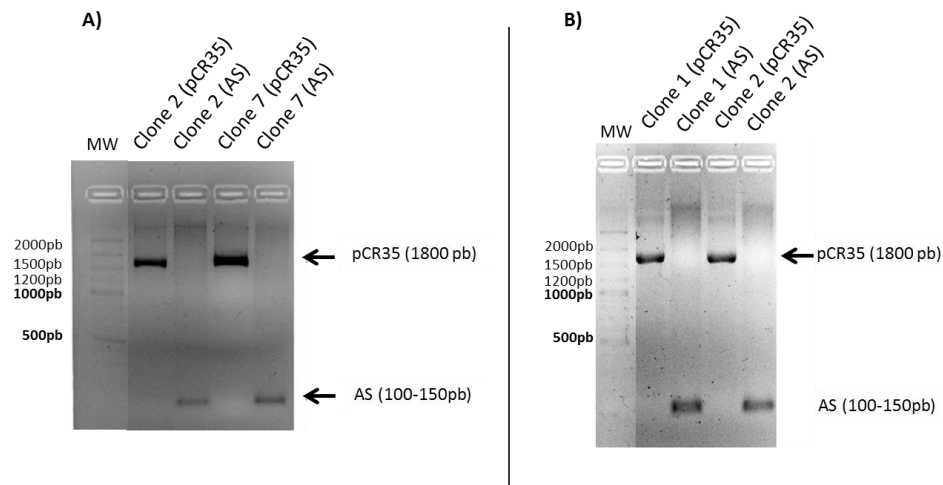


Figura 23. PCR confirmatória da clonagem no vetor pCR35. PCR feita com o DNA plasmidial dos clones 2 e 7 da clonagem com o antisentido EF-AS4 no vetor pCR35 (A), e clone 1 e 2 da clonagem de 14-3-3-AS3 (B). C+: controle positivo (não amplificou), C-: controle negativo. MW: peso molecular de 100 pb. Banda de aproximadamente 1800 pb para a confirmação com iniciadores do vetor pCR35 e banda entre 100-150 pb para a confirmação com os iniciadores referentes às moléculas antisentido.

4.2.4 Restrição enzimática com *XhoI* e *AscI* confirmatória da clonagem no vetor pCR35

Com a restrição enzimática utilizando-se as enzimas *XhoI* e *AscI* foi possível realizar a confirmação definitiva da primeira etapa de clonagem realizada no vetor pCR35 através da visualização em gel de agarose de três bandas referentes a CBP-1 (promotor de pCR35, 896 pb), CAT-B (terminador, 757 pb) e o antisentido (100 pb) (Figura 24).

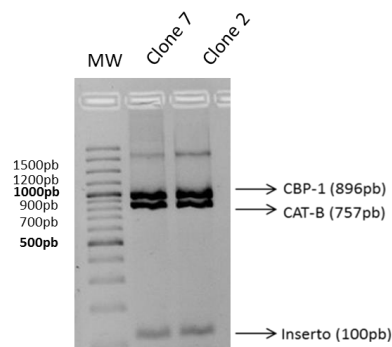


Figura 24. Restrição enzimática confirmatória com *XhoI* e *AscI* do DNA plasmidial obtido da clonagem no vetor pCR35. A) Restrição dos clones da clonagem com os antisentidos EF-Tu-AS4, e B) 14-3-3-AS3. As setas apontam os fragmentos de tamanhos esperados: CBP-1

(promotor, 896 pb), CAT-B (terminador, 757 pb), inserto (± 100 pb). MW: peso molecular de 100 pb.

4.2.5 PCR para amplificação dos insertos *CBP-1-EFTu-CAT-B* e *CBP-1-14-3-3-CAT-B*

Após a confirmação da clonagem no vetor pCR35, realizou-se nova PCR com os oligonucleotídeos iniciadores específicos do vetor pCR35 (para inserção de sítios de restrição para *KpnI* no inserto), tendo como amostra o DNA plasmidial obtido da primeira clonagem, a fim de se obter o inserto a ser introduzido no vetor binário pUR5750, inserto este contendo promotor (*CBP-1*)-antisentido (EF-Tu ou 14-3-3 inserido na orientação oposta)-terminador (*CAT-B*). A amplificação está demonstrada na figura 25, pela visualização de banda de 1800 pb.

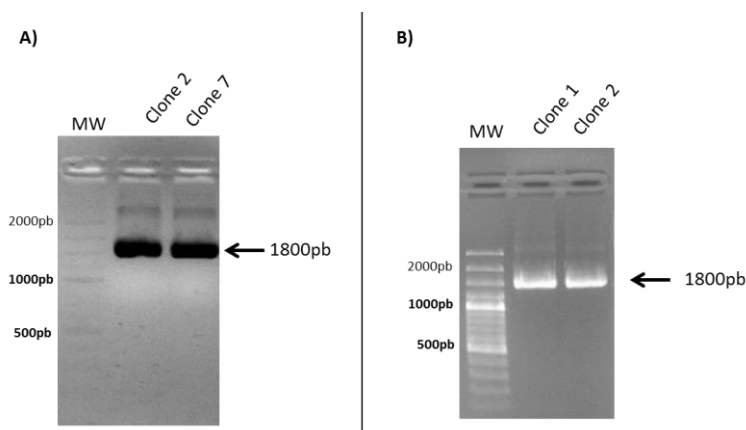


Figura 25. Amplicons *CBP-1-EFTu-CAT-B* e *CBP-1-14-3-3-CAT-B*. PCR com DNA plasmidial dos clones 2 e 7 para PbEF-Tu aRNA (A) e clones 1 e 2 para Pb14-3-3 aRNA (B) utilizando Taq *High Fidelity* e iniciadores do vetor pCR35 para obtenção do inserto a ser utilizado na clonagem no vetor pUR5750. Banda de tamanho esperado de 1.800 pb. MW: peso molecular de 100 pb.

4.2.6 Confirmação da clonagem no vetor pUR5750 por PCR de colônia

Após a obtenção dos insertos *CBP-1-EFTu-CAT-B* e *CBP-1-14-3-3-CAT-B* estes foram submetidos à restrição enzimática com *KpnI*, o mesmo foi realizado com o vetor binário pUR5750. A transformação foi realizada por eletroporação em *E. coli* TOP10.

Algumas colônias resistentes foram selecionadas e avaliadas por PCR de colônia utilizando os oligonucleotídeos iniciadores referentes ao vetor pUR5750. Foi possível a confirmação de um clone positivo (clone 16) para PbEF-Tu aRNA (Figura

26A) e um clone positivo (clone 23) para Pb14-3-3 (Figura 26B). A baixa eficiência nesta transformação se deve ao tamanho do vetor utilizado (aproximadamente 15700 pb), o qual dificulta a sua entrada na bactéria. Esta etapa foi realizada inúmeras vezes, e não foi possível a obtenção de clones positivos para todos os antisentidos propostos no trabalho. Com os clones positivos procedeu-se a realização da extração plasmidial.

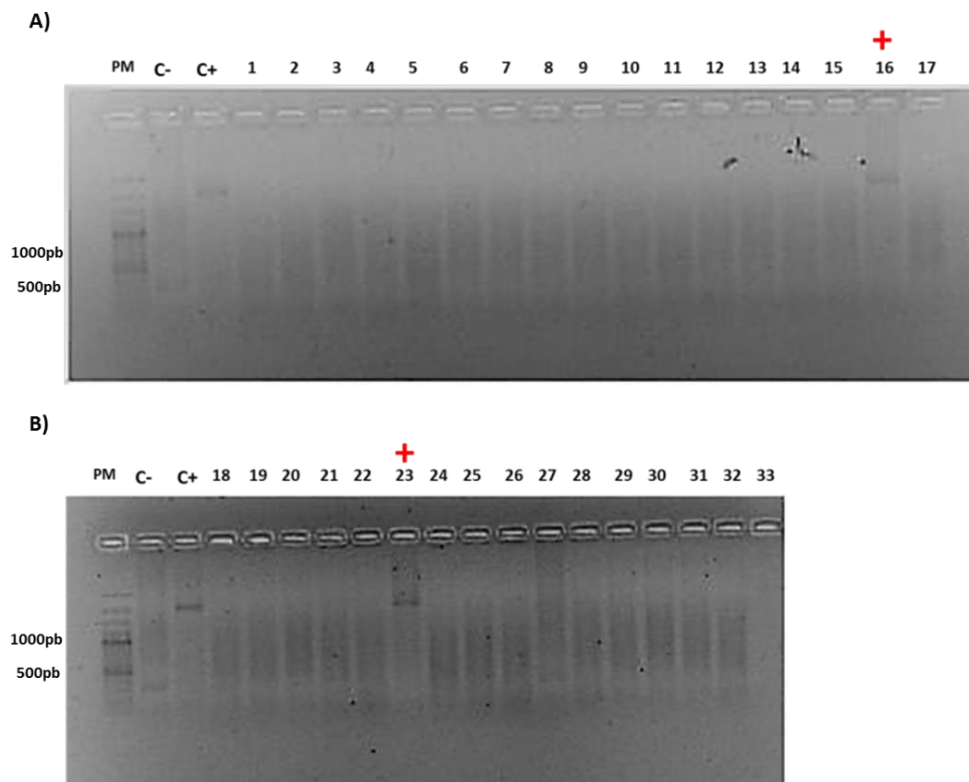


Figura 26. PCR de colônia com iniciadores de pUR5750. A) Transformação com o inserto *CBP-I-EF-AS4-CAT-B* e **B)** *CBP-I-14-3-3-AS3-CAT-B*. C-: controle negativo, banda de 300 pb. C+: controle positivo, banda de 1800 pb. +: clones positivos (aproximadamente 1800 pb). PM: peso molecular de 100 pb).

4.2.7 PCR confirmatória da clonagem no vetor pUR5750 com iniciadores do vetor pCR35, vetor pUR5750 e antisentido

Adicionalmente nova confirmação da etapa de clonagem em vetor pUR5750 foi realizada com o plasmídeo recombinante dos clones positivos confirmados por PCR de colônia. Estas PCRs foram realizadas com todos os oligonucleotídeos iniciadores utilizados até o momento (vetor pCR35, vetor pUR5750 e antisentidos) para confirmar que todos os elementos da construção genética proposta estão presentes nos plasmídeos obtidos (iniciadores, terminadores, antisentido) (Figura 27).

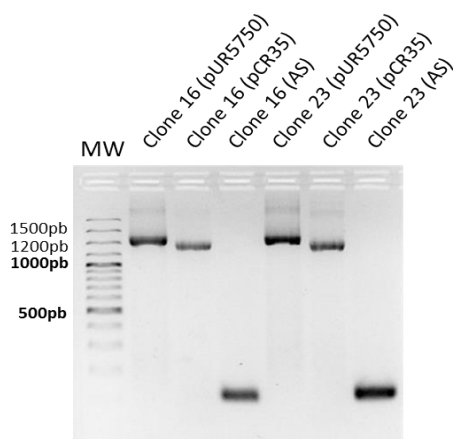


Figura 27. PCR confirmatória da clonagem em pUR5750. Clones 16 e 23 da transformação dos insertos *CBP-I-EF-Tu-CAT-B* e *CBP-I-14-3-3-CAT-B*, respectivamente, no plasmídeo pUR5750. MW: peso molecular de 100 pb. AS: PCR realizada com iniciadores dos antissentidos (banda de ± 100 pb), pUR5750: PCR realizada com iniciadores do vetor pUR5750 (banda de ± 1800 pb) e pCR35: PCR realizada com os iniciadores do vetor pCR35.

4.2.8 Restrição enzimática com *XhoI* e *AscI* confirmatória da clonagem no vetor pUR5750

Assim como realizado para a primeira clonagem, para a clonagem no vetor pUR5750 também realizamos a confirmação através de restrição com *XhoI* e *AscI* como descrito no item 3.4.9, sendo possível a visualização em gel de agarose das três bandas esperadas (Figura 28).

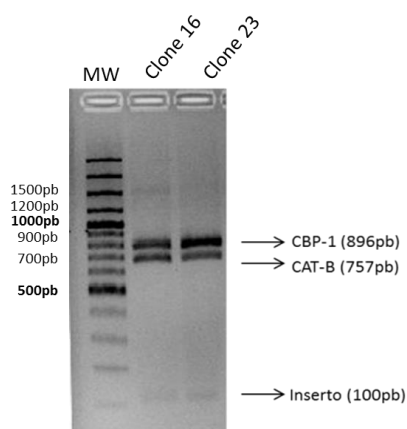


Figura 28. Restrição enzimática confirmatória com *XhoI* e *AscI* do DNA plasmidial obtido da clonagem no vetor pUR5750. Restrição dos clones da clonagem com os antissentidos EF-Tu-AS4 (clone 16), e 14-3-3-AS3 (clone 23). As setas apontam os fragmentos de tamanhos esperados: CBP-1 (promotor, 896 pb), CAT-B (terminador, 757 pb), inserto (± 100 pb). MW: peso molecular de 100 pb.

4.2.9 Estratégia utilizada para clonar os oligonucleotídeos antisentido nos vetores pCR35 e pUR5750

Na figura 29, temos um resumo de todas as etapas realizadas até o item anterior (4.2.8.), desde a obtenção dos oligonucleotídeos antisentidos (insertos), clonagens em vetor pCR35 e vetor pUR5750.

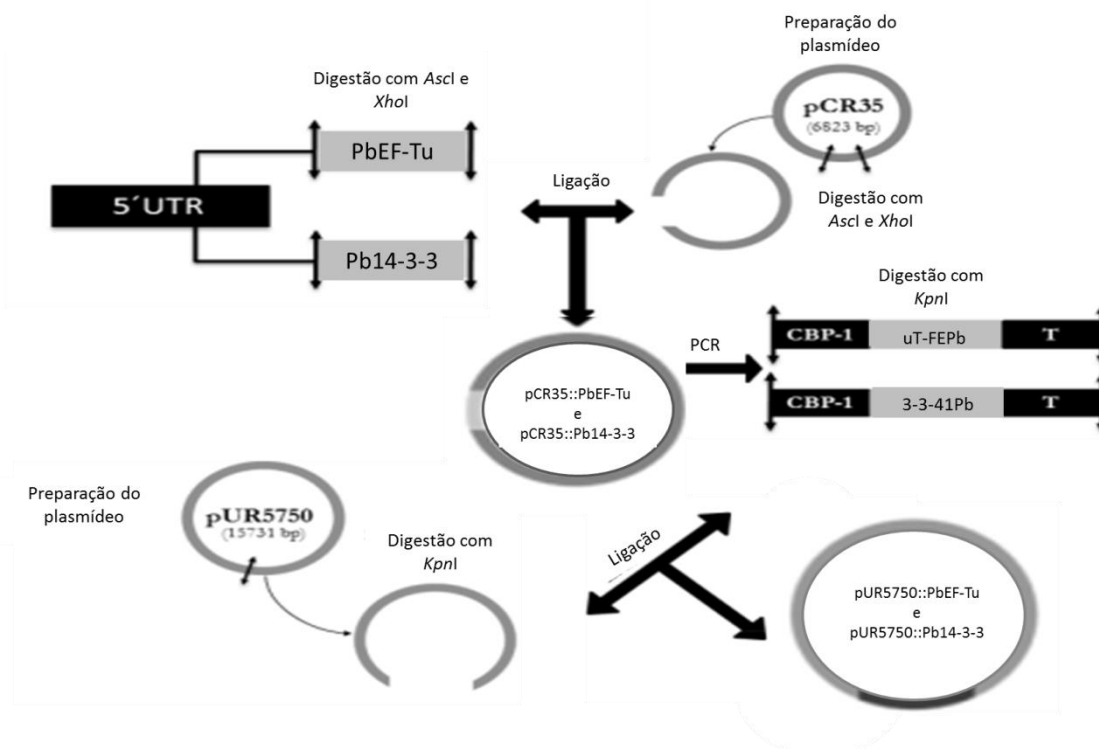


Figura 29. Esquema da estratégia utilizada para obtenção dos plasmídeos recombinantes contendo as moléculas antisentidos (Barros, 2010) com modificações.

4.2.10 Confirmação da transformação em *A. tumefaciens*

Após as confirmações da clonagem dos insertos de interesse no vetor pUR5750, estes plasmídeos recombinantes foram utilizadas para a transformação em *A. tumefaciens* através de eletroporação. Algumas colônias resistentes foram selecionadas e procedeu-se a extração do respectivo DNA plasmidial, e com este foram realizadas PCRs (Figura 30A) com os diferentes oligonucleotídeos iniciais para a confirmação da clonagem, incluindo agora oligonucleotídeos referentes ao gene *hph*, presente no vetor pUR5750, e que irá conferir resistência à higromicina em *P. brasiliensis* transformantes. As colônias recombinantes de *A. tumefaciens* foram utilizadas para a

transformação em *P. brasiliensis*. Na figura 30B temos a demonstração dos T-DNAs a serem transferidos do *A. tumefaciens* para *P. brasiliensis*.

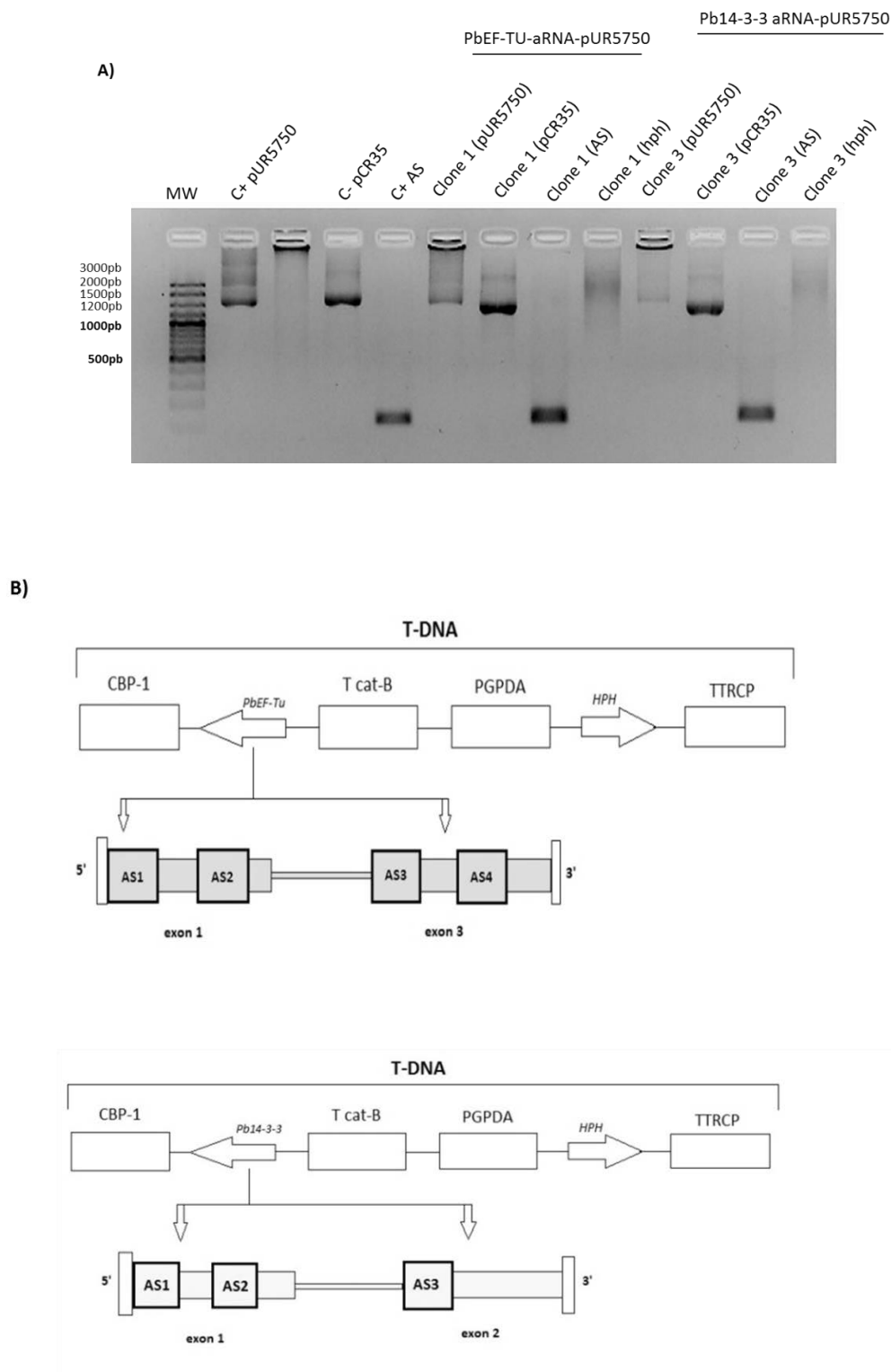


Figura 30. A) PCR confirmatória da transformação dos plasmídeos *PbEF-Tu-pUR5750* e *PbE14-3-3-pUR5750* em *A. tumefaciens*. C+: controles positivos, C-: controles negativos. MW: peso molecular de 100 pb. B) T-DNAs construídos para o silenciamento via RNA

antisense de PbEF-Tu e Pb14-3-3 em *P. brasiliensis* via ATMT. T-DNA contém o gene que confere resistência à higromicina (*HPH*) sob controle do promotor GPDA e terminador TTRCP; oligonucleotídeos antisentidos Pb14-3-3-aRNA e PbEF-Tu-aRNA sob controle do promotor CBP-1 e terminador cat-B.

4.2.11 Confirmação da transformação em *P. brasiliensis*

Após a transformação de *P. brasiliensis* com a *A. tumefaciens* foi realizada a seleção de colônias de *P. brasiliensis* resistentes à higromicina (colônias estas que levaram cerca de 20 dias para crescerem). Tais colônias foram submetidas a repiques sucessivos para o alcance da estabilidade mitótica (5 repiques, intervalos de sete dias). Após este período foi realizada a extração de DNA, e com este a confirmação inicial da transformação em *P. brasiliensis* através de reações de PCR com todos os oligonucleotídeos iniciadores utilizados até o momento. Foi possível constatar pela PCR que ambas as colônias de *P. brasiliensis* avaliadas foram de fungos transformantes, pela visualização de amplificação de bandas de tamanhos esperados para todos os iniciadores utilizados: iniciador pUR5750 (banda de \pm 1800 pb), iniciador pCR35 (banda de \pm 1800 pb), iniciador antisentido (banda de \pm 100 pb) e iniciador *hph* (banda de 900-1000 pb), o mesmo foi realizado com o DNA de *P. brasiliensis* WT (selvagem) que não apresentou amplificação para nenhum dos iniciadores utilizados, sendo aqui demonstrado apenas a PCR realizada com o iniciador *hph* e para PbEV (transformado com o vetor pUR5750 vazio) houve amplificação quando se utilizou o iniciador *hph* como esperado (Figura 31).

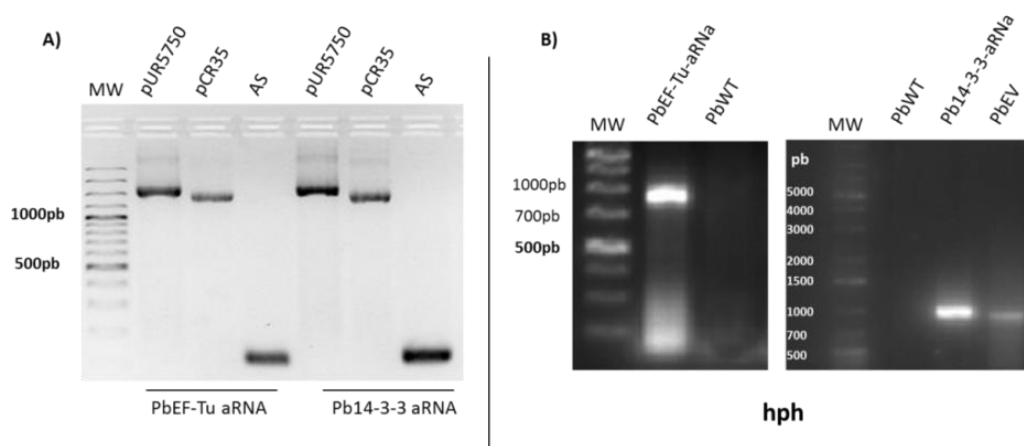


Figura 31. Confirmação da transformação em *P. brasiliensis*. A) PCR com iniciadores referentes à molécula AS (100-150 pb), iniciadores do vetor pCR35 (aproximadamente 1800 pb), primers do vetor pUR5750 (1800 pb) e B) PCR com iniciadores para *hph* (gene de resistência à higromicina) (900-1000 pb), utilizando-se DNA de PbEF-Tu-aRNA, Pb14-3-3-aRNA, PbWT e PbEV.

4.2.12 Representação da transformação de *P. brasiliensis* mediada por *A. tumefaciens*

Na figura 32 está resumida a agrotransformação realizada em *P. brasiliensis*.

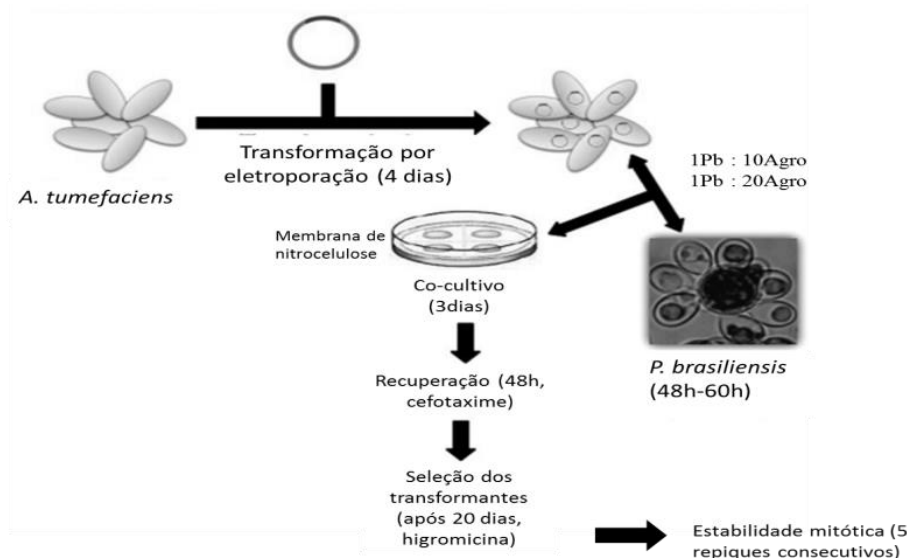


Figura 32. Representação da ATMT (agrotransformação) em células leveduriformes de *P. brasiliensis* (Barros, 2010).

4.2.13 Análise da expressão gênica dos isolados silenciados

Utilizando a metodologia de RNA antisentido com transformação mediada por *A. tumefaciens* foi possível a obtenção de isolados com baixa expressão dos genes de interesse deste estudo, PbEF-Tu e Pb14-3-3. Não foi possível a obtenção de diferentes mutantes que contemplassem todos os antisentidos propostos no estudo. Para cada gene foi possível obter um mutante com apenas uma das moléculas antisentido respectivas de cada gene. Para EF-Tu, molécula antisentido denominada de AS4, que contempla o *exon 3* deste gene, e para 14-3-3, molécula AS3 que contempla o *exon 2* deste gene. Portanto após a confirmação da integração do cassete contendo o gene *hph* (que confere resistência a higromicina), e toda a maquinaria genética construída, foi realizada a PCR em Tempo Real, para isto foram selecionadas colônias mitoticamente estáveis, condição esta observada após vários repiques em meio BHI contendo higromicina. Obtivemos uma redução na expressão de Pb14-3-3 de 55 % (Figura 33A), e para PbEF-Tu 55,5 % (Figura 33B). A redução no número de transcritos de ambos os genes foi reavaliada após o período de um ano, após subcultivos de Pb14-3-3-aRNA e PbEF-Tu-aRNA para averiguar se a redução se manteve durante o desenvolvimentos de todos os testes, sendo

possível confirmar que os silenciamentos se mantiveram estáveis após este período (Figura 33A e 33B).

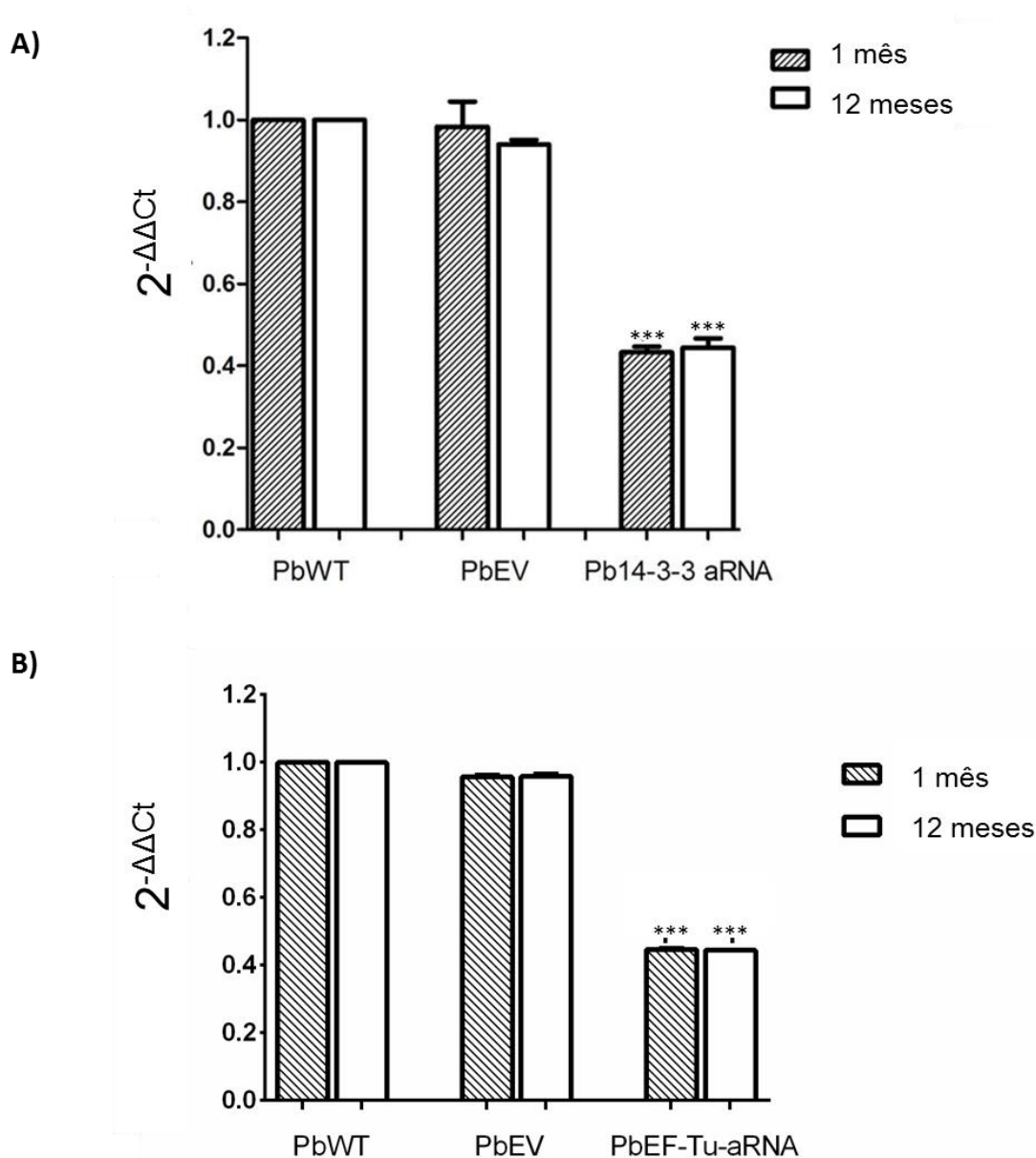


Figura 33. Expressão relativa de Pb14-3-3 e PbEF-Tu. **A)** Nível de expressão gênica de Pb14-3-3 em PbWT, PbEV e Pb14-3-3-aRNA após um mês da transformação e após 12 meses de subcultivos, sendo possível observar redução da expressão gênica de Pb14-3-3 no isolado silenciado Pb14-3-3-aRNA para ambos os períodos avaliados. **B)** Nível de expressão gênica de PbEF-Tu em PbWT, PbEV e PbEF-Tu-aRNA após um mês da transformação e após 12 meses de subcultivos, sendo possível observar redução da expressão gênica de PbEF-Tu no isolado silenciado PbEF-Tu-aRNA para ambos os períodos avaliados. Controle da expressão gênica endógena foi realizado com o gene da β -tubulina2. *** $p < 0.0001$ quando comparado com PbWT e PbEV.

4.2.14 Immunoblotting

Antes de analisar o papel da proteína Pb14-3-3 na interação patógeno-hospedeiro, foi realizada a confirmação de que a diminuição da expressão gênica de Pb14-3-3 levou a uma redução na tradução da respectiva proteína. Portanto foi realizada a extração de proteínas de PbWT e Pb14-3-3-aRNA, seguida de SDS-PAGE em condições redutoras (Figura 34A) e *immunoblotting* com anticorpos policlonal (Figura 34B) e monoclonal anti-Pb14-3-3 (Figura 34C) o qual reconheceram a proteína 14-3-3 presente nos extratos proteicos fúngicos. Foi possível verificar visualmente sensível redução na produção da respectiva proteína, concluindo que a redução da expressão gênica de 14-3-3 resultou em alterações no nível de tradução à mesma.

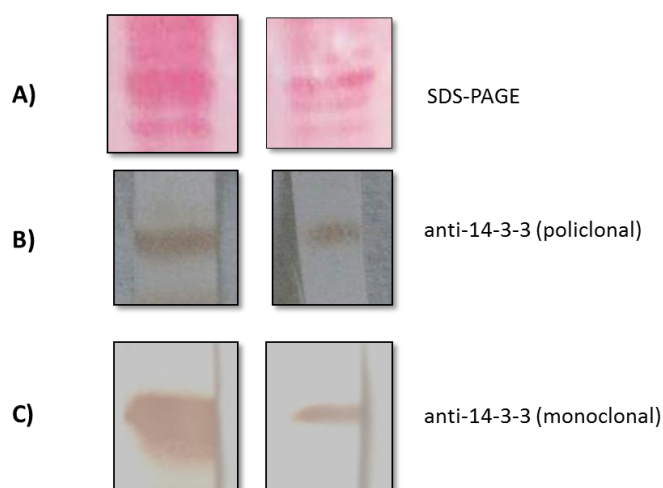


Figura 34. Immunoblotting. A) *Blot* das proteínas totais de PbWT e Pb14-3-3-aRNA, membranas coradas com Ponceau S (Sigma); B) e C) *Immunoblotting* de proteínas totais de PbWT e Pb14-3-3-aRNA com anticorpos anti-Pb14-3-3 policlonal e monoclonal respectivamente.

4.2.15 Viabilidade e crescimento dos isolados silenciados

A diminuição da expressão de Pb14-3-3 e PbEF-Tu não alteraram o crescimento celular e a viabilidade de *P. brasiliensis*. Para o crescimento celular avaliado pela medida da turbidimetria do meio de cultivo ao longo de 120 h, não foram detectadas diferenças significativas entre os isolados PbWT, PbEV e Pb14-3-3-aRNA (Figura 35A) e entre PbWT, PbEV e PbEF-Tu-aRNA (Figura 36A). Para a viabilidade avaliada pelo ensaio de redução do sal XTT (que leva a formação de produto com coloração, medida) em diferentes tempos de cultivo foi possível constatar que não houve diferenças na

viabilidade ao longo dos experimentos comparando-se PbWT, PbEV e Pb14-3-3-aRNA (Figura 35B) e PbWT, PbEV e PbEF-Tu-aRNA (Figura 36B). Portanto a diminuição da expressão de ambos os genes, Pb14-3-3 e PbEF-Tu, não afetaram aspectos biológicos importantes, tais como processos celulares como o metabolismo mitocondrial e crescimento celular, para a fase parasitária de *P. brasiliensis in vitro*.

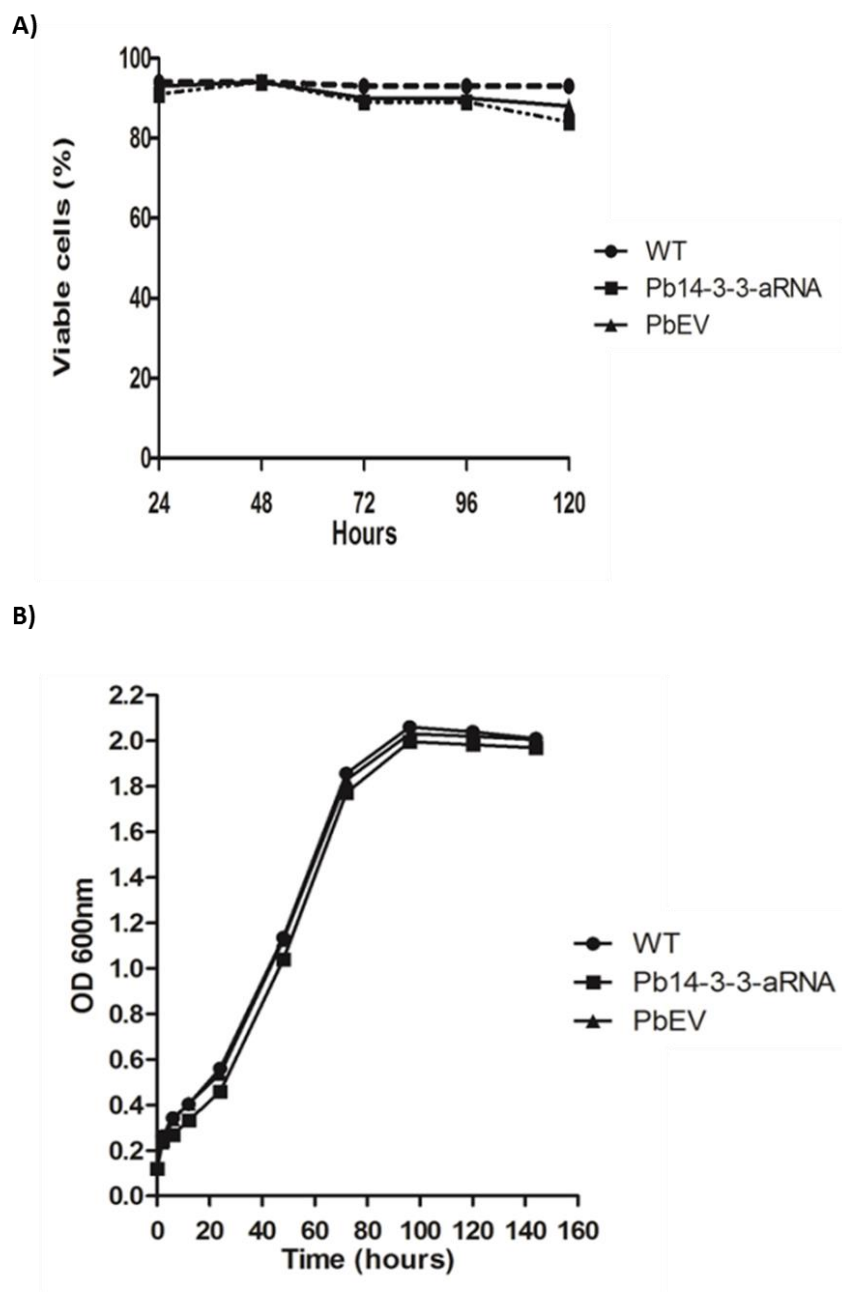


Figura 35. Silenciamento de Pb14-3-3 não altera o crescimento celular e viabilidade de *P. brasiliensis*. PbWT, PbEV e Pb14-3-3-aRNA foram avaliados por (A) ensaio colorimétrico de redução de XTT em diferentes tempos e (B) turbidimetria do cultivo determinada na densidade óptica de 600 nm em diferentes tempos.

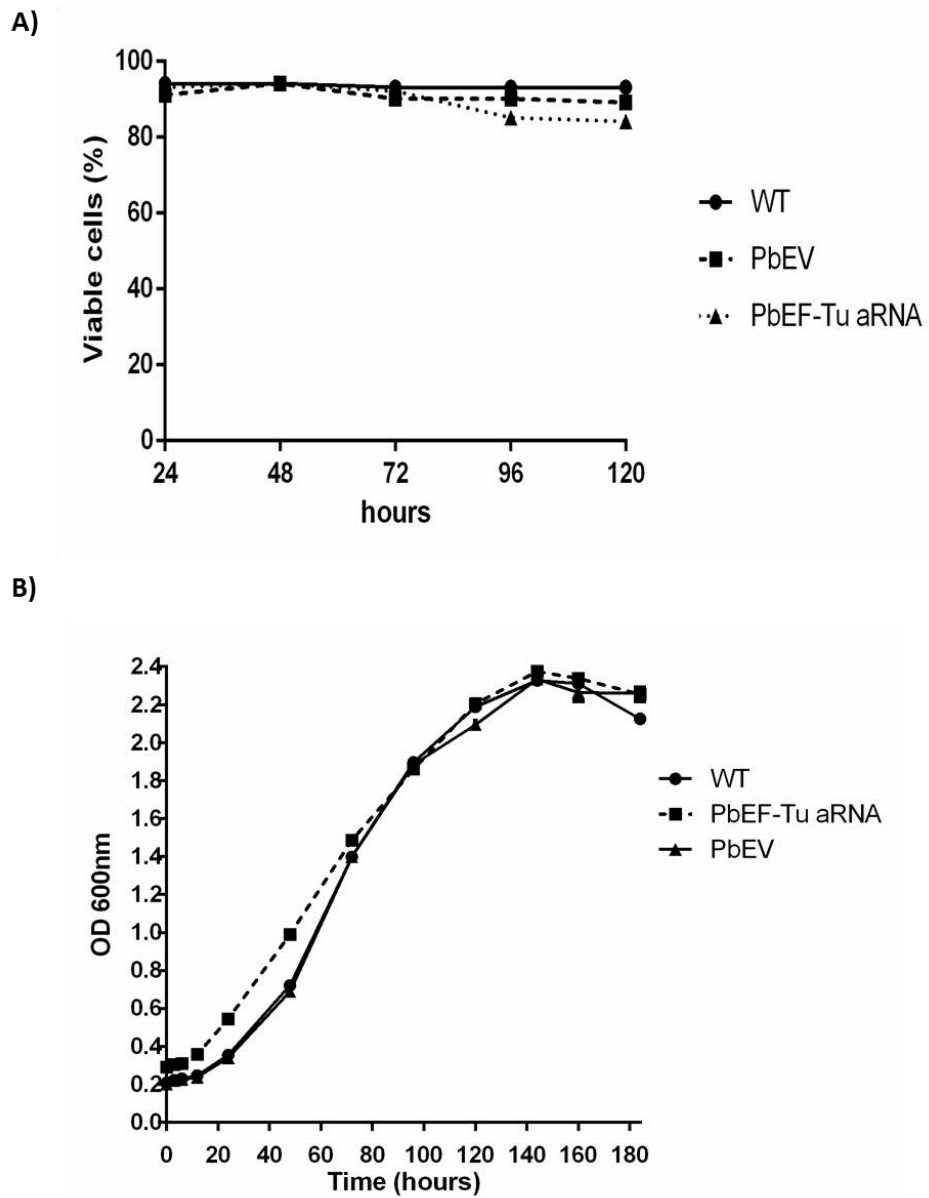


Figura 36. Silenciamento de PbEF-Tu não altera o crescimento celular ou viabilidade de *P. brasiliensis*. PbWT, PbEV e PbEF-Tu-aRNA foram avaliados por (A) ensaio colorimétrico de redução de XTT em diferentes tempos e (B) turbidimetria do cultivo determinada na densidade óptica de 600 nm em diferentes tempos.

4.2.16 Morfologia

Nenhuma alteração morfológica foi observada para as células leveduriformes de PbEF-Tu-aRNA quando comparadas com PbWT ou PbEV, todas apresentaram-se na forma de leveduras com múltiplos brotamentos (Figura 37), demonstrando que a proteína PbEF-Tu não possui envolvimento na manutenção da forma leveduriforme.

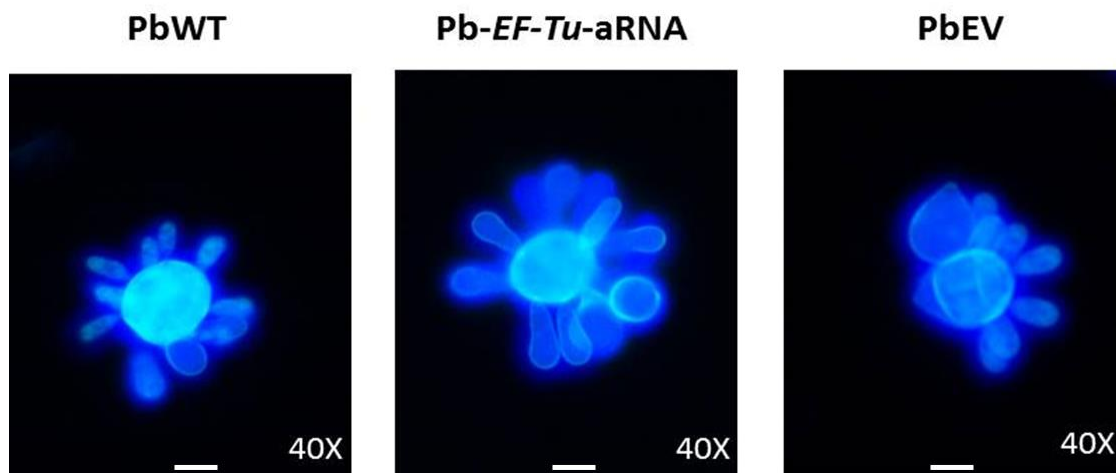


Figura 37. Silenciamento de PbEF-Tu não ocasiona alterações morfológicas em células leveduriformes de *P. brasiliensis*. Microscopia de fluorescência (Calcofluor) de células leveduriformes de PbWT, PbEV e PbEF-Tu-aRNA; aumento de 40 X. As barras brancas correspondem a 5 μ m.

Interessantemente, observações microscópicas indicaram células leveduriformes de Pb14-3-3-aRNA mais alongadas, menores e com presença de filamentação no crescimento a 37°C quando comparadas com PbWT e PbEV (Figura 38) sugerindo que a proteína Pb14-3-3 esteja envolvida na manutenção da forma celular de *P. brasiliensis* durante o seu crescimento.

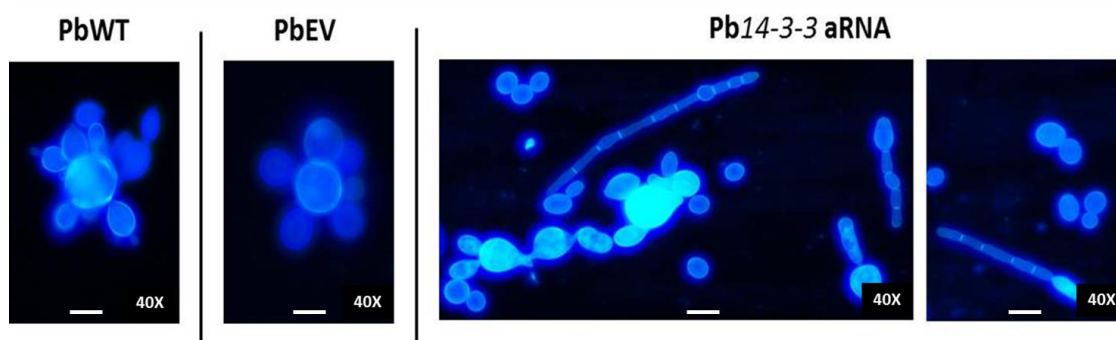


Figura 38. Silenciamento de Pb14-3-3 leva a alterações morfológicas em células leveduriformes de *P. brasiliensis*. Microscopia de fluorescência de células leveduriformes de PbWT, PbEV e Pb14-3-3-aRNA; aumento de 40 X. As barras brancas correspondem a 5 μ m.

Estudos para *P. brasiliensis* demonstram que este fungo necessita da habilidade, conhecida como termodimorfismo, para o processo de adesão e estabelecimento da infecção no hospedeiro (Böhmer *et al.*, 2007). Alterações morfológicas em fungos dimórficos são eventos altamente complexos desencadeados por inúmeros fatores ambientais e consiste em uma mudança reversível no padrão de crescimento sendo

alternados os crescimentos na forma leveduriforme unicelular e forma filamentosa (hifas ou pseudohifas) (Hurtado and Rachubinski, 2002).

Entender os mecanismos que regulam esses eventos é de extrema importância devido às implicações na diferenciação celular e patogênese, como o que pode ser observado na inibição da transição para a forma parasitária causada pelo estrógeno, hormônio feminino (Aristizabal *et al.*, 1998).

As proteínas Bmh1p e Bmh2p de *Saccharomyces cerevisiae* são homólogas à proteína 14-3-3 e regulam o crescimento de pseudohifas através da cascata da via MAPK (proteína quinase ativada por mitógeno), esta interação em *S. cerevisiae* tem sido relacionada com a regulação da morfogênese fúngica (Roberts *et al.*, 1997). Kraus *et al.* (2002) demonstraram que a proteína ArtA de *Aspergillus nidulans*, o qual possui alta homologia com a proteína 14-3-3 está envolvida na prevenção da formação de septo, adicionalmente foi demonstrado que a proteína 14-3-3 está envolvida na filamentação de outros fungos como *Candida albicans* e *Yarrowia lipolytica* (Palmer *et al.*, 2004). Nestes microrganismos o crescimento filamentoso é proporcional ao nível de expressão da proteína 14-3-3 (Hurtado and Rachubinski, 2002).

A evidência apresentada neste estudo demonstrou que a redução da expressão de Pb14-3-3 induziu alterações morfológicas em *P. brasiliensis*, sugerindo que esta proteína tenha um importante papel na manutenção da forma leveduriforme de *P. brasiliensis*, contribuindo para a sua virulência, possivelmente devido à mudanças na composição do polissacarídeo prevalente na parede do fungo e também devido à diminuição do tamanho das células leveduriformes. Entretanto os mecanismos específicos de como essa diminuição da expressão de Pb14-3-3 resultaram em alterações morfológicas não foram elucidados neste estudo, sendo necessárias futuras investigações para identificar os mecanismos moleculares envolvidos nesta alteração.

4.2.17 Ensaio de afinidade de ligação à matriz extracelular

A influência de Pb14-3-3 na ligação à MEC foi avaliada por ELISA. Os resultados demonstraram que Pb14-3-3-aRNA teve redução significativa na capacidade de se ligar principalmente à laminina (28 %) e fibronectina (14 %) quando comparados ao controle PbWT (Figura 39).

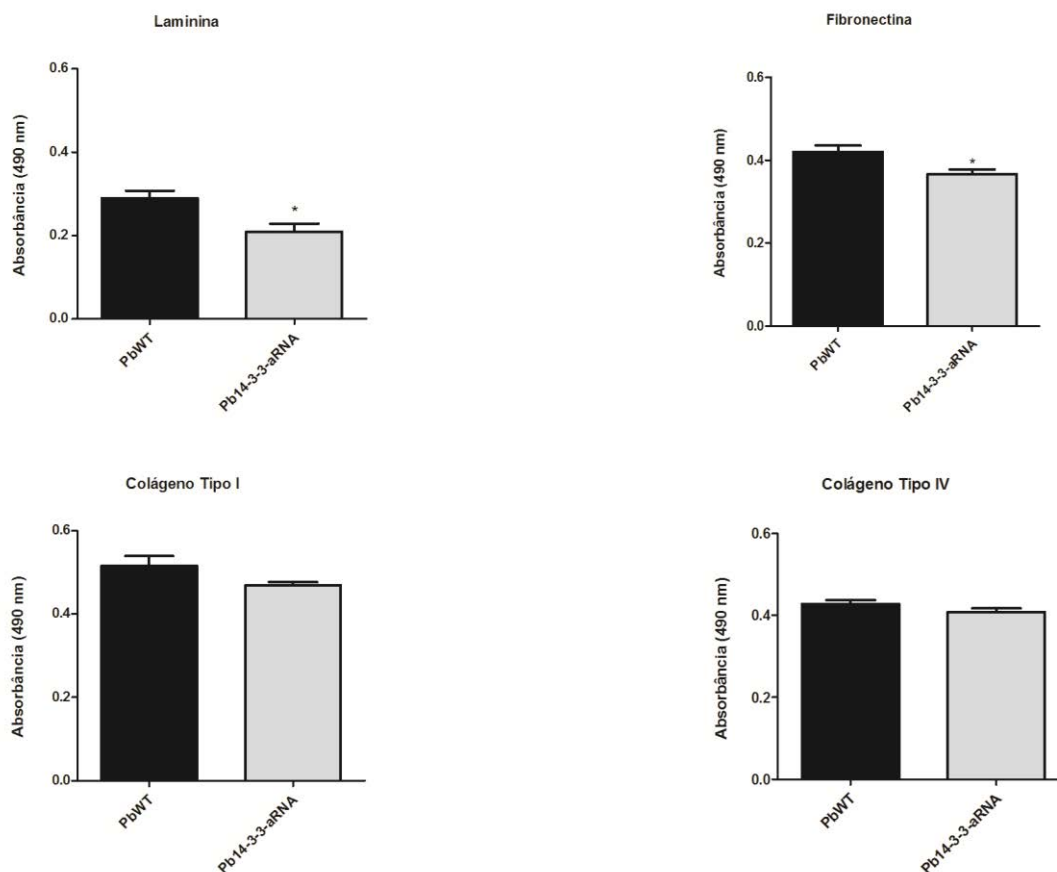


Figura 39. Ligação de Pb14-3-3-aRNA à componentes da matriz extracelular é reduzida quando comparada ao isolado PbWT. Ligação de células leveduriformes dos isolados PbWT e Pb14-3-3 aRNA aos componentes da matriz extracelular: laminina, fibronectina, colágenos tipo I e IV ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$). A interação foi realizada através de ELISA. * $p < 0,05$ quando comparado PbWT e Pb14-3-3-aRNA para laminina e fibronectina.

A matriz extracelular é composta de uma grande variedade de proteínas e polissacarídeos que são secretados localmente e formam uma rede complexa e organizada de macromoléculas. A MEC fornece a armação física necessária para a estabilização das estruturas de tecidos modulando o comportamento celular. A matriz permanece em estreita associação com a superfície das células que a produz (Jong *et al.*, 2008). As principais classes de macromoléculas presentes na MEC são de cadeias polissacarídicas a partir de glicosaminoglicanas normalmente encontradas ligadas à proteínas que formam proteoglicanas, proteínas fibrosas que desempenham papel estrutural (exemplo: colágenos), e de proteínas adesivas (exemplo: fibronectina e laminina) (Verstrepen and Klis, 2006).

Muitos eventos de interações moleculares que ocorrem entre o hospedeiro e fungos patogênicos com posterior estabelecimento da infecção são mediados por proteínas de adesão da superfície fúngica (adesinas) que são capazes de se ligar à MEC

da célula hospedeira (Lengeler *et al.*, 2000). Mendes-Giannini *et al.* (2006) observaram relação entre virulência e adesão à MEC ao comparar vários isolados de *P. brasiliensis* que apresentavam diferentes graus de virulência *in vivo*; os autores demonstraram que o isolado 18 de *P. brasiliensis* recém isolado de infecção em camundongo apresentou maior capacidade em aderir aos componentes da MEC.

Confirmando os resultados de Andreotti *et al.* (2005), foi possível demonstrar que a diminuição da expressão de Pb14-3-3 resultou na redução da capacidade de ligação principalmente à laminina; esta interação foi avaliada por ELISA, o qual possui maior sensibilidade e especificidade que o *Immunoblotting* realizado do estudo anteriormente citado. Além disso, também houve diminuição na capacidade de ligação à fibronectina, sugerindo, portanto que a proteína Pb14-3-3 possa estar envolvida na virulência de *P. brasiliensis* mediante a interação com componentes da MEC. Esta interação representa um passo crítico no processo de adesão e invasão dos tecidos do hospedeiro.

4.2.18 Adesão dos isolados silenciados à pneumócitos

Para elucidar o papel de Pb14-3-3 e PbEF-Tu na adesão de *P. brasiliensis* à células do hospedeiro, foi realizada a infecção de pneumócitos A549 com os diferentes isolados, PbWT, PbEV, Pb14-3-3-aRNA e PbEF-Tu-aRNA, comparando-se o índice de adesão dos mutantes com PbWT.

Para o silenciamento de Pb14-3-3 no tempo de 2h de infecção a adesão foi significativamente reduzida (± 90 %), o que também pode ser observado para o tempo de 5 h ($\pm 49,7$ %); entretanto nos tempos posteriores avaliados o índice de adesão de Pb14-3-3-aRNA foi similar a PbWT (Figura 40). Para o silenciamento de PbEF-Tu houve redução significativa na adesão a partir do tempo de 8 h ($\pm 92,74$ %) e para 24 h de infecção ($\pm 91,6$ %) (Figura 41).

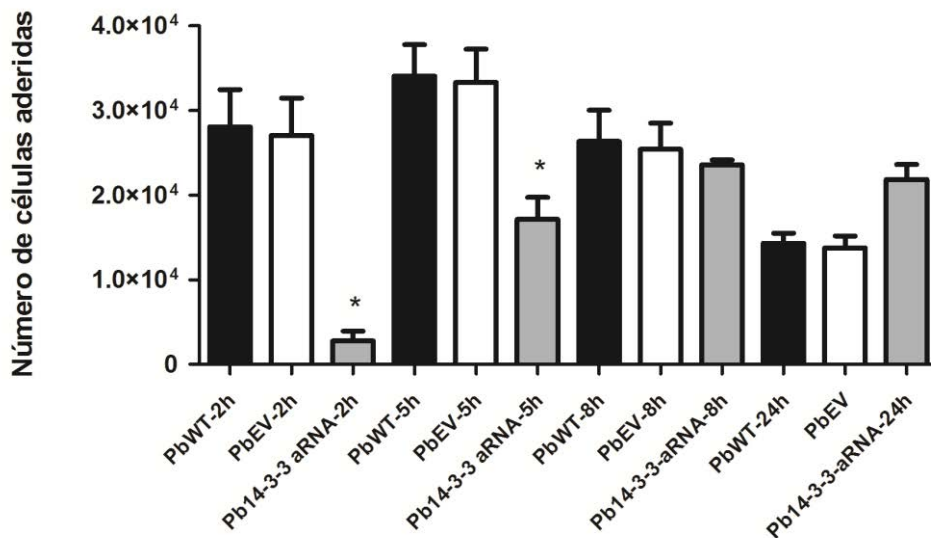


Figura 40. Interação de células leveduriformes de *Pb14-3-3*-aRNA com pneumócitos é principalmente afetada em tempos iniciais de infecção. A adesão foi analisada por citometria de fluxo em diferentes tempos. * $p < 0.05$ quando comparado PbWT e PbEV com Pb14-3-3-aRNA para os tempos de 2 h e 5 h de infecção.

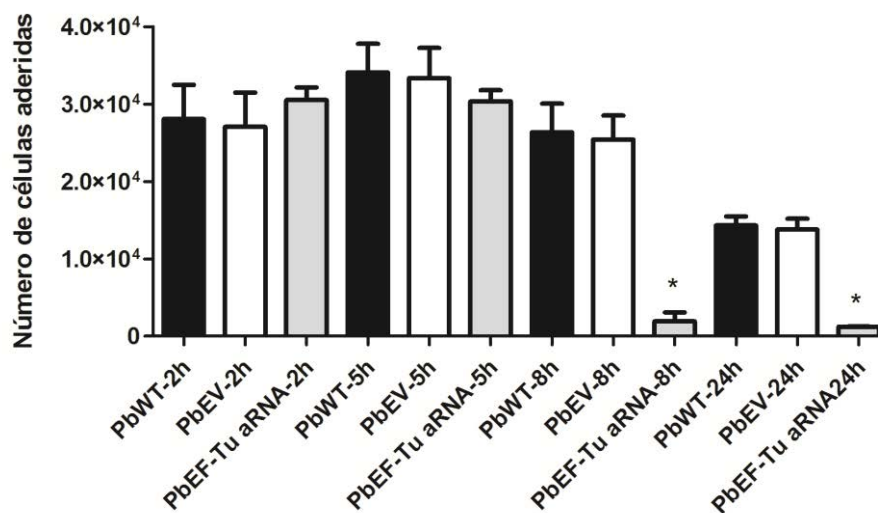


Figura 41. Interação de células leveduriformes de *PbEF-Tu*-aRNA com pneumócitos é afetada a partir de 8h e se mantém em tempo posterior de infecção. A adesão foi avaliada

por citometria de fluxo em diferentes tempos. * $p < 0.05$ quando comparado PbWT e PbEV com PbEF-Tu-aRNA para os tempos 8 h e 24 h de infecção.

A habilidade dos patógenos em colonizar seus hospedeiros é altamente dependente de mecanismos que possuem para romper as barreiras físicas e imunológicas. A fim de evitar a rápida remoção do organismo, os patógenos agem rapidamente e de maneira eficaz na adesão às células hospedeiras. A adesão é um pré-requisito universal entre os patógenos para acionar de forma eficiente seu repertório de fatores de virulência que exercerão efeitos sobre as células hospedeiras (Krachler and Orth, 2013).

P. brasiliensis é considerado um patógeno intracelular facultativo, que pode aderir e invadir células epiteliais *in vivo* e *in vitro*. A habilidade deste fungo em aderir e invadir é dependente da virulência do isolado (Hanna *et al.*, 2000). *P. brasiliensis* utiliza uma sequência de mecanismos para estabelecer com sucesso a infecção, iniciando primeiramente com o contato com as células hospedeiras estendendo-se até os estágios posteriores da doença (Franco, 1987; André *et al.*, 2004; Kurokawa *et al.*, 2005). A capacidade de interação entre células depende de forma ordenada de múltiplas interações adesivas entre as células adjacentes e o seu ambiente extracelular, e é mediada por molécula de adesão celular (Trojanovsky, 1999; Miyoshi and Takai, 2008; Trojanovsky, 2009). A adesão de patógenos requer o reconhecimento de carboidratos ou proteínas de superfície da célula hospedeira ou matriz extracelular (Patti and Höök, 1994; Latgé, 2010; Frases *et al.*, 2011).

A redução na adesão em tempos iniciais observado neste estudo sugere que a proteína Pb14-3-3 tem grande importância na adesão inicial de *P. brasiliensis*, mas que a sua requisição foi contornada após o contato prolongado com a célula hospedeira. Em conjunto, esses dados sugerem que a adesão primária de *P. brasiliensis* à pneumócitos é dependente de uma combinação de fatores, incluindo sinalização de GTPases e expressão de outras adesinas, e que defeitos induzidos pela baixa expressão de um único gene são compensados no contato prolongado. O baixo índice de adesão também pode ser explicado pela diminuição da capacidade de interagir com alguns componentes da matriz extracelular como laminina, fibronectina, como demonstrado no ítem 4.2.17.

Em *Lactobacillus johnsonii* a proteína EF-Tu media a interação às mucinas e células epiteliais humanas (Granato *et al.*, 2004) sendo considerada uma adesina-like, bem como apresenta capacidade de se ligar à diferentes componentes da matriz extracelular (como descrito no ítem 4.2.7), portanto uma redução no índice de adesão do isolado PbEF-Tu-aRNA com redução da expressão de PbEF-Tu pode estar correlacionado com o fato desta proteína interagir com as células do hospedeiro, através da matriz extracelular, sendo portanto importante para a etapa inicial de estabelecimento da infecção, assim como ocorre em diferentes patógenos, como por exemplo para a mesma proteína em *Mycobacterium avium* de maneira dependente de fibronectina (Viale *et al.*, 2014). Os resultados do ensaio de adesão à pneumócitos com o isolado

silenciado, PbEF-Tu-aRNA corroboram com os dados encontrados no ensaio de inibição da adesão realizando-se o tratamento do fungo com o anticorpo anti-PbEF-Tu, no qual também se observou redução da adesão para os tempos de 8 h e 24 h de infecção.

4.2.19 Indução de apoptose dos isolados Pb14-3-3-aRNA e PbEF-Tu-aRNA

Para determinar se a baixa expressão dos genes PbEF-Tu e Pb14-3-3 altera a capacidade do fungo em induzir a fase inicial de apoptose em pneumócitos, a detecção de fragmentação do DNA foi avaliada pela técnica de TUNEL após infecção à pneumócitos com os isolados Pb14-3-3-aRNA e PbEF-Tu-aRNA pelos períodos de 5 e 24h de infecção. Em tempo inicial de infecção, 5h, foi possível constatar uma diminuição de 22,5% na intensidade nuclear (DNA fragmentado) de pneumócitos infectados com Pb14-3-3-aRNA quando comparado à infecção com PbWT, e em relação à pneumócitos não infectados os valores não apresentaram diferença significativa (Figura 42). E para o tempo de 24h de infecção pneumócitos infectados com Pb14-3-3-aRNA apresentaram redução de 26,9% da intensidade nuclear e para aqueles infectados com PbEF-Tu apresentaram redução de 30,9% da intensidade nuclear quando comparados com a infecção com PbWT (Figura 42). Sugerindo que as proteínas PbEF-Tu e Pb14-3-3 participem do processo de indução da fase inicial de apoptose desencadeada durante a patogênese de *P. brasiliensis*.

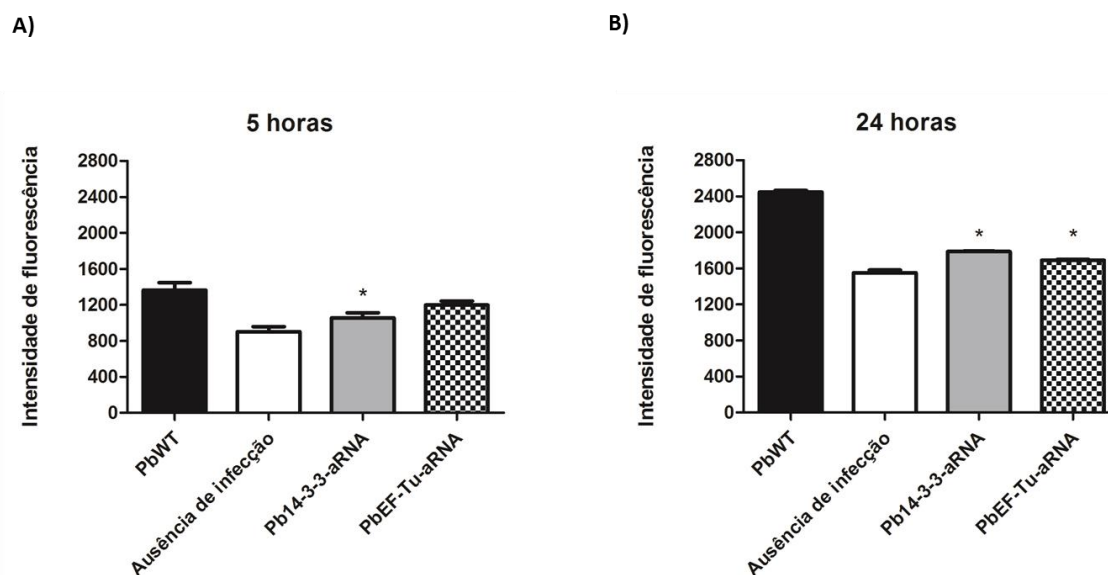


Figura 42. Indução da fase inicial de apoptose de pneumócitos infectados com PbEF-Tu-aRNA e Pb14-3-3-aRNA pela técnica de TUNEL. A) Pneumócitos infectados com os diferentes isolados de *P. brasiliensis* e não infectados pelo período de 5h; B) Pneumócitos infectados com os diferentes isolados de *P. brasiliensis* e não infectados pelo período de 24h; a

intensidade de fluorescência nuclear indica a presença de DNA fragmentado e portanto fase inicial de apoptose. *: $p < 0,05$;

A apoptose é um processo fisiológico altamente regulado de morte celular necessário para o desenvolvimento e homeostase de organismos multicelulares, eliminando células individualmente sem a indução de resposta inflamatória. A ativação ou prevenção da apoptose pode ser um passo crítico na evolução de processos infecciosos. O processo de apoptose é caracterizado por alterações típicas que incluem: alteração da simetria da membrana plasmática, condensação da cromatina, fragmentação nuclear, clivagem do DNA, desintegração celular e formação de corpos apoptóticos (Strasser *et al.*, 2011).

A morte celular programada tem sido observada como resposta a uma grande variedade de infecções e pode ser mediada por uma variedade de determinantes de virulência codificados pelos patógenos. A modulação induzida por patógenos de vias responsáveis pela morte celular no hospedeiro favorecem a eliminação de células do sistema imune ou evasão da resposta de defesa do hospedeiro que atuam na tentativa de eliminação da infecção (Weinrauch and Zychlinsky, 1999).

Crescentes evidências apontam para o fato de que a apoptose desempenha um papel importante na modulação da patogênese em uma grande variedade de doenças infecciosas (Gao and Kwaik, 2000). Uma das consequências da invasão por patógenos intracelulares é a apoptose, o qual pode ser observada em fagócitos profissionais e não-profissionais (Zychlinsky and Sansonetti, 1997).

Mendes-Giannini *et al.*, (2004a) demonstraram que *P. brasiliensis* possui a capacidade de invadir células de mamíferos e manipular tal ambiente a fim de favorecer o seu crescimento e sobrevivência. A sobrevivência de *P. brasiliensis* no ambiente intracelular serve como um mecanismo contra a resposta imune e ações antimicrobianas uma vez que fagócitos não-profissionais, como pneumócitos, não possuem maquinaria microbicida eficiente como os macrófagos. Entretanto é especulado que a modulação da apoptose seja uma vantagem para o fungo, pois a morte celular de células infectadas com *P. brasiliensis* poderia fornecer um meio para a disseminação fúngica, além disso células em apoptose contendo fungos internalizados poderiam servir como veículo para a entrada em macrófagos sem a estimulação desencadeada por agentes microbicidas. Através da indução de apoptose de macrófagos, o microrganismo pode se evadir da morte que poderia ser ocasionada pela maquinaria antimicrobiana dos fagócitos (Bayles *et al.*, 1998; Lewis, 2000).

Um grande número de patógenos pode causar a morte celular através da indução de apoptose (Moss *et al.*, 1999). Em *Staphylococcus aureus* foi demonstrado que a invasão de células endoteliais causa indução da apoptose e isto ocorre somente quando esta bactéria expressa um componente denominado alfa-toxina, o qual é o maior participante do processo de indução de apoptose, demonstrando que tal processo é

dependente de fatores de virulência (Haslinger-Löffler *et al.*, 2005). Outro exemplo é a *Yersinia sp.* que expressa em sua superfície a proteína *inv* responsável pela adesão e internalização desta bactéria ao epitélio do intestino, e quando esta proteína é expressa ocorre a indução de apoptose (Superti *et al.*, 2005). No fungo patogênico *Histoplasma capsulatum*, patógeno obrigatoriamente intracelular, a apoptose é um elemento crítico na resposta imune, promovendo aumento dos níveis de IL-4 e IL-10 quando a apoptose é inibida, entretanto o aumento da liberação de citocinas é diretamente proporcional à severidade da doença (Allen and Deepe, 2005). Em *Candida albicans* também foi demonstrado que este fungo induz a apoptose como mecanismo de evasão da resposta imune (Panagio *et al.*, 2002; Ganesan *et al.*, 2014).

A habilidade do patógeno em induzir apoptose em fagócitos pode ser um importante fator de virulência, uma vez que reduz os mecanismos de defesa do hospedeiro. *P. brasiliensis* e outros fungos podem induzir a apoptose de fagócitos para adquirir vantagens, permitindo a sua sobrevivência intracelular em células epiteliais. Campanelli *et al.* (2003) demonstraram que a apoptose mediada por Fas-FasL e o envolvimento de CTLA-4 estão envolvidos na modulação da resposta imune em pacientes infectados com PCM. Estudos anteriores investigaram a indução de apoptose em células infectadas com *P. brasiliensis*, Souto *et al.*, (2003) demonstrou em modelo experimental de paracoccidioidomicose um aumento considerável de apoptose no sítio da infecção.

A morte celular programada é regulada por sinais extracelulares, os quais podem ativar ou inibir a apoptose. Há dois mecanismos distintos que iniciam a apoptose: 1) via extrínseca, que envolve receptores de morte da superfície celular e seus ligantes, e 2) via intrínseca mitocondrial, a qual é primariamente controlada por proteínas pró e anti-apoptóticas da família Bcl-2; ambas as vias ativam caspases (Perskvist *et al.*, 2002). Bcl-2, Bcl XL e Bcl-1 exibem funções anti-apoptóticas, enquanto que Bax, Bak, Bim e BclXS promovem a apoptose. O balanço entre estes dois grupos determinam o destino das células em muitos sistemas. Em mamíferos a apoptose pode ser ativada por caspases, os quais clivam substratos específicos e disparam a morte celular. Essas moléculas sinalizadoras regulam o nível e a atividade dos membros da família Bcl-2 (Adams and Cory, 1998).

Há um consenso de que subcultivos sucessivos de *P. brasiliensis* levam a diminuição da patogenicidade do isolado que pode ser recuperada através do reisolamento do fungo após passagem em animal ou células epiteliais *in vitro* (Brummer *et al.*, 1990; Andreotti *et al.*, 2005). Del Vecchio *et al.*, (2009) compararam a habilidade de isolado recém-isolado de infecção em animal e isolado atenuado em aderir à células A549 e induzir apoptose, e concluíram que o isolado recém recuperado de passagem por animal, e portanto mais virulento, apresentou maior capacidade de adesão, e que a indução de apoptose relaciona-se com o isolado utilizado e a duração da infecção. Em tempos iniciais de infecção, 5h, há poucas células apoptóticas e com 24 e 48h ocorre um aumento da apoptose. Em tempos iniciais de infecção a expressão de Bcl-2 e Bak não apresenta diferenças significativas, sugerindo um mecanismo competitivo que favorece

a persistência da infecção, e em tempos posteriores, 24 e 48 h há um aumento da expressão de Bak, que resultam em maior índice de apoptose, favorecendo a disseminação de *P. brasiliensis* (Del Vecchio *et al.*, 2009). Ainda em *P. brasiliensis* foi demonstrado que em neutrófilos, o fungo é capaz de inibir a apoptose destas células *in vitro*, prolongando o tempo de vida das células hospedeira, mantendo o ambiente propício para a sua sobrevivência e replicação (Acorci *et al.*, 2009), o que nos leva a crer que a indução ou não da apoptose pode variar de acordo com o tipo celular com o qual *P. brasiliensis* está interagindo.

Os mecanismos que fazem com que *P. brasiliensis* invada células hospedeiras, sua persistência neste ambiente e subsequente indução de apoptose podem juntos explicar a sua habilidade em disseminar pelo hospedeiro. Com os resultados apresentados aqui sugerimos que a proteína Pb14-3-3 e PbEF-Tu atuam alterando o programa apoptótico da célula hospedeira promovendo a apoptose destas durante a infecção por *P. brasiliensis*, e portanto atuam como fatores importantes para a virulência, favorecendo a sobrevivência e disseminação fúngica. Porém estudos futuros devem ser realizados para averiguar os mecanismos exatos pelo qual estas proteínas atuariam na modulação da apoptose.

4.2.20 Virulência dos isolados Pb14-3-3-aRNA e PbEF-Tu-aRNA

A importância das proteínas deste estudo, Pb14-3-3 e PbEF-Tu na interação patógeno-hospedeiro foi avaliada utilizando-se como modelo de infecção *G. mellonella*. Larvas infectadas *P. brasiliensis* controle (PbWT) começaram a morrer a partir do 3º dia de experimento, e completados 5 dias de experimentos todas as larvas infectadas com este isolado já estavam mortas.

Larvas infectadas com Pb14-3-3-aRNA começaram a morrer a partir do 3º dia de experimento, mas em contraste com o resultado do controle ao final do experimento (7 dias) houve uma taxa de sobrevivência de 35 % (Figura 43). Nenhuma diferença significativa foi observada quando se comparou PbWT e PbEV.

Larvas infectadas com PbEF-Tu-aRNA também começaram a morrer a partir do 3º dia de experimento, mas em contraste com o resultado do controle ao final do experimento (7 dias) houve uma taxa de sobrevivência de 52,7 % (Figura 44). Nenhuma diferença significativa foi observada quando se comparou PbWT e PbEV.

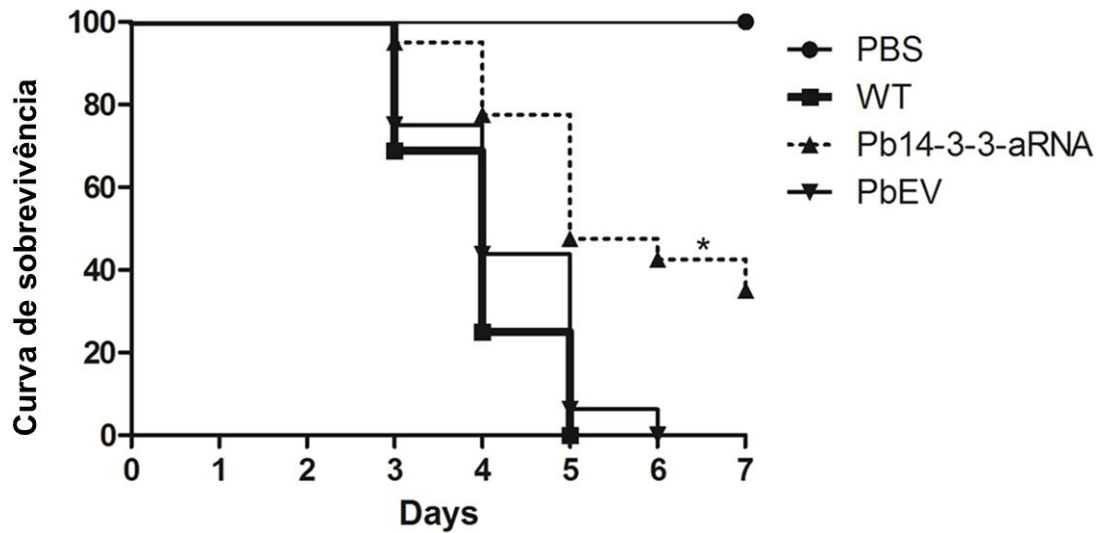


Figura 43. Silenciamento de Pb14-3-3 reduz a virulência de *P. brasiliensis* em modelo de infecção de *Galleria mellonella*. Curva de sobrevivência do experimento de infecção realizado em *G. mellonella* com 5×10^6 células leveduriformes de PbWT, PbEV e Pb14-3-3-aRNA; $p < 0.05$ quando comparado PbWT e PbEV com Pb14-3-3-aRNA. $n=16$.

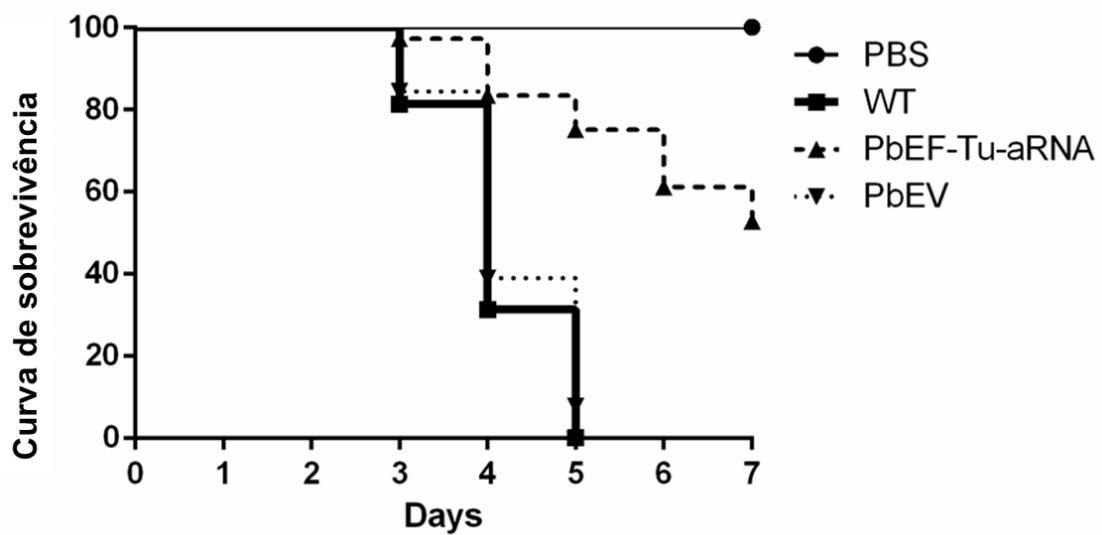


Figura 44. Silenciamento de PbEF-Tu reduz a virulência de *P. brasiliensis* em modelo de infecção de *Galleria mellonella*. Curva de sobrevivência do experimento de infecção realizado em *G. mellonella* com 5×10^6 células leveduriformes de PbWT, PbEV e PbEF-Tu-aRNA; $p < 0.05$ quando comparado PbWT e PbEV com PbEF-Tu-aRNA. $n=16$.

Patogenicidade é a habilidade de um microrganismo infectar o hospedeiro e produzir a doença, como resultado da interação do patógeno com o hospedeiro através da expressão de fatores de ambas as partes. A patogenicidade do fungo depende da sua habilidade em se adaptar ao ambiente dos tecidos do hospedeiro e suportar a atividade lítica de defesa desse hospedeiro. Vários determinantes incluindo genes e seus produtos tais como proteínas conhecidas como fatores de virulência estão envolvidas nessa relação, ocasionando desde infecções superficiais até invasivas. Virulência se refere especificamente à propriedade do patógeno e, de acordo com definições mais atuais, virulência é determinada como a habilidade do patógeno se multiplicar e causar prejuízo ao hospedeiro (Casadevall, 2007).

Determinantes de patogenicidade são chamados de fatores de virulência. Microrganismos patogênicos possuem um grande número de fatores de virulência, tais fatores determinam se o organismo (hospedeiro) sobreviverá ou morrerá durante a interação parasito-hospedeiro. Esses fatores podem ser constitutivos ou induzidos, produto direto de um gene (proteína) ou produto da biossíntese de diferentes vias, como lipídios ou polissacarídeos. O fator de virulência pode ser avaliado através de comparações de respostas biológicas do fungo com ou sem tal fator. Fatores de virulência auxiliam, por exemplo, o crescimento do patógeno a altas temperaturas, facilitam a aderência, penetração e disseminação, ou ajudam na resistência contra defesas do sistema imune (exemplo: fagocitose e complemento), evasão de respostas imunes adaptativas, ou variações da morfologia. A patogênese é um evento complexo, e, portanto o fato de possuir um único fator de virulência não é suficiente para tornar um fungo patogênico, pelo contrário, uma complexa combinação é frequentemente necessária, sendo vários processos envolvidos na virulência (Khan *et al.*, 2010)

A patogênese desencadeada por *P. brasiliensis* tem sido extensivamente estudada nos últimos anos. O conhecimento sobre os mecanismos de virulência deste patógeno está aumentando o que leva a amplos estudos envolvendo diferentes isolados (Kurokawa *et al.*, 2005; Brito, 2012). Determinantes de virulência adicionais, tais como aqueles que codificam adesinas, também têm sido objetos de estudos e há relatos da contribuição destes para a virulência (Khan *et al.*, 2010). O grande arsenal de fatores de virulência está sob o controle de uma rede que coordena e sincroniza todos os elementos envolvidos (Fábrega and Vila, 2013). Essa regulação não é apenas importante do ponto de vista de assegurar a expressão dos elementos individuais de virulência, mas também conferir um “*cross-talk*” entre os fatores determinantes para garantir uma resposta adequada do fungo, no qual todas as etapas são ativadas após uma hierarquia temporal.

Para verificar a importância da proteína Pb14-3-3 na virulência de *P. brasiliensis*, foi utilizado o modelo de infecção no invertebrado *Galleria mellonella*. Este é um modelo interessante, pois apresenta baixo custo e não requer manutenção especializada (Fuchs, Eby, *et al.*, 2010; Fuchs, O'Brien, *et al.*, 2010). Atualmente este modelo tem sido amplamente utilizado na pesquisa de fatores de virulência, principalmente para estimar mudanças na virulência após disrupção ou interferência genética, uma vez que já foi demonstrado que as respostas à infecção em insetos e

mamíferos são altamente similares (Cotter *et al.*, 2000; Jander *et al.*, 2000; Salamiou *et al.*, 2000), além de permitir a redução do número de mamíferos utilizados em laboratório ou até sua substituição de acordo com o proposto no princípio dos 3Rs (*reduction, refinement and replacement*) (Arora *et al.*, 2011). Além disso, Vogel *et al.* (2011) demonstraram a presença de três transcritos de receptores do tipo *Toll-like*, um grande número de peptídeos antimicrobianos e proteínas envolvidas no espectro imune de *G. mellonella*. Diferentes estudos têm demonstrado que *G. mellonella* é um modelo bem estabelecido para se avaliar a virulência fúngica (Brennan *et al.*, 2002; Mylonakis *et al.*, 2005; Fuchs, O'Brien, *et al.*, 2010; Coleman *et al.*, 2011; García-Rodas *et al.*, 2011; Magnani Dinamarco *et al.*, 2012; Lev *et al.*, 2013; Mesa-Arango *et al.*, 2013; Thomaz *et al.*, 2013; Firacative *et al.*, 2014; Jacobsen, 2014) isto em *C. albicans*, *Candida tropicalis*, *Cryptococcus neoformans*, *Cryptococcus gattii*, *Fusarium* spp., *Histoplasma capsulatum* e *Aspergillus fumigatus*, incluindo *Paracoccidioides lutzii*, outra espécie pertencente ao complexo *Paracoccidioides* spp. (Thomaz *et al.*, 2013).

Nossos dados demonstraram que a diminuição nos níveis de expressão de Pb14-3-3 e PbEF-Tu resultou em significativa redução do fenótipo de virulência, refletido na taxa de sobrevivência das larvas infectadas com Pb14-3-3-aRNA e PbEF-Tu-aRNA ao final do experimento, portanto esses isolados podem ser considerado menos virulento quando comparado ao controle PbWT, sugerindo a importância destas proteínas na patogênese de *P. brasiliensis*.

Um painel de mutantes isogênicos da proteína 14-3-3 (Bmh1p) de *C. albicans* foi utilizado para verificar quais mutações especificamente afetariam diferentes vias associadas à virulência, incluindo aquelas envolvidas na formação de filamentos ou interação com células do sistema imune do hospedeiro (Kelly *et al.*, 2009).

TLR (*tool-like receptors*) são proteínas presentes em células de defesa do sistema imune que reconhecem padrões moleculares associados à patógenos como bactérias, vírus e fungos, iniciando a ativação de uma via comum de sinalização que leva a respostas inflamatórias específicas através da ativação de fatores de transcrição tais como o fator nuclear κ B (NF κ B) e fatores de regulação de interferon (IRFs), na imunidade inata, primeira linha de defesa contra parasitas (Qi *et al.*, 2003). Em estudo realizado por Faisal *et al.* (2008) foi sugerido o envolvimento da proteína 14-3-3 na modulação da sinalização de TLR, neste foi demonstrado que a fosforilação da proteína quinase C ϵ (PKC ϵ , que regula diferentes processos celulares tais como proliferação, sobrevivência, imunidade e apoptose) leva a ligação desta à proteína 14-3-3, etapa essa necessária para a divisão celular ao final da citocinese, porém tais eventos são dependentes de Myd88 (proteína envolvida na transdução de sinais), e a fosforilação de PKC ϵ que resulta na ligação à 14-3-3 induz a ativação de TLR4.

O papel de TLR4 no reconhecimento e internalização de *P. brasiliensis* foram reportados em monócitos e neutrófilos humanos (Bonfim *et al.*, 2009). Calich *et al.* (1985) demonstraram a importância de TLR4 no reconhecimento de *P. brasiliensis*, de acordo com estes autores camundongos deficientes em TLR4 infectados

intraperitonealmente com este fungo foram mais resistentes à infecção. Recentemente, experimentos *in vivo* e *in vitro* demonstraram que o reconhecimento de *P. brasiliensis* por TLR4 leva à infecção severa e com padrões pró-inflamatórios (Loures *et al.*, 2011). Considerando-se que a proteína Pb14-3-3 possui localização preferencial na superfície de *P. brasiliensis* quando este está em contato com o hospedeiro (da Silva *et al.*, 2013), nos sugerimos neste estudo que a diminuição da produção desta proteína em *P. brasiliensis* leva a uma redução na sua capacidade de interagir com componentes e que gera um decréscimo na habilidade de evadir à resposta imune, possivelmente devido a uma modulação inicial da resposta imune, resultando, portanto em uma atenuação da virulência de *P. brasiliensis*.

A caracterização de fatores de virulência é essencial para a melhoria na compreensão da patogênese ocasionada por fungos e interação entre fungos patogênicos e hospedeiros, tal entendimento também como a base para explorar o desenvolvimento de profilaxias ou novas estratégias terapêuticas. Neste presente estudo estabeleceu-se que a diminuição da expressão de Pb14-3-3 regulou diferencialmente aspectos importantes que afetaram a interação com a célula hospedeira, como morfologia, interação com MEC/pneumócitos e virulência. Portanto a proteína Pb14-3-3 é um alvo interessante para combater a infecção e modular as condições inflamatórias associadas com a PCM devido à *P. brasiliensis*.

A imunidade inata primeira linha de defesa do organismo atua imediatamente para matar e eliminar a invasão de patógenos (Lambris *et al.*, 2008; Zipfel *et al.*, 2013). A cascata de complemento quando disparada pela indução de um agente patogênico induz uma resposta de defesa sequencial e efetiva. O sistema complemento do hospedeiro é ativado por três vias diferentes, alternativa, clássica e via de lectina. Todas essas vias formam C3 convertases que clivam o componente central do sistema complemento, C3, em C3a e C3b. Acúmulo de C3b na superfície ocasiona a opsonização da superfície do agente estranho. C3a é uma anafilotoxina e possui atividades antimicrobicidas (Mohan *et al.*, 2014). O sistema complemento é altamente regulado pela fase fluída, como membrana associada a reguladores que bloqueiam a progressão da cascata do complemento. O fator H, proteína presente no plasma humano, atua mediando à degradação e conseqüentemente inativação do componente C3b, além de inibir a formação e acelerar o decaimento de C3 convertase (Rodríguez de Córdoba *et al.*, 2004; Zipfel *et al.*, 2008).

Patógenos têm desenvolvido inúmeros mecanismos para controlar e escapar da ação do sistema complemento do hospedeiro, fugindo deste ataque através de moléculas que atuam no complemento (Foster *et al.*, 2014). Muitos patógenos mimetizam a superfície celular do hospedeiro, sendo capazes de se ligar a inibidores solúveis do complemento, por exemplo, o fator H, para a evasão da resposta de ataque do hospedeiro (Lewis *et al.*, 2010; Amdahl *et al.*, 2013; Poolpol *et al.*, 2014; Zipfel and Skerka, 2014). A maioria das proteínas que apresentam capacidade de ligação ao fator H também de ligam ao plasminogênio (glicoproteína humana) (Castellino and Ploplis, 2005), uma vez os patógenos se ligam ao plasminogênio ocorre a formação de plasmina

que atua na degradação de componentes do sistema complemento e também proteínas da matriz extracelular (Myöhänen and Vaheri, 2004) como fibrinogênio, laminina, fibronectina e vitronectina (Lähteenmäki *et al.*, 2000) ocasionando a disseminação no hospedeiro.

O fator de alongação Tu primeiramente identificado como proteína citoplasmática envolvida na regulação da biossíntese de proteínas e metabolismo celular, se ligando e transportando amino-acil-tRNA aos ribossomos foi identificado como componente regulatório do sistema complemento em *S. pneumoniae* mediante a ligação ao fator H e plasminogênio e degradação do componente C3b, inibindo o sistema complemento, degradando proteínas da MEC e consequentemente facilitando a sua disseminação pelos tecidos do hospedeiro (Mohan *et al.*, 2014). Portanto a proteína EF-Tu contribui para a virulência de alguns patógenos por diferentes mecanismos. Em nosso estudo comprovamos pelo ensaio de infecção em modelo de *G. mellonella* que esta proteína atua na virulência de *P. brasiliensis*, porém ainda não sabemos qual o exato mecanismo pelo qual isto ocorre, sendo necessários resultados adicionais que estão sendo realizados e também investigações futuras, mas tudo leva a crer já que esta proteína apresenta-se relativamente conservada em diferentes espécies incluindo bactérias G-positivas (*L. monocytogenes*) e G-negativas (*E. coli*) e fungos como *S. cerevisiae* e *C. albicans* (Jacobson and Rosenbusch, 1976; Crowe *et al.*, 2003; Archambaud *et al.*, 2005) que *P. brasiliensis* utilize essa proteína na tentativa de evadir da resposta imune do hospedeiro, e por isso o isolado com redução na expressão de PbEF-Tu apresentou-se menos virulento quando comparado ao *P. brasiliensis* selvagem.

5 CONCLUSÕES

- ❖ 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 facilitar as interações do fungo com as células hospedeiras, proteínas presentes no soro humano ou MEC durante a infecção (Silva, 2008). Neste trabalho demos início à caracterização da proteína EF-Tu de *P. brasiliensis* como adesina potencialmente envolvida nos mecanismos de adesão e invasão necessários para o processo de infecção desencadeado por este fungo. A partir da sequência completa do cDNA que codifica para a EF-Tu de *P. brasiliensis* e a sua expressão heteróloga e purificação da proteína recombinante foi possível através da imunização em coelhos, a obtenção do anticorpo policlonal que reconhece especificamente a proteína EF-Tu do fungo, análise esta realizada através de *Western-blotting* com a proteína recombinante purificada e extrato total do fungo;
- ❖ *P. brasiliensis* não é considerado um fungo intracelular obrigatório, mas há relatos de que o mesmo pode aderir e invadir células epiteliais *in vitro* e *in vivo*, sendo a adesão pré-requisito para o estabelecimento da infecção (Mendes-Giannini *et al.*, 2004a). Neste trabalho foi demonstrado por ensaio de ELISA que a proteína EF-Tu de *P. brasiliensis* foi capaz de se ligar a fibronectina e plasminogênio, habilidade esta considerada importante para o processo de adesão, colonização e disseminação pelos diferentes tecidos do hospedeiro;
- ❖ Foi ainda avaliado o comportamento da potencial adesina EF-Tu de *P. brasiliensis* na sua interação com pneumócitos, sendo possível verificar que células leveduriformes de *P. brasiliensis* pré-incubadas com o anticorpo policlonal anti-PbEF-Tu apresentaram forte inibição da adesão à pneumócitos, sugerindo sua influência na adesão do fungo, etapa esta crucial para o processo infectivo de *P. brasiliensis*;
- ❖ Adicionalmente foi obtida linhagem de *P. brasiliensis* com redução na expressão do gene codificante de EF-Tu pela estratégia de RNA antisense mediante agrotransformação, a linhagem silenciada não apresentou diferenças em relação ao crescimento, viabilidade e morfologia quando comparada à linhagem selvagem;
- ❖ Paralelamente à caracterização da proteína EF-Tu de *P. brasiliensis* demos continuidade a estudos envolvendo outra proteína de *P. brasiliensis*, a 14-3-3, identificada e caracterizada por nosso grupo como importante adesina utilizado por este patógeno (Andreotti *et al.*, 2005; da Silva *et al.*, 2013), para isto foi possível à obtenção de linhagem de *P. brasiliensis* com redução na expressão do gene codificante de 14-3-3 pela mesma estratégia citada anteriormente;
- ❖ A linhagem de *P. brasiliensis* silenciada para o gene da 14-3-3 aparentemente resultou em menor produção da respectiva proteína, sendo isto inferido por *Western*

blotting com os respectivos anticorpos policlonal e monoclonal. Esta linhagem não apresentou diferenças em relação ao crescimento e viabilidade, porém, quanto à morfologia pôde-se observar um número elevado de células alongadas, situação esta encontrada no início do processo de conversão para a forma miceliar (forma infectante), podendo ser observada a presença de hifas septadas com clamidoconídeos intercalares. Desta maneira sugerimos que de alguma maneira a proteína 14-3-3 de *P. brasiliensis* possa estar envolvida na manutenção da forma leveduriforme, e, portanto atuante na virulência deste fungo, uma vez que o dimorfismo é condição essencial para o estabelecimento de infecção (Kurokawa *et al.*, 1998);

❖ As linhagens silenciadas para EF-Tu e 14-3-3 apresentaram diferenças significativas em relação à sua capacidade de aderir a pneumócitos, dados estes similares aos encontrados no presente ensaio de inibição da adesão à pneumócitos utilizando o anticorpo anti-PbEF-Tu, apresentado anteriormente e trabalho posterior de nosso grupo demonstrando a mesma inibição da adesão utilizando o tratamento com a anticorpo anti-Pb14-3-3 (da Silva *et al.*, 2013), reforçando a atuação de ambas as proteínas no processo de estabelecimento da infecção;

❖ Ensaios de virulência *in vivo* em modelo de *Galleria mellonella* demonstraram que as linhagens de *P. brasiliensis* silenciadas para EF-Tu e 14-3-3 apresentaram maior capacidade de sobrevivência quando comparada à linhagem selvagem, indicando que tais proteínas podem ser importantes fatores de virulência que contribuem para o estabelecimento ou a manutenção da infecção;

❖ *P. brasiliensis* pode invadir diferentes tipos celulares e provavelmente manipular o ambiente da célula do hospedeiro para beneficiar o seu crescimento e sobrevivência (Mendes-Giannini *et al.*, 2004a). Há relatos de que *P. brasiliensis* induz apoptose em células hospedeiras, e que isolado recém-isolado de passagem por animal, e, portanto, mais virulento, possui maior expressão de proteínas relacionadas ao desencadeamento da apoptose (Del Vecchio *et al.*, 2009). Em tempos iniciais de infecção experimental de PCM a indução da apoptose pode ser um eficiente estratégia do hospedeiro para eliminar o fungo sem causar danos teciduais (Verícimo *et al.*, 2006), por outro lado, os mecanismos de invasão e persistência no hospedeiro os quais consequentemente induzem a apoptose podem contribuir para o sucesso no estabelecimento da infecção de *P. brasiliensis* nos tecidos do hospedeiro e disseminação. Uma hipótese existente é de que células apoptóticas contendo o fungo internalizado poderiam servir como veículo para o patógeno adentrar macrófagos sem a estimulação de processos microbicidas destas células, evadindo-se, portanto da resposta imune (Mendes-Giannini *et al.*, 2008). Neste trabalho demonstramos pela técnica de TUNEL que ambos os isolados silenciados obtidos apresentaram menor capacidade de indução da apoptose, sugerindo portanto que as proteínas EF-Tu e 14-3-3 não participariam apenas do processo de adesão, mas também de outros mecanismos importantes como a apoptose;

6 REFERÊNCIAS

- Abuodeh, R. O. et al. Genetic transformation of *Coccidioides immitis* facilitated by *Agrobacterium tumefaciens*. **J Infect Dis**, v. 181, n. 6, p. 2106-10, Jun 2000. ISSN 0022-1899. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10837205> >.
- Acorci, M. J. et al. Inhibition of human neutrophil apoptosis by *Paracoccidioides brasiliensis*: role of interleukin-8. **Scand J Immunol**, v. 69, n. 2, p. 73-9, Feb 2009. ISSN 1365-3083. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19144080> >.
- Adams, J. M.; Cory, S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. **Science**, v. 281, n. 5381, p. 1322-6, Aug 1998. ISSN 0036-8075. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9735050> >.
- Allen, H. L.; Deepe, G. S. Apoptosis modulates protective immunity to the pathogenic fungus *Histoplasma capsulatum*. **J Clin Invest**, v. 115, n. 10, p. 2875-85, Oct 2005. ISSN 0021-9738. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16151533> >.
- Almeida, A. J. et al. Towards a molecular genetic system for the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **Fungal Genet Biol**, v. 44, n. 12, p. 1387-98, Dec 2007. ISSN 1087-1845. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17512227> >.
- Almeida, A. J. et al. Cdc42p controls yeast-cell shape and virulence of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Fungal Genet Biol**, v. 46, n. 12, p. 919-26, Dec 2009. ISSN 1096-0937. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19686860> >.
- Almeida, A. J. et al. Genome size and ploidy of *Paracoccidioides brasiliensis* reveals a haploid DNA content: flow cytometry and GP43 sequence analysis. **Fungal Genet Biol**, v. 44, n. 1, p. 25-31, Jan 2007. ISSN 1087-1845. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16879998> >.
- Almeida, S. R.; Unterkircher, C. S.; Camargo, Z. P. Involvement of the major glycoprotein (gp43) of *Paracoccidioides brasiliensis* in attachment to macrophages. **Med Mycol**, v. 36, n. 6, p. 405-11, Dec 1998. ISSN 1369-3786. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10206751> >.
- Alvarez, R. A.; Blaylock, M. W.; Baseman, J. B. Surface localized glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Mycoplasma genitalium* binds mucin. **Mol Microbiol**, v. 48, n. 5, p. 1417-25, Jun 2003. ISSN 0950-382X. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12787366> >.
- Alves, G. R.; Lauda Filho, J. D.; Haygert, C. J. Neuroparacoccidioidomycosis. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 44, n. 5, p. 654, Oct 2011. ISSN 1678-9849. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22031091> >.
- Amdahl, H. et al. Staphylococcal Ecb protein and host complement regulator factor H enhance functions of each other in bacterial immune evasion. **J Immunol**, v. 191, n. 4, p. 1775-84, Aug 2013. ISSN 1550-6606. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23863906> >.
- Amenta, P. S.; Gil, J.; Martinez-Hernandez, A. Connective tissue of rat lung. II: Ultrastructural localization of collagen types III, IV, and VI. **J Histochem Cytochem**, v. 36, n. 9, p. 1167-73, Sep 1988. ISSN 0022-1554. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3403967> >.

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

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

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

Archambaud, C. et al. Translation elongation factor EF-Tu is a target for Stp, a serine-threonine phosphatase involved in virulence of *Listeria monocytogenes*. **Mol Microbiol**, v. 56, n. 2, p. 383-96, Apr 2005. ISSN 0950-382X. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15813732> >.

Aristizabal, B. H. et al. Morphological transition of *Paracoccidioides brasiliensis* conidia to yeast cells: in vivo inhibition in females. **Infect Immun**, v. 66, n. 11, p. 5587-91, Nov 1998. ISSN 0019-9567. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9784579> >.

Arora, T. et al. Substitute of Animals in Drug Research: An Approach Towards Fulfillment of 4R's. **Indian J Pharm Sci**, v. 73, n. 1, p. 1-6, Jan 2011. ISSN 1998-3743. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22131615> >.

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. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16473563> >.

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

Bagagli, E. et al. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillos (*Dasybus novemcinctus*) captured in an endemic area of paracoccidioidomycosis. **Am J Trop Med Hyg**, v. 58, n. 4, p. 505-12, Apr 1998. ISSN 0002-9637. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9574800> >.

Bailão, A. M. et al. The transcriptional profile of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast cells is influenced by human plasma. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 51, n. 1, p. 43-57, Oct 2007. ISSN 0928-8244. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17608708> >.

Balasubramanian, S.; Kannan, T. R.; Baseman, J. B. The surface-exposed carboxyl region of *Mycoplasma pneumoniae* elongation factor Tu interacts with fibronectin. **Infect Immun**, v. 76, n. 7, p. 3116-23, Jul 2008. ISSN 1098-5522. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18411296> >.

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. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16368993> >.

Barbosa, M. S. et al. 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. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15275662> >.

Barel, M. et al. A novel receptor - ligand pathway for entry of *Francisella tularensis* in monocyte-like THP-1 cells: interaction between surface nucleolin and bacterial elongation factor Tu. **BMC Microbiol**, v. 8, p. 145, 2008. ISSN 1471-2180. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18789156> >.

Barros, D. C. M. C. **Study of the dimorphic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*: development of molecular tools and morphology evaluation**. 2010. 79 *Genética Molecular*, Universidade do Minho

Baseman, J. B.; Tully, J. G. Mycoplasmas: sophisticated, reemerging, and burdened by their notoriety. **Emerg Infect Dis**, v. 3, n. 1, p. 21-32, 1997 Jan-Mar 1997. ISSN 1080-6040. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9126441> >.

Bayles, K. W. et al. Intracellular *Staphylococcus aureus* escapes the endosome and induces apoptosis in epithelial cells. **Infect Immun**, v. 66, n. 1, p. 336-42, Jan 1998. ISSN 0019-9567. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9423876> >.

Behnsen, J. et al. The opportunistic human pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus* evades the host complement system. **Infect Immun**, v. 76, n. 2, p. 820-7, Feb 2008. ISSN 1098-5522. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18039838> >.

Beijersbergen, A. et al. Conjugative Transfer by the Virulence System of *Agrobacterium tumefaciens*. **Science**, v. 256, n. 5061, p. 1324-7, May 1992. ISSN 0036-8075. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17736763> >.

Bergmann, S. et al. alpha-Enolase of *Streptococcus pneumoniae* is a plasmin(ogen)-binding protein displayed on the bacterial cell surface. **Mol Microbiol**, v. 40, n. 6, p. 1273-87, Jun 2001. ISSN 0950-382X. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11442827> >.

Berman, J. Morphogenesis and cell cycle progression in *Candida albicans*. **Curr Opin Microbiol**, v. 9, n. 6, p. 595-601, Dec 2006. ISSN 1369-5274. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17055773> >.

Berrier, C. et al. Elongation factor Tu and DnaK are transferred from the cytoplasm to the periplasm of *Escherichia coli* during osmotic downshock presumably via the mechanosensitive channel mscL. **J Bacteriol**, v. 182, n. 1, p. 248-51, Jan 2000. ISSN 0021-9193. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10613892> >.

Beutler, B. Toll-like receptors and their place in immunology. Where does the immune response to infection begin? **Nat Rev Immunol**, v. 4, n. 7, p. 498, Jul 2004. ISSN 1474-1733. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18293536> >.

Bhattacharya, S.; Ploplis, V. A.; Castellino, F. J. Bacterial plasminogen receptors utilize host plasminogen system for effective invasion and dissemination. **J Biomed Biotechnol**, v. 2012, p. 482096, 2012. ISSN 1110-7251. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23118509> >.

Bialkowska, K. et al. 14-3-3 zeta mediates integrin-induced activation of Cdc42 and Rac. Platelet glycoprotein Ib-IX regulates integrin-induced signaling by sequestering 14-3-3 zeta. **J**

Biol Chem, v. 278, n. 35, p. 33342-50, Aug 2003. ISSN 0021-9258. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12810725> >.

Bicalho, R. N. et al. Oral paracoccidioidomycosis: a retrospective study of 62 Brazilian patients. **Oral Dis**, v. 7, n. 1, p. 56-60, Jan 2001. ISSN 1354-523X. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11354923> >.

Blumenthal, T.; Hill, D. Roles of the host polypeptides in Q beta RNA replication. Host factor and ribosomal protein S1 allow initiation at reduced GTP concentration. **J Biol Chem**, v. 255, n. 24, p. 11713-6, Dec 1980. ISSN 0021-9258. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6160152> >.

Boily, P. Individual variation in metabolic traits of wild nine-banded armadillos (*Dasypus novemcinctus*), and the aerobic capacity model for the evolution of endothermy. **J Exp Biol**, v. 205, n. Pt 20, p. 3207-14, Oct 2002. ISSN 0022-0949. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12235198> >.

Bonfim, C. V.; Mamoni, R. L.; Blotta, M. H. TLR-2, TLR-4 and dectin-1 expression in human monocytes and neutrophils stimulated by *Paracoccidioides brasiliensis*. **Med Mycol**, v. 47, n. 7, p. 722-33, Nov 2009. ISSN 1460-2709. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19888805> >.

Bowman, B. H.; White, T. J.; Taylor, J. W. Human pathogenic fungi and their close nonpathogenic relatives. **Mol Phylogenet Evol**, v. 6, n. 1, p. 89-96, Aug 1996. ISSN 1055-7903. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8812309> >.

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. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12381467> >.

Brito, M. M. S. **Morfologia, virulência e perfil genético de *Paracoccidioides brasiliensis* Avaliação pré e pós-passagem em modelo murino de isolados provenientes de forma clínica crônica humana da paracoccidioidomicose**. 2012. 118 Pós-Graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas, Fundação Oswaldo Cruz. Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas

Brummer, E.; Castaneda, E.; Restrepo, A. Paracoccidioidomycosis: an update. **Clin Microbiol Rev**, v. 6, n. 2, p. 89-117, Apr 1993. ISSN 0893-8512. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8472249> >.

Brummer, E. et al. Virulence of *Paracoccidioides brasiliensis*: the influence of in vitro passage and storage. **Mycopathologia**, v. 109, n. 1, p. 13-7, Jan 1990. ISSN 0301-486X. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2139178> >.

Bundock, P. et al. Trans-kingdom T-DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to *Saccharomyces cerevisiae*. **EMBO J**, v. 14, n. 13, p. 3206-14, Jul 1995. ISSN 0261-4189. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7621833> >.

Buret, A.; Cripps, A. W. The immunoevasive activities of *Pseudomonas aeruginosa*. Relevance for cystic fibrosis. **Am Rev Respir Dis**, v. 148, n. 3, p. 793-805, Sep 1993. ISSN 0003-0805. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8368651> >.

Böhmer, M. et al. Proteomic analysis of dimorphic transition in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. **Proteomics**, v. 7, n. 5, p. 675-85, Mar 2007. ISSN 1615-9853. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17340586> >.

Caldas, T. D. et al. Purification of elongation factors EF-Tu and EF-G from *Escherichia coli* by covalent chromatography on thiol-sepharose. **Protein Expr Purif**, v. 14, n. 1, p. 65-70, Oct 1998. ISSN 1046-5928. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9758752> >.

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

Calich, V. L. et al. Susceptibility and resistance of inbred mice to *Paracoccidioides brasiliensis*. **Br J Exp Pathol**, v. 66, n. 5, p. 585-94, Oct 1985. ISSN 0007-1021. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4063162> >.

Campanelli, A. P. et al. Fas-Fas ligand (CD95-CD95L) and cytotoxic T lymphocyte antigen-4 engagement mediate T cell unresponsiveness in patients with paracoccidioidomycosis. **J Infect Dis**, v. 187, n. 9, p. 1496-505, May 2003. ISSN 0022-1899. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12717632> >.

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. Available at: < <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. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10417127> >.

Castellino, F. J.; Ploplis, V. A. Structure and function of the plasminogen/plasmin system. **Thromb Haemost**, v. 93, n. 4, p. 647-54, Apr 2005. ISSN 0340-6245. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15841308> >.

Chapman, H. A. Plasminogen activators, integrins, and the coordinated regulation of cell adhesion and migration. **Curr Opin Cell Biol**, v. 9, n. 5, p. 714-24, Oct 1997. ISSN 0955-0674. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9330876> >.

Chung, M. C. et al. *Bacillus anthracis* interacts with plasmin(ogen) to evade C3b-dependent innate immunity. **PLoS One**, v. 6, n. 3, p. e18119, 2011. ISSN 1932-6203. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21464960> >.

Clemons, K. V.; Feldman, D.; Stevens, D. A. Influence of oestradiol on protein expression and methionine utilization during morphogenesis of *Paracoccidioides brasiliensis*. **J Gen Microbiol**, v. 135, n. 6, p. 1607-17, Jun 1989. ISSN 0022-1287. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2614390> >.

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. Available at: < <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. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16476564> >.

Corredor, G. G. et al. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from the nine-banded armadillo *Dasybus novemcinctus*, in an endemic area for paracoccidioidomycosis in Colombia. **Rev**

Iberoam Micol, v. 16, n. 4, p. 216-20, Dec 1999. ISSN 1130-1406. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18473551> >.

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. Available at: < <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. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12244377> >.

Crowe, J. D. et al. Candida albicans binds human plasminogen: identification of eight plasminogen-binding proteins. **Mol Microbiol**, v. 47, n. 6, p. 1637-51, Mar 2003. ISSN 0950-382X. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12622818> >.

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

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. Available at: < <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. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20034376> >.

Dallo, S. F.; Baseman, J. B. Intracellular DNA replication and long-term survival of pathogenic mycoplasmas. **Microb Pathog**, v. 29, n. 5, p. 301-9, Nov 2000. ISSN 0882-4010. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11031124> >.

Dallo, S. F. et al. Elongation factor Tu and E1 beta subunit of pyruvate dehydrogenase complex act as fibronectin binding proteins in Mycoplasma pneumoniae. **Mol Microbiol**, v. 46, n. 4, p. 1041-51, Nov 2002. ISSN 0950-382X. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12421310> >.

Dallo, S. F. et al. Association of Acinetobacter baumannii EF-Tu with cell surface, outer membrane vesicles, and fibronectin. **ScientificWorldJournal**, v. 2012, p. 128705, 2012. ISSN 1537-744X. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22666090> >.

Dave, S. et al. PspC, a pneumococcal surface protein, binds human factor H. **Infect Immun**, v. 69, n. 5, p. 3435-7, May 2001. ISSN 0019-9567. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11292770> >.

de Almeida, S. M. Central nervous system paracoccidioidomycosis: an overview. **Braz J Infect Dis**, v. 9, n. 2, p. 126-33, Apr 2005. ISSN 1413-8670. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16127588> >.

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

de Groot, M. J. et al. Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of filamentous fungi. **Nat Biotechnol**, v. 16, n. 9, p. 839-42, Sep 1998. ISSN 1087-0156. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9743116> >.

De Luca, C. et al. Mutations in yeast mt tRNAs: specific and general suppression by nuclear encoded tRNA interactors. **Gene**, v. 377, p. 169-76, Aug 2006. ISSN 0378-1119. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16777356> >.

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

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. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19429745> >.

Dos Santos, A. L.; Soares, R. M. Candida guilliermondii isolated from HIV-infected human secretes a 50 kDa serine proteinase that cleaves a broad spectrum of proteinaceous substrates. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 43, n. 1, p. 13-20, Jan 2005. ISSN 0928-8244. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15607631> >.

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

Fagundes-Pereyra, W. J. et al. [Central nervous system paracoccidioidomycosis: analysis of 13 cases]. **Arq Neuropsiquiatr**, v. 64, n. 2A, p. 269-76, Jun 2006. ISSN 0004-282X. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16791368> >.

Faisal, A. et al. The scaffold MyD88 acts to couple protein kinase Cepsilon to Toll-like receptors. **J Biol Chem**, v. 283, n. 27, p. 18591-600, Jul 2008. ISSN 0021-9258. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18458086> >.

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

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

Firacative, C.; Duan, S.; Meyer, W. Galleria mellonella model identifies highly virulent strains among all major molecular types of Cryptococcus gattii. **PLoS One**, v. 9, n. 8, p. e105076, 2014. ISSN 1932-6203. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25133687> >.

Flavia Popi, A. F.; Lopes, J. D.; Mariano, M. GP43 from Paracoccidioides brasiliensis inhibits macrophage functions. An evasion mechanism of the fungus. **Cell Immunol**, v. 218, n. 1-2, p. 87-94, 2002 Jul-Aug 2002. ISSN 0008-8749. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12470616> >.

Foster, T. J. et al. Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of Staphylococcus aureus. **Nat Rev Microbiol**, v. 12, n. 1, p. 49-62, Jan 2014. ISSN 1740-1534. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24336184> >.

Fox, D.; Smulian, A. G. Plasminogen-binding activity of enolase in the opportunistic pathogen *Pneumocystis carinii*. **Med Mycol**, v. 39, n. 6, p. 495-507, Dec 2001. ISSN 1369-3786. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11798055> >.

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

Franco, M. et al. A critical analysis of isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from soil. **Med Mycol**, v. 38, n. 3, p. 185-91, Jun 2000. ISSN 1369-3786. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10892985> >.

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

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

Fuchs, B. B. et al. Role of filamentation in *Galleria mellonella* killing by *Candida albicans*. **Microbes Infect**, v. 12, n. 6, p. 488-96, Jun 2010. ISSN 1769-714X. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20223293> >.

Fuchs, B. B. et al. Methods for using *Galleria mellonella* as a model host to study fungal pathogenesis. **Virulence**, v. 1, n. 6, p. 475-82, 2010 Nov-Dec 2010. ISSN 2150-5608. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21178491> >.

Fàbrega, A.; Vila, J. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium skills to succeed in the host: virulence and regulation. **Clin Microbiol Rev**, v. 26, n. 2, p. 308-41, Apr 2013. ISSN 1098-6618. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23554419> >.

Ganesan, S. et al. Caspase-8 modulates dectin-1 and complement receptor 3-driven IL-1 β production in response to β -glucans and the fungal pathogen, *Candida albicans*. **J Immunol**, v. 193, n. 5, p. 2519-30, Sep 2014. ISSN 1550-6606. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25063877> >.

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. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17400504> >.

Gao, L. Y.; Kwaik, Y. A. The modulation of host cell apoptosis by intracellular bacterial pathogens. **Trends Microbiol**, v. 8, n. 7, p. 306-13, Jul 2000. ISSN 0966-842X. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10878765> >.

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. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21915338> >.

Geiger, B.; Yamada, K. M. Molecular architecture and function of matrix adhesions. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, v. 3, n. 5, May 2011. ISSN 1943-0264. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21441590> >.

Gelvin, S. B. Improving plant genetic engineering by manipulating the host. **Trends Biotechnol**, v. 21, n. 3, p. 95-8, Mar 2003. ISSN 0167-7799. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12628361> >.

Gelvin, S. B. Agrobacterium virulence gene induction. **Methods Mol Biol**, v. 343, p. 77-84, 2006. ISSN 1064-3745. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16988335> >.

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. Available at: < <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. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15784595> >.

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

Granato, D. et al. Cell surface-associated elongation factor Tu mediates the attachment of *Lactobacillus johnsonii* NCC533 (La1) to human intestinal cells and mucins. **Infect Immun**, v. 72, n. 4, p. 2160-9, Apr 2004. ISSN 0019-9567. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15039339> >.

Gross, S. R.; Kinzy, T. G. Translation elongation factor 1A is essential for regulation of the actin cytoskeleton and cell morphology. **Nat Struct Mol Biol**, v. 12, n. 9, p. 772-8, Sep 2005. ISSN 1545-9993. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16116436> >.

Gushulak, B. D.; MacPherson, D. W. Population mobility and infectious diseases: the diminishing impact of classical infectious diseases and new approaches for the 21st century. **Clin Infect Dis**, v. 31, n. 3, p. 776-80, Sep 2000. ISSN 1058-4838. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11017829> >.

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. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10962270> >.

Haslinger-Löffler, B. et al. Multiple virulence factors are required for *Staphylococcus aureus*-induced apoptosis in endothelial cells. **Cell Microbiol**, v. 7, n. 8, p. 1087-97, Aug 2005. ISSN 1462-5814. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16008576> >.

Hellens, R.; Mullineaux, P.; Klee, H. Technical Focus: a guide to *Agrobacterium* binary Ti vectors. **Trends Plant Sci**, v. 5, n. 10, p. 446-51, Oct 2000. ISSN 1360-1385. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11044722> >.

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

Hernández, O. et al. Kinetic analysis of gene expression during mycelium to yeast transition and yeast to mycelium germination in *Paracoccidioides brasiliensis*. **Biomedica**, v. 31, n. 4, p.

570-9, 2011 Oct-Dec 2011. ISSN 0120-4157. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22674368> >.

Herzog, E. L. et al. Knowns and unknowns of the alveolus. **Proc Am Thorac Soc**, v. 5, n. 7, p. 778-82, Sep 2008. ISSN 1546-3222. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18757317> >.

Hogan, L. H.; Klein, B. S.; Levitz, S. M. Virulence factors of medically important fungi. **Clin Microbiol Rev**, v. 9, n. 4, p. 469-88, Oct 1996. ISSN 0893-8512. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8894347> >.

Hong, Y. Q.; Ghebrehiwet, B. Effect of *Pseudomonas aeruginosa* elastase and alkaline protease on serum complement and isolated components C1q and C3. **Clin Immunol Immunopathol**, v. 62, n. 2, p. 133-8, Feb 1992. ISSN 0090-1229. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1730152> >.

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

Hurtado, C. A.; Rachubinski, R. A. Y1BMH1 encodes a 14-3-3 protein that promotes filamentous growth in the dimorphic yeast *Yarrowia lipolytica*. **Microbiology**, v. 148, n. Pt 11, p. 3725-35, Nov 2002. ISSN 1350-0872. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12427962> >.

Hynes, R. O. The extracellular matrix: not just pretty fibrils. **Science**, v. 326, n. 5957, p. 1216-9, Nov 2009. ISSN 1095-9203. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19965464> >.

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. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24384470> >.

Jacobson, G. R.; Rosenbusch, J. P. Abundance and membrane association of elongation factor Tu in *E. coli*. **Nature**, v. 261, n. 5555, p. 23-6, May 1976. ISSN 0028-0836. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/775340> >.

Jander, G.; Rahme, L. G.; Ausubel, F. M. Positive correlation between virulence of *Pseudomonas aeruginosa* mutants in mice and insects. **J Bacteriol**, v. 182, n. 13, p. 3843-5, Jul 2000. ISSN 0021-9193. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10851003> >.

Janeway, C. A. The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self. **Immunol Today**, v. 13, n. 1, p. 11-6, Jan 1992. ISSN 0167-5699. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1739426> >.

Janeway, C. A.; Medzhitov, R. Innate immune recognition. **Annu Rev Immunol**, v. 20, p. 197-216, 2002. ISSN 0732-0582. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11861602> >.

Janulczyk, R. et al. Hic, a novel surface protein of *Streptococcus pneumoniae* that interferes with complement function. **J Biol Chem**, v. 275, n. 47, p. 37257-63, Nov 2000. ISSN 0021-9258. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10967103> >.

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

Johnsson, E. et al. Role of the hypervariable region in streptococcal M proteins: binding of a human complement inhibitor. **J Immunol**, v. 161, n. 9, p. 4894-901, Nov 1998. ISSN 0022-1767. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9794423> >.

Jong, A. et al. Involvement of human CD44 during *Cryptococcus neoformans* infection of brain microvascular endothelial cells. **Cell Microbiol**, v. 10, n. 6, p. 1313-26, Jun 2008. ISSN 1462-5822. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18248627> >.

Kelly, B. A.; Kado, C. I. Agrobacterium-mediated T-DNA transfer and integration into the chromosome of *Streptomyces lividans*. **Mol Plant Pathol**, v. 3, n. 3, p. 125-34, May 2002. ISSN 1364-3703. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20569318> >.

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

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

Kesimer, M. et al. Identification of salivary mucin MUC7 binding proteins from *Streptococcus gordonii*. **BMC Microbiol**, v. 9, p. 163, 2009. ISSN 1471-2180. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19671172> >.

Khan, M. S. A. et al. **Virulence and Pathogenicity of Fungal Pathogens with Special Reference to *Candida albicans***. Springer Berlin Heidelberg, 2010. 24.

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

Konno, F. T. et al. Paracoccidioides brasiliensis GP43-derived peptides are potent modulators of local and systemic inflammatory response. **Microbes Infect**, v. 14, n. 6, p. 517-27, Jun 2012. ISSN 1769-714X. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22281666> >.

Krab, I. M.; Parmeggiani, A. EF-Tu, a GTPase odyssey. **Biochim Biophys Acta**, v. 1443, n. 1-2, p. 1-22, Nov 1998. ISSN 0006-3002. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9838020> >.

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. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23799663> >.

Kraiczy, P. et al. Further characterization of complement regulator-acquiring surface proteins of *Borrelia burgdorferi*. **Infect Immun**, v. 69, n. 12, p. 7800-9, Dec 2001. ISSN 0019-9567. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11705962> >.

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

Kunert, A. et al. Immune evasion of the human pathogen *Pseudomonas aeruginosa*: elongation factor Tuf is a factor H and plasminogen binding protein. **J Immunol**, v. 179, n. 5, p. 2979-88, Sep 2007. ISSN 0022-1767. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17709513> >.

Kunik, T. et al. Genetic transformation of HeLa cells by Agrobacterium. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 98, n. 4, p. 1871-6, Feb 2001. ISSN 0027-8424. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11172043> >.

Kurokawa, C. S. et al. Virulence profile of ten *Paracoccidioides brasiliensis* isolates: association with morphologic and genetic patterns. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 47, n. 5, p. 257-62, 2005 Sep-Oct 2005. ISSN 0036-4665. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16302108> >.

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

Kurtenbach, K. et al. Host association of *Borrelia burgdorferi* sensu lato--the key role of host complement. **Trends Microbiol**, v. 10, n. 2, p. 74-9, Feb 2002. ISSN 0966-842X. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11827808> >.

Lacaz, C. S. **Historical evolution of the knowledge on *Paracoccidioides brasiliensis***. 2. 1994. 5.

Lacaz, C. S.; Porto, E.; Martins, J. E. C. **Micologia Médica: Fungos, actinomicetos e algas de interesse médico**. 13. 1991. 5.

Lacaz, C. S. et al. **Aspectos clínicos gerais. Formas polares de paracoccidioidomicose. Particularidades clínicas infanto-juvenis**. 1982. 7.

Lambris, J. D.; Ricklin, D.; Geisbrecht, B. V. Complement evasion by human pathogens. **Nat Rev Microbiol**, v. 6, n. 2, p. 132-42, Feb 2008. ISSN 1740-1534. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18197169> >.

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

Leal, C. V. et al. Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Med Mycol**, v. 42, n. 4, p. 391-5, Aug 2004. ISSN 1369-3786. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15473367> >.

Leclerc, M. C.; Philippe, H.; Guého, E. Phylogeny of dermatophytes and dimorphic fungi based on large subunit ribosomal RNA sequence comparisons. **J Med Vet Mycol**, v. 32, n. 5, p. 331-41, 1994. ISSN 0268-1218. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7844699> >.

Lee, J. D.; Kolattukudy, P. E. Molecular cloning of the cDNA and gene for an elastinolytic aspartic proteinase from *Aspergillus fumigatus* and evidence of its secretion by the fungus during invasion of the host lung. **Infect Immun**, v. 63, n. 10, p. 3796-803, Oct 1995. ISSN 0019-9567. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7558282> >.

Lengeler, K. B. et al. Signal transduction cascades regulating fungal development and virulence. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 64, n. 4, p. 746-85, Dec 2000. ISSN 1092-2172. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11104818> >.

LENZI, H. L. et al. **Two patterns of extracellular matrix expression in experimental paracoccidioidomycosis** 2000. 6.

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. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23381992> >.

Lewis, K. Programmed death in bacteria. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 64, n. 3, p. 503-14, Sep 2000. ISSN 1092-2172. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10974124> >.

Lewis, L. A. et al. The meningococcal vaccine candidate neisserial surface protein A (NspA) binds to factor H and enhances meningococcal resistance to complement. **PLoS Pathog**, v. 6, n. 7, p. e1001027, 2010. ISSN 1553-7374. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20686663> >.

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

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

Lipp-Nissinen, K. **Molecular and Cellular Mechanisms of Agrobacterium-mediated Plant Transformation**. . 1993.

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

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

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

Lähteenmäki, K.; Kuusela, P.; Korhonen, T. K. Plasminogen activation in degradation and penetration of extracellular matrices and basement membranes by invasive bacteria. **Methods**, v. 21, n. 2, p. 125-32, Jun 2000. ISSN 1046-2023. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10816373> >.

Magee, P. T. et al. Molecular genetic and genomic approaches to the study of medically important fungi. **Infect Immun**, v. 71, n. 5, p. 2299-309, May 2003. ISSN 0019-9567. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12704098> >.

Magnani Dinamarco, T. et al. *Aspergillus fumigatus* calcineurin interacts with a nucleoside diphosphate kinase. **Microbes Infect**, v. 14, n. 11, p. 922-9, Sep 2012. ISSN 1769-714X. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22634424> >.

Mangiaterra, M. et al. Histoplasmin and paracoccidioidin skin reactivity in infantile population of northern Argentina (1). **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 38, n. 5, p. 349-53, 1996 Sep-Oct 1996. ISSN 0036-4665. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9293076> >.

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

Maresca, B.; Kobayashi, G. S. Dimorphism in *Histoplasma capsulatum* and *Blastomyces dermatitidis*. **Contrib Microbiol**, v. 5, p. 201-16, 2000. ISSN 1420-9519. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10863674> >.

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. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16151188> >.

McClelland, C. M.; Chang, Y. C.; Kwon-Chung, K. J. High frequency transformation of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* by *Agrobacterium tumefaciens*. **Fungal Genet Biol**, v. 42, n. 11, p. 904-13, Nov 2005. ISSN 1087-1845. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16260158> >.

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

McEwen, J. G. et al. In search of the natural habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Arch Med Res**, v. 26, n. 3, p. 305-6, 1995. ISSN 0188-4409. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8580685> >.

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. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16698299> >.

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

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

Mendes-Giannini, M. J. et al. 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. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17940851> >.

Mendes-Giannini, M. J. et al. 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. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7965489> >.

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

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

Menino, J. F.; Almeida, A. J.; Rodrigues, F. Gene knockdown in *Paracoccidioides brasiliensis* using antisense RNA. **Methods Mol Biol**, v. 845, p. 187-98, 2012. ISSN 1940-6029. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22328375> >.

Meri, T. et al. The yeast *Candida albicans* binds complement regulators factor H and FHL-1. **Infect Immun**, v. 70, n. 9, p. 5185-92, Sep 2002. ISSN 0019-9567. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12183569> >.

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. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23170962> >.

Meshulam, T. et al. A simplified new assay for assessment of fungal cell damage with the tetrazolium dye, (2,3)-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulphenyl)-(2H)-tetrazolium-5-carboxanil ide (XTT). **J Infect Dis**, v. 172, n. 4, p. 1153-6, Oct 1995. ISSN 0022-1899. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7561202> >.

Michielse, C. B. et al. Agrobacterium-mediated transformation leads to improved gene replacement efficiency in *Aspergillus awamori*. **Fungal Genet Biol**, v. 42, n. 1, p. 9-19, Jan 2005. ISSN 1087-1845. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15588992> >.

Michielse, C. B. et al. Agrobacterium-mediated transformation as a tool for functional genomics in fungi. **Curr Genet**, v. 48, n. 1, p. 1-17, Jul 2005. ISSN 0172-8083. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15889258> >.

Miller, D. L.; Weissbach, H. **Molecular mechanisms of protein synthesis**. 1977. 50.

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

Mohan, S. et al. Tuf of *Streptococcus pneumoniae* is a surface displayed human complement regulator binding protein. **Mol Immunol**, v. 62, n. 1, p. 249-64, Nov 2014. ISSN 1872-9142. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25046156> >.

Momany, M. Growth control and polarization. **Med Mycol**, v. 43 Suppl 1, p. S23-5, May 2005. ISSN 1369-3786. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16110788> >.

Monod, M. et al. Isolation and characterisation of an extracellular alkaline protease of *Aspergillus fumigatus*. **J Med Microbiol**, v. 35, n. 1, p. 23-8, Jul 1991. ISSN 0022-2615. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2072376> >.

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. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17120081> >.

Montenegro, M. R.; Franco, M. **Pathology**. 1994. 20.

Moss, J. E.; Aliprantis, A. O.; Zychlinsky, A. The regulation of apoptosis by microbial pathogens. **Int Rev Cytol**, v. 187, p. 203-59, 1999. ISSN 0074-7696. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10212981> >.

Mueller-Ortiz, S. L.; Drouin, S. M.; Wetsel, R. A. The alternative activation pathway and complement component C3 are critical for a protective immune response against *Pseudomonas aeruginosa* in a murine model of pneumonia. **Infect Immun**, v. 72, n. 5, p. 2899-906, May 2004. ISSN 0019-9567. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15102802> >.

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. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15972469> >.

Myöhänen, H.; Vaheri, A. Regulation and interactions in the activation of cell-associated plasminogen. **Cell Mol Life Sci**, v. 61, n. 22, p. 2840-58, Nov 2004. ISSN 1420-682X. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15558213> >.

Nam, J.; Matthyse, A. G.; Gelvin, S. B. Differences in susceptibility of *Arabidopsis* ecotypes to crown gall disease may result from a deficiency in T-DNA integration. **Plant Cell**, v. 9, n. 3, p. 317-33, Mar 1997. ISSN 1040-4651. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9090878> >.

Neuhoff, V. et al. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. **Electrophoresis**, v. 9, n. 6, p. 255-62, Jun 1988. ISSN 0173-0835. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2466658> >.

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. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20605975> >.

Nomura, M. Plasminogen activation by lactic acid bacteria. **Biosci Biotechnol Biochem**, v. 76, n. 8, p. 1459-62, 2012. ISSN 1347-6947. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22878187> >.

Obsilova, V. et al. 14-3-3 Protein interacts with nuclear localization sequence of forkhead transcription factor FoxO4. **Biochemistry**, v. 44, n. 34, p. 11608-17, Aug 2005. ISSN 0006-2960. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16114898> >.

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

Palmer, G. E. et al. Mutant alleles of the essential 14-3-3 gene in *Candida albicans* distinguish between growth and filamentation. **Microbiology**, v. 150, n. Pt 6, p. 1911-24, Jun 2004. ISSN 1350-0872. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15184577> >.

Panagio, L. A. et al. Early membrane exposure of phosphatidylserine followed by late necrosis in murine macrophages induced by *Candida albicans* from an HIV-infected individual. **J Med Microbiol**, v. 51, n. 11, p. 929-36, Nov 2002. ISSN 0022-2615. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12448676> >.

Pancholi, V.; Fischetti, V. A. A major surface protein on group A streptococci is a glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase with multiple binding activity. **J Exp Med**, v. 176, n. 2, p. 415-26, Aug 1992. ISSN 0022-1007. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1500854> >.

Paniago, A. M. et al. [Paracoccidioidomycosis: a clinical and epidemiological study of 422 cases observed in Mato Grosso do Sul]. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 36, n. 4, p. 455-9, 2003 Jul-Aug 2003. ISSN 0037-8682. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12937721> >.

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

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

Pedroso, V. S. et al. [Paracoccidioidomycosis compromising the central nervous system: a systematic review of the literature]. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 42, n. 6, p. 691-7, 2009 Nov-Dec 2009. ISSN 1678-9849. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20209357> >.

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. Available at: < <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. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21071542> >.

Perskvist, N. et al. Mycobacterium tuberculosis promotes apoptosis in human neutrophils by activating caspase-3 and altering expression of Bax/Bcl-xL via an oxygen-dependent pathway. **J Immunol**, v. 168, n. 12, p. 6358-65, Jun 2002. ISSN 0022-1767. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12055253> >.

Poolpol, K. et al. Interaction of Shiga toxin 2 with complement regulators of the factor H protein family. **Mol Immunol**, v. 58, n. 1, p. 77-84, Mar 2014. ISSN 1872-9142. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24317278> >.

Purtilo, D. T. et al. The immune system of the nine-banded armadillo (Dasypus novemcinctus, Linn). **Anat Rec**, v. 181, n. 4, p. 725-33, Apr 1975. ISSN 0003-276X. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1091181> >.

Qi, H.; Denning, T. L.; Soong, L. Differential induction of interleukin-10 and interleukin-12 in dendritic cells by microbial toll-like receptor activators and skewing of T-cell cytokine profiles. **Infect Immun**, v. 71, n. 6, p. 3337-42, Jun 2003. ISSN 0019-9567. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12761116> >.

Ram, S. et al. A novel sialic acid binding site on factor H mediates serum resistance of sialylated Neisseria gonorrhoeae. **J Exp Med**, v. 187, n. 5, p. 743-52, Mar 1998. ISSN 0022-1007. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9480984> >.

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. Available at: < <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. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23271509> >.

Rappleye, C. A.; Engle, J. T.; Goldman, W. E. RNA interference in *Histoplasma capsulatum* demonstrates a role for alpha-(1,3)-glucan in virulence. **Mol Microbiol**, v. 53, n. 1, p. 153-65, Jul 2004. ISSN 0950-382X. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15225311> >.

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

Restrepo, A. Morphological aspects of *Paracoccidioides brasiliensis* in lymph nodes: implications for the prolonged latency of paracoccidioidomycosis? **Med Mycol**, v. 38, n. 4, p. 317-22, Aug 2000. ISSN 1369-3786. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10975700> >.

Restrepo, A.; Jiménez, B. E. Growth of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast phase in a chemically defined culture medium. **J Clin Microbiol**, v. 12, n. 2, p. 279-81, Aug 1980. ISSN 0095-1137. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7229010> >.

Restrepo, A. et al. Estrogens inhibit mycelium-to-yeast transformation in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*: implications for resistance of females to paracoccidioidomycosis. **Infect Immun**, v. 46, n. 2, p. 346-53, Nov 1984. ISSN 0019-9567. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6500694> >.

Restrepo-Moreno, A. **Paracoccidioidomycosis**. 2003. 13.

Richarme, G. Protein-disulfide isomerase activity of elongation factor EF-Tu. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 252, n. 1, p. 156-61, Nov 1998. ISSN 0006-291X. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9813162> >.

Roberts, R. L.; Mösch, H. U.; Fink, G. R. 14-3-3 proteins are essential for RAS/MAPK cascade signaling during pseudohyphal development in *S. cerevisiae*. **Cell**, v. 89, n. 7, p. 1055-65, Jun 1997. ISSN 0092-8674. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9215628> >.

Rodríguez de Córdoba, S. et al. The human complement factor H: functional roles, genetic variations and disease associations. **Mol Immunol**, v. 41, n. 4, p. 355-67, Jun 2004. ISSN 0161-5890. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15163532> >.

Romani, L. Immunity to fungal infections. **Nat Rev Immunol**, v. 4, n. 1, p. 1-23, Jan 2004. ISSN 1474-1733. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14661066> >.

Rosenthal, L. P.; Bodley, J. W. Purification and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondrial elongation factor Tu. **J Biol Chem**, v. 262, n. 23, p. 10955-9, Aug 1987. ISSN 0021-9258. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3301847> >.

Rossi, L.; Hohn, B.; Tinland, B. Integration of complete transferred DNA units is dependent on the activity of virulence E2 protein of *Agrobacterium tumefaciens*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 93, n. 1, p. 126-30, Jan 1996. ISSN 0027-8424. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8552588> >.

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

Ruiz-Díez, B. Strategies for the transformation of filamentous fungi. **J Appl Microbiol**, v. 92, n. 2, p. 189-95, 2002. ISSN 1364-5072. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11849345> >.

Salamitou, S. et al. The plcR regulon is involved in the opportunistic properties of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus* in mice and insects. **Microbiology**, v. 146 (Pt 11), p. 2825-32, Nov 2000. ISSN 1350-0872. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11065361> >.

Salazar, M. E.; Restrepo, A.; Stevens, D. A. Inhibition by estrogens of conidium-to-yeast conversion in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **Infect Immun**, v. 56, n. 3, p. 711-3, Mar 1988. ISSN 0019-9567. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3343055> >.

Sambrook, J.; Fritsch, E. F.; Maniatis, T. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. New York: 1998.

San Blas, F.; Centeno, S. Isolation and preliminary characterization of auxotrophic and morphological mutants of the yeastlike form of *Paracoccidioides brasiliensis*. **J Bacteriol**, v. 129, n. 1, p. 138-44, Jan 1977. ISSN 0021-9193. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/830638> >.

San-Blas, F.; San-Blas, G.; Gil, F. Production and regeneration of protoplasts from the Y-phase of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **J Med Vet Mycol**, v. 32, n. 5, p. 381-8, 1994. ISSN 0268-1218. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7844703> >.

San-Blas, G.; Niño-Vega, G.; Iturriaga, T. *Paracoccidioides brasiliensis* and paracoccidioidomycosis: molecular approaches to morphogenesis, diagnosis, epidemiology, taxonomy and genetics. **Med Mycol**, v. 40, n. 3, p. 225-42, Jun 2002. ISSN 1369-3786. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12146752> >.

San-Blas, G.; San-Blas, F. *Paracoccidioides brasiliensis*: cell wall structure and virulence. A review. **Mycopathologia**, v. 62, n. 2, p. 77-86, Dec 1977. ISSN 0301-486X. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/340954> >.

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

Schaumburg, J. et al. **The cell wall subproteome of *Listeria monocytogenes***. *Proteomics*. 4: 15 p. 2004.

Schmidtchen, A. et al. Elastase-producing *Pseudomonas aeruginosa* degrade plasma proteins and extracellular products of human skin and fibroblasts, and inhibit fibroblast growth. **Microb Pathog**, v. 34, n. 1, p. 47-55, Jan 2003. ISSN 0882-4010. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12620384> >.

Schwartz, M. A. Integrins and extracellular matrix in mechanotransduction. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, v. 2, n. 12, p. a005066, Dec 2010. ISSN 1943-0264. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21084386> >.

Schwarz-Linek, U.; Höök, M.; Potts, J. R. The molecular basis of fibronectin-mediated bacterial adherence to host cells. **Mol Microbiol**, v. 52, n. 3, p. 631-41, May 2004. ISSN 0950-382X. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15101971> >.

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. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23555877> >.

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. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16906260> >.

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.

Silva-Vergara, M. L. et al. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillos (*Dasypus novemcinctus*) in an area where the fungus was recently isolated from soil. **Med Mycol**, v. 38, n. 3, p. 193-9, Jun 2000. ISSN 1369-3786. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10892986> >.

Simões, L. B.; Marques, S. A.; Bagagli, E. Distribution of paracoccidioidomycosis: determination of ecologic correlates through spatial analyses. **Med Mycol**, v. 42, n. 6, p. 517-23, Dec 2004. ISSN 1369-3786. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15682640> >.

Singh, B. et al. Human pathogens utilize host extracellular matrix proteins laminin and collagen for adhesion and invasion of the host. **FEMS Microbiol Rev**, v. 36, n. 6, p. 1122-80, Nov 2012. ISSN 1574-6976. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22537156> >.

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

Soares, R. e. B. et al. Hygromycin B-resistance phenotype acquired in *Paracoccidioides brasiliensis* via plasmid DNA integration. **Med Mycol**, v. 43, n. 8, p. 719-23, Dec 2005. ISSN 1369-3786. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16422302> >.

Souto, P. C. et al. Programmed cell death in thymus during experimental paracoccidioidomycosis. **Med Microbiol Immunol**, v. 192, n. 4, p. 225-9, Nov 2003. ISSN 0300-8584. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12687355> >.

Souza, A. R. et al. Anti-idiotypic antibodies in patients with different clinical forms of paracoccidioidomycosis. **Clin Diagn Lab Immunol**, v. 7, n. 2, p. 175-81, Mar 2000. ISSN 1071-412X. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10702489> >.

Stie, J.; Fox, D. Blood-brain barrier invasion by *Cryptococcus neoformans* is enhanced by functional interactions with plasmin. **Microbiology**, v. 158, n. Pt 1, p. 240-58, Jan 2012. ISSN 1465-2080. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21998162> >.

Strasser, A.; Cory, S.; Adams, J. M. Deciphering the rules of programmed cell death to improve therapy of cancer and other diseases. **EMBO J**, v. 30, n. 18, p. 3667-83, Sep 2011. ISSN 1460-2075. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21863020> >.

Sullivan, T. D.; Rooney, P. J.; Klein, B. S. Agrobacterium tumefaciens integrates transfer DNA into single chromosomal sites of dimorphic fungi and yields homokaryotic progeny from multinucleate yeast. **Eukaryot Cell**, v. 1, n. 6, p. 895-905, Dec 2002. ISSN 1535-9778. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12477790> >.

Superti, F. et al. Inv-mediated apoptosis of epithelial cells infected with enteropathogenic Yersinia: a protective effect of lactoferrin. **Res Microbiol**, v. 156, n. 5-6, p. 728-37, 2005 Jun-Jul 2005. ISSN 0923-2508. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15950128> >.

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. Available at: < <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. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14732047> >.

Szaniszlo, P. J.; Jacobs, C. W.; Geis, P. A. **Dimorphism: morphological and biochemical aspects**. 1983. 110.

Tamayo, D. et al. Involvement of the 90 kDa heat shock protein during adaptation of Paracoccidioides brasiliensis to different environmental conditions. **Fungal Genet Biol**, v. 51, p. 34-41, Feb 2013. ISSN 1096-0937. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23207691> >.

Theodoro, R. C.; Bagagli, E.; Oliveira, C. Phylogenetic analysis of PRP8 intein in Paracoccidioides brasiliensis species complex. **Fungal Genet Biol**, v. 45, n. 9, p. 1284-91, Sep 2008. ISSN 1096-0937. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18672080> >.

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. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23302787> >.

Toledo, M. S. et al. Glycolipids from Paracoccidioides brasiliensis. Isolation of a galactofuranose-containing glycolipid reactive with sera of patients with paracoccidioidomycosis. **J Med Vet Mycol**, v. 33, n. 4, p. 247-51, 1995 Jul-Aug 1995. ISSN 0268-1218. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8531023> >.

Torres, I. et al. Paracoccidioides brasiliensis PbP27 gene: knockdown procedures and functional characterization. **FEMS Yeast Res**, Oct 2013. ISSN 1567-1364. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24118983> >.

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

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

Tristano, A. G. et al. Central nervous system paracoccidioidomycosis: case report and review. **Invest Clin**, v. 45, n. 3, p. 277-88, Sep 2004. ISSN 0535-5133. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15469072> >.

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

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

van Burik, J. A. et al. Comparison of six extraction techniques for isolation of DNA from filamentous fungi. **Med Mycol**, v. 36, n. 5, p. 299-303, Oct 1998. ISSN 1369-3786. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10075499> >.

van Heusden, G. P. 14-3-3 proteins: regulators of numerous eukaryotic proteins. **IUBMB Life**, v. 57, n. 9, p. 623-9, Sep 2005. ISSN 1521-6543. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16203681> >.

van Heusden, G. P.; Steensma, H. Y. Yeast 14-3-3 proteins. **Yeast**, v. 23, n. 3, p. 159-71, Feb 2006. ISSN 0749-503X. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16498703> >.

Vanlaere, I.; Libert, C. Matrix metalloproteinases as drug targets in infections caused by gram-negative bacteria and in septic shock. **Clin Microbiol Rev**, v. 22, n. 2, p. 224-39, Table of Contents, Apr 2009. ISSN 1098-6618. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19366913> >.

Verstrepen, K. J.; Klis, F. M. Flocculation, adhesion and biofilm formation in yeasts. **Mol Microbiol**, v. 60, n. 1, p. 5-15, Apr 2006. ISSN 0950-382X. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16556216> >.

Verícimo, M. A. et al. Increased apoptosis during the early phase of experimental paracoccidioidomycosis as a phenotypic marker of resistance. **Microbes Infect**, v. 8, n. 12-13, p. 2811-20, Oct 2006. ISSN 1286-4579. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17045508> >.

Viale, M. N. et al. Description of a novel adhesin of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis. **Biomed Res Int**, v. 2014, p. 729618, 2014. ISSN 2314-6141. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25136616> >.

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. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8132354> >.

Vogel, H. et al. A comprehensive transcriptome and immune-gene repertoire of the lepidopteran model host *Galleria mellonella*. **BMC Genomics**, v. 12, p. 308, 2011. ISSN 1471-2164. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21663692> >.

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

Wanke, B.; Londero, A. T. Epidemiology and Paracoccidioidomycosis infection. In: Press, C. (Ed.). **Paracoccidioidomycosis**. London, 1994. p.109-117.

Weinrauch, Y.; Zychlinsky, A. The induction of apoptosis by bacterial pathogens. **Annu Rev Microbiol**, v. 53, p. 155-87, 1999. ISSN 0066-4227. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10547689> >.

Weiss, B.; Davidkova, G.; Zhou, L. W. Antisense RNA gene therapy for studying and modulating biological processes. **Cell Mol Life Sci**, v. 55, n. 3, p. 334-58, Mar 1999. ISSN 1420-682X. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10228554> >.

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

Wolff, D. G. et al. Interaction of Leptospira elongation factor Tu with plasminogen and complement factor H: a metabolic leptospiral protein with moonlighting activities. **PLoS One**, v. 8, n. 11, p. e81818, 2013. ISSN 1932-6203. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24312361> >.

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

Wong, D. K. et al. Identification of fur, aconitase, and other proteins expressed by Mycobacterium tuberculosis under conditions of low and high concentrations of iron by combined two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. **Infect Immun**, v. 67, n. 1, p. 327-36, Jan 1999. ISSN 0019-9567. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9864233> >.

Wood, D. W. et al. The genome of the natural genetic engineer Agrobacterium tumefaciens C58. **Science**, v. 294, n. 5550, p. 2317-23, Dec 2001. ISSN 0036-8075. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11743193> >.

Yamada, K. M.; Hahn, L. H.; Olden, K. Structure and function of the fibronectins. **Prog Clin Biol Res**, v. 41, p. 797-819, 1980. ISSN 0361-7742. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7465578> >.

Young, C. C.; Bernlohr, R. W. **Elongation factor Tu is methylated in response to nutrient deprivation in Escherichia coli**. Journal of Bacteriology. 173: 4 p. 1991.

Zaas, A. K. et al. Plasminogen alleles influence susceptibility to invasive aspergillosis. **PLoS Genet**, v. 4, n. 6, p. e1000101, Jun 2008. ISSN 1553-7404. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18566672> >.

Zheng, S. J. et al. Molecular characterization of transgenic shallots (*Allium cepa* L.) by adaptor ligation PCR (AL-PCR) and sequencing of genomic DNA flanking T-DNA borders. **Transgenic Res**, v. 10, n. 3, p. 237-45, Jun 2001. ISSN 0962-8819. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11437280> >.

Zipfel, P. F. et al. The complement fitness factor H: role in human diseases and for immune escape of pathogens, like pneumococci. **Vaccine**, v. 26 Suppl 8, p. I67-74, Dec 2008. ISSN 0264-410X. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19388168> >.

Zipfel, P. F.; Hallström, T.; Riesbeck, K. Human complement control and complement evasion by pathogenic microbes--tipping the balance. **Mol Immunol**, v. 56, n. 3, p. 152-60, Dec 2013. ISSN 1872-9142. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23810413> >.

Zipfel, P. F.; Skerka, C. Staphylococcus aureus: the multi headed hydra resists and controls human complement response in multiple ways. **Int J Med Microbiol**, v. 304, n. 2, p. 188-94, Mar 2014. ISSN 1618-0607. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24461453> >.

Zychlinsky, A.; Sansonetti, P. Perspectives series: host/pathogen interactions. Apoptosis in bacterial pathogenesis. **J Clin Invest**, v. 100, n. 3, p. 493-5, Aug 1997. ISSN 0021-9738. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9239394> >.

CAPÍTULO 2-

Artigos

1. Artigos elaborados durante a realização do Doutorado.

1.1. Artigo publicado: The multifaceted roles of metabolic enzymes of *Paracoccidioides* species complex.

Revista: Frontiers in Microbiology

frontiers in
MICROBIOLOGY

REVIEW ARTICLE
published: 19 December 2014
doi: 10.3389/fmicb.2014.00719



The multifaceted roles of metabolic enzymes in the *Paracoccidioides* species complex

Caroline M. Marcos, Haroldo C. de Oliveira, Julhiany de F. da Silva, Patricia A. Assato, Ana M. Fusco-Almeida and Maria J. S. Mendes-Giannini*

Laboratório de Micologia Clínica, Departamento de Análises Clínicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, Brazil

Edited by:

Helio K. Takahashi, Universidade Federal de São Paulo, Brazil

Reviewed by:

Marcelo Tolmasky, California State University, Fullerton, USA
Marcos Sergio Toledo, Universidade Federal de São Paulo, Brazil

*Correspondence:

Maria J. S. Mendes-Giannini, Laboratório de Micologia Clínica, Departamento de Análises Clínicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Rodovia Araraquara-Jaú, Km 1, Araraquara, São Paulo, Brazil
e-mail: mgiannini@fctc.unesp.br

Paracoccidioides species are dimorphic fungi and are the etiologic agents of paracoccidioidomycosis, which is a serious disease that involves multiple organs. The many tissues colonized by this fungus suggest a variety of surface molecules involved in adhesion. A surprising finding is that most enzymes in the glycolytic pathway, tricarboxylic acid (TCA) cycle and glyoxylate cycle in *Paracoccidioides* spp. have adhesive properties that aid in interacting with the host extracellular matrix and thus act as 'moonlighting' proteins. Moonlighting proteins have multiple functions, which adds a dimension to cellular complexity and benefit cells in several ways. This phenomenon occurs in both eukaryotes and prokaryotes. For example, moonlighting proteins from the glycolytic pathway or TCA cycle can play a role in bacterial pathogenesis by either acting as proteins secreted in a conventional pathway and/or as cell surface components that facilitate adhesion or adherence. This review outlines the multifunctionality exhibited by many *Paracoccidioides* spp. enzymes, including aconitase, aldolase, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, isocitrate lyase, malate synthase, triose phosphate isomerase, fumarase, and enolase. We discuss the roles that moonlighting activities play in the virulence characteristics of this fungus and several other human pathogens during their interactions with the host.

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

INTRODUCTION

A great challenge in studying proteins is understanding how encoded proteins function and interact with each other to coordinate essential cellular processes. Although many protein roles can be inferred by homology-based function predictions, this approach may be complicated for multifunctional proteins. The notion that one gene encodes one protein and results in only one function is outdated because proteins may have multiple functions (including on a single polypeptide chain), and the function may change based on external signals (Kirschner and Bisswanger, 1976; Jeffery, 1999; Wolff and Arnau, 2002; Jeffery, 2009; Pandini et al., 2012; Wienkers and Rock, 2014).

and the cellular levels of a ligand, substrate, cofactor, product, or different binding sites (Jeffery, 2003a); moonlighting cannot be attributed to hybrid genes, which are single genes that code for multiple proteins or polypeptides that express different functions after protease cleavage (Kainulainen and Korhonen, 2014). Moonlighting functions have been demonstrated by multiple independent studies with unexpected phenotypes, locations, and binding partners (Copley, 2012).

The steady increase in new proteins characterized as multifunctional supports the potential importance of in-depth studies on the mechanism underlying these moonlighting functions in the same cell. (Chung et al., 1999; Jeffery, 1999, 2003a). Moonlighting may

1.2. Artigo submetido para publicação: Decrease in *Paracoccidioides brasiliensis* 14-3-3 expression confirms its involvement in fungal pathogenesis

Revista: Fungal Genetics and Biology

Title: Decrease in *Paracoccidioides brasiliensis* 14-3-3 expression confirms its involvement in fungal pathogenesis

Caroline Maria Marcos^a, Julhiany de Fátima da Silva^a, Haroldo Cesar de Oliveira^a, Patrícia Akemi Assato^a, Angela Maria Lopez^b, Diana Patricia Tamayo^b, Orville Hernandez Ruiz^{b,c}, Juan G. McEwen^{b,d}, Maria José Soares Mendes Gianinni^a and Ana Marisa Fusco Almeida^{a*}

^a Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, FCFAr, - Univ Estadual Paulista - UNESP – Araraquara, Departamento de Análises Clínicas, SP, Brazil

^b Unidad de Biología Celular y Molecular, Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB) - Medellín, Colombia

^c Escuela de Microbiología. Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

^d Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

marcos_caroline@yahoo.com.br; julhiany.silva@gmail.com;
haroldocdoliveira@gmail.com; patricia.assato@gmail.com;
angelusmaria15@hotmail.com; dianaapto3@hotmail.com; orvillehr@hotmail.com;
mcewen@une.net.co; giannini@fcfar.unesp.br; ana.marisa@uol.com.br

* **corresponding author:** Ana Marisa Fusco Almeida

e-mail address: ana.marisa@uol.com.br

Tel.: +55 (16) 33014638

Address: Rodovia Araraquara-Jaú, km 1

Araraquara - São Paulo - Brazil

CEP - 14800-901

Abstract

The interaction between the fungal pathogen *Paracoccidioides brasiliensis* and host cells is usually mediated by specific binding events between adhesins on the fungal surface and receptors on the host extracellular matrix or cell surface. One of the molecules implicated in the *P. brasiliensis*-host interaction is the 14-3-3 protein. The 14-3-3 protein belongs to a family of conserved regulatory molecules that are expressed on all eukaryotic cells and are involved in diverse cellular functions. Here, we investigated the relevance of the 14-3-3 protein to the virulence of *P. brasiliensis*. Through the use of antisense RNA technology and *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation, we generated a 14-3-3-silenced strain (expression reduced \pm 55%). This strain allowed us to confirm the interaction between 14-3-3 and the host, and correlate the functions of *P. brasiliensis* 14-3-3 with cellular processes such as morphological characteristics and virulence that are important for pathogenesis.

Key words: *Paracoccidioides brasiliensis*, 14-3-3 protein, gene knockdown, virulence, morphological alterations

Highlights

- Reduced Pb14-3-3 expression not alters yeast cell viability and growth rate
- Pb14-3-3 is important to maintenance of yeast morphology
- Reduced Pb14-3-3 leads to decreased adhesion to pneumocytes and extracellular matrix
- Pb14-3-3 influences the virulence.

Abbreviations

Pb14-3-3, *Paracoccidioides brasiliensis* 14-3-3

aRNA, antisense RNA

ATMT, *Agrobacterium-tumefaciens*-mediated transformation

PCM, paracoccidioidomycosis

1 Introduction

Paracoccidioidomycosis (PCM) is an infection caused by fungi of the *Paracoccidioides* species complex (*P. brasiliensis* and *P. lutzii*) that is important due to the frequency and severity of some of its anatomical and clinical forms (Lacaz, 1994). The disease is geographically limited to Latin America, ranging from Mexico to Argentina, with a high incidence rate in Brazil (80%) (Restrepo *et al.*, 2001, Colombo *et al.*, 2011). *P. brasiliensis* is a thermal dimorphic fungus that grows both as a yeast (at approximately 37°C) and as a filamentous fungi (below 25°C). In the lungs and in contact with the host body temperature, the inhaled conidia produced by the mycelial form of the fungi transitions to its yeast form (Bocca *et al.*, 2013). The yeast form is often necessary for the expression of virulence factors and is important for the establishment of infection (San-Blas *et al.*, 2002, Berman, 2006). The process of development and the course of the microbial infection can be considered as a result of the interaction between the virulence factors of the pathogen and the host's ability to prevent and resist microbial colonization or invasion (Hube & Naglik, 2001).

P. brasiliensis has developed pathogenic mechanisms such as the ability to adhere, colonize, disseminate, and survive intracellularly within a specific host cell type. These mechanisms allow the fungi to evade the immune response allowing the establishment in the host and cause disease (Franco, 1987b, Kurokawa *et al.*, 1998, VAN DE Wouw & Howlett, 2011). Therefore, the pathogen uses a large repertoire of surface molecules capable of binding to the extracellular matrix (ECM) of different cell types, including normally non-phagocytic host cells such as epithelial and endothelial cells, during the invasion process (Filler & Sheppard, 2006). Indeed, *P. brasiliensis* has been demonstrated to adhere to epithelial cells, resulting in endocytosis (Mendes-Giannini *et al.*, 2004).

An important aspect of the interaction between *P. brasiliensis* and the host is the fungi's ability to adhere to extracellular matrix components (ECM). This interaction has been correlated with the adhesion and invasion processes. The ECM is composed of components such as collagen, laminin, fibronectin, vitronectin and proteoglycans that participate in the regulation of physiological processes including cell migration, signaling and the transport of solutes across cellular barriers. The ECM surrounds epithelial cells, endothelial cells, and connective tissues and is present in many organs and tissues in mammals (Hynes, 2009). The

respiratory tract, the primary focus of PCM, is composed of tissues rich in ECM, such as laminin and various types of collagen. Moreover, alveolar fibroblasts in the lungs secrete extracellular matrix components (Amenta *et al.*, 1988, Herzog *et al.*, 2008, Schwartz, 2010, Geiger & Yamada, 2011).

The molecular mechanisms involved from the first contact with the infectious agent to the subsequent stages of the disease have been the subject of intense investigation. A required step for colonization and ultimately the development of disease is the ability of pathogens to adhere to host surfaces. The ability to adhere is a biological phenomenon that is widely distributed and shared by many pathogens that enables colonization of their respective habitats. Successful colonization is generally a complex event that involves cell-surface components called adhesins that interact with host cell receptors (Sohn *et al.*, 2006, Bhavsar *et al.*, 2010).

Some adhesins have been described for *P. brasiliensis*, such as gp43 (Vicentini *et al.*, 1994, Hanna *et al.*, 2000, Torres *et al.*, 2013b), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (Barbosa *et al.*, 2006), triose phosphate isomerase (Pereira *et al.*, 2007), enolase (Donofrio *et al.*, 2009, Nogueira *et al.*, 2010, Marcos *et al.*, 2012), a 32-Kda hydrolase (González *et al.*, 2005, Hernández *et al.*, 2010), malate synthase (da Silva Neto *et al.*, 2009), isocitrate lyase (Zambuzzi-Carvalho *et al.*, 2009, Cruz *et al.*, 2011), PbDfg5p (da Silva Castro *et al.*, 2008) and the 14-3-3 protein (30 KDa) (Andreotti *et al.*, 2005, da Silva *et al.*, 2013); this last adhesin is the focus of this study.

Strong evidence has resulted in the classification of the 14-3-3 protein of *P. brasiliensis* as an adhesin, including its ability to bind laminin and its association with virulent isolates of the fungus (Andreotti *et al.*, 2005). Additionally, immunocytochemical studies demonstrated the ubiquitous distribution of the 14-3-3 protein in the yeast form of *P. brasiliensis* using both *in vitro* and *in vivo* models. A significant increase in the amount of 14-3-3 was observed in the fungal cell wall during interaction with pneumocytes and in an experimental acute infection in mice. Inhibition assays using the recombinant 14-3-3 protein and anti-14-3-3 antibody to study the interaction of *P. brasiliensis* with pneumocytes reported a reduction in the rate of adherence at different stages during infection, suggesting an important role for 14-3-3 in fungus-pathogen interactions (da Silva *et al.*, 2013).

The aim of this study was to develop an isolate of *P. brasiliensis* with low expression of the 14-3-3 protein using antisense RNA technology. We used transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens* to elucidate the role of this protein in *P. brasiliensis* pathogenesis by investigating its biological function and involvement in virulence. To date, these factors have not yet been described for this fungus.

2 Materials and Methods

2.1 Strains and growth conditions

For this study we used yeasts cells of *P. brasiliensis* Pb18. The fungus was grown in BHI media supplemented with 1% glucose (Beckton Dickinson and Company, Sparks, MD) at 37°C with aeration in a mechanical shaker and was collected during the early exponential phase (72-96 h).

Selection of *P. brasiliensis* transformants was performed in BHI solid media supplemented with 200 µg mL⁻¹ hygromycin B (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) after a 15-day incubation period

at 37°C. *Escherichia coli* DH5α grown in Luria Bertani (LB) supplemented with appropriate antibiotics at 37°C was used for cloning and propagation of the plasmids (Sambrook *et al.*, 1998). *Agrobacterium tumefaciens* strain LBA1100 (Beijersbergen *et al.*, 1992) was used to carry the binary vector used in this study; recombinant *A. tumefaciens* was maintained in LB medium supplemented with 100 µg mL⁻¹ kanamycin.

2.2 Obtaining silenced 14-3-3 *P. brasiliensis*

We followed the anti-sense strategy and *A. tumefaciens*-mediated transformation protocol described previously by Almeida *et al.* (2007) and Ruiz *et al.* (2011) to obtain *P. brasiliensis* mutants with silenced Pb14-3-3. Based on the genomic sequence from Pb18 (PbWt) (GenBank accession number AY462124), we amplified three anti-sense oligonucleotides designated as AS1, AS2 and AS3. Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen, USA) and the anti-sense oligonucleotides (Table 1) were employed to amplify aRNA from *PbWT* 14-3-3 DNA. These fragments were inserted into the pCR35 plasmid under the control of the promoter region of the calcium-binding protein gene (CBP-1) from *Histoplasma capsulatum* (Rappleye *et al.*, 2004) and propagated in *E. coli* DH5α. The CBP-1 promoter-AS cassette was subcloned into the pUR5750 plasmid, allowing the parental binary vector to harbor the transferred DNA (T-DNA) with the antisense molecule. *P. brasiliensis* yeast transformed with an empty vector (PbEV) was used as a Pb18 recombination control as previously described (Almeida *et al.*, 2009, Hernández *et al.*, 2010). Following transformation, the cells were spread onto selective BHI media supplemented with 200 µg mL⁻¹ hygromycin B. Prior to incubation, the plates were air-dried in a safety cabinet for 30 min. The selection plates were monitored for colony transformation and for colony-formatting ability at 36°C for 15-20 days (Almeida *et al.*, 2009). Randomly selective hygromycin-resistant transformants were tested for mitotic stability.

Primer name	Primer sequence 5'-3'
AS1 Pb14-3-3-F Pb14-3-3-R	CCGCTCGAGCGGATGGTGGAAAACATGAAGA GGCGCGCCACGTCGGGCGCCAATCACG
AS2 Pb14-3-3-F Pb14-3-3-R	CCGCTCGAGCGGGCCTATAAGAACGTGATTG GGCGCGCCCTCCTTGATAAGAGCAACCT
AS3 Pb14-3-3-F Pb14-3-3-R	CCGCTCGAGCGGAAGGGGGACTACCACCGCT GGCGCGCCCTGAGCAACCTCAGTTGCAT

2.3 Molecular detection of the hygromycin resistance gene (*HPH*)

Genomic DNA from PbWT, PbEV and Pb14-3-3 aRNA yeast cells was isolated according to the glass beads protocol described by van Burik *et al.*, (van Burik *et al.*, 1998). To confirm the presence of the hygromycin B resistance cassette, a PCR amplification was performed to detect the HPH 1000-bp amplification product using primers *hphF* (5'-AACTCACCGCGACGTCTGTCTCGA-3') and *hphR* (5'-CTACACAGCCATCGGTCCAGA-3'). The PCR included 40 cycles of 10 min at 94°C for denaturing, 1 min at 56°C for annealing and 1 min at

65°C for extension. The reaction products were analyzed in 1% agarose gels and visualized with GelRed under UV light.

2.4 Gene expression analysis

Total RNA was obtained from PbWT, PbEV and Pb14-3-3 aRNA yeast cells using the TRIzol® reagent (Invitrogen). cDNA synthesis was performed with RevertAid H minus reverse transcriptase (Thermo Scientific) according to the manufacturer's instructions. cDNAs were subjected to a qRT-PCR reaction to measure Pb14-3-3 expression levels; this reaction was performed using Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix according to the manufacturer's instructions (Fermentas®) in a 7500 Cyclor Real time System (Applied Biosystems®). Pb14-3-3 expression was evaluated in PbWT, PbEV and Pb14-3-3 aRNA yeast cells; β -tubulin was selected as the endogenous control (Goldman *et al.*, 2003). The sequences of the oligonucleotide primer used for the amplification are provided in Table 2. Melting curve analysis was performed after the amplification phase to eliminate the possibility of nonspecific amplification or primer-dimer formation. Fold changes in mRNA expression were calculated using the $2^{\Delta\Delta C_T}$ formula, where $\Delta\Delta C_T$ is the difference between the target gene and β -tubulin (Livak & Schmittgen, 2001). Each experiment was performed in triplicate, and the expression levels were measured three times.

Primer name	Primer sequence 5'-3'
Pb14-3-3RT-F	AATCTGCTTTCCGTTGCCTA
Pb14-3-3RT-R	GTTTTGGCGGTACTCCTTGA
β -tubulin-F	GTGGACCAGGTGATCGATGT
β -tubulin-R	ACCCTGGAGGCAGTCACA

2.5 Western blotting

SDS-PAGE was performed according to Laemmli (1970). For Western blotting experiments, proteins were transferred onto nitrocellulose membranes (Hybond-C extra, Amersham Biosciences®) as described by Sambrook *et al.*, (1998). The membranes were blocked with a solution containing PBS, 5% skim milk and 1% bovine serum albumin (BSA) for 4 h at room temperature. After three washings with PBS, the membranes were incubated with the polyclonal anti-14-3-3 (diluted 1:100) (da Silva *et al.*, 2013) and monoclonal anti-14-3-3 (Imuny®, diluted 1:500) antibodies overnight. The anti-IgG secondary antibody conjugated with peroxidase (Sigma®) diluted 1:1000 was added after further washing, and the 14-3-3 protein was visualized by adding 3,3' diaminobenzidine and hydrogen peroxide as a substrate.

2.6 Growth curve and viability assays

Growth curves were performed in BHI broth (100 mL) inoculated with 48-h cultures (1×10^8 washed cells). Cellular density was measured in triplicate at 3, 6, 12, 24, 48, 72, 120 and 144 h of growth using a spectrophotometer at 600 nm (Genesys 10 μ v, Thermo Scientific®) (Tamayo et al., 2013, Torres et al., 2013b).

Viability was assessed by measuring the metabolic activity of 2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfphenyl)-(2H)-tetrazolium-5-carboxanilide (XTT) in a reduction assay. Individual inoculums of PbWT, PbEV and Pb14-3-3 aRNA with 10^6 cells mL^{-1} , 50 μL of XTT salt solution (1 mg mL^{-1} in PBS, Sigma) and 4 μL of menadione solution (1 mM in acetone; Sigma) were added to develop the reaction. Microtiter plates were incubated at 37°C for 5 h. Fungal mitochondrial dehydrogenase activity reduces XTT tetrazolium salt to XTT formazan, resulting in a colorimetric change that correlates with cell viability. The colorimetric change was measured using a microtiter plate reader (Kasvi®) at 492 nm. In all experiments, microtiter wells containing heat-killed *P. brasiliensis* and minimal medium alone were included as negative controls (Meshulam et al., 1995).

2.7 Microscopy

The yeast cell morphology of PbWT, PbEV and Pb14-3-3 aRNA was evaluated. The yeasts were grown under standard conditions to exponential phase as described above, collected, washed with PBS, resuspended in 5 μL of a 5 mM solution of Calcofluor White M2R® (Life Technologies), and observed under a Leica DMLB fluorescence microscope equipped with a mercury lamp, optic filters (436/7 nm) for UV light excitation, and a 40X objective. A DFC350FX Leica camera was used for image capture.

2.8 Adherence of *P. brasiliensis* to pneumocytes

The infection assays were performed in 24-well plates. Pneumocyte monolayers (A549 cells) were cultured for approximately 24 h in HAM-F12 medium (Cultilab). Then, these monolayers were washed and infected with 10^5 cells mL^{-1} of PbWT, PbEV and Pb14-3-3 aRNA yeast cells previously stained for 30 min at 37°C with 100 μM mL^{-1} of CFSE (5,6 – carboxyfluorescein diacetate N-succinimidyl ester) (BioChemika). The infected cells were incubated for 2 h, 5 h, 8 h and 24 h at 37°C. Subsequently, after each incubation period, the cells were washed with PBS to remove non-adherent cells, trypsinized, and fixed in 4% paraformaldehyde. The adherence index was determined by flow cytometry using a FACsCanto™ (Becton Dickinson); uninfected cells and unlabeled yeast were used as internal controls to define the gates and for self-fluorescence evaluation. The excitation wavelength was 488 nm, and emitted light was collected via the 530/30 nm band pass-filter. Data were processed and analyzed using the FACsDiva software program. The assays were performed in triplicate, and the median results were expressed as the percentage of fluorescent cells per 10,000 events.

2.9 Ligand affinity of *P. brasiliensis* to ECM components

Next, 96-well polypropylene ELISA microtiter plates (Corning®) were sensitized with ECM proteins (10 μg mL^{-1}) in carbonate buffer (pH 9.6) for 1 h at room temperature. After blocking with 1% BSA (w/v) and 0.05% PBS-Tween, the plates were incubated individually with 5×10^6 cells mL^{-1} of PbWT and Pb14-3-3 aRNA for 15 h at 37°C in triplicate wells. The cells were washed, and then anti-cell free antibody (1:100) in 0.5% BSA and 0.05% PBS-Tween was added

for 1 h at 37°C. Anti-rabbit IgG conjugated with peroxidase (1:2000; Sigma®) in 0.05% BSA and 0.05% PBS-Tween was added for 1 h at 37°C. The reaction was developed using citrate (pH 4.9) conjugated with o-phenylenediamine as a chromogenic substrate. Negative controls were performed by incubating the matrix with the primary and secondary antibodies alone and with 0.05% BSA. The absorbance was measured at 490 nm, and the results were analyzed using GraphPad Prism® software.

2.10 Evaluation of the virulence of *P. brasiliensis* using the *Galleria mellonella* model

Galleria mellonella larvae (n=16) weighing from 0.1 to 0.2 g were selected and used for the virulence assay. *P. brasiliensis*, PbWT, PbEV and Pb14-3-3 aRNA yeast cells were harvested at the exponential phase of growth in BHI liquid medium at 37°C. Prior to the infection, the cells were washed thrice with PBS, passed through a syringe to eliminate cells clumps, and an inoculum of 5×10^6 cells mL⁻¹ (an inoculum lethal for the *P. brasiliensis* WT strain) was prepared in PBS. A total of 10 µL was inoculated into the larvae through the last left proleg. Each experiment was repeated three times. One additional group of larvae was inoculated with PBS to monitor effects on survival due to physical injury, while another group was used as an untreated control. After the infection, the larvae were incubated in Petri dishes at 37°C for 7 days and checked daily for mortality (Thomaz et al., 2013, Scorzoni et al., 2013)

2.11 Statistical analysis

One-way ANOVA with Tukey's coefficient was used to analyze the results obtained in this study. The results of the statistical analyses were considered significant when the p value was <0.05. The analyses and graphs constructions were performed using the software Prism 5 (GraphPad Software Inc.).

For the survival curves, statistical analyses from the results of three independent experiments were performed using the Mantel-Cox test in GraphPad Prism software with the p-value set at p <0.05.

3 Results

3.1 Knockdown of Pb14-3-3 expression

Using antisense (aRNA) technology and *A. tumefaciens*-mediated transformation (ATMT), we generated the Pb14-3-3 aRNA strain to study the role of 14-3-3 in *P. brasiliensis*. We tested cassettes containing three different aRNA oligonucleotides (AS1, AS2, and AS3): one directed against exon 2 (109-bp) and two directed against exon 1 (106-bp and 111-bp) (Fig. 1A). We confirmed the integration of the hygromycin cassette into the genomic DNA of one hygromycin-resistant transformant (Fig. 1B). To pursue our main goals in this work, we selected a mitotically stable isolate with the highest decrease in Pb14-3-3 expression ($\pm 55\%$) confirmed by RT-qPCR. The reduction in the mRNA transcripts levels of Pb14-3-3 was confirmed even after 12 months of successive subcultures of Pb14-3-3 aRNA (Fig. 1C). Next, SDS-PAGE under reducing conditions and immunoblotting (Fig. 1D) were performed with polyclonal rabbit anti-14-3-3 antiserum (da Silva et al., 2013) (Fig. 1E) and monoclonal anti-14-3-3 (Imuny®); the recombinant protein was used as the control. The results demonstrated that the Pb14-3-3 aRNA strain expressed lower levels of the protein.

3.2 **Pb14-3-3 silencing affects yeast cell morphology without affecting cell viability or fungal growth**

Microscopic observations indicated that *Pb14-3-3* aRNA yeast cells were more elongated than the wild-type and cells harboring the empty vector (Fig. 2C). The decrease in expression of *Pb14-3-3* did not alter the yeast cell vitality or viability. Moreover, no significant differences between the *Pb14-3-3* aRNA strain and the control were detected during batch culture growth of yeast cells (Fig. 2A). We also studied the viability of *Pb14-3-3* aRNA and PbWt yeast cells at different time points during batch culture. We calculated the percentage of live cells in each test strain based on the OD measured from the dead control cells (Fig. 2B) and found no major differences in either viability or cell growth throughout the assays.

3.3 **Differential adherence kinetics of Pb14-3-3 aRNA**

To elucidate the role of *Pb14-3-3* in the adherence of *P. brasiliensis* to host cells, we infected the A549 epithelial human lung cell line with PbWT, PbEV and *Pb14-3-3* aRNA strain yeast cells. After 2 h of interaction, the adherence of *Pb14-3-3* aRNA yeast cells was significantly decreased ($\pm 90\%$). It was also possible to observe a reduction in adherence after 5 h of incubation (± 49.7); however, at the later evaluated time points the adherence index of *Pb14-3-3* aRNA was similar to the adhesion of PbWT (Fig. 3).

3.4 **14-3-3 of *P. brasiliensis* is important for binding to ECM proteins**

The influence of *Pb14-3-3* to binding to ECM proteins was evaluated using the ELISA assay. The results showed that *Pb14-3-3* aRNA had a significant reduction in binding to laminin (28%) followed by fibronectin (14%) (Fig. 4).

3.5 **Pb14-3-3 is an important virulence factor for *P. brasiliensis***

The relevance of *Pb14-3-3* during the host-pathogen interaction was further evaluated using a *G. mellonella* model of infection. Larvae infected with the *P. brasiliensis* control strain (PbWT) started to die at day 3, with an average survival time of 5 days. In contrast, larvae infected with the *Pb14-3-3* aRNA strain started to die at day 3, with an average survival time of 7 days. The percentage of survival of larvae infected with *Pb14-3-3* aRNA was 35% (Fig. 5). No significant difference was observed between PbEV and PbWT (Fig. 5).

4 **Discussion**

Antisense RNA silencing has proven to be a strong molecular biological tool to study the functions of cellular genes and identify the genetic factors that govern virulence and the polymorphic nature of *P. brasiliensis* (Menino *et al.*, 2012, Hernández *et al.*, 2012, Tamayo *et al.*, 2013, Torres *et al.*, 2013a, Torres *et al.*, 2013b). Previous studies focused on the elucidation of the function of the 14-3-3 protein in the pathogenesis of *P. brasiliensis* (da Silva *et al.*, 2013, Andreotti *et al.*, 2005). These studies were limited to the use of the 14-3-3 recombinant protein and the antibody anti-14-3-3, and therefore indirectly explored the role of 14-3-3 without manipulation of gene expression. This is the first report using a strain of *P. brasiliensis*

with a reduction in 14-3-3 transcripts and protein levels to elucidate its role in host-pathogen interactions and the biology and virulence of *P. brasiliensis*.

The Pb14-3-3 aRNA silenced strain of *P. brasiliensis* was used in all of the experiments, with PbWT and PbEV serving as the controls. The reduction in both gene and protein expression levels by strain Pb14-3-3 aRNA was confirmed prior to its experimental use. The silenced strain demonstrated a yeast cell viability and growth rate similar to the controls, confirming that strain Pb14-3-3 aRNA was viable. Based on these results, we can hypothesize that this protein is not important for fungal metabolism. In contrast, our results suggest a role in fungal adherence with an effect on virulence.

Interestingly, the decreased expression of the Pb14-3-3 gene affected the morphology of yeast cells maintained at 37° C, resulting in a more elongated yeast cell with the presence of filamentation. Previous studies with dimorphic fungi such as *P. brasiliensis* have demonstrated that these fungi require this feature for efficient adherence and invasion of the host to establish infection (Böhmer *et al.*, 2007). Morphological transitions in dimorphic fungi are a highly complex event triggered by a wide range of environmental factors and consist of a reversible change in the growth pattern alternating between the unicellular yeast form and the filamentous form (hyphae and pseudohyphae) (Hurtado & Rachubinski, 2002). Understanding the mechanisms that regulate these events is of extreme interest due to its implications for pathogenesis and cell differentiation, as observed for the inhibition of the transition to the parasitic form caused by the female hormone estrogen (Aristizabal *et al.*, 1998). The Bmph1p and Bmph2p proteins in *Saccharomyces cerevisiae* are homologous to 14-3-3 and regulate pseudohyphal growth through the MAPK (mitogen-activated protein kinase) pathway cascade. This interaction has been shown to regulate fungal morphogenesis (Roberts *et al.*, 1997). Kraus *et al.* (2002) demonstrated that the ArtA protein of *Aspergillus nidulans*, which also has high homology to the 14-3-3 protein, is involved in preventing septum formation; additionally 14-3-3 was shown to be involved in the filamentation of other dimorphic fungi such as *Candida albicans* (Palmer *et al.*, 2004) and *Yarrowia lipolytica*. In this microorganism, the filamentous growth is proportional to the level of expression of the 14-3-3 protein (Hurtado & Rachubinski, 2002). The evidence presented in this study demonstrated that reduced 14-3-3 expression induced morphological alterations, suggesting that the protein plays an important role in maintaining the yeast form in *P. brasiliensis*, thereby contributing to its virulence. However, the specific mechanism by which the obtained gene silencing was able to generate morphological changes was not elucidated in the present study; therefore, further investigation is necessary to identify the involved mechanism.

The ECM is composed of a wide variety of proteins and polysaccharides that are secreted locally and form an organized and complex network of macromolecules. The ECM provides a physical framework to stabilize the tissue structures modulating the behavior of cells. The matrix remains in close association with the cell surfaces that produces it (Jong *et al.*, 2008). The major classes of macromolecules present in the ECM are the polysaccharide chains from the glycosaminoglycans usually found attached to proteins forming proteoglycans, fibrous proteins that play structural roles (i.e., collagen), and adhesive proteins (i.e., fibronectin and laminin) (Verstrepen & Klis, 2006). Many molecular interaction events and the subsequent establishment of infection that occurs between the pathogenic fungi and host are mediated by fungal adhesion surface proteins that are capable of binding to the host cell ECM (Lengeler *et al.*, 2000). Mendes-Giannini *et al.*, (2006) observed a relationship between virulence and adherence to the ECM when comparing several *P. brasiliensis* isolates that showed different levels of virulence *in vivo*; the authors demonstrated that the isolate Pb18 that was recently isolated from an animal had a greater ability to adhere to ECM components. Confirming the results of Andreotti *et al.*, (2005), we demonstrated that low expression of

Pb14-3-3 resulted in a reduction of binding to laminin; this interaction was assessed by ELISA, which has greater sensitivity and specificity than the immunoblotting that was performed in the study cited above. Additionally, the Pb14-3-3 protein has been reported to interact with other ECM component, the fibronectin, suggesting that Pb14-3-3 is likely involved in the virulence of *P. brasiliensis* through interaction with ECM components. This interaction represents a critical step in the adherence and invasion of host tissues.

P. brasiliensis uses a sequence of different mechanisms to establish successful infections, beginning with the first contact with host cells and extending through the later stages of disease (André *et al.*, 2004, Franco, 1987a, Kurokawa *et al.*, 2005). The reduced initial adhesion observed in this study suggested that the Pb14-3-3 gene products had major influences on initial adhesion, but that their requirement was bypassed following extended contact with the host cell. Together, these data suggest that the primary adhesion of *P. brasiliensis* to pneumocytes relies on a combination of factors, including GTPase signaling and the expression of appropriate adhesins, but that the defects elicited by the over-expression of a single gene are compensated for by prolonged contact. The pathogenesis triggered by *P. brasiliensis* has been extensively studied over last the few years. Knowledge about the virulence mechanisms of this pathogen is increasing and has led to a comprehensive study of different isolates (Kurokawa *et al.*, 2005, Brito, 2012). Additional virulence determinants, such those encoded by adhesins, have also been the focus of study and have been reported to contribute to successful infection (Khan *et al.*, 2010). The huge armamentarium of virulence factors is under control of an extremely complicated regulatory network that coordinates and synchronizes all of the elements involved (Fàbrega & Vila, 2013). This regulation is important not only from the point of view of guaranteeing the expression of individual virulence elements but also to confer cross-talk between these determinants to ensure the appropriate response of the fungus in which all of the stages are activated following a temporal hierarchy.

To verify the importance of the Pb14-3-3 protein to the virulence of *P. brasiliensis*, we used the invertebrate infection model *Galleria mellonella*. This is an interesting model because it has a relatively low cost and does not require specialized maintenance (Fuchs *et al.*, 2010a, Fuchs *et al.*, 2010b). Currently, this model is widely used to screen virulence mechanisms and to estimate changes in virulence after disruption or genetic interference. Because it has been shown that the responses to infection in insects and mammals are highly similar (Jander *et al.*, 2000, Cotter *et al.*, 2000, Salamitou *et al.*, 2000), this method has allowed a reduction in the number of mammals used for testing. Furthermore, Vogel *et al.* (2011) demonstrated the presence of three *toll-like* receptor transcripts and a large number of antimicrobial peptides and proteins involved in the effector immune spectrum in *G. mellonella*.

Several studies have demonstrated that *G. mellonella* is a well-established model to evaluate fungal virulence (Brennan *et al.*, 2002, Mylonakis *et al.*, 2005, Fuchs *et al.*, 2010a, García-Rodas *et al.*, 2011, Coleman *et al.*, 2011, Lev *et al.*, 2013, Mesa-Arango *et al.*, 2013, Magnani Dinamarco *et al.*, 2012, Jacobsen, 2014, Firacative *et al.*, 2014), including *P. lutzii*, another species belonging to the *Paracoccidioides* species complex (Thomaz *et al.*, 2013).

Our data showed that the decreased expression level of Pb14-3-3 resulted in a significant reduction of the virulence phenotype, as reflected in the increased survival of larvae infected with yeast strain Pb14-3-3 aRNA. Therefore, the silenced isolate was considered less virulent compared to *P. brasiliensis* WT. These data support the hypothesis that Pb14-3-3 is involved in the pathogenicity of *P. brasiliensis*.

A panel of isogenic mutants to the 14-3-3 protein (Bmh1p) of *C. albicans* was used to verify that specific mutations affected different pathways associated with virulence, including

those involved with the formation of filaments and interactions with cells of the host immune system (Kelly *et al.*, 2009). Recently, the involvement of the 14-3-3 protein in the modulation of TLR (toll-like receptor) signaling was described. It was demonstrated that 14-3-3 impairs TLR2, TLR3, TLR4, TLR7/8, and TLR9 ligand-induced IL-6, TNF α , and IFN- β production, thereby playing a major regulatory role in balancing the host inflammatory response to viral and bacterial infections through modulation of the TLR signaling pathway (Butt *et al.*, 2012). Toll-like receptors are a group of pattern recognition receptors that play a crucial role in the induction of innate immune responses against bacteria, viruses and fungi. Innate immunity is the first line of defense against parasites (Qi *et al.*, 2003). A role for TLR2 and TLR4 in the recognition and internalization of *P. brasiliensis* has been reported in human monocytes and neutrophils (Bonfim *et al.*, 2009). Considering that the 14-3-3 protein of *P. brasiliensis* possesses a more abundant superficial location when in contact with the host (da Silva *et al.*, 2013), we suggest that decreased levels of this protein result in the reduced interaction of the fungus with host structures and lead to a decreased ability to evade host responses, possibly due to the modulation of the initial immune response, thereby resulting in the attenuation of the virulence of Pb14-3-3 aRNA.

The characterization of virulence factors is essential for the improvement of our understanding of fungal pathogenesis and the interactions between fungal pathogens and the host. These studies may also serve as a baseline to explore the development of prophylactics or new therapeutic strategies. This study established that Pb14-3-3 silencing differentially regulated important aspects that affected the interaction with the host cell, such as morphology, the attachment index for ECM/pneumocytes and virulence. Therefore, the 14-3-3 protein is an interesting therapeutic target to combat infection and modulate inflammatory conditions associated with PCM due to *P. brasiliensis*.

5 Acknowledgements

This work was supported by FAPESP, CNPq and CAPES. We would like to acknowledge Suélen Andreia Rossi, Junya de Lacorte Singulani and all members of Biología Celular y Molecular (Corporación para Investigaciones Biológicas – CIB, Medellín-Colômbia).

6 Conflict of Interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

7 References

- Almeida, A.J., J.A. Carmona, C. Cunha, A. Carvalho, C.A. Rappleye, W.E. Goldman, P.J. Hooykaas, C. Leão, P. Ludovico & F. Rodrigues, (2007) Towards a molecular genetic system for the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Fungal Genet Biol* **44**: 1387-1398.
- Almeida, A.J., C. Cunha, J.A. Carmona, B. Sampaio-Marques, A. Carvalho, I. Malavazi, H.Y. Steensma, D.I. Johnson, C. Leão, E. Logarinho, G.H. Goldman, A.G. Castro, P. Ludovico & F. Rodrigues, (2009) Cdc42p controls yeast-cell shape and virulence of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Fungal Genet Biol* **46**: 919-926.
- Amenta, P.S., J. Gil & A. Martinez-Hernandez, (1988) Connective tissue of rat lung. II: Ultrastructural localization of collagen types III, IV, and VI. *J Histochem Cytochem* **36**: 1167-1173.

- Andreotti, P.F., J.L. Monteiro da Silva, A.M. Bailão, C.M. Soares, G. Benard, C.P. Soares & M.J. Mendes-Giannini, (2005) Isolation and partial characterization of a 30 kDa adhesin from *Paracoccidioides brasiliensis*. *Microbes Infect* **7**: 875-881.
- André, D.C., J.D. Lopes, M.F. Franco, C.A. Vaz & V.L. Calich, (2004) Binding of laminin to *Paracoccidioides brasiliensis* induces a less severe pulmonary paracoccidioidomycosis caused by virulent and low-virulence isolates. *Microbes Infect* **6**: 549-558.
- Aristizabal, B.H., K.V. Clemons, D.A. Stevens & A. Restrepo, (1998) Morphological transition of *Paracoccidioides brasiliensis* conidia to yeast cells: in vivo inhibition in females. *Infect Immun* **66**: 5587-5591.
- Barbosa, M.S., S.N. Bão, P.F. Andreotti, F.P. de Faria, M.S. Felipe, L. dos Santos Feitosa, M.J. Mendes-Giannini & C.M. Soares, (2006) Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Paracoccidioides brasiliensis* is a cell surface protein involved in fungal adhesion to extracellular matrix proteins and interaction with cells. *Infect Immun* **74**: 382-389.
- Beijersbergen, A., A.D. Dulk-Ras, R.A. Schilperoort & P.J. Hooykaas, (1992) Conjugative Transfer by the Virulence System of *Agrobacterium tumefaciens*. *Science* **256**: 1324-1327.
- Berman, J., (2006) Morphogenesis and cell cycle progression in *Candida albicans*. *Curr Opin Microbiol* **9**: 595-601.
- Bhavsar, A.P., S.D. Auweter & B.B. Finlay, (2010) Proteomics as a probe of microbial pathogenesis and its molecular boundaries. *Future Microbiol* **5**: 253-265.
- Bocca, A.L., A.C. Amaral, M.M. Teixeira, P.K. Sato, P. Sato, M.A. Shikanai-Yasuda & M.S. Soares Felipe, (2013) Paracoccidioidomycosis: eco-epidemiology, taxonomy and clinical and therapeutic issues. *Future Microbiol* **8**: 1177-1191.
- Bonfim, C.V., R.L. Mamoni & M.H. Blotta, (2009) TLR-2, TLR-4 and dectin-1 expression in human monocytes and neutrophils stimulated by *Paracoccidioides brasiliensis*. *Med Mycol* **47**: 722-733.
- Brennan, M., D.Y. Thomas, M. Whiteway & K. Kavanagh, (2002) Correlation between virulence of *Candida albicans* mutants in mice and *Galleria mellonella* larvae. *FEMS Immunol Med Microbiol* **34**: 153-157.
- Brito, M.M.S., (2012) Morfologia, virulência e perfil genético de *Paracoccidioides brasiliensis* Avaliação pré e pós-passagem em modelo murino de isolados provenientes de forma clínica crônica humana da paracoccidioidomicose. In: Pós-Graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas. Fundação Oswaldo Cruz. Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, pp. 118.
- Butt, A.Q., S. Ahmed, A. Maratha & S.M. Miggin, (2012) 14-3-3 ϵ and 14-3-3 σ inhibit Toll-like receptor (TLR)-mediated proinflammatory cytokine induction. *J Biol Chem* **287**: 38665-38679.
- Böhmer, M., T. Colby, C. Böhmer, A. Bräutigam, J. Schmidt & M. Bölker, (2007) Proteomic analysis of dimorphic transition in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *Proteomics* **7**: 675-685.
- Coleman, J.J., M. Muhammed, P.V. Kasperkovitz, J.M. Vyas & E. Mylonakis, (2011) *Fusarium* pathogenesis investigated using *Galleria mellonella* as a heterologous host. *Fungal Biol* **115**: 1279-1289.
- Colombo, A.L., A. Tobón, A. Restrepo, F. Queiroz-Telles & M. Nucci, (2011) Epidemiology of endemic systemic fungal infections in Latin America. *Med Mycol* **49**: 785-798.
- Cotter, G., S. Doyle & K. Kavanagh, (2000) Development of an insect model for the in vivo pathogenicity testing of yeasts. *FEMS Immunol Med Microbiol* **27**: 163-169.
- Cruz, A.H., M. Brock, P.F. Zambuzzi-Carvalho, L.K. Santos-Silva, R.F. Troian, A.M. Góes, C.M. Soares & M. Pereira, (2011) Phosphorylation is the major mechanism regulating isocitrate lyase activity in *Paracoccidioides brasiliensis* yeast cells. *FEBS J* **278**: 2318-2332.
- da Silva Castro, N., M.S. Barbosa, Z.A. Maia, S.N. Bão, M.S. Felipe, J.M. Santana, M.J. Soares Mendes-Giannini, M. Pereira & C.M. de Almeida Soares, (2008) Characterization of

- Paracoccidioides brasiliensis PbDfg5p, a cell-wall protein implicated in filamentous growth. *Yeast* **25**: 141-154.
- da Silva, J.e.F., H.C. de Oliveira, C.M. Marcos, R.A. da Silva, T.A. da Costa, V.L. Calich, A.M. Almeida & M.J. Mendes-Giannini, (2013) Paracoccidioides brasiliensis 30 kDa adhesin: identification as a 14-3-3 protein, cloning and subcellular localization in infection models. *PLoS One* **8**: e62533.
- da Silva Neto, B.R., J. de Fátima da Silva, M.J. Mendes-Giannini, H.L. Lenzi, C.M. de Almeida Soares & M. Pereira, (2009) The malate synthase of Paracoccidioides brasiliensis is a linked surface protein that behaves as an anchorless adhesin. *BMC Microbiol* **9**: 272.
- Donofrio, F.C., A.C. Calil, E.T. Miranda, A.M. Almeida, G. Benard, C.P. Soares, S.N. Veloso, C.M. Soares & M.J. Mendes Giannini, (2009) Enolase from Paracoccidioides brasiliensis: isolation and identification as a fibronectin-binding protein. *J Med Microbiol* **58**: 706-713.
- Filler, S.G. & D.C. Sheppard, (2006) Fungal invasion of normally non-phagocytic host cells. *PLoS Pathog* **2**: e129.
- Firacative, C., S. Duan & W. Meyer, (2014) Galleria mellonella model identifies highly virulent strains among all major molecular types of Cryptococcus gattii. *PLoS One* **9**: e105076.
- Franco, M., (1987a) Host-parasite relationships in paracoccidioidomycosis. *J Med Vet Mycol* **25**: 5-18.
- Franco, M., (1987b) Host-parasite relationships in paracoccidioidomycosis. *J Med Vet Mycol* **25**: 5-18.
- Fuchs, B.B., J. Eby, C.J. Nobile, J.B. El Khoury, A.P. Mitchell & E. Mylonakis, (2010a) Role of filamentation in Galleria mellonella killing by Candida albicans. *Microbes Infect* **12**: 488-496.
- Fuchs, B.B., E. O'Brien, J.B. Khoury & E. Mylonakis, (2010b) Methods for using Galleria mellonella as a model host to study fungal pathogenesis. *Virulence* **1**: 475-482.
- Fàbrega, A. & J. Vila, (2013) Salmonella enterica serovar Typhimurium skills to succeed in the host: virulence and regulation. *Clin Microbiol Rev* **26**: 308-341.
- García-Rodas, R., A. Casadevall, J.L. Rodríguez-Tudela, M. Cuenca-Estrella & O. Zaragoza, (2011) Cryptococcus neoformans capsular enlargement and cellular gigantism during Galleria mellonella infection. *PLoS One* **6**: e24485.
- Geiger, B. & K.M. Yamada, (2011) Molecular architecture and function of matrix adhesions. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **3**.
- Goldman, G.H., E. dos Reis Marques, D.C. Duarte Ribeiro, L.A. de Souza Bernardes, A.C. Quiapin, P.M. Vitorelli, M. Savoldi, C.P. Semighini, R.C. de Oliveira, L.R. Nunes, L.R. Travassos, R. Puccia, W.L. Batista, L.E. Ferreira, J.C. Moreira, A.P. Bogossian, F. Tekaia, M.P. Nobrega, F.G. Nobrega & M.H. Goldman, (2003) Expressed sequence tag analysis of the human pathogen Paracoccidioides brasiliensis yeast phase: identification of putative homologues of Candida albicans virulence and pathogenicity genes. *Eukaryot Cell* **2**: 34-48.
- González, A., B.L. Gómez, S. Diez, O. Hernández, A. Restrepo, A.J. Hamilton & L.E. Cano, (2005) Purification and partial characterization of a Paracoccidioides brasiliensis protein with capacity to bind to extracellular matrix proteins. *Infect Immun* **73**: 2486-2495.
- Hanna, S.A., J.L. Monteiro da Silva & M.J. Giannini, (2000) Adherence and intracellular parasitism of Paracoccidioides brasiliensis in Vero cells. *Microbes Infect* **2**: 877-884.
- Hernández, O., A.J. Almeida, A. Gonzalez, A.M. Garcia, D. Tamayo, L.E. Cano, A. Restrepo & J.G. McEwen, (2010) A 32-kilodalton hydrolase plays an important role in Paracoccidioides brasiliensis adherence to host cells and influences pathogenicity. *Infect Immun* **78**: 5280-5286.
- Hernández, O., A.J. Almeida, D. Tamayo, I. Torres, A.M. Garcia, A. López, A. Restrepo & J.G. McEwen, (2012) The hydrolase PbHAD32 participates in the adherence of Paracoccidioides brasiliensis conidia to epithelial lung cells. *Med Mycol* **50**: 533-537.

- Herzog, E.L., A.R. Brody, T.V. Colby, R. Mason & M.C. Williams, (2008) Knowns and unknowns of the alveolus. *Proc Am Thorac Soc* **5**: 778-782.
- Hube, B. & J. Naglik, (2001) *Candida albicans* proteinases: resolving the mystery of a gene family. *Microbiology* **147**: 1997-2005.
- Hurtado, C.A. & R.A. Rachubinski, (2002) YIBM1 encodes a 14-3-3 protein that promotes filamentous growth in the dimorphic yeast *Yarrowia lipolytica*. *Microbiology* **148**: 3725-3735.
- Hynes, R.O., (2009) The extracellular matrix: not just pretty fibrils. *Science* **326**: 1216-1219.
- Jacobsen, I.D., (2014) *Galleria mellonella* as a model host to study virulence of *Candida*. *Virulence* **5**: 237-239.
- Jander, G., L.G. Rahme & F.M. Ausubel, (2000) Positive correlation between virulence of *Pseudomonas aeruginosa* mutants in mice and insects. *J Bacteriol* **182**: 3843-3845.
- Jong, A., C.H. Wu, G.M. Shackleford, K.J. Kwon-Chung, Y.C. Chang, H.M. Chen, Y. Ouyang & S.H. Huang, (2008) Involvement of human CD44 during *Cryptococcus neoformans* infection of brain microvascular endothelial cells. *Cell Microbiol* **10**: 1313-1326.
- Kelly, M.N., D.A. Johnston, B.A. Peel, T.W. Morgan, G.E. Palmer & J.E. Sturtevant, (2009) Bmh1p (14-3-3) mediates pathways associated with virulence in *Candida albicans*. *Microbiology* **155**: 1536-1546.
- Khan, M.S.A., I. Ahmad, F. Aqil, M. Owais, M. Shahid & J. Musarrat, (2010) *Virulence and Pathogenicity of Fungal Pathogens with Special Reference to Candida albicans*, p. 24. *Springer Berlin Heidelberg*.
- Kraus, P.R., A.F. Hofmann & S.D. Harris, (2002) Characterization of the *Aspergillus nidulans* 14-3-3 homologue, ArtA. *FEMS Microbiol Lett* **210**: 61-66.
- Kurokawa, C.S., C.R. Lopes, M.F. Sugizaki, E.E. Kuramae, M.F. Franco & M.T. Peraçoli, (2005) Virulence profile of ten *Paracoccidioides brasiliensis* isolates: association with morphologic and genetic patterns. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* **47**: 257-262.
- Kurokawa, C.S., M.F. Sugizaki & M.T. Peraçoli, (1998) Virulence factors in fungi of systemic mycoses. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* **40**: 125-135.
- Lacaz, C.S., (1994) *Historical evolution of the knowledge on Paracoccidioides brasiliensis*, p. 5.
- Laemmli, U.K., (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Lengeler, K.B., R.C. Davidson, C. D'souza, T. Harashima, W.C. Shen, P. Wang, X. Pan, M. Waugh & J. Heitman, (2000) Signal transduction cascades regulating fungal development and virulence. *Microbiol Mol Biol Rev* **64**: 746-785.
- Lev, S., D. Desmarini, C. Li, M. Chayakulkeeree, A. Traven, T.C. Sorrell & J.T. Djordjevic, (2013) Phospholipase C of *Cryptococcus neoformans* regulates homeostasis and virulence by providing inositol trisphosphate as a substrate for Arg1 kinase. *Infect Immun* **81**: 1245-1255.
- Livak, K.J. & T.D. Schmittgen, (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods* **25**: 402-408.
- Magnani Dinamarco, T., N.A. Brown, R.S. Couto de Almeida, P. Alves de Castro, M. Savoldi, M.H. de Souza Goldman & G.H. Goldman, (2012) *Aspergillus fumigatus* calcineurin interacts with a nucleoside diphosphate kinase. *Microbes Infect* **14**: 922-929.
- Marcos, C.M., J. de Fátima da Silva, H.C. de Oliveira, R.A. Moraes da Silva, M.J. Mendes-Giannini & A.M. Fusco-Almeida, (2012) Surface-expressed enolase contributes to the adhesion of *Paracoccidioides brasiliensis* to host cells. *FEMS Yeast Res* **12**: 557-570.
- Mendes-Giannini, M.J., P.F. Andreotti, L.R. Vincenzi, J.L. da Silva, H.L. Lenzi, G. Benard, R. Zancopé-Oliveira, H.L. de Matos Guedes & C.P. Soares, (2006) Binding of extracellular matrix proteins to *Paracoccidioides brasiliensis*. *Microbes Infect* **8**: 1550-1559.
- Mendes-Giannini, M.J., S.A. Hanna, J.L. da Silva, P.F. Andreotti, L.R. Vincenzi, G. Benard, H.L. Lenzi & C.P. Soares, (2004) Invasion of epithelial mammalian cells by *Paracoccidioides*

- brasiliensis leads to cytoskeletal rearrangement and apoptosis of the host cell. *Microbes Infect* **6**: 882-891.
- Menino, J.F., A.J. Almeida & F. Rodrigues, (2012) Gene knockdown in *Paracoccidioides brasiliensis* using antisense RNA. *Methods Mol Biol* **845**: 187-198.
- Mesa-Arango, A.C., A. Forastiero, L. Bernal-Martínez, M. Cuenca-Estrella, E. Mellado & O. Zaragoza, (2013) 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* **51**: 461-472.
- Meshulam, T., S.M. Levitz, L. Christin & R.D. Diamond, (1995) A simplified new assay for assessment of fungal cell damage with the tetrazolium dye, (2,3)-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulphenyl)-(2H)-tetrazolium-5-carboxanil ide (XTT). *J Infect Dis* **172**: 1153-1156.
- Mylonakis, E., R. Moreno, J.B. El Khoury, A. Idnurm, J. Heitman, S.B. Calderwood, F.M. Ausubel & A. Diener, (2005) *Galleria mellonella* as a model system to study *Cryptococcus neoformans* pathogenesis. *Infect Immun* **73**: 3842-3850.
- Nogueira, S.V., F.L. Fonseca, M.L. Rodrigues, V. Mundodi, E.A. Abi-Chacra, M.S. Winters, J.F. Alderete & C.M. de Almeida Soares, (2010) *Paracoccidioides brasiliensis* enolase is a surface protein that binds plasminogen and mediates interaction of yeast forms with host cells. *Infect Immun* **78**: 4040-4050.
- Palmer, G.E., K.J. Johnson, S. Ghosh & J. Sturtevant, (2004) Mutant alleles of the essential 14-3-3 gene in *Candida albicans* distinguish between growth and filamentation. *Microbiology* **150**: 1911-1924.
- Pereira, L.A., S.N. Bão, M.S. Barbosa, J.L. da Silva, M.S. Felipe, J.M. de Santana, M.J. Mendes-Giannini & C.M. de Almeida Soares, (2007) Analysis of the *Paracoccidioides brasiliensis* triosephosphate isomerase suggests the potential for adhesin function. *FEMS Yeast Res* **7**: 1381-1388.
- Qi, H., T.L. Denning & L. Soong, (2003) Differential induction of interleukin-10 and interleukin-12 in dendritic cells by microbial toll-like receptor activators and skewing of T-cell cytokine profiles. *Infect Immun* **71**: 3337-3342.
- Rappleye, C.A., J.T. Engle & W.E. Goldman, (2004) RNA interference in *Histoplasma capsulatum* demonstrates a role for alpha-(1,3)-glucan in virulence. *Mol Microbiol* **53**: 153-165.
- Restrepo, A., J.G. McEwen & E. Castañeda, (2001) The habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*: how far from solving the riddle? *Med Mycol* **39**: 233-241.
- Roberts, R.L., H.U. Möscher & G.R. Fink, (1997) 14-3-3 proteins are essential for RAS/MAPK cascade signaling during pseudohyphal development in *S. cerevisiae*. *Cell* **89**: 1055-1065.
- Ruiz, O.H., A. Gonzalez, A.J. Almeida, D. Tamayo, A.M. Garcia, A. Restrepo & J.G. McEwen, (2011) Alternative oxidase mediates pathogen resistance in *Paracoccidioides brasiliensis* infection. *PLoS Negl Trop Dis* **5**: e1353.
- Salamitou, S., F. Ramière, M. Brehélin, D. Bourguet, N. Gilois, M. Gominet, E. Hernandez & D. Lereclus, (2000) The *plcR* regulon is involved in the opportunistic properties of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus* in mice and insects. *Microbiology* **146** (Pt 11): 2825-2832.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch & T. Maniatis, (1998) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York.
- San-Blas, G., G. Niño-Vega & T. Iturriaga, (2002) *Paracoccidioides brasiliensis* and paracoccidioidomycosis: molecular approaches to morphogenesis, diagnosis, epidemiology, taxonomy and genetics. *Med Mycol* **40**: 225-242.
- Schwartz, M.A., (2010) Integrins and extracellular matrix in mechanotransduction. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**: a005066.
- Scorzoni, L., M.P. de Lucas, A.C. Mesa-Arango, A.M. Fusco-Almeida, E. Lozano, M. Cuenca-Estrella, M.J. Mendes-Giannini & O. Zaragoza, (2013) Antifungal efficacy during

- Candida krusei* infection in non-conventional models correlates with the yeast in vitro susceptibility profile. *PLoS One* **8**: e60047.
- Sohn, K., I. Senyürek, J. Fertey, A. Königsdorfer, C. Joffroy, N. Hauser, G. Zelt, H. Brunner & S. Rupp, (2006) An in vitro assay to study the transcriptional response during adherence of *Candida albicans* to different human epithelia. *FEMS Yeast Res* **6**: 1085-1093.
- Tamayo, D., J.F. Muñoz, I. Torres, A.J. Almeida, A. Restrepo, J.G. McEwen & O. Hernández, (2013) Involvement of the 90 kDa heat shock protein during adaptation of *Paracoccidioides brasiliensis* to different environmental conditions. *Fungal Genet Biol* **51**: 34-41.
- Thomaz, L., R. García-Rodas, A.J. Guimarães, C.P. Taborda, O. Zaragoza & J.D. Nosanchuk, (2013) *Galleria mellonella* as a model host to study *Paracoccidioides lutzii* and *Histoplasma capsulatum*. *Virulence* **4**: 139-146.
- Torres, I., O. Hernandez, D. Tamayo, J.F. Muñoz, A.M. García, B.L. Gómez, A. Restrepo & J.G. McEwen, (2013a) *Paracoccidioides brasiliensis* PbP27 gene: knockdown procedures and functional characterization. *FEMS Yeast Res*.
- Torres, I., O. Hernandez, D. Tamayo, J.F. Muñoz, N.P. Leitão, A.M. García, A. Restrepo, R. Puccia & J.G. McEwen, (2013b) Inhibition of PbGP43 expression may suggest that gp43 is a virulence factor in *Paracoccidioides brasiliensis*. *PLoS One* **8**: e68434.
- van Burik, J.A., R.W. Schreckhise, T.C. White, R.A. Bowden & D. Myerson, (1998) Comparison of six extraction techniques for isolation of DNA from filamentous fungi. *Med Mycol* **36**: 299-303.
- VAN DE Wouw, A.P. & B.J. Howlett, (2011) Fungal pathogenicity genes in the age of 'omics'. *Mol Plant Pathol* **12**: 507-514.
- Verstrepen, K.J. & F.M. Klis, (2006) Flocculation, adhesion and biofilm formation in yeasts. *Mol Microbiol* **60**: 5-15.
- Vicentini, A.P., J.L. Gesztesi, M.F. Franco, W. de Souza, J.Z. de Moraes, L.R. Travassos & J.D. Lopes, (1994) Binding of *Paracoccidioides brasiliensis* to laminin through surface glycoprotein gp43 leads to enhancement of fungal pathogenesis. *Infect Immun* **62**: 1465-1469.
- Vogel, H., B. Altincicek, G. Glöckner & A. Vilcinskas, (2011) A comprehensive transcriptome and immune-gene repertoire of the lepidopteran model host *Galleria mellonella*. *BMC Genomics* **12**: 308.
- Zambuzzi-Carvalho, P.F., A.H. Cruz, L.K. Santos-Silva, A.M. Goes, C.M. Soares & M. Pereira, (2009) The malate synthase of *Paracoccidioides brasiliensis* Pb01 is required in the glyoxylate cycle and in the allantoin degradation pathway. *Med Mycol* **47**: 734-744.

Table legend

Table 1. Oligonucleotides primers pairs for each anti-sense.

Table 2. Oligonucleotides primers pairs used in RT-qPCR.

Figure legends

Figure 1. Inhibition of Pb14-3-3 expression using aRNA and *A. tumefaciens*-mediated transformation. A) Transfer DNA (T-DNA) inserted into *P. brasiliensis* by ATMT to silence Pb14-3-3. Three anti-sense oligonucleotides were produced based on the Pb18 (PbWT) genomic sequence, as detailed in the Materials and Methods section. The sequences were cloned under the control of CBP-1 promoter (calcium-binding protein). The constructs were sub-cloned into

T-DNA region of the binary vector pUR5750 harboring hygromycin B phosphotransferase (HPH) driven by the glyceraldehyde-3-phosphate of *Aspergillus nidulans* (PGPDA) and with terminator (TTRPC) as described by (Tamayo et al., 2013). B) PCR fragments amplified with an HPH-specific primer yielded a 1,000 bp internal fragment. *Pb14-3-3* aRNA, PbWT and PbEV were used as the templates. MW, DNA molecular marker. C) *Pb14-3-3* expression levels in PbWT, PbEV and *Pb14-3-3*-aRNA after 1 month and over 12 months of subculture. Gene expression levels obtained by RT-qPCR were normalized with internal control TUB2; *** $p < 0.0001$ when compared with PbWT and PbEV; D)

Figure 2. Silencing of *Pb14-3-3* leads to distinct *P. brasiliensis* yeast cell morphology without affecting cell viability or vitality. *P. brasiliensis* PbWT, PbEV and *Pb14-3-3* aRNA were evaluated by (A) culture turbidity determined at Optical Density 600 nm and (B) a colorimetric XTT reduction assay at different time points; $p < 0.05$ compared to all tested strains. (C) Microscopic evaluation of PbWT and PbEV yeast cells and yeast cells generated from the *Pb14-3-3* aRNA strain; magnification 40X.

Figure 3. Interaction of *Pb14-3-3* aRNA yeast cells with pneumocytes is affected during the early stage of infection. The interaction was assessed by indirect immunofluorescence and analyzed by flow cytometry at different time points. * $p < 0.05$ when comparing PbWT and PbEV with *Pb14-3-3* aRNA within two hours of infection.

Figure 4. Binding of the *Pb14-3-3* mutant to ECM is reduced compared to the PbWT. Binding of PbWT and *Pb14-3-3* aRNA strain yeast cells to ECM components laminin, fibronectin, and types I and IV collagen ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$). The interaction was determined by ELISA with peroxidase. * $p < 0.05$ when PbWT was compared to *Pb14-3-3* aRNA for laminin and fibronectin.

Figure 5. Silencing of *Pb14-3-3* decreases the virulence of *P. brasiliensis* in a *Galleria mellonella* model of infection. Representative survival curves of an experimental infection performed in *G. mellonella* with 5×10^6 PbWT, PbEV and *Pb14-3-3* aRNA yeast cells; $p < 0.05$ when PbWT and PbEV were compared with *Pb14-3-3* aRNA.

Figure 1.

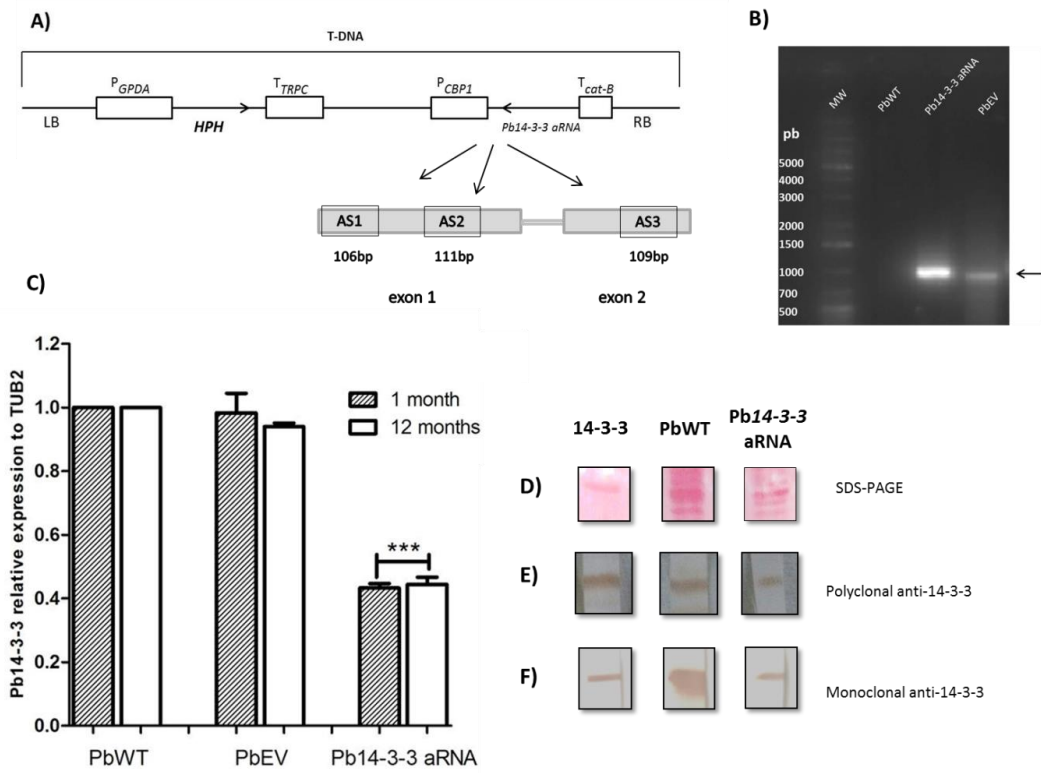


Figure 2.

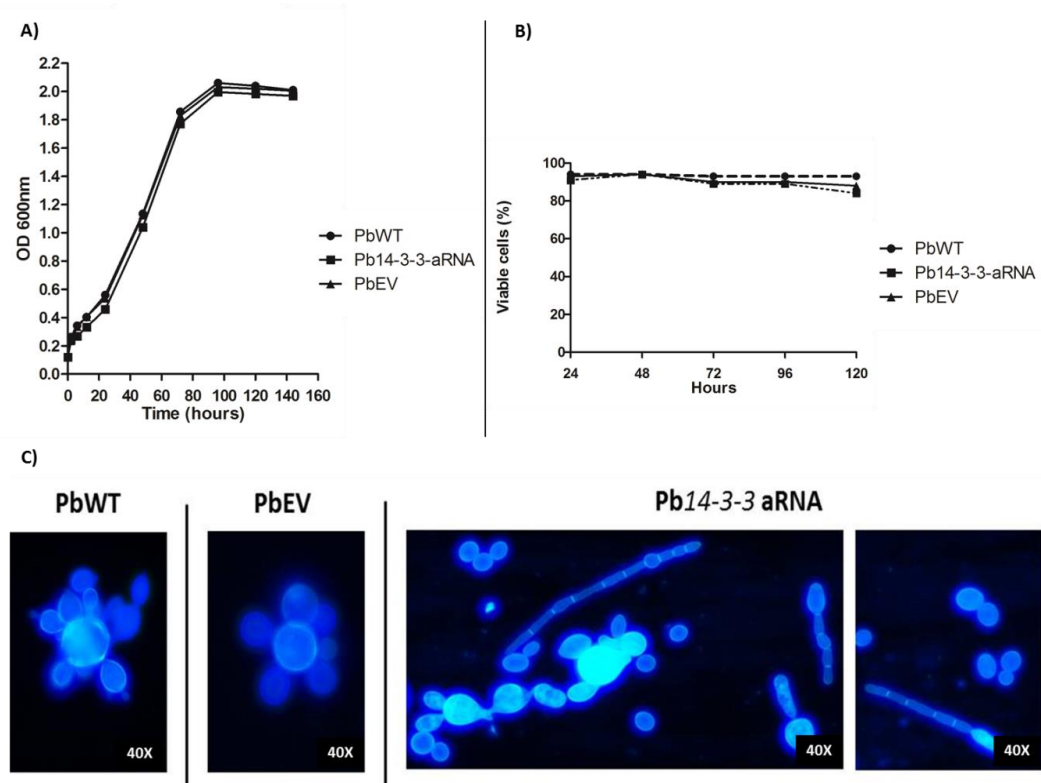


Figure 3.

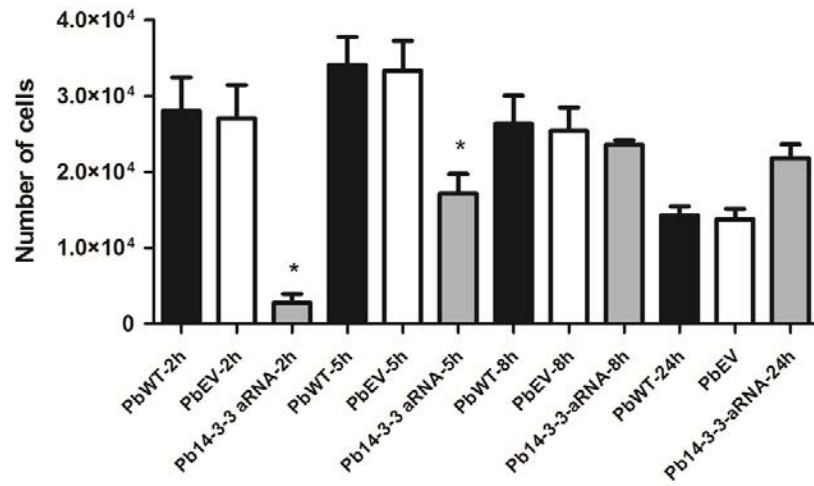


Figure 4.

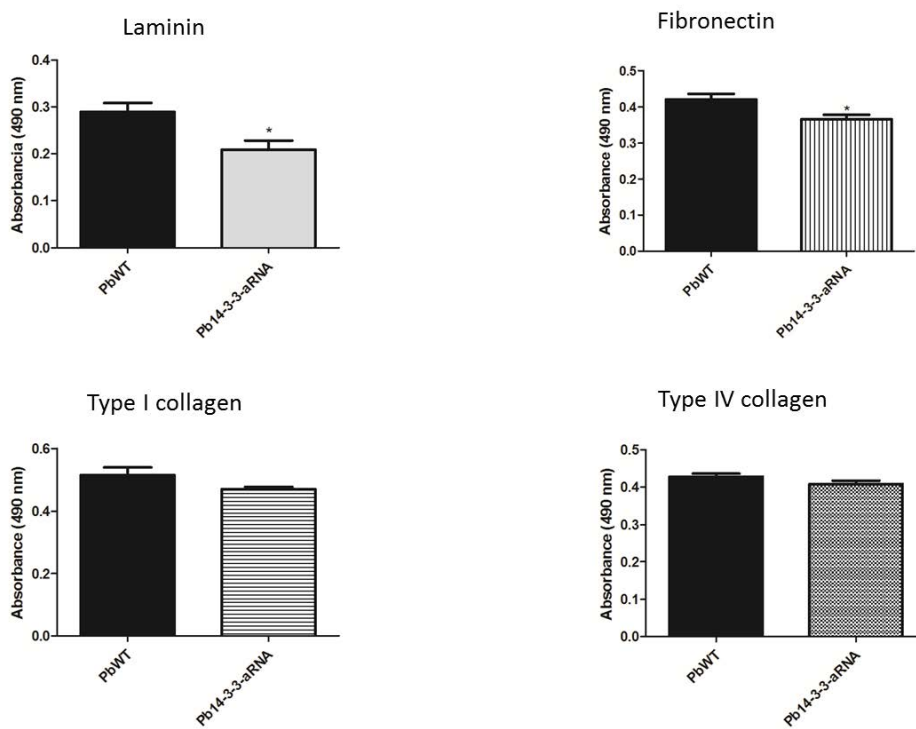
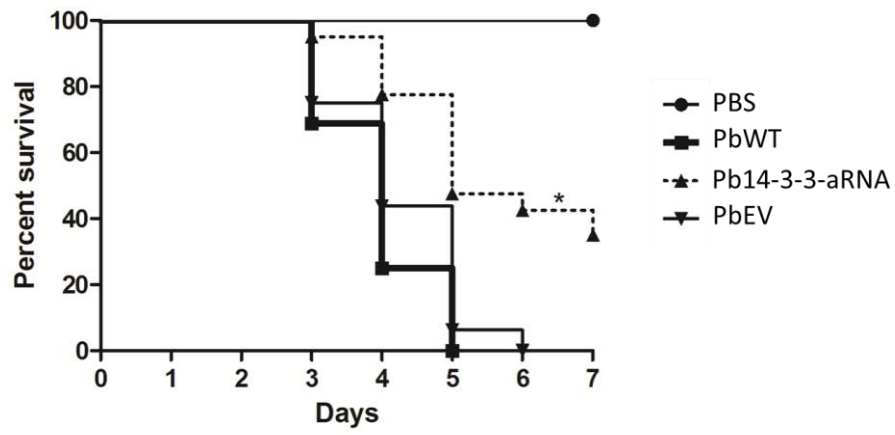


Figure 5.



2. Co-autoria em artigos publicados pelo grupo durante período do 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, pl 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), PADCF-CF-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 Coordenacao de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nivel Superior.

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

* E-mail: giannini@cfar.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. Importance of adhesins in virulence of *Paracoccidioides* spp. Revista: Frontiers in Microbiology.

Importance of adhesins in virulence of *Paracoccidioides* spp.

Haroldo C. de Oliveira, Julhiany de Fátima da Silva, Lílana Scorzoni, Caroline M. Marcos, Suelen A. Rossi, Ana C. A. de Paula e Silva, Patrícia A. Assato, Rosângela A. M. da Silva, Ana M. Fusco-Almeida and Maria J. S. Mendes-Giannini*

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

OPEN ACCESS

Edited by:

Helo K. Takahashi,
Universidade Federal de São Paulo,
Brazil

Reviewed by:

Jose M. Diaz-Minguez,
University of Salamanca Spain
Derek Thomas,
Grand Valley State University, USA
Alejandro De Las Penas,
Instituto Potosino de Investigación
Científica y Tecnológica, Mexico

*Correspondence:

Maria J. S. Mendes-Giannini,
Rodovia Araraquara-Jaú, Km 1,
Araraquara, CEP - 14801-902, Brazil
giannini@fctfar.unesp.br

Specialty section:

This article was submitted to Fungi
and Their Interactions, a section of the
journal Frontiers in Microbiology

Received: 24 November 2014

Accepted: 27 March 2015

Published: 10 April 2015

Citation:

Members of the *Paracoccidioides* genus are the etiologic agents of paracoccidioidomycosis (PCM). This genus is composed of two species: *Paracoccidioides brasiliensis* and *Paracoccidioides lutzii*. The correct molecular taxonomic classification of these fungi has created new opportunities for studying and understanding their relationships with their hosts. *Paracoccidioides* spp. have features that permit their growth under adverse conditions, enable them to adhere to and invade host tissues and may contribute to disease development. Cell wall proteins called adhesins facilitate adhesion and are capable of mediating fungi-host interactions during infection. This study aimed to evaluate the adhesion profile of two species of the genus *Paracoccidioides*, to analyze the expression of adhesin-encoding genes by real-time PCR and to relate these results to the virulence of the species, as assessed using a survival curve in mice and in *Galleria mellonella* after blocking the adhesins. A high level of heterogeneity was observed in adhesion and adhesin expression, showing that the 14-3-3 and enolase molecules are the most highly expressed adhesins during pathogen-host interaction. Additionally, a survival curve revealed a correlation between the adhesion rate and survival, with *P. brasiliensis* showing higher adhesion and adhesin expression levels and greater virulence when compared with *P. lutzii*. After blocking 14-3-3 and enolase adhesins, we observed modifications in the virulence of these two species, revealing the importance of these molecules during the pathogenesis of members of the *Paracoccidioides* genus. These results revealed new insights into the host-pathogen interaction of this genus and may enhance our understanding of different isolates that could be useful for the treatment of this mycosis.

Keywords: *Paracoccidioides* spp., virulence, adhesion, adhesins

Introduction

2.3. Alterations of protein expression in conditions of copper-deprivation for *Paracoccidioides lutzii* in the presence of extracellular matrix components. Revista: BMC Microbiology.

Oliveira et al. *BMC Microbiology* (2014) 14:302
DOI 10.1186/s12866-014-0302-7



RESEARCH ARTICLE

Open Access

Alterations of protein expression in conditions of copper-deprivation for *Paracoccidioides lutzii* in the presence of extracellular matrix components

Haroldo Cesar de Oliveira¹, Julhiany de Fátima da Silva¹, Marcelo Teruyuki Matsumoto¹, Caroline Maria Marcos¹, Roberta Peres da Silva¹, Rosângela Aparecida Moraes da Silva¹, Mônica Teresa Veneziano Labate², Carlos Alberto Labate², Ana Marisa Fusco Almeida¹ and Maria José Soares Mendes Giannini^{1*}

Abstract

Background: *Paracoccidioides* spp is a fungi genus and the agent of paracoccidioidomycosis. The strategies of infection used by these pathogens involve the expression of proteins related to adaptation to the host, particularly regarding the uptake of micronutrients. This study analyzed the adhesion of *Paracoccidioides lutzii* during conditions of copper (Cu) and iron (Fe) deprivation, while also evaluating the proteins expressed in conditions of Cu depletion in the presence of four extracellular matrix (ECM) components (laminin, fibronectin and types I and IV collagen).

Results: We cultured the *P. lutzii* in a chemically defined media without Cu and Fe. The fungus was then placed in contact with different ECM components and adhesion was evaluated. A significant increase in binding to all ECM components was observed when the fungus was cultured without Cu; which might be related to some adhesins expression. A proteomic assay was developed and revealed 39 proteins expressed that are involved in processes such as virulence, protein synthesis, metabolism, energy, transcription, transport, stress response and the cell cycle when the fungus was interacting with the ECM components. The up-regulated expression of two important adhesins, enolase and 14-3-3, was observed at the fungal cell wall during the interaction with the ECM components, indicating the role of these proteins in the *Paracoccidioides*-host interaction.

Conclusions: This study is important for determining prospective proteins that may be involved in the interaction of *Paracoccidioides* with a host. Understanding the adaptive response to different growth conditions, elucidating the processes of adhesion and cell invasion, and identifying the proteins that are differentially expressed during the fungus-host interaction may help elucidate mechanisms used for survival and growth of *Paracoccidioides* in various human tissues.

Keywords: *Paracoccidioides* spp, Copper, Adhesion, Protein expression, Paracoccidioidomycosis

Background

Paracoccidioides lutzii, a specie from a complex genus [1-4], are dimorphic fungi and the etiologic agents of paracoccidioidomycosis (PCM), which is the most important systemic mycosis in Latin America [5]. *Paracoccidioides* is a notably versatile pathogen, with the ability of infecting

because it has developed mechanisms that enable adherence and invasion of host tissues [6].

The *Paracoccidioides* species initiates host infection by adhering to components of the extracellular matrix (ECM); this adherence is mediated by a variety of adhesins on the fungal surface, with component recognition

2.4. Influence of the *Paracoccidioides brasiliensis* 14-3-3 and gp43 proteins on the induction of apoptosis in A549 epithelial cells. Revista: Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.

Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro: 1-9, 2015 1

Influence of the *Paracoccidioides brasiliensis* 14-3-3 and gp43 proteins on the induction of apoptosis in A549 epithelial cells

Julhiany de Fátima da Silva¹, Juliana Vicentim¹, Haroldo Cesar de Oliveira¹,
Caroline Maria Marcos¹, Patricia Akemi Assato¹, Patrícia Ferrari Andreotti¹,
Juliana Leal Monteiro da Silva¹, Christiane Pienna Soares¹, Gil Benard^{2,3},
Ana Marisa Fusco Almeida¹, Maria José Soares Mendes-Giannini^{1/*}

¹Departamento de Análises Clínicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, SP, Brasil ²Laboratório de Alergia e Imunologia Clínica e Experimental

³Clínica de Doenças Infecciosas e Parasitárias, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil

The fungal strain Paracoccidioides brasiliensis remains viable inside of epithelial cells and can induce apoptosis in this population. However, until now, the molecules that participate in this process remained unknown. Thus, this study evaluated the contribution of two P. brasiliensis molecules, the 14-3-3 and glycoprotein of 43 kDa proteins, which had been previously described as extracellular matrix adhesins and apoptosis inducers in human pneumocytes. Accordingly, epithelial cells were treated with these molecules for different periods of time and the expression of the apoptosis regulating-proteins Bak, Bax, Bcl-2, p53 and caspases were evaluated by terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labelling, flow cytometry and real-time polymerase chain reaction analysis. Our results demonstrated that treatment with these molecules induces apoptosis signalling in pulmonary epithelial cells, showing the same pattern of programmed cell-death as that observed during infection with P. brasiliensis. Thus, we could conclude that P. brasiliensis uses these molecules as virulence factors that participate not only in the fungal adhesion process to host cells, but also in other important cellular mechanisms such as apoptosis.

Key words: *Paracoccidioides brasiliensis* - adhesins - apoptosis

Paracoccidioides brasiliensis is a pathogenic fungus and an etiological agent of paracoccidioidomycosis, a systemic mycosis with great importance in Brazil due the high concentration of endemic areas for this disease (Blotta et al. 1999, Coutinho et al. 2002). During its evolution, *P. brasiliensis* developed several features that

adhesins and a cell receptor (Mendes-Giannini et al. 2000) that makes the fungus capable of adhering to and invading epithelial cells (Mendes-Giannini et al. 1994). This phenomenon has been associated with the fungal virulence (Hanna et al. 2000). The identification of molecules that are involved in microorganism adhesion is of