

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS

Roberta Peres da Silva

Análise de cDNA diferencialmente expressos durante o processo de  
infecção de *Paracoccidioides brasiliensis* a queratinócitos e  
pneumócitos.

**Araraquara**

**2010**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS

Roberta Peres da Silva

Análise de cDNA diferencialmente expressos durante o processo de infecção de *Paracoccidioides brasiliensis* a queratinócitos e pneumócitos.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas a Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Campus de Araraquara, como pré-requisito para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Maria José Soares Mendes Giannini

**Araraquara**

**2010**

## Ficha Catalográfica

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

S586a Silva, Roberta Peres da  
Análise de cDNA diferencialmente expressos durante o processo de  
infecção de *Paracoccidioides brasiliensis* a queratinócitos e pneumócitos /  
Roberta Peres da Silva. – Araraquara, 2010.  
84 f.

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

1. Paracoccidioides brasiliensis. 2. Queratinócitos. 3. Pneumócitos. 4.  
Micologia. I.Giannini, Maria José Soares Mendes, orient. II. Título.

**CAPES: 40300005**

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Micologia Clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP Araraquara. Recebeu apoio financeiro da FAPESP (Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo), da CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) e do CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico)

"Tenho uma alma muito prolixa e uso poucas palavras; sou irritável e piro facilmente; também sou muito calma e perdôo logo; não esqueço nunca; mas há poucas coisas de que eu me lembre; sou paciente, mas profundamente colérica, como a maioria dos pacientes; as pessoas nunca me irritam mesmo, certamente porque eu as perdôo de antemão; gosto muito das pessoas por egoísmo: é que elas se parecem no fundo comigo; nunca esqueço uma ofensa, o que é uma verdade, mas como pode ser verdade, se as ofensas saem de minha cabeça como se nunca nela tivessem entrando? Tenho uma paz profunda, somente porque ela é profunda e não pode ser sequer atingida por mim mesmo; se fosse alcançável por mim, eu não teria um minuto de paz; quanto a minha paz superficial, ela é uma alusão à verdadeira paz; outra coisa que esqueci é que há outra alusão em mim - a do mundo grande e aberto; apesar do meu ar duro, sou cheia de muito amor e é isso o que certamente me dá uma grandeza..."

**Clarice Lispector**

## **DEDICATÓRIA**

À minha mãe, Marisa da Conceição Peres da Silva, uma grande guerreira, por nunca se cansar de ouvir os problemas e vitórias alcançadas, por me ajudar a transpor todos os obstáculos encontrados durante essa jornada.

À minha irmã, Eryka Peres Nascimento pelo apoio incondicional, a minha sobrinha Betsy Luiza Peres Nascimento, pelas flores, lindas flores, nas manhãs de domingo. Ao meu irmão Lincoln Peres da Silva, pela constante preocupação.

Às amigas, Cibele Cintra e Joelma Placedino, pela amizade verdadeira ao longo desses nove anos.

**O meu coração pertence a vocês!**

## **AGRADECIMENTOS**

À Profa. Dra. Maria José Soares Mendes Giannini, por abrir as portas ainda durante minha graduação e permitir meu desenvolvimento ao longo desses anos, lançando sempre novos desafios e cobrando o meu melhor.

**Minha Admiração!**

## **AGRADECIMENTOS**

Ao amigo Marcelo Teruyuki Matsumoto, por me acompanhar durante todo o mestrado, incansavelmente, por toda paciência, “ouvidos” e incentivos.

À querida Rosângela Aparecida Moraes da Silva (Rô), pela preocupação comigo em todos os momentos, pela enorme ajuda, pelos cafés da manhã, por toda a diversão, enfim por ser essa pessoa tão especial.

Às amigas Tatiane Benaducci, Jaqueline Derissi Braz e Aline Voltan, obrigada pela ajuda preciosa, lealdade, paciência, amizade, conversas hilárias e momentos inesquecíveis.

**Adoro vocês!!!**



## **AGRADECIMENTOS**

... “A gente não faz amigos, reconhece-os.”

.

À todos os amigos e companheiros que me ajudaram nesta caminhada, deixaram suas marcas e me modificaram ajudando a escrever essa história

**Obrigada por tudo!**

.

Finalmente, agradeço à FAPESP pelo apoio financeiro a este projeto.

## RESUMO:

A paracoccidiodomicose é micose sistêmica causada pelo fungo dimórfico *Paracoccidioides brasiliensis*. As manifestações clínicas incluem desde formas localizadas até doença disseminada que pode evoluir para letalidade, dependendo provavelmente da relação entre a virulência do fungo, a resposta imunológica e a habilidade deste em interagir com as estruturas superficiais do hospedeiro e invadir células epiteliais e mononucleares. *P. brasiliensis* tem a capacidade de invadir células epiteliais de linhagens humanas e animais, pode circunscrever os sinais celulares via actina e tubulina para invadir células normalmente não fagocíticas, assim como a citoqueratina parece desempenhar um importante papel. Neste projeto foi estudado o comportamento de *P. brasiliensis* quanto ao perfil de infecção aos queratinócitos e as células epiteliais pulmonares. Por outro lado, identificou-se a expressão diferencial de RNAm e de proteínas quando o fungo foi posto em contato com os dois tipos celulares, no intuito de caracterizar genes diferencialmente expressos e proteínas durante a infecção de *P. brasiliensis*. Verificou-se que a porcentagem de fungos que interagiu com os dois tipos celulares foi bastante semelhante. No entanto, o mecanismo de interação pode ser diferente, uma vez que as proteínas encontradas ligadas fracamente à parede do fungo apresentaram diferenças significativas no perfil eletroforético. O fungo após o contato com as células NOK aparentemente induziu alterações expressivas nas células, aparecendo prolongamentos celulares, fruto da provável alteração do citoesqueleto em que actina pode estar envolvida, principalmente em cinco e oito horas de infecção. Por outro lado, a técnica de RDA foi extremamente útil, fornecendo-nos uma visão global da situação da célula nas horas iniciais de contato entre *P. brasiliensis*, pneumócitos e queratinócitos. Os produtos destes genes apresentaram homologia com 28 proteínas envolvidas nos diferentes processos biológicos. Foram encontrados transcritos com várias funções, incluindo a indução de citocinas, metabolismo de proteínas, metabolismo alternativo de carbono, transporte de proteínas e de zinco e resposta de estresse durante o contato do fungo com células. Foram encontradas proteínas que sugerem que a levedura está numa situação de estresse (RDS1), mas apesar disso, esta parece

estar proliferando e metabolicamente ativa (proteassoma, acetiladores de cadeia curta, glicosamina isomerase e carreadores de ADP/ATP). Adicionalmente, vias metabólicas estão sendo ativadas com o objetivo de eliminar substâncias tóxicas à célula (Transportador de Zinco), sendo este último, alvo potencial para o desenvolvimento de futuras drogas.

**Palavras-chave:** *Paracoccidioides brasiliensis*, RDA, queratinócitos, pneumócitos.

## **ABSTRACT:**

Paracoccidioidomycosis is a systemic mycosis caused by the dimorphic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. Clinical manifestations range from localized forms to disseminated disease that can progress to lethality, probably depending on the relationship among the virulence of the fungus, the immune response, the ability to interact with the surface structures and invade epithelial cells and mononuclear cells of the host. In order to study the steps involved from the initial contact of *P. brasiliensis* until the events of adhesion and invasion culminating in its entry into the cell. Using this model, it was demonstrated that not only *P. brasiliensis* has the ability to invade human and animal epithelial cells, as correlated for the first time, the degree of virulence with the adhesion ability of the isolates. Among the components of the cytoskeleton, *P. brasiliensis* probably using the actin and tubulin to invade cells, and cytokeratin seems to play an important role. In this study, we evaluated the behavior of *P. brasiliensis* and the profile of infection to keratinocytes and lung epithelial cells. Furthermore, we identified the differential expression of mRNA and protein when the fungus was placed in contact with the two cell types in order to characterize differentially expressed genes and proteins during *P. brasiliensis* infection. The percentage of fungi that interacted with the two cell types was very similar. However, the mechanism of interaction may be different, since the expressed proteins showed significant differences in electrophoretic profile. We analyzed two cDNA populations of *P. brasiliensis*, one obtained from contact between *P. brasiliensis* and pneumocytes, and other PB and keratinocytes. Our analysis identified transcripts related to 28 proteins involved in different biological processes. Transcripts were found with multiple functions including induction of cytokines, protein metabolism, alternative carbon metabolism, zinc transport proteins and stress response during contact with the fungal cells. The proteins found suggest that the yeast is in a stress situation (RDS1), but nevertheless, the yeast seems to be proliferating and metabolically active (proteasome, acetylators short-chain glucosamine isomerase and e ADP / ATP carriers). Additionally, metabolic pathways may be activated in order to

eliminate toxic substances from the cell (zinc transporter), the latter being a potential target for the development of future drugs.

**Keywords:** *Paracoccidioides brasiliensis*, RDA, keratinocytes, pneumocytes.

## LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

|                    |   |   |
|--------------------|---|---|
| $\alpha$           | = | Alfa  |
| $\Omega$           | = | Ohm   |
| $\mu\text{g}$      | = | Micrograma  |
| $\mu\text{L}$      | = | Microlitro  |
| $^{\circ}\text{C}$ | = | Graus Celsius   |
| A549               | = | Pneumócitos tipo II   |
| ATP                | = | Adenosina trifosfato  |
| BSA                | = | Bovine serum albumin (= Soro albumina bovina)                             |
| CFSE               | = | 5(6)-Carboxyfluorescein diacetate N-succinimidyl Ester                    |
| DEPC               | = | Dietil Pirocarbonato  |
| DNA                | = | Ácido desoxirribonucléico   |
| dNTP               | = | Desoxirribonucleosídeo(s) trifosfato(s)                                   |
| ddNTP              | = | Didesoxirribonucleosídeo(s) trifosfato(s)                                 |
| D.O.               | = | Densidade óptica  |
| DTT                | = | Ditiotreitol  |
| EDTA               | = | Ácido etileno diamianino tetracético                                      |
| EE                 | = | EPPS - EDTA   |
| EST                | = | <i>Expressed Sequence Tags</i> (= Etiqueta de seqüência expressa)         |
| FN                 | = | Meio de cultura de Fava Netto   |
| GL                 | = | Glicosamina 6 phosphate isomerase de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> |
| g                  | = | Grama   |
| x g                | = | Força da gravidade  |
| GTE                | = | Glicose - Tris-HCl - EDTA   |
| IPTG               | = | isopropil-tio- $\beta$ -D-galactopiranosídeo                              |
| L                  | = | Litro   |
| L34                | = | Proteína ribossomal L34   |
| LB                 | = | Luria - Bertani   |
| M                  | = | Molar   |
| mg                 | = | Miligrama   |
| mL                 | = | Mililitro   |

|       |   |  |
|-------|---|--|
| mM    | = | Milimolar  |
| mm    | = | Milímetro  |
| mV    | = | Milivolt   |
| ng    | = | Nanograma  |
| nm    | = | Nanômetro  |
| NOK   | = | Nomal oral keratinocytes(=keratinócitos de mucosa oral imortalizados)                    |
| pb    | = | Pares de bases   |
| PBS   | = | Phosphate buffered saline (= tampão fosfato)   |
| PE    | = | Proteína PENR2 de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>                                   |
| PCR   | = | <i>Polymerase Chain Reaction</i> (= Reação em cadeia da polimerase)                      |
| pH    | = | Potencial hidrogeniônico   |
| pmol  | = | Picomol  |
| R     | = | Resistente   |
| RDA   | = | <i>Representational Difference Analysis</i> (=Análise de diferença representacional)     |
| RD    | = | Proteína Rds1 de <i>Cryptococcus neoformans</i>  |
| RNA   | = | Ácido ribonucléico   |
| RT    | = | Transcrição reversa  |
| TBE   | = | Tris-base - ácido bórico - EDTA  |
| TE    | = | Tris-base - EDTA   |
| Tris  | = | 2-amino-2-hidroximetilpropano  |
| U     | = | Unidades   |
| UB    | = | Enzima de conjugação de ubiquitina variante MMS2 de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> |
| UFC   | = | Unidade formadora de colônia   |
| X-gal | = | 5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosídeo                                 |

## LISTA DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| Figura 1: Esquema representativo da síntese da primeira fita de cDNA.....   | 36 |
| Figura 2: Esquema representativo da técnica de RDA.....   | 38 |
| Figura 3: Análise por citometria de fluxo da infecção de <i>P. brasiliensis</i> a NOK e A549.....                           | 43 |
| Figura 4: Microscopia de varredura da infecção de <i>P. brasiliensis</i> a NOK.....   | 46 |
| Figura 5: Eletroforese bidimensional dos diferentes extratos “cell-free” de <i>P. brasiliensis</i> testados .....           | 47 |
| Figura 6: Análise comparativa da eletroforese bidimensional dos extratos cell-free” de <i>P. brasiliensis</i> testados..... | 48 |
| Figura 7: Ensaio de binding dos extratos “cell-free” de <i>P. brasiliensis</i> em contato com A549 e NOK .....              | 48 |
| Figura 8: Microscopia confocal das células NOK durante a infecção por <i>P. brasiliensis</i> .....                          | 49 |
| Figura 9: Produtos diferencialmente expressos de <i>P. brasiliensis</i> durante a infecção em A549 e NOK.....               | 50 |
| Figura 10: Confirmação dos resultados do RDA pela técnica de RT-PCR.....  | 53 |
| Figura 11: Confirmação dos resultados do RDA pela técnica de PCR em tempo real .....  | 54 |



# SUMÁRIO

|  |    |
|--|----|
| CAPÍTULO I .....   | 18 |
| I. INTRODUÇÃO: .....   | 19 |
| II. PROPOSIÇÃO: .....  | 29 |
| III. OBJETIVOS ESPECÍFICOS: .....  | 29 |
| IV. METODOLOGIA: .....   | 29 |
| 1. Microrganismo. ....   | 29 |
| 2. Cultura de células. ....  | 29 |
| 3. Avaliação, por citometria de fluxo, da infecção por <i>P. brasiliensis</i> a A549 e NOK. .... | 30 |
| 3.1. Marcação da suspensão de <i>P. brasiliensis</i> com CFSE.....                               | 30 |
| 3.2. Infecção de <i>P. brasiliensis</i> à monocamada celular. ....                               | 30 |
| 4. Análise protéica. ....  | 30 |
| 4.1. Obtenção do extrato “cell-free”. ....   | 30 |
| 4.2. Eletroforese bidimensional.....   | 31 |
| 4.3. Ensaio de binding .....   | 31 |
| 5. Ensaio de microscopia .....   | 32 |
| 5.1 Imunofluorescência para visualização dos filamentos de actina.....                           | 32 |
| 5.2. Microscopia eletrônica de Varredura .....   | 32 |
| 6. Análise dos genes diferencialmente expressos por RDA. ....                                    | 33 |
| 6.1. Condições de tratamento. ....   | 33 |
| 6.2. Extração de RNA total. ....   | 33 |
| 6.3. Metodologia de RDA.....   | 34 |
| 6.3.1. Síntese de cDNA fita simples. ....  | 34 |
| 6.3.2. Síntese de cDNA fita dupla. ....  | 34 |
| 6.3.3. Digestão com <i>Sau3AI</i> . ....   | 35 |
| 6.3.4. Anelamento do primeiro par de adaptadores.....  | 35 |
| 6.3.5. Ligação do primeiro par de adaptadores. ....  | 36 |
| 6.3.6. Teste de ligação do primeiro par de adaptadores.....                                      | 36 |
| 6.3.7. Primeira amplificação.....  | 36 |
| 6.3.8. Primeira subtração.....   | 37 |
| 6.3.9. Segunda amplificação.....   | 37 |
| 6.3.10. Ligação dos fragmentos em vetor de clonagem. ....  | 39 |
| 6.3.11. Preparo de células competentes para transformação por eletroporação. ....                | 39 |
| 6.3.12. Transformação de células de <i>E. coli</i> por eletroporação.....                        | 39 |
| 6.3.13. Extração de DNA plasmidial em microplaca. ....   | 40 |
| 6.3.14. Seqüenciamento.....  | 40 |
| 6.3.15. Análise das seqüências. ....   | 41 |
| 6.4. Confirmação dos resultados obtidos por RDA. ....  | 41 |
| 6.4.1 RT-PCR .....   | 41 |
| 6.4.2. PCR em tempo real. ....   | 42 |
| V. RESULTADOS:.....  | 43 |
| 1. Ensaio de infecção de <i>P. brasiliensis</i> as monocamadas celulares. ....                   | 43 |
| 2. Microscopia de Varredura.....   | 43 |
| 3. Análise protéica dos extratos “cell-free” do isolado 18 de <i>P. brasiliensis</i> . ....      | 46 |

|   |    |
|---|----|
| 3.1. Eletroforese Bidimensional. ....                                   | 46 |
| 3.2. Ensaio de binding. ....  | 48 |
| 4. Imunofluorescência para observação de microfilamentos de actina..... | 48 |
| 5. Análise do RNAm por RDA.....   | 49 |
| 5.1. Validação dos resultados obtidos por RDA.....                      | 52 |
| 5.1.1.RT-PCR. ....  | 52 |
| 5.1.2.PCR em tempo real. ....   | 53 |
| VI. DISCUSSÃO:.....   | 54 |
| VII. CONCLUSÃO: .....   | 64 |
| VIII. REFERÊNCIAS: .....  | 66 |

## I. INTRODUÇÃO:

*Paracoccidioides brasiliensis* é um fungo dimórfico, que pertence taxonomicamente ao Reino Fungi, a Ordem Onygenales, na Família Ajellomycetaceae, formando um clado monofilético que inclui os gêneros *Blastomyces*, *Emmonsia* e *Histoplasma* (UNTEREINER et al., 2004). Matute et al. (2006) estudaram 65 isolados de *P. brasiliensis* e os classificaram em três diferentes espécies filogenéticas, S1, PS2 e PS3 sendo a espécie S1, um grupo parafilético encontrado no Brasil, Argentina, Paraguai, Peru e Venezuela, a espécie PS2, um grupo monofilético encontrado no Brasil e Venezuela e a espécie PS3, um grupo monofilético encontrado apenas na Colômbia. Carrero et al. (2008) classificaram o isolado Pb01 separado dos demais, propondo uma nova espécie filogenética. A correta taxonomia molecular deste fungo tem aberto novas possibilidades para o estudo e o entendimento de suas relações ecoepidemiológicas com seus hospedeiros (BAGAGLI et al., 2006).

*P. brasiliensis* é um fungo termo-dependente, assim, a 25-27°C encontra-se na fase miceliana, saprobiótica, com culturas de aspecto cotonoso, esbranquiçado e microscopicamente são observados filamentos hialinos, finos e septados. A fase leveduriforme, a 35-37°C, constitui a forma parasitária do fungo e, as células encontradas são arredondadas, de parede dupla refringente e com múltiplos brotamentos característicos (LACAZ, 1994).

A paracoccidioidomicose (PCM) é geograficamente limitada à América Latina, com regiões de maior endemicidade, como o Brasil, Colômbia, Venezuela, seguidas por outras áreas, de menor incidência, como Bolívia, Paraguai, Argentina, Uruguai e outros territórios da América Central. Entretanto, outros casos foram relatados fora desta área em geral com períodos longos de latência, representando reativações endógenas de focos infecciosos previamente adquiridos nessas regiões (MANNNS et al., 1996). Pouco se sabe sobre o habitat de *P. brasiliensis*, achados do fungo têm sido relatados em solo, água e plantas das áreas endêmicas, mais recentemente em tatus, mas nenhum desses estudos até o momento pode estabelecer definitivamente seu nicho ecológico (FRANCO et al., 2000; BAGAGLI et al., 2006; BARROZO ET AL., 2010). Acredita-se que *P.*

*brasiliensis* necessita de um reservatório heterotérmico, capaz de mantê-lo na fase leveduriforme e, também, de manter a existência de um nicho no subsolo.

O fungo tem acesso ao organismo via inalação de propágulos da fase miceliana, artroconídios e aleuroconídios, que invadem as vias aéreas terminais, alvéolos e bronquíolos terminais, onde se transformam em células leveduriformes (RESTREPO, 1985). Os indivíduos infectados por *P. brasiliensis* podem permanecer assintomáticos ou desenvolver a doença nas formas aguda/subaguda ou crônica. A primeira acomete principalmente crianças e adolescentes, mas eventualmente pode atingir indivíduos com até 35 anos de idade. A distribuição da forma aguda / subaguda é semelhante em crianças dos gêneros masculino e feminino, causando principalmente linfadenomegalia, manifestações digestivas, hepatoesplenomegalia, envolvimento ósteo-articular e lesões cutâneas. (SHIKANAI-YASUDA et al, 2006). A forma crônica da doença se manifesta em indivíduos com faixa etária entre 30 e 49 anos, atingindo índice de 15 homens para cada mulher. Acredita-se que o menor número de mulheres com PCM esteja relacionado ao efeito protetor exercido pelos hormônios femininos. Em estudos realizados em camundongos infectados intranasalmente, a transição dos conídios foi observada no lavado bronco-alveolar para as formas intermediárias e leveduriformes após um período de 24 a 96 horas; esta transição não foi observada no lavado bronco-alveolar de fêmeas. Estes eventos “in vivo” são consistentes com as observações epidemiológicas e estudos “in vitro” (RESTREPO et al., 1984; SALAZAR et al., 1998), sugerindo que hormônios femininos bloqueiam a transição, tornando as fêmeas menos susceptíveis a doença (ARISTIZABAL et al., 1998). A forma crônica pode progredir lentamente podendo levar anos para sua implantação (SHIKANAI-YASUDA et al, 2006). O principal alvo da PCM é a mucosa da via respiratória baixa até a cavidade oral, sendo considerada resultante da reativação do fungo a partir de focos que permaneceram quiescentes durante anos (FRANCO, 1986). As manifestações pulmonares estão presentes em 90% e em até 25% dos casos, esses, podem ser o único órgão afetado. Mas, geralmente, a doença envolve mais de um órgão simultaneamente, na apresentação multifocal, sendo pulmões, mucosas e pele os

sítios mais acometidos pela infecção (SHIKANAI-YASUDA et al, 2006). Durante a PCM pode ocorrer um processo inflamatório granulomatoso crônico, com conseqüente fibrose. A resposta inflamatória, em estágio avançado, leva a um aumento substancial na produção de citocinas, TNF- $\alpha$  e TGF- $\beta$ , que são capazes de induzir o acúmulo de colágeno gerando alterações anatômicas e funcionais nos órgãos acometidos pela infecção podendo levar a perda da função específica, principalmente no pulmão, glândulas adrenais, sistema nervoso central e pele, além das mucosas (BENARD & MENDES-GIANNINI, 2009; SHIKANAI-YASUDA et al, 2006).

*P. brasiliensis* tem como características a capacidade de aderir, extravasar e invadir barreiras impostas pelos tecidos do hospedeiro (MENDES-GIANNINI et al. 1994; LOPES et al., 1985; LENZI et al., 2000), sintetizando várias substâncias que participam direta ou indiretamente da relação parasito-hospedeiro. A estrutura antigênica de *P. brasiliensis* é bastante complexa; cerca de 60 componentes solúveis foram descritos incluindo glicoproteínas e proteínas com e sem atividade enzimática (YARZÁBAL, 1982).

Esforços no sentido de caracterizar a composição antigênica e de identificar um extrato espécie-específico levaram diferentes autores a isolar a glicoproteína de 43 kDa (gp43) considerada como molécula antigênica altamente específica para o diagnóstico sorológico da paracoccidiodomicose (BLUMER et al., 1984; DE CAMARGO et al., 1988; MENDES-GIANNINI et al., 1989; PUCCIA et al., 1991).

A gp43 tem papel também nos mecanismos de adesão de *P. brasiliensis* (HANNA, 1995; VICENTINI et al., 1994). Vicentini et al. (1994) desenvolveram estudos e propuseram que esta proteína estaria envolvida na ligação de *P. brasiliensis* a elementos da matriz extracelular, sugerindo ainda que o revestimento do fungo pela laminina pudesse explicar, inclusive, a disseminação do fungo no hospedeiro a partir do foco infeccioso. Em recente estudo, foi observada em camundongos, a influência do pré-tratamento com laminina, empregando-se isolados de alta (Pb 18) e de baixa virulência (Pb 265). A ligação da laminina diminuiu a virulência de *P. brasiliensis* em face de ocorrer baixa resposta inflamatória quando foi empregado isolado virulento e na diminuição do

dano pulmonar no isolado de baixa virulência, indicando um efeito inibidor no tratamento de *P. brasiliensis* com laminina e na interação com as células pulmonares do hospedeiro ou proteínas de matriz extracelular (ANDRÉ et al., 2004). A glicoproteína de 43kDa tem papel na aderência desde que soro anti-gp 43 inibiu o processo de adesão em 85% (HANNA et al., 2000). Mas provavelmente, outros componentes do fungo tenham papel no processo de adesão (MENDES-GIANNINI et al., 2000). Em ensaios de afinidade de ligação, verificou-se que a gp43 foi capaz de se ligar tanto a fibronectina quanto a laminina e que esta ligação foi inibida quando se tratou as células Vero com peptídeos sintéticos derivados da laminina (YIGRS) e fragmentos de ambos componentes de matriz (seqüência RGD), indicando que a gp43 participaria do processo de adesão (MENDES-GIANNINI et al., 2006). O sequenciamento do gene que codifica a gp43 revelou similaridade a exo-1,3- $\beta$ -D-glucanase e, conseqüentemente poderia ter papel como ligante de carboidratos, possivelmente à molécula de laminina (CISALPINO et al., 1996; BORGES-WALMSLEY et al., 2002). Uma adesina de 30 kDa de *P. brasiliensis*, com capacidade de ligação a laminina foi isolada sendo mais expressa num isolado de *P. brasiliensis* que apresentava alta capacidade de adesão (ANDREOTTI, 2002; ANDREOTTI et al., 2005). *P. brasiliensis* também apresenta em sua superfície celular duas proteínas com massas moleculares de 19 e 32 kDa que interagem com diferentes proteínas da MEC, tais como laminina, fibronectina e fibrinogênio (GONZALEZ et al., 2005). A proteína gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), recombinante de *P. brasiliensis*, foi capaz de se ligar a laminina, colágeno I e fibronectina. O tratamento de formas leveduriformes de *P. brasiliensis* com anti-GAPDH e de pneumócitos com GAPDH recombinante promoveu a inibição da infecção do fungo às células epiteliais (BARBOSA et al., 2006). Os avanços na caracterização de *P. brasiliensis* têm sido obtidos com os estudos de transcriptoma (FELIPE et al., 2003; FELIPE et al., 2005 ; GOLDMANN et al., 2003; ANDRADE et al., 2005; NUNES et al., 2005; San-Blas & Niño-Veja, 2008; Costa et al., 2007; Bastos et al., 2007; Parente et al., 2008; Silva et al., 2008).

Castro et al., 2005 realizaram um *screening* das proteínas Glicosil Fosfatidil Inusitol (GPI) ancoradoras de *P. brasiliensis*. As proteínas GPI ancoradoras são uma família de proteínas funcional e estruturalmente modificadas pós-tradução encontradas na membrana plasmática ou parede celular de uma variedade de células eucarióticas. Entre as proteínas possivelmente envolvidas há adesinas ligantes da matriz extracelular. Da mesma forma, em estudos de transcriptoma, Tomazett et al., 2005 estudaram as enzimas possivelmente envolvidas na biossíntese e remodelagem de polissacarídeos da parede celular, bem como várias moléculas associadas a esta. Ainda, Bonfim, et al., 2006 analisaram a quitinase de *P. brasiliensis* demonstrando através de ensaios de atividade glicosil-hidrolase que *P. brasiliensis* é capaz de produzir e secretar esta enzima principalmente durante a transição L para M. A análise do transcriptoma permitiu inferir novos alvos para drogas antifúngicas (AMARAL et al. 2005). Recentemente, foi isolada e caracterizada uma lecitina de *P. brasiliensis*, de 70KDa, denominada paracoccina, capaz de ligar a N-acetil-glucosamina (GlcNac). Esta lecitina interage com laminina e a ligação é inibida por GlcNac, D-glucose e D-manose, mas não por D-galactose, N- acetil- galactosamina e L-fucose. A presença desta *in vitro* revelou níveis persistentes de TNF $\alpha$  o que leva ao aumento da produção de óxido nítrico (NO) e conseqüentemente à supressão da imunidade celular (COLTRI et al, 2006).

*P. brasiliensis* não é considerado um parasita essencialmente intracelular, todavia foi observado no citoplasma de células epiteliais (DE BRITO et al., 1973), podendo, esta interação, representar uma via de escape ao sistema imunitário do hospedeiro (MENDES-GIANNINI et al., 1994, HANNA,1996; MONTEIRO DA SILVA et al., 2001; HANNA et al., 2000). Com a finalidade de estudar a interação fungo-hospedeiro, modelos envolvendo técnicas de culturas de células de mamíferos vêm sendo utilizados. MENDES-GIANNINI et al., (1994) utilizaram culturas de células da linhagem Vero (rim de macaco verde da África) e demonstraram que *P. brasiliensis* deve apresentar mecanismos de adesão e de invasão (MENDES-GIANNINI et al., 1992; MENDES-GIANNINI et al., 2000). Inicialmente, pequenos brotos apareciam aderidos às células, mudando

visivelmente sua morfologia e, decorrido algum tempo, estruturas esféricas foram observadas no citoplasma, com aparente migração para o núcleo (MENDES-GIANNINI et al., 1994). HANNA (1995) e UEMURA (1996) estudaram a cinética do processo de interação de *P. brasiliensis* às culturas celulares Vero e HeLa, respectivamente e, os prováveis fatores envolvidos nesta interação. *P. brasiliensis* foi capaz de aderir às células epiteliais e os isolados mais virulentos para animais também tinham maior capacidade de adesão (HANNA et al., 2000), feita aparentemente por um pequeno túbulo (HANNA, 1995; HANNA, 1996; UEMURA, 1996), com presença de cavitações circunscritas ao redor do elemento fúngico e também vacúolos, resultantes provavelmente dos produtos extracelulares do fungo ou através de um processo fagocitário da própria célula hospedeira (MONTEIRO DA SILVA et al., 2001).

A interação com receptores celulares, que estão normalmente envolvidos no contato célula-célula ou célula-matriz (especialmente integrinas), pode ser usada pelo patógeno para invadir e coexistir como parasita intracelular. O patógeno tem opção de interagir com vários componentes do hospedeiro (HOSTETTER, 1994; FINLAY & FALKOW, 1989; HO & WHITE, 1999). Desta maneira, o entendimento e identificação de moléculas envolvidas na adesão de microrganismos a diferentes substratos no hospedeiro podem ser opções a serem seguidas na descoberta de tratamentos eficientes para as micoses sistêmicas.

A internalização de patógenos pode envolver diferentes vias e requer interações coordenadas entre uma variedade de moléculas como proteínas e lipídios. O citoesqueleto de actina é parte integrante do córtex celular (Engqvist-Goldstein & Drubin, 2003) e controla diversas funções celulares, tais como transporte, sinalização e migração celular (Cantinello, et. al., 1997). A remodelação actínica é constante, devido a agregação de monômeros de actina globular sobre o controle de ATP, assim, o controle de vias e proteínas que promovam a formação de filamentos actínicos, é, portanto, capaz de direcionar a polimerização de actina em sítios específicos auxiliando a entrada do patógeno. *P. brasiliensis* é capaz de invadir as células epiteliais por meio de alterações da actina e tubulina, bem como sua disseminação pode ocorrer por modificações da



citoqueratina (MENDES GIANNINI et al., 2004; 2008). Toscano, 2006, demonstrou que *P. brasiliensis* possui fatores virulência capazes de ativar a família Rho GTPases (Rho, Rac e Cdc42), que são reguladores essenciais na reorganização da actina.

O fungo induz células epiteliais para produzir pseudópodes (um movimento de actina do córtex celular) englobando o organismo e puxando-o para dentro da célula. A formação destes pseudópodes é acompanhada pelo acúmulo citoplasmático de microfilamentos, necessários a endocitose (Mendes-Giannini *et. al.*, 2004).

O epitélio da mucosa oral estratificada é composto principalmente de queratinócitos que fornecem uma barreira protetora contra agentes patogênicos, contra abrasão mecânica e química. O epitélio da mucosa oral exhibe graus variáveis de estratificação em função da sua localização anatômica na cavidade oral e da sua função. A maioria das superfícies é coberta por epitélio estratificado escamoso, não queratinizado. Em contraste, a gengiva e o palato são cobertos por epitélio queratinizado. Queratinócitos de várias regiões do epitélio oral e da epiderme continuam a exibir padrões de diferenciação distintos.

Enquanto modelos animais fornecem valiosas informações para a compreensão global da biologia de diversas doenças, modelos de cultura celulares *in vitro* são úteis para dissecar os vários mecanismos e as vias de sinalização celular sob diferentes condições. Devido à facilidade de obtenção de cultura de células epiteliais e da habilidade de manipular a expressão gênica nessas culturas, muito da nossa compreensão molecular de sinalização associada com a proliferação epitelial, a diferenciação e morte celular programada é derivada de estudos realizados com queratinócitos cultivados. As linhagens mais freqüentemente disponíveis são de origem da epiderme. O desenvolvimento de linhagens de origem bucal também foi feita nos últimos anos e aplicadas ao estudo de diferentes doenças (NAGLIK et al., 2008; KANG & PARK, 2001).

Por outro lado, a epiderme é composta também por células denominadas queratinócitos, que estão distribuídas em diversas camadas sobrepostas formadas por células firmemente unidas entre si. Os queratinócitos originam-se na camada

basal da epiderme e são deslocados para a superfície da pele. Durante esse processo, essas células tornam-se anucleadas e preenchidas por queratina, uma proteína que impermeabiliza a superfície da pele e impede sua desidratação e danos causados por agressões ambientais. Queratinócitos basais podem ser dissociados e podem proliferar em placas de culturas, dando origem a novas células basais, diferenciando-se. Dependendo das linhagens celulares de queratinócitos, estes podem expressar queratinas diversas (LINDBERG & RHEINWAL, 1990).

A forma multifocal da paracoccidiodomicose é caracterizada pelo envolvimento de sítios extrapulmonares, tais como a pele, a mucosa bucal (estomatite moriforme), a faringe ou laringe (ou uma combinação das duas) e a região apical dos dentes. Portanto, esta doença apresenta diversos quadros clínicos com repercussões na cavidade bucal e camada cutânea (BENARD & MENDES GIANNINI, 2009). Paracoccidiodomicose é caracterizada por inflamação granulomatosa e hiperplasia pseudoepiteliomatosa. Até o momento, a adesão a queratinócitos não foi estudada com o fungo *P. brasiliensis*.

Em dermatófitos, o modelo de cultura de queratinócitos tem sido utilizado para o entendimento da natureza da interação entre os dermatófitos e a pele humana, através dos estudos dos processos de adesão e invasão (SHIRAKI et al., 2006) e, também, na determinação do tipo de resposta imunitária apresentada pelo hospedeiro frente a diferentes espécies de dermatófitos (DUEK et al., 2004). O estudo de *Candida albicans* em cultura de queratinócitos tem sido útil para o reconhecimento das moléculas responsáveis pela adesão. Ollert et al. (1993) observaram a dependência do tamanho do inóculo e da temperatura de incubação para o sucesso da adesão aos queratinócitos, além do grau de inibição da adesão por diversas moléculas, como fibronectina, laminina, colagênio tipo III, ou seus peptídeos derivados, além dos açúcares D (+) – glicosamina, D (+) – galactosamina, D (+) - glicosamina e alfa-D (+) – fucose, sugerindo a existência de múltiplos mecanismos moleculares para o sucesso da adesão de *C. albicans* aos queratinócitos. Em dermatites atópicas, os queratinócitos têm um papel crítico nas respostas inflamatórias e na secreção de citocinas. A pesquisa dessas células

demonstrou o perfil de secreção de citocinas diferentes para as espécies de *Malassezia*. *Malassezia globosa* induz principalmente IL-10 e IL-13 enquanto a *M. restricta* IL-4, demonstrando o possível motivo da exacerbação da resposta imunitária por Th2 (ISHIBASHI et al., 2006). Ainda quanto a indução de citocinas, *Staphylococcus aureus* tem capacidade de induzir a produção tanto de RNAm quanto de TNF-alfa durante a síntese bacteriana ativa na interação com queratinócitos, mesmo sem que ocorra a invasão da célula do hospedeiro (AUFIERO et al., 2007). *Propionibacterium acne* pode induzir a expressão de beta1 integrinas tanto em queratinócitos em proliferação, como nos diferenciados. (JARROUSSE et al., 2007).

*P. brasiliensis* é fungo com capacidade de modificar a expressão de genes para se adaptar e colonizar o hospedeiro, desse modo, a identificação de genes diferencialmente expressos durante a interação fungo-hospedeiro pode ajudar a elucidar os mecanismos utilizados para a sobrevivência, resistência e crescimento deste fungo.

Nos últimos anos, algumas técnicas têm sido desenvolvidas com o propósito de avaliar a expressão diferencial de genes em um organismo ou célula e identificá-los (LIANG et al., 1994; WADA et al., 1997). Estas técnicas são ferramentas poderosas, que permitem detectar mudanças na expressão dos RNAs mensageiros (RNAm) sem qualquer conhecimento prévio dos genes em questão (PASTORIAN et al., 2000). Os métodos mais comumente usados para detectar genes diferencialmente expressos, são: RDA (representational differential analysis) (HUBANK e SCHATZ, 1994), DD (*Differential Display*) (LIANG e PARDEE, 1992) e SH (*Subtractive Hybridization*) (DIATCHENKO et al., 1996). Basicamente, todos estes métodos foram desenvolvidos para amplificar e isolar seqüências de ácido nucléico, presentes em uma amostra e ausentes (ou expressos em menor extensão) em outra.

O RDA em sua forma original foi designado para identificar diferenças entre populações de DNA genômico (LISITSYN et al., 1995). Esta metodologia foi subsequenteiramente modificada para permitir a análise de populações de RNAm, sendo uma técnica poderosa e sensível para identificação de genes expressos

diferencialmente (HUBANK e SCHATZ 1999), permitindo o isolamento de seqüências mais e menos expressas em duas diferentes populações de cDNAs (PASTORIAN et al., 2000). Mais recentemente, populações de cDNAs foram caracterizadas pela técnica de RDA para identificar possíveis genes envolvidos no processo de infecção de *Metarhizium anisopliae* em carrapatos *Boophilus microplu*, comparação entre *C. neoformans* e *C.gatti*, e também durante a infecção de ambos em macrófagos, e em *P. brasiliensis* tem sido avaliado através dessa técnica situações de infecção em camundongos e humanos (DUTRA et al., 2004, Rosa e Silva et al., 2008, Goulart et al., 2010 e BAILAO et al., 2006 e 2007).

Muitos genes de *P. brasiliensis* têm sido descritos como prováveis codificadores de proteínas indispensáveis para essa interação, participando em várias vias metabólicas, captação e transporte de metais como o ferro, cobre e zinco e a síntese de fatores de virulência, tais como a melanina e seus precursores, entre outras funções (COSTA et al, 2007, RATLEDGE & DOVER, 2000, BAILAO et al., 2006, HAMILTON & GOMEZ, 2002, TABORDA et al., 2008, SILVA et al, 2006). A expressão elevada de genes envolvidos na autofagia peroxissomal, transporte de membrana, metabolismo lipídico e na resposta ao estresse oxidativo tem sido associada com a infecção por fungos e virulência (HU et al. 2008, FAN et al., 2005, BAEZA et al 2007 e BAILÃO et al. 2008). Perfis de expressão gênica podem variar substancialmente para infecções agudas ou crônicas em tecidos diferentes do hospedeiro, como foi observado com *Candida albicans*, mostrando a importância de mais estudos com esta abordagem (LORENZ e FINK, 2001; FRADIN et al., 2003; BARELLE et al., 2006).

Neste trabalho, com intuito de avançar no conhecimento da interação de *P.brasiliensis* com diferentes tipos celulares, foi proposto pela primeira vez o estudo da interação deste fungo com queratinócitos, a expressão de proteínas e de genes envolvidos na interação fungo-hospedeiro no modelo de culturas celulares. Para tanto, foram empregadas as técnicas de eletroforese bidimensional e de RDA (Análise de diferença representacional) para avaliar o perfil transcricional de *P. brasiliensis* em contato com pneumócitos e queratinócitos.

## II. PROPOSIÇÃO:

Neste projeto foi avaliada a capacidade de infecção de *P. brasiliensis* aos queratinócitos e às células epiteliais pulmonares, bem como a expressão de proteínas e de transcritos, quando *P. brasiliensis* foi posto em contato com os dois tipos celulares, no intuito de caracterizar genes diferencialmente expressos durante a infecção.

## III. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Comparar capacidade de infecção de *P. brasiliensis* frente a tipos celulares diferentes: pneumócitos e queratinócitos;
- Verificar a expressão de proteínas e identificar genes diferencialmente expressos durante a interação com pneumócitos e queratinócitos.

## IV. METODOLOGIA:

### 1. Microrganismo.

Foi empregado o isolado 18 de *P. brasiliensis* mantido na fase leveduriforme, a 36°C, em meio sólido de Fava Netto, por 03 a 04 dias, gentilmente cedido pela Dra. Vera Lucia Calich do ICB, São Paulo, USP. Este projeto foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

### 2. Cultura de células.

Neste estudo foi utilizada a linhagem de pneumócitos A549, células epiteliais de pulmão humano (obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro), e a linhagem NOK de queratinócitos (células orais normais imortalizadas com o gene *h-tert* doadas pelo Department of Medicine Harvard Medical School-Dr Karl Hunger). Os pneumócitos foram cultivados em meio HAM F-12 suplementado com 100 µl de soro fetal bovino ml<sup>-1</sup>, enquanto os queratinócitos foram cultivados em

5% de CO<sub>2</sub> em meio Keratinocyte SFM (Invitrogen). As duas linhagens foram mantidas a temperatura de 36.5° C.

### **3. Avaliação, por citometria de fluxo, da infecção por *P. brasiliensis* a A549 e NOK.**

#### **3.1. Marcação da suspensão de *P. brasiliensis* com CFSE.**

A suspensão padronizada de *P. brasiliensis* em PBS (Tampão salina fosfato) foi incubada por 10 minutos à 37°C com CFSE (5(6)-Carboxyfluorescein diacetate N-succinimidyl Ester, BioChemika), em seguida foi adicionado 5 volumes de PBS-BSA 0.1% gelado e incubou-se a amostra no gelo por 5 minutos. A amostra foi, então, centrifugada a 2500 x g por 5 minutos, foram feitas duas lavagens em PBS e, novamente, o fungo foi ressuspensão em PBS e a seguir realizou-se a infecção à monocamada de celular.

#### **3.2. Infecção de *P. brasiliensis* à monocamada celular.**

Os ensaios de infecção foram realizados em placas de seis orifícios. Após a formação da monocamada celular, cada poço foi inoculado com 1000µL da suspensão de *P. brasiliensis* em PBS marcado com CFSE e 1000µL de meio sem suplementos, Ham-F12 para pneumócitos e DMEN para queratinócitos. A seguir, as células infectadas foram incubadas por 2, 5 e 8 horas a 36,5°C. As células foram tripsinizadas, lavadas em meio com soro fetal bovino, centrifugadas, fixadas em paraformaldeído 4% e avaliadas por citometria de fluxo para avaliar a quantidade de fungos, diferenciando a capacidade de infecção do isolado 18 frente aos dois tipos celulares avaliados.

### **4. Análise protéica.**

#### **4.1. Obtenção do extrato “cell-free”.**

O antígeno “cell-free” foi obtido da amostra 18 de *P. brasiliensis*, na fase leveduriforme (L) antes e depois do contato de cinco horas do fungo com pneumócitos e queratinócitos. Cerca de 300mg de crescimento foram suspensos em 01 ml de PBS e levados ao vortex por 30s, a suspensão foi centrifugada a

1620 x g por 1min e a concentração protéica dos antígenos foi quantificada pelo método de LOWRY, et al. (1951) e mantidos a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### **4.2. Eletroforese bidimensional.**

Os componentes protéicos de *P. brasiliensis* foram primeiramente submetidos à focalização isoeétrica, utilizando o Ettan IPGphor 3 (GE Healthcare). A segunda dimensão foi realizada para a separação das proteínas de acordo com a massa molecular, realizada em gel de poliacrilamida de 12,5% de acordo com Laemmli, 1970. Os géis foram corados com Coomassie Azul Brilhante G-250 segundo Neuhoff et al. (1988). A análise dos géis foi realizada por meio do software Image Master 2D Platinum(GE Healthcare).

#### **4.3. Ensaio de binding**

O extrato “cell-free” do Pb reisolado de A549 e NOK foi submetido a biotinição utilizando o kit ECL Protein Biotinylation Module (Amersham Pharmacia Biotech). Após esse processo, foi colocado em contato com células, de forma que o “cell-free” de Pb reisolado de NOK foi posto em contato com a monocamada de NOK e cell-free de Pb reisolado de A549 incubado com a monocamada desta célula, ambas por 5 horas a  $37^{\circ}\text{C}$  e posteriormente lavadas três vezes com PBS, para retirar proteínas que não se ligaram à superfície das células. Foi realizada a lise com 1mL de água bidestilada, seguindo-se incubação por 4h à  $25^{\circ}\text{C}$ . As células lisadas foram centrifugadas a 1400 X g por 5min e o sobrenadante submetido a eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE, posteriormente transferidos para membrana de nitrocelulose durante 4h a 400mA. Esta foi bloqueada, com o reagente do kit, por 4h sob agitação a temperatura ambiente e incubada com o conjugado Streptavidin-HRP no título de 1/1000 por 1h à temperatura ambiente. A revelação foi realizada com DAB diluída em 20mL de PBS acrescido de 200 $\mu\text{L}$  de água oxigenada. A reação foi bloqueada com água destilada.

## **5. Ensaio de microscopia**

### **5.1 Imunofluorescência para visualização dos filamentos de actina.**

Após ensaios de infecção à monocamada celular sobre lamínulas redondas em placas de 24 orifícios, cada poço foi inoculado com 500 $\mu$ L da suspensão padronizada de *P. brasiliensis* em PBS acrescida de 500 $\mu$ L de meio, Ham-F12 sem suplementos. Estas lamínulas fixadas com paraformaldeído 4% foram submetidas à reação de imunofluorescência tripla. As lamínulas foram permeabilizadas com solução de Triton X-100, 0,5% em PBS por 20 minutos. Nova lavagem foi feita e, a seguir, foi adicionado o soro anti “cell-free”, feita incubação a temperatura ambiente por 1 hora, nova lavagem e adição de conjugado anti coelho marcado com Alexa 594 (Invitrogen) no título 1:300. Após lavagem acrescentou-se o conjugado faloidina-FITC (Sigma) no título de 1:100, a 4°C overnight. As lamínulas foram novamente lavadas e montadas em lâmina com glicerina tamponada, examinadas em microscópio ótico de fluorescência (Leica) e microscópio confocal.

### **5.2. Microscopia eletrônica de Varredura**

A metodologia foi baseada na técnica utilizada por Hanna, 2000. A suspensão de 1,2x10<sup>5</sup> de células NOK foi incubada a 36,5°C overnight em um suporte de sílica em placas de 24 wells para a formação da monocamada celular, em seguida foi realizada a infecção por *P. brasiliensis* como descrito no item 5. Após os períodos de 2, 5 e 8 horas as células foram lavadas com tampão cacodilato 0.1M, fixadas com glutaraldeído 2% em tampão cacodilato 0.1M overnight e pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1% durante 2 horas.

Após fixação, nova série de lavagens com tampão cacodilato foi realizada e em seguida o material foi submetido a uma bateria de banhos de imersão, de 15 minutos cada, em alcoóis 30%, 50%, 70% e 100%, a desidratação completa foi realizada através da técnica de ponto crítico, em seguida realizou-se a microscopia eletrônica de varredura de emissão de campo (FEG-SEM).



## 6. Análise dos genes diferencialmente expressos por RDA.

### 6.1. Condições de tratamento.

Uma suspensão padronizada do isolado 18 de *P. brasiliensis* foi posto em contato durante cinco horas com as culturas A549 e NOK isoladamente. Decorrido o tempo de infecção realizou-se três lavagens com PBS, as células foram lisadas e realizou-se uma centrifugação para recuperar as leveduras que estavam em contato, invadidas ou aderidas, às células epiteliais. Então, a extração de RNA foi realizada das situações avaliadas (testes) e também do isolado cultivado em meio de Fava-Netto (controle).

**Tabela 1:** Descrição dos testes e controles avaliados nas situações de RDA realizadas.

| Situação | Controle                        | Teste                  |
|----------|---------------------------------|------------------------|
| <b>A</b> | Pb cultivado em meio Fava Netto | Pb em contato com A549 |
| <b>B</b> | Pb cultivado em meio Fava Netto | Pb em contato com NOK  |

### 6.2. Extração de RNA total.

As células fúngicas foram maceradas com nitrogênio líquido e rapidamente transferidas para um tubo (tipo falcon) contendo 3,5mL de Trizol e pérolas de vidro. A amostra foi agitada vigorosamente em vórtex por 15 minutos e após, centrifugadas a 1620 x g por 10 minutos. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo, adicionado de 0,2mL de clorofórmio para cada 0,75mL de trizol recuperado, agitado vigorosamente e deixado em repouso por 10 minutos. Após o repouso, a amostra foi centrifugada a 1620 x g por 15 minutos e a fase aquosa, transferida para um novo tubo. Foram acrescentados 0,25mL de isopropanol e 0,25mL de solução de citrato de sódio 0,4M e cloreto de sódio 0,8M para cada 0,75mL de trizol recuperado inicialmente, agitado gentilmente e deixado em repouso por 10 minutos a temperatura ambiente. A amostra foi centrifugada a 1620 x g por 30 minutos, o sobrenadante foi descartado e o precipitado, lavado

com etanol a 75%. Nova centrifugação foi realizada a 1620 x g por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi seco a temperatura ambiente. Finalmente, o precipitado foi ressuspensão em 30 $\mu$ L de água DEPC (Dietil Pirocarbonato) 0.01% e armazenado a -70 °C.

### 6.3. Metodologia de RDA.

Foi seguido o protocolo descrito por Pastorian et al., (2000) modificado por Dutra et al., (2004).

#### 6.3.1. Síntese de cDNA fita simples.

A síntese da primeira fita de cDNA foi feita em uma reação contendo 1 $\mu$ g de RNA total, 10pmol/ $\mu$ L da seqüência iniciadora *cDNA* (5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCGGG-3') e essa mistura foi aquecida por 2 minutos a 72°C. Em seguida foi acrescentado 10pmol/ $\mu$ L do oligo dT modificado *CDS* (5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTAC(T)<sub>30</sub>N<sub>1</sub>N, onde N=A, C, G ou T; N<sub>1</sub>=A, G ou C), 2 $\mu$ L de uma mistura de dNTPs (10 mM), 2 $\mu$ L de RNaseOUT (40U/ $\mu$ L) (Invitrogen), 0,4 $\mu$ L de DTT (100mM), 1,2 $\mu$ L de cloreto de magnésio (50mM), 2 $\mu$ L da enzima transcriptase reversa (200U/ $\mu$ L) (RT Superscript II - Invitrogen) e 4 $\mu$ L de tampão 5X (Tris-HCl 250mM pH 8,3; KCl 375mM; MgCl<sub>2</sub> 15mM). Esta reação foi aquecida durante 1 hora e trinta minutos a 42°C. Após este período foi adicionado 80 $\mu$ L de TE (Tris-HCl 10mM; EDTA 1mM pH 8,0) e aquecida por mais 7 minutos a 72°C.

#### 6.3.2. Síntese de cDNA fita dupla.

Para síntese da segunda fita de cDNA foi utilizado 3 $\mu$ L da primeira fita, 10pmol/ $\mu$ L da seqüência iniciadora *PCR II* (5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3'), 10 $\mu$ L de tampão 10X (Tris-SO<sub>4</sub> 600mM pH 8,9, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 180mM), 2 $\mu$ L de uma mistura de dNTPs (10mM), 2 $\mu$ L de sulfato de magnésio (50mM), 2 $\mu$ L de *Taq* Hi-Fi (Invitrogen) e água milli-Q estéril tratada com DEPC 0,01% para volume final de 100 $\mu$ L. As condições de amplificação foram as seguintes: um ciclo inicial por 1

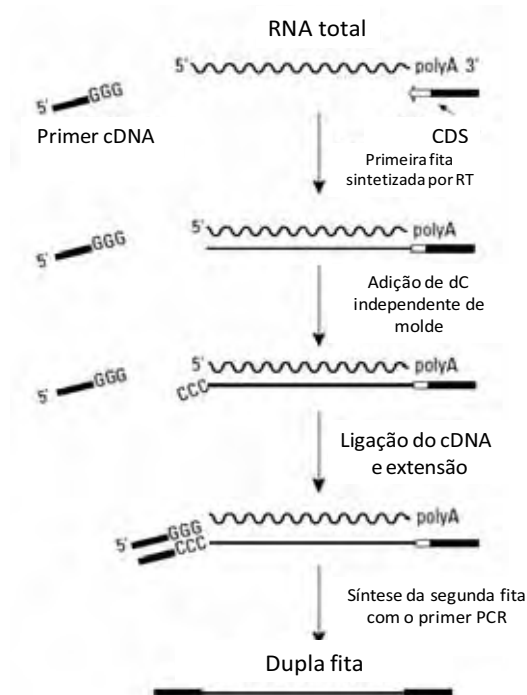
minuto a 95°C, seguido por 20 ciclos de desnaturação por 15 segundos a 95°C, anelamento por 30 segundos a 55°C, e extensão por 5 minutos a 68°C e um ciclo final de extensão por 7 minutos a 68°C. A figura 1 apresenta um esquema da síntese da primeira e segunda fita de cDNA a partir do RNA total.

### 6.3.3. Digestão com *Sau3AI*.

1 µg da fita dupla de cDNA de ambos teste e controle foi digerido com 1 µL da enzima *Sau3AI* (10U/µL) (Promega), 5 µL de tampão B (Tris-HCl 60mM pH 7,5; NaCl 500mM; MgCl<sub>2</sub> 60mM; DTT 10mM), e água milli-Q estéril para volume final de 50 µL durante 3 horas e trinta minutos a 37°C. Posteriormente, a reação foi purificada através do kit QIAquick (Qiagen) e quantificados a 260nm.

### 6.3.4. Anelamento do primeiro par de adaptadores.

Os produtos da digestão das amostras teste e controle (300ng) foram ligados ao primeiro par de adaptadores RBam12 (5'-GATCCGTTTCATG-3') e RBam24 (5'-ACCGACGTCGACTATCCATGAACG-3') (500pmol/µL), nas seguintes condições: 55°C/20 minutos; 54°C/10 minutos; 53°C/1 minuto; 52°C/1 minuto; 50°C/1 minuto; 45°C/5 minutos; 40°C/5 minutos; 30°C/5 minutos; 25°C/5 minutos; 20°C/3 minutos; 15°C/5 minutos; 10°C/5 minutos; 4°C/30 minutos.



**Figura 1:** Síntese da primeira fita com os iniciadores 3' CDS e 5' PCR a partir de RNA total.

### 6.3.5. Ligação do primeiro par de adaptadores.

Após anelamento foi adicionado 1 $\mu$ L de ligase (5U/ $\mu$ L) (Fermentas), 3 $\mu$ L de tampão ligação 10X (Tris-HCl 400mM; MgCl<sub>2</sub> 100mM; DTT 100mM; ATP 5mM) e 3 $\mu$ L de ATP (10 mM) (Invitrogen), por 18 horas a 16°C em seguida a reação foi purificada através do kit QIAquik (Qiagen).

### 6.3.6. Teste de ligação do primeiro par de adaptadores.

Para confirmar a ligação dos adaptadores, foi feito o teste utilizando-se: 0,5 $\mu$ L da reação de ligação- antes da purificação, 5 $\mu$ L de uma mistura de dNTPs (1mM), 2,5 $\mu$ L de tampão 10X (Tris-SO<sub>4</sub> 600mM pH 8,9; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 180mM), 2 $\mu$ L de cloreto de magnésio (50mM), 0,5 $\mu$ L de *Taq* Hi-Fi (Invitrogen) e água milli-Q estéril para volume final de 25 $\mu$ L, o excesso de adaptador adicionado no item 6.3.5 funcionou como primer para esta reação. A PCR foi realizada nas seguintes condições: um ciclo inicial por 1 minuto/95°C, seguido por 25 ciclos de desnaturação por 45 segundos/95°C e extensão por 4 minutos/72°C e um ciclo final por 10 minutos/72°C. A reação foi visualizada em gel de agarose 1% em tampão TBE 1X, corado pelo brometo de etídio (0,5 $\mu$ g/mL) e observado à luz ultra-violeta.

### 6.3.7. Primeira amplificação.

Foi feito um *mix* contendo 10,4 $\mu$ L de tampão 10X (Tris-SO<sub>4</sub> 600 mM pH 8,9; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 180 mM), 8,3 $\mu$ L de cloreto de magnésio (50mM), 5,2 $\mu$ L de uma mistura de dNTPs e água milli-Q estéril para volume final de 93,4 $\mu$ L. Foram retirados 10 $\mu$ L desta mistura e adicionado 0,5 $\mu$ L de *Taq* Hi-Fi (Invitrogen) e reservado, ao restante foi adicionado 0,1 $\mu$ L da seqüência iniciadora RBam24 e 6 $\mu$ L do produto de ligação, esta foi aquecida durante 2 minutos a 72°C, em seguida foi adicionado o restante do *mix* e aquecido por mais 5 minutos a 72°C, seguido de: 1 ciclo inicial de 1

minuto/95°C, seguido por 7 ciclos de 45 segundos/95°C; 4 minutos/72°C e um ciclo final de 10 minutos/72°C.

Posteriormente foi realizada uma nova PCR, onde 6µL da primeira foi utilizado como *amplicon* para uma segunda reação realizada nas mesmas condições da anterior, entretanto esta foi amplificada 30 vezes. Como controle negativo foi utilizado a mesma mistura exceto o produto de ligação. A reação foi visualizada em gel de agarose 2,0% em tampão TBE 1X, corado pelo brometo de etídio e observado à luz ultravioleta.

O produto final foi purificado e digerido com a enzima de restrição *Sau3AI* para remoção dos adaptadores e uma nova purificação foi feita. A segunda ligação foi feita usando-se os adaptadores NBam12 (5'-GATCCTCCCTCG-3') e NBam24 (5'-AGGCAACTGTGCTATCCGAGGGAG-3') que foram anelados e ligados apenas aos produtos de amplificação da condição teste Para isso, foram utilizadas as mesmas condições da primeira reação de anelamento e ligação (itens 6.3.4. e 6.3.5.) e depois, purificada novamente antes da primeira subtração.

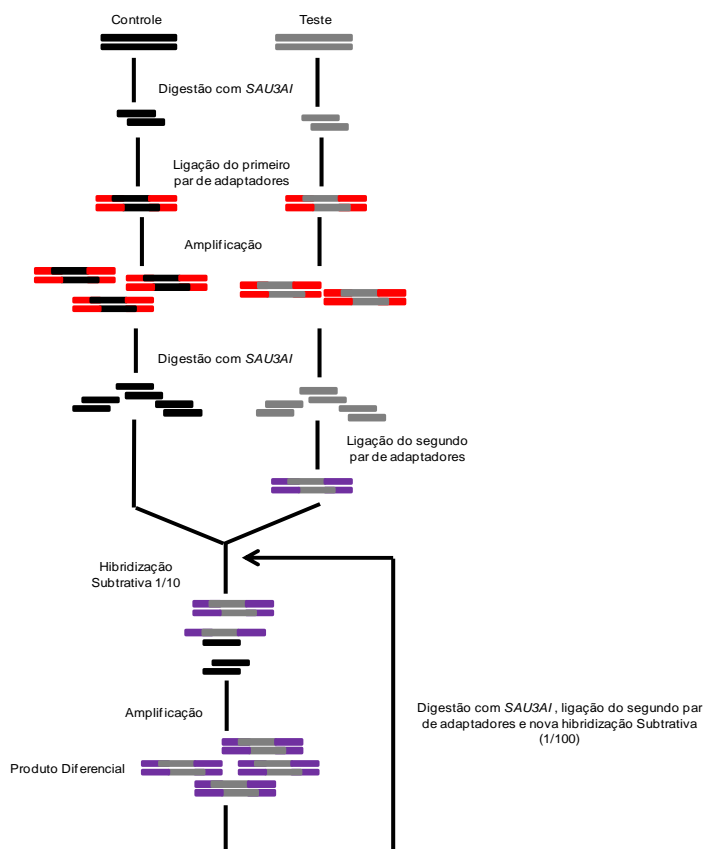
#### **6.3.8. Primeira subtração.**

Para primeira subtração, o teste (cDNA digerido e ligado aos adaptadores) e o controle (cDNA digerido sem os adaptadores) foram misturados na proporção de 1:10, acrescido de 50µL de acetato de amônio 7,5M e 375µL de etanol absoluto, a reação foi incubada por 3 horas à -20°C. Posteriormente, esta foi centrifugada a 20800 x g por 30 minutos e lavada com etanol 70%. O *pellet* foi ressuscitado em 4µL de tampão EE 3X (EPPS 30 mM (Sigma) pH 8,0; EDTA 3 mM), aquecido por 95°C/2 minutos. Em seguida, esta foi transferida para um tubo contendo 1,5µL de NaCl 5M, coberta com óleo mineral e incubada nas seguintes condições: 95°C/3 minutos; 67°C/24 horas. Após este período foi adicionado 40µL de água milli-Q estéril.

#### **6.3.9. Segunda amplificação.**

Após a primeira subtração, os produtos foram amplificados nas mesmas condições do item 6.3.7., porém, utilizando o iniciador NBam24.

O produto amplificado foi purificado e digerido com a enzima de restrição *Sau3AI* e a terceira ligação foi feita usando-se os adaptadores JBam12 (5'-GATCCGTTTCATG -3') e JBam24 (5'-ACCGACGTCGACTATCCATGAACG-3') que foram anelados e ligados apenas aos produtos da condição teste (produtos da terceira ligação) e depois, purificado novamente antes da segunda subtração. Esta foi realizada de acordo com o item 6.3.8., porém na proporção de 1:100 de teste e controle. A amplificação foi feita com o iniciador JBam24, seguindo-se o protocolo descrito no item 6.3.7., após purificação, esta foi clivada com a enzima de restrição *Sau3AI* para remoção dos adaptadores, novamente purificados e, por fim, verificados em gel de agarose 2% em tampão TBE 1X corado pelo brometo de etídio, observado à luz ultra-violeta e em seguida será feita a clonagem e sequenciamento. A figura 2 mostra um esquema resumido das etapas do RDA.



**Figura 2:** Esquema simplificado das etapas do método RDA.

### **6.3.10. Ligação dos fragmentos em vetor de clonagem.**

Os fragmentos de interesse foram ligados ao vetor de clonagem pGEM T Easy, na proporção de 1:5 (vetor / inserto). A reação de ligação foi efetuada em 1 $\mu$ L de tampão ligase (1X), 1 $\mu$ L de T4 DNA ligase, 1 $\mu$ L de ATP num volume final de 10  $\mu$ L. Após incubação a 16°C/18horas, este foi precipitado e a transformação foi realizada em células de *Escherichia coli*.

### **6.3.11. Preparo de células competentes para transformação por eletroporação.**

Uma colônia de *E. coli* XL1 *blue* foi inoculada em 10mL de meio LB (Luria-Bertani) líquido por 18 horas a 37°C. Em seguida, foi inoculado 5mL deste pré-inóculo em 500mL de meio LB, incubado a 37°C sob agitação até atingir uma D.O. de 0,35-0,4 em comprimento de onda de 550nm. A cultura foi então resfriada em banho de gelo por 30 minutos e centrifugada a 4500 x g por 15 minutos a 4°C. As células foram ressuspensas em 450mL de água milli-Q estéril gelada, centrifugadas 4500 x g por 15 minutos a 4°C e ressuspensas em 200mL de água gelada e submetidas a uma nova centrifugação. Em seguida as células foram ressuspensas em 10mL de glicerol 10% gelado e centrifugadas. O precipitado foi ressuspenso em aproximadamente 2mL de glicerol 10% ( $3 \times 10^{10}$  células/mL), em seguida estas foram alíquotadas, congeladas em nitrogênio líquido e mantidas a -80°C.

### **6.3.12. Transformação de células de *E. coli* por eletroporação.**

Uma alíquota de 20 $\mu$ L de células competentes foi descongelada em banho de gelo e recebeu a adição de 1 $\mu$ L do sistema de ligação (item 6.3.9.). Esta mistura foi então colocada em uma cubeta de 0,2cm previamente gelada. A cubeta foi colocada no aparelho de eletroporação com os seguintes parâmetros: 2,5mV e 125 $\Omega$ . Após o pulso as células foram recolhidas com 1mL de meio SOC (SAMBROOK e RUSSEL, 2001) e incubadas por 1 hora a 37°C. A suspensão foi plaqueada em ágar LB acrescido de 100 $\mu$ g/mL de ampicilina, IPTG (isopropil-tio- $\beta$ -D-galactopiranosídeo) e X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosídeo),

nas concentrações de 0,1mM e 30µg/mL, respectivamente, e incubada por 18 horas a 37°C para a seleção de clones recombinantes.

#### **6.3.13. Extração de DNA plasmidial em microplaca.**

As colônias positivas foram crescidas em 1mL de meio LB contendo 50µg/mL de ampicilina em microplacas tipo *deep well*, por 18 horas (*overnight*), a 37°C sob agitação constante. Após este período 100µL dos clones cultivados foram transferidos para placas tipo ELISA, adicionado v/v de glicerol 50% e estocadas a -80°C. O restante do crescimento foi centrifugado a 2250 x g por 6 minutos, o sobrenadante foi descartado e 250µL de solução GTE (glicose 50mM; Tris-HCl 25mM pH 8,0; EDTA 10mM pH 8,0) foram adicionados a cada poço. A microplaca foi submetida a agitação em vortex e novamente centrifugada a 2250 x g por 10 minutos a 20°C. O sobrenadante foi descartado e 80µL de solução GTE foram adicionados a cada poço. Após agitação em vortex as suspensões foram transferidas para uma placa tipo ELISA (fundo redondo) contendo 2µL de RNase (10mg/mL). Em seguida, 80µL de NaOH 0,2N; SDS 1% foram adicionados a cada poço, a placa foi homogeneizada por inversão e mantida à temperatura ambiente por 10 minutos. 80µL de acetato de potássio 3M foram adicionados a cada poço. Após homogeneização por inversão a reação foi mantida à temperatura ambiente por 10 minutos. Após esse período, as placas foram incubadas a 90°C por 30 minutos e em seguida resfriadas em banho de gelo e centrifugada a 2250 x g por 9 minutos. A reação foi transferida para um sistema contendo uma placa Millipore (MAGV N22) no topo de uma placa tipo ELISA (fundo cônico) o qual foi centrifugado a 2250 x g por 6 minutos. O sistema foi desmontado, e a etapa seguinte consistiu na precipitação do DNA. Para tanto, 100µL de isopropanol foram adicionados ao filtrado, e a placa centrifugada a 2250 x g por 45 minutos, o precipitado foi lavado com etanol 70% e ressuspendido em água milli-Q estéril.

#### **6.3.14. Seqüenciamento.**

O seqüenciamento foi realizado pelo método de Sanger et al., (1977) utilizando o seqüenciador automático MegaBACE 1000 (Amersham Biosciences).



As reações foram realizadas com o kit *DYEnamic ET* e *Dye Terminator Cycle Sequencing* (Amersham Biosciences), seguindo os protocolos recomendados pelo fabricante, utilizando o oligonucleotídeo M13 *forward* onde se utilizou um ciclo inicial por 95°C/2 minutos seguido de 35 ciclos a 95°C/20 segundos, 50°C/20 segundos, 60°C/1 minuto. A seqüência nucleotídica foi determinada através da incorporação de dideoxynucleotídeos (ddNTP) terminadores e foram analisadas e avaliadas automaticamente através dos cromatogramas gerados e interpretados pelo software MegaBACE 1000 sequencer convertidos em seqüência de DNA.

#### **6.3.15. Análise das seqüências.**

Inicialmente, as ESTs foram processadas utilizando o programa Phred (EWING et al., 1998). Somente as seqüências com mais de 100 nucleotídeos e com qualidade Phred maior ou igual a 20 foram selecionadas. A retirada de seqüências contaminantes de vetor foi realizada, utilizando-se o programa Crossmatch (GREEN, 1996) e para a montagem dos *contigs* foi utilizado o programa CAP3 (HUANG & MADAN, 1999). Finalmente, as ESTs resultantes foram comparadas com o banco de dados não redundante GenBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) utilizando-se o programa BLASTx (ALTSCHUL, et al., 1997).

### **6.4. Confirmação dos resultados obtidos por RDA.**

#### **6.4.1 RT-PCR**

Para confirmação dos resultados por RT-PCR, foram desenhados iniciadores específicos para as ESTs, entre elas: Glucosamine 6 phosphate isomerase (200pb): 5' C C C A G C C A A C A T C A A T A T C C 3' e 5' G A T G G T G T C G T A T G C G A G T G 3'; PenR2 (283pb): 5' C C C T A G T T T C G A G A G C A A C G 3' e 5' G A C C A T C T T G G C G A T T T C A T 3' e Ubiquitina-MMS2: 5' T G G C C T A G C T A A C G G A G A T G 3' e 5' A T T T T C A C C G C A T T G G A T G T 3'(120pb). Foi utilizado nas reações, o mesmo RNA usado para o RDA e a síntese da primeira fita foi realizada conforme o item 6.14.1. Iniciadores para o gene da proteína ribossomal L34: 5' A T G T C C T G T

C T A C A C T G C G C A A G 3' e 5' T G C T A A C A G G G A T A C A G A T G G A G A G 3', foram utilizados como controle da reação e para ajuste de concentração de cDNA.

As reações foram realizadas utilizando-se o kit OneStep RT-PCR Kit PCR (Qiagen), com concentrações de 25pmol de cada seqüência iniciadora e RNA, o volume final na reação de amplificação foi de 25µL. As reações foram realizadas com temperatura inicial 50°C, para a síntese da primeira fita e 95°C e 15 minutos para inativação das transcriptases e ativação da polimerase, a seguir foi realizado o ciclo de amplificação com 35 ciclos com temperatura de desnaturação de 94°C por 1 minuto; a temperatura de anelamento foi ajustada de acordo com os iniciadores variando de 55 a 63°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos e um ciclo final a 72°C por dez minutos, utilizando-se aparelho termociclador Perkin Elmer modelo *GeneAmp PCR System 9700*. O produto amplificado foi separado em gel de agarose 1,5%, em tampão TBE 1X, durante 1,5 hora a 100 volts, corados com gel red (Uniscience) e observados à luz ultravioleta.

#### **6.4.2. PCR em tempo real.**

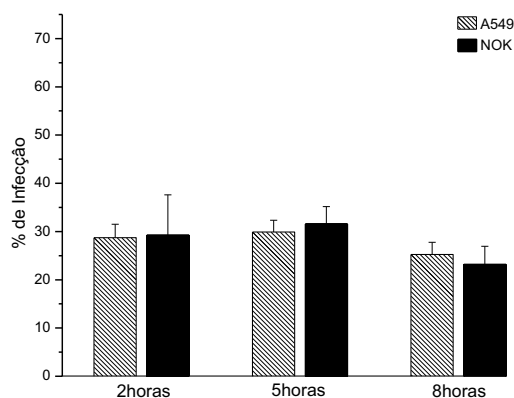
Para esse ensaio além dos genes avaliados por RT-PCR, também foi observada a expressão da proteína RDS 1- 5' C T A T C A C A C A C A A T C G A A C T 3' e 5' A G G T A G T G T T A A G C T G T G A A 3' (177pb). As reações foram realizadas com 12,5 µl de máster mix e 2 µl de RT mix do kit QuantiTect SYBR Green RT PCR (Qiagen), cada primer foi adicionado a 400 nM e o volume foi final ajustado a 25 µl. O programa de reação foi iniciado com 50°C, para a execução da primeira fita e 95°C e 15 minutos para inativação das transcriptases e ativação da polimerase, a seguir foi realizado o ciclo de amplificação com 45 ciclos com temperatura de desnaturação de 94°C por 30s; a temperatura de anelamento foi 60°C por 30 segundos, 72°C por 45 segundos e um ciclo final a 72°C por dez minutos. Para confirmar que cada pico correspondia a um único fragmento foi realizada a eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão TBE 1X, durante 2 horas a 100 volts e corados com gel red e observados à luz ultravioleta. As reações foram realizadas em duas repetições, em triplicata, usando o aparelho

Applied Biosystems 7500 cycler. Os dados foram analisados pelo método  $2^{-\Delta \Delta C_T}$  (Livak & Schmittgen, 2001,).

## V. RESULTADOS:

### 1. Ensaio de infecção de *P. brasiliensis* as monocamadas celulares.

Foram realizados três experimentos independentes, em duplicata, para o teste de infecção. Na figura 3 está representado o padrão de infecção das células avaliadas nesta etapa do trabalho. Os índices de infecção nas células A549 e NOK foram semelhantes, em torno de 30% para os tempos de 2 e 5 horas e 25% em 8 horas.

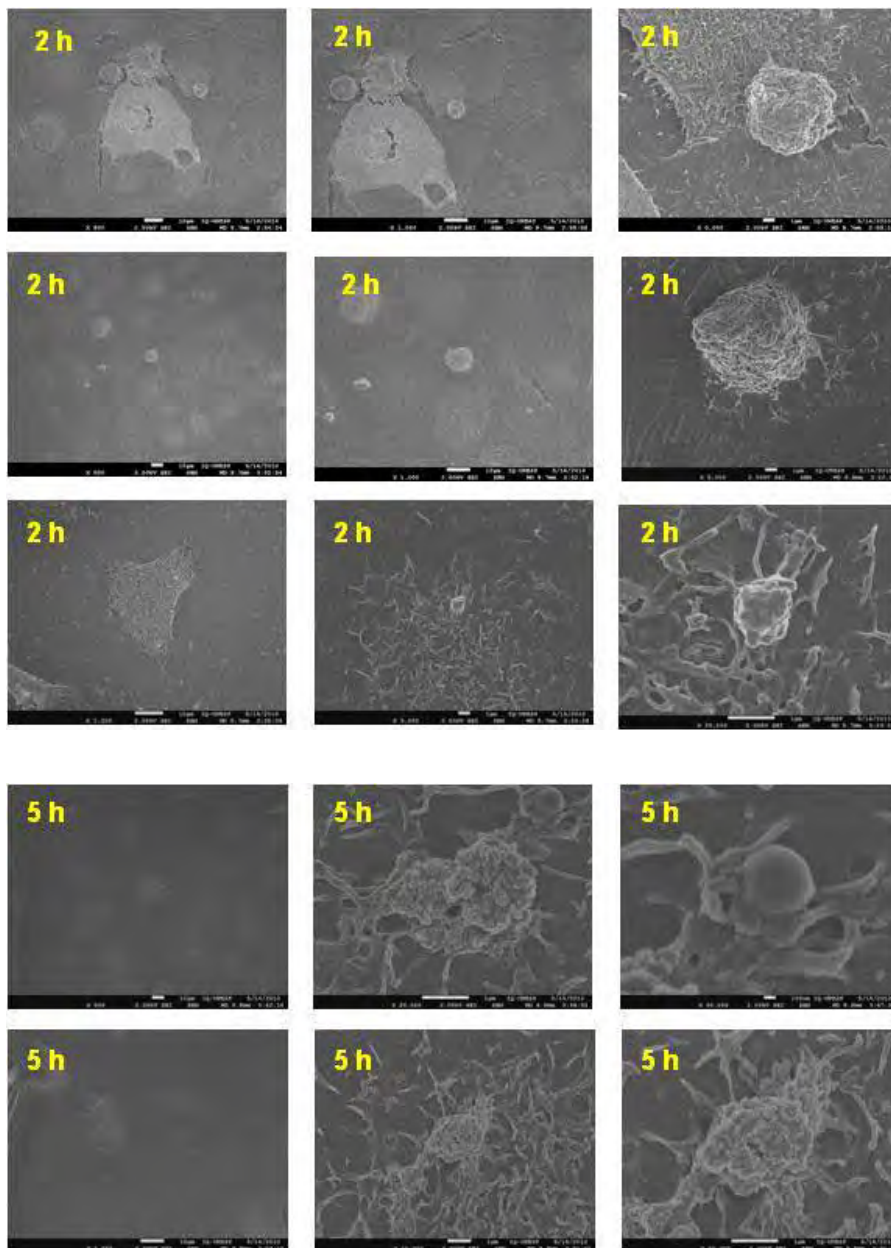


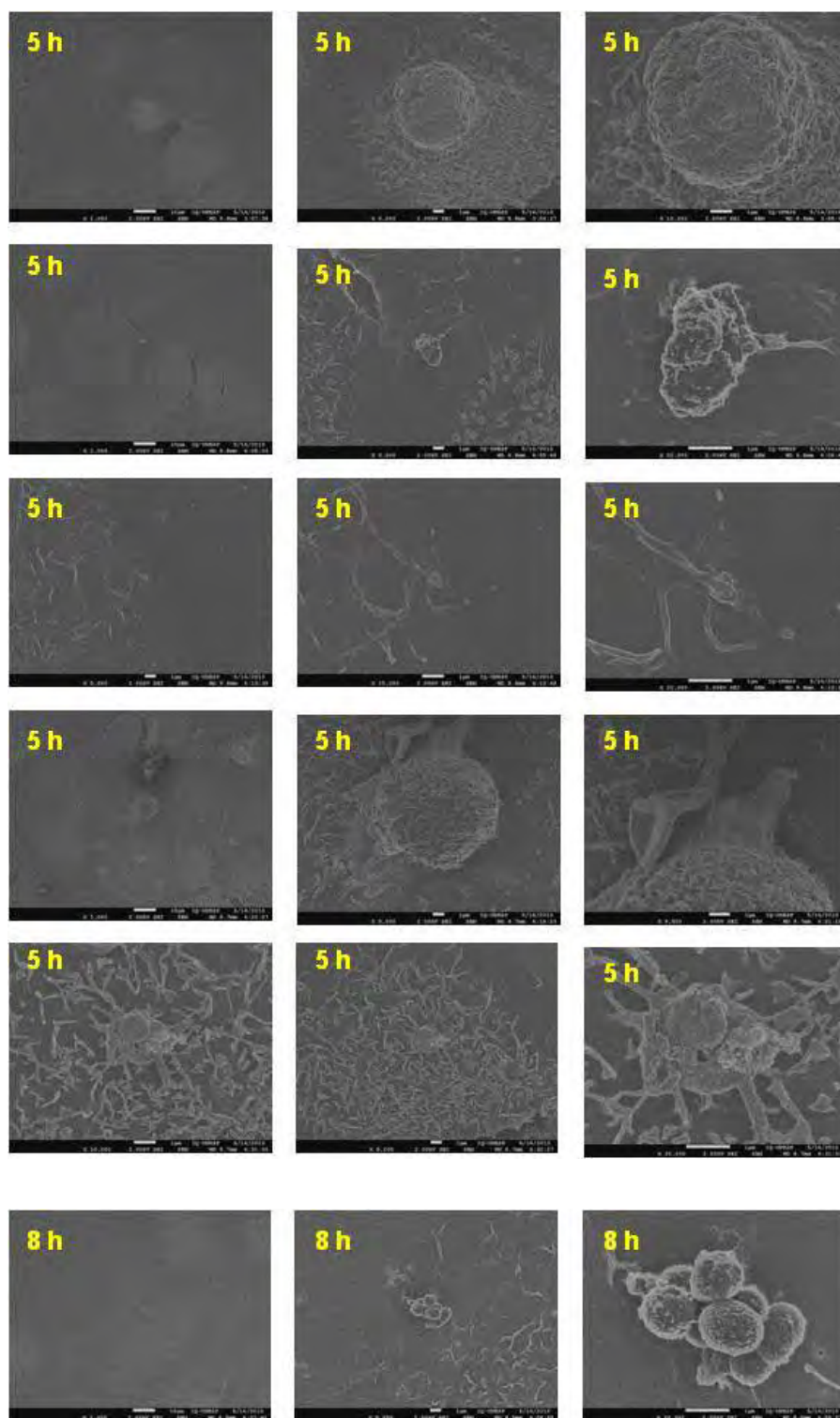
**Figura 3:** Ensaio de infecção do isolado 18 de *P. brasiliensis* avaliado por citometria de fluxo em períodos de incubação de 2, 5 e 8h com células A549 e NOK. O nível de significância entre os índices de infecção para as duas células foi avaliado, mas todos os tempos apresentaram valores de  $p > 0,05$ .

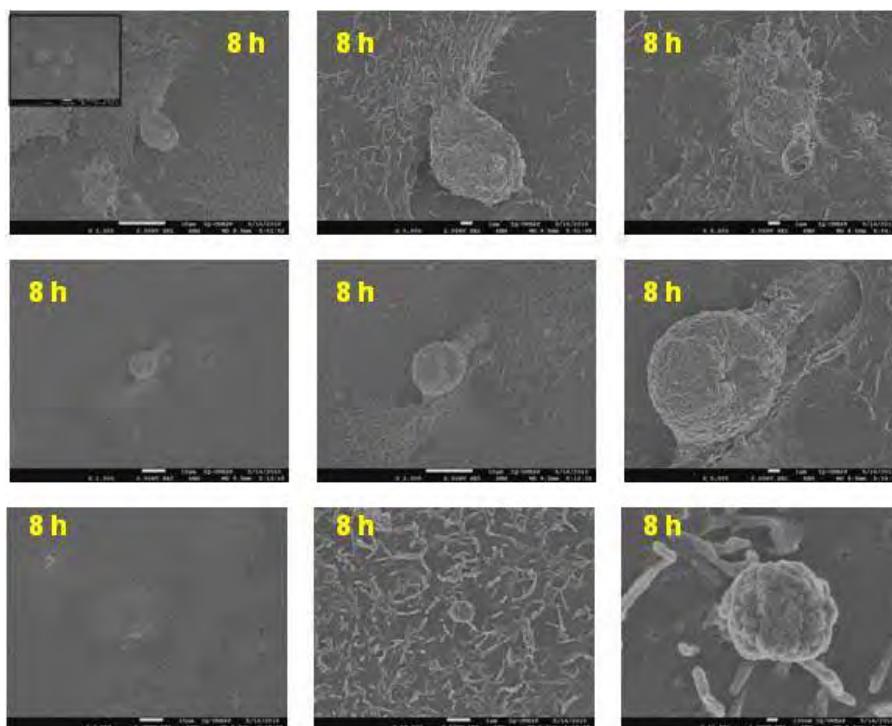
### 2. Microscopia de Varredura.

Foi possível observar em maior detalhe a adesão de *P. brasiliensis* às células NOK. O fungo após este contato aparentemente induziu alterações expressivas nas células, aparecendo prolongamentos celulares, fruto da provável alteração do citoesqueleto em que actina pode estar envolvida, principalmente em cinco e oito horas de infecção. *P. brasiliensis* adere às células por uma estrutura

tubular, e há alterações destas com o aparecimento de depressões na superfície celular, sugerindo um processo de cavitação ativa. Nas zonas de contato entre fungo e célula nota-se material lançado pelo fungo provavelmente para facilitar sua entrada na célula (Figura 4).





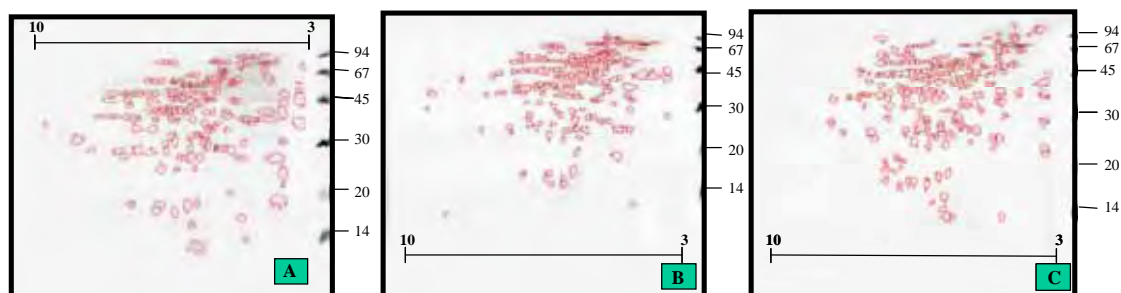


**Figura 4;** Infecção das células NOK por *P. brasiliensis*, nos períodos de 2, 5 e 8 horas, demonstrado através de microscopia eletrônica de varredura.

### 3. Análise protéica dos extratos “cell-free” do isolado 18 de *P. brasiliensis*.

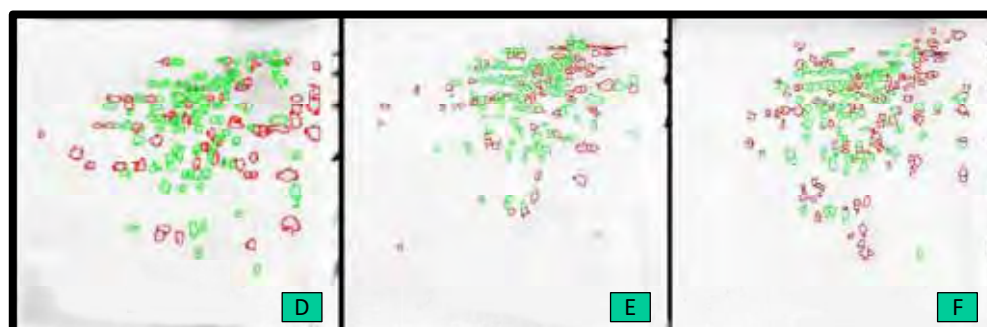
#### 3.1. Eletroforese Bidimensional.

Os extratos “cell free”, do isolado 18, 18 reisolado de A459 e de NOK, foram submetidos à eletroforese bidimensional para a análise da expressão das diversas proteínas de acordo com os pontos isoelétricos e massas moleculares. De maneira geral foram observados de 167 a 243 *spots* com pI variando de 3.2 a 9.5 e massas moleculares de 11 a 121 kDa. A figura 5 demonstra a eletroforese bidimensional nas três situações, assim como a análise dos géis de cada extrato “cell free” pelo programa Image Master 2D Platinum, determinando o número e localização dos *spots*, bem como os valores dos pIs e massas moleculares.



**Figura 5:** Eletroforese bidimensional dos extratos “cell free”: (A) isolado 18 que apresentou 167 spots, com pI variando de 3.8 a 8.3 e massa molecular de 13.1 a 95.3kDa; (B) isolado 18 reisolado de A549 que apresentou 191 spots, com pI variando de 3.3 a 8.8 e massa molecular de 11 a 96 kDa; (C) isolado 18 reisolado de NOK que apresentou 243 spots, com pI variando de 3.2 a 8.5 e massa molecular de 13.2 a 121 kDa.

A análise comparativa da eletroforese bidimensional demonstrou a existência de 80 spots semelhantes entre os três extratos “cell-free” do isolado 18, deste em contato com A549 e em contato com NOK. O isolado 18 em contato com A549 apresentou 95 spots semelhantes ao isolado 18, cultivado em meio de Fava Netto, apresentando uma similaridade de 46%. Enquanto que o isolado 18 cultivado em meio de Fava Netto, apresentou 100 spots semelhantes com o mesmo isolado em contato com NOK, com uma similaridade de 49%. Na figura 6 podem ser observados, em verde, os spots semelhantes e, em vermelho estão marcados os spots exclusivos de cada situação. Foram observados 53, 96, 143 spots exclusivos para os extratos “cell-free” do isolado 18, deste em contato com A549 e em contato com NOK, respectivamente.

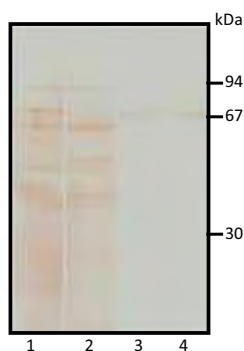




**Figura 6:** Eletroforese bidimensional dos extratos “cell free” do isolado 18 (D), do isolado 18 reisolado de A549 (E) e isolado 18 reisolado de NOK (F). Em verde estão marcados os *spots* semelhantes e em vermelho os *spots* exclusivos de cada situação.

### 3.2. Ensaio de binding.

Os extratos “cell-free” biotinizados foram submetidos ao ensaio de “binding” em células A549 e NOK, para a exploração de possíveis ligantes. Na figura 7 é possível observar a existência de uma banda em torno de 70 KDa, indicando que *P. brasiliensis* apresenta ligantes protéicos para ambas as células com características semelhantes.



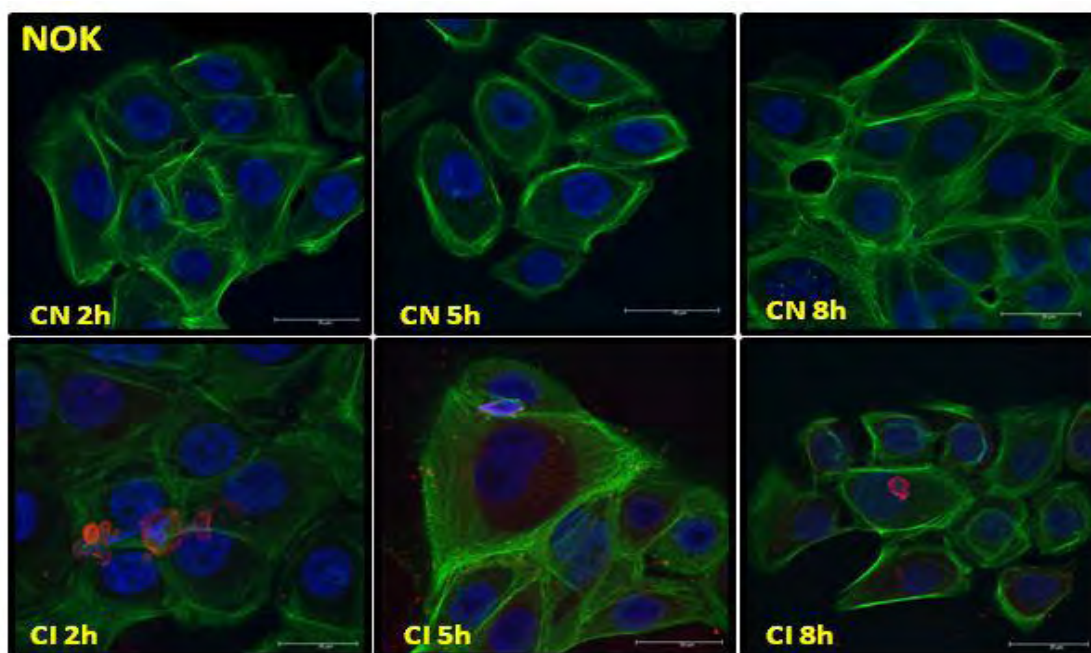
**Figura 7:** Ensaio de “binding” dos extratos “cell-free”: (1) somente “cell-free” Pb18 reisolado de A549; (2) somente “cell-free” Pb 18 reisolado de NOK; (3) ensaio de “binding” com “cell-free” na condição 1 em células A549; e (4) ensaio de “binding” com “cell-free” condição 2 em células NOK.

### 4. Imunofluorescência para observação de microfilamentos de actina.

A remodelação do citoesqueleto foi observada previamente na interação de *P. brasiliensis* com células A549 (Monteiro, 2004). No intuito de realizar a comparação entre as duas linhagens celulares foi utilizada a microscopia confocal para verificar as alterações devido à presença deste fungo em contato com a célula NOK.



Os filamentos de actina das células NOK mostraram-se condensados na margem com projeções nas zonas de contato com as células vizinhas. Os filamentos apresentavam-se finos e não arranjados em paralelo. Após duas horas de contacto com o fungo houve uma aparente perda de filamentos ao redor da célula aparecendo uma intensidade diminuída de fluorescência. Nos tempos maiores houve uma aparente recuperação na organização da actina celular (Figura 8).

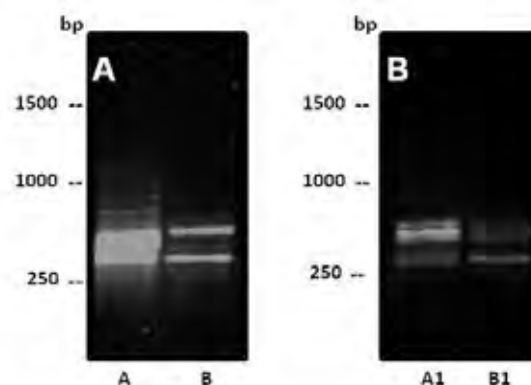


**Figura 8:** Microscopia confocal de filamentos de actina marcados com faloidina-FITC e *P. brasiliensis* marcado com Alexa 594. NOK indica queratinócitos, NOK não infectado (CN) e NOK infectado com o fungo nos tempos de duas horas (2h), cinco horas (5h) e oito horas (8h) de infecção.

### 5. Análise do RNAm por RDA.

A caracterização da expressão gênica diferencial foi realizada por meio da técnica de RDA. Para tanto, o RNA total foi extraído, individualmente para cada caso (Tabela 1). A partir do cDNA resultante após digestão com a enzima de restrição SAU 3AI foi construída uma biblioteca. Os cDNAs resultantes foram reunidos, hibridizados a 67°C por 20 horas e amplificados por PCR, sendo

utilizados dois ciclos sucessivos de subtração e PCR utilizando as seqüências não hibridizadas nos títulos de 1:10 e 1:100. Os produtos diferencialmente expressos das quatro situações foram amplificados, resultando em padrões distintos (Figura 9).



**Figura 9:** RDA, respectivamente, dos produtos diferencialmente expressos de *P. brasiliensis*: A e B correspondem às subtrações 1/10 das situações descritas na tabela 1. A1 e B1, as subtrações 1/100 das mesmas situações.

Os produtos diferencialmente expressos entre o fungo cultivado em meio de Fava Netto e da condição de infecção de *P. brasiliensis* a NOK e A549, após clonagem e extração do DNA plasmidial, foram submetidos ao seqüenciamento automático. Um total de 384 clones foi seqüenciado para cada situação, 143 e 177 foram de boa qualidade para a infecção em NOK e A549, respectivamente. A condição de infecção *P. brasiliensis* em NOK gerou 19 clusters, com dez *contigs* e nove *singlets*, enquanto a infecção em A549 foi agrupada em dezoito *clusters*, com 12 *contigs* e seis *singlets*. As seqüências (*contigs* e *singlets*) geradas a partir das duas subtrações apresentaram homologia com 28 proteínas que estão representadas na tabela 2.

**Tabela 2:** Proteínas homólogas as seqüências encontradas no RDA para a infecção de *P. brasiliensis* em NOK e A549 em relação ao cultivo em meio de Fava Netto. Estão representados os valores de *e*, o número de acesso das proteínas encontradas no Gene Bank, o número de clones para cada proteína (a) infecção em NOK e (b) infecção em A549 a partir de *P. brasiliensis*, e a função biológica segundo Gene Ontology (GO).

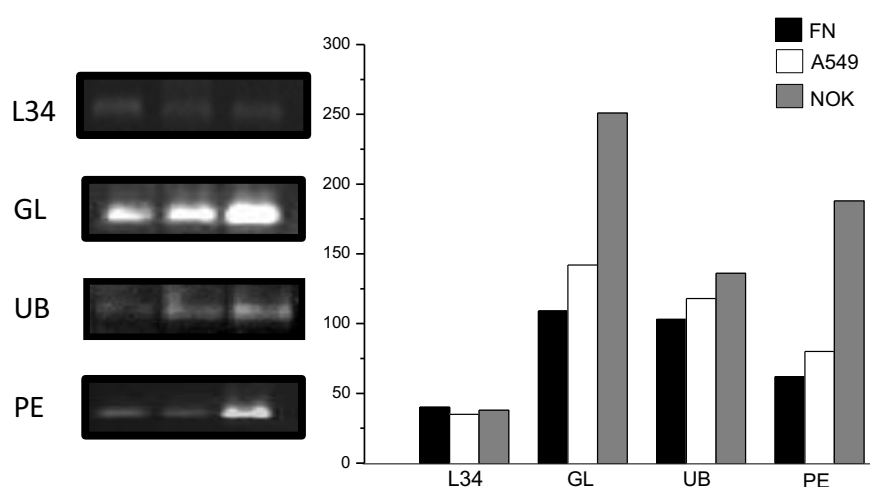
| Proteína  | Tipo Celular | e-value | Número de Acesso | Frequência (número de clones)     | Função biológica  |
|---|--------------|---------|------------------|-----------------------------------|---|
| 40S ribosomal protein S9 de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> (Pb18)   | NOK/A549     | 3e-27   | gb EEH50187.1    | 5 <sup>a</sup> /3 <sup>b</sup>    | Constituinte estrutural dos ribossomos  |
| 60S ribosomal protein L27-A de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> (Pb18)  | NOK          | 2e-22   | gb EEH44323.1    | 1 <sup>a</sup> /3 <sup>b</sup>    | Constituinte estrutural dos ribossomos  |
| ADP,ATP carrier protein de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> (Pb18)  | NOK          | 9e-11   | gb EEH45290.1    | 1 <sup>a</sup>                    | Antiporte de ATP-ADP na célula  |
| Conserved hypothetical protein de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> (Pb18)                                     | NOK/A549     | 3e-59   | gb EEH46428.1    | 14 <sup>a</sup> /26 <sup>b</sup>  | Catálise da oxirredução de grupos sulfeto   |
| Conserved hypothetical protein de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> (Pb18)                                     | A549         | 2e-12   | gb EEH44515.1    | 2 <sup>b</sup>                    | Desconhecida  |
| conserved hypothetical protein de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> (Pb18)                                     | A549         | 1e-87   | gb EEH48267.1    | 2 <sup>b</sup>                    | Catálise da transferência de resíduos de manose para aminoácidos de proteínas   |
| Cytokine inducing-glycoprotein de <i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>Neoformans</i>                           | NOK          | 2e-56   | emb CAC78984.1   | 1 <sup>a</sup>                    | Indução de citocina   |
| Elongation factor 2 de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> (Pb18)  | A549         | 7e-41   | PADG_08125.1     | 1 <sup>b</sup>                    | Catálise de síntese protéica  |
| Glucosamine 6 phosphate isomerase de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> (Pb18)                                  | NOK/A549     | 3e-19   | gb EEH44112.1    | 14 <sup>a</sup> / 30 <sup>b</sup> | Catalise da transformação de D-glucosamina-6-fosfato em D-frutose 6-fosfato   |
| Golgi to plasma membrane transport-related protein de <i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>neoformans</i> JEC21 | NOK/A549     | 1e-10   | ref XP_568859.1  | 1 <sup>a</sup> /3 <sup>b</sup>    | Transporte de substâncias a partir do Golgi para a membrana plasmática  |
| Heat shock protein 90 de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> (Pb18)  | A549         | 1e-23   | gb AAX33296.1    | 1 <sup>b</sup>                    | Resposta ao estresse como resultado de uma perturbação na homeostase; dobra de proteína, interação seletiva e não-covalente com ATP |
| Hypothetical protein CNBD4690 de <i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>neoformans</i> B-3501A                    | NOK          | 4e-10   | ref XP_775740.1  | 9 <sup>a</sup>                    | Desconhecida  |
| Hypothetical protein CNBM0020 de <i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>neoformans</i> B-3501A                    | NOK          | 2e-11   | ref XP_772265.1  | 1 <sup>a</sup>                    | Simporte transmembrana ânion/cátion   |

|   |          |       |                 |                                   |  |
|---|----------|-------|-----------------|-----------------------------------|--|
| <b>Hypothetical protein de <i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>neoformans</i> JEC21</b>              | A549     | 2e-17 | ref XP_572912.1 | 3 <sup>b</sup>                    | Catálise da ligação de ubiquitina a resíduos de lisina; interação seletiva e não-covalente com zinco   |
| <b>Hypothetical protein de <i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>neoformans</i> JEC21</b>              | A549     | 8e-32 | ref XP_571062.1 | 1 <sup>b</sup>                    | Mudanças no estado ou atividade celular indicando estresse do organismo  |
| <b>Hypothetical protein de <i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>neoformans</i></b>                    | A549     | 2e-46 | ref XP_570403.1 | 1 <sup>b</sup>                    | Desconhecida   |
| <b>Hypothetical protein de <i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>neoformans</i> JEC21</b>              | A549     | 9e-13 | ref XP_570610.1 | 1 <sup>b</sup>                    | Catálise da transformação de D-manose-6-fosfato em D-frutose 6-fosfato   |
| <b>Hypothetical protein PAAG_02259 de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> (Pb01)</b>                   | NOK/A549 | 5e-11 | gb EEH40204.1   | 1 <sup>a</sup> /1 <sup>b</sup>    | Desconhecida   |
| <b>Hypothetical protein PABG_06807 de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> (Pb03)</b>                   | NOK      | 4e-42 | gb EEH16720.1   | 1 <sup>a</sup>                    | Desconhecida   |
| <b>Low-affinity zinc ion transporter de <i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>neoformans</i> JEC21</b> | NOK/A549 | 1e-8  | ref XP_570392.1 | 1 <sup>a</sup> /2 <sup>a</sup>    | Transportador de baixa afinidade de zinco (Zn), de fora para dentro ou entre as células  |
| <b>PENR2 protein de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> (Pb18)</b>                                     | NOK/A549 | 8e-44 | gb EEH49739.1   | 5 <sup>a</sup> /2 <sup>b</sup>    | Regulação da transcrição   |
| <b>Predicted protein de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> (Pb18)</b>                                 | NOK      | 9e-12 | gb EEH47615.1   | 1 <sup>a</sup>                    | Respiração aeróbica; incorporação de ferro e enxofre exógeno em um cluster metalo-enxofre; transferência de elétrons do ubiquinol para citocromo c |
| <b>Proteasome component PRE6 de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> (Pb18)</b>                         | NOK      | 3e-25 | gb EEH46637.1   | 2 <sup>a</sup>                    | Catálise da hidrólise de peptídeos internos em uma cadeia polipeptídica  |
| <b>Rds1 protein de <i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>neoformans</i> JEC21</b>                      | NOK/A549 | 4e-17 | ref XP_568514.1 | 32 <sup>a</sup> / 5 <sup>b</sup>  | Mudanças no estado ou atividade celular indicando estresse do organismo  |
| <b>RNA binding protein de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> (Pb18)</b>                               | NOK      | 2e-26 | gb EEH48229.1   | 6 <sup>a</sup>                    | Interação não-covalente seletiva com uma molécula do RNA ou uma parte dele   |
| <b>Short chain fatty acid CoA ligase de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> (Pb18)</b>                 | NOK/A549 | 3e-16 | gb EEH42484.1   | 43 <sup>a</sup> / 84 <sup>b</sup> | Catalise da formação de ácidos graxos de cadeia curta com menos de 8 carbonos  |
| <b>Stress response protein Rds1, putative de <i>Aspergillus fumigatus</i> A1163</b>                     | A549     | 4e-13 | gb EDP51986.1   | 2 <sup>b</sup>                    | Mudanças no estado ou atividade celular indicando estresse do organismo  |
| <b>Ubiquitin conjugating enzyme variant MMS2 de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> (Pb18)</b>         | NOK/A549 | 3e-52 | gb EEH45652.1   | 4 <sup>a</sup> /5 <sup>b</sup>    | Catálise da ligação de proteínas semelhantes à ubiquitina ou ubiquitina-semelhante a um resíduo de lisina  |

## 5.1. Validação dos resultados obtidos por RDA.

### 5.1.1.RT-PCR.

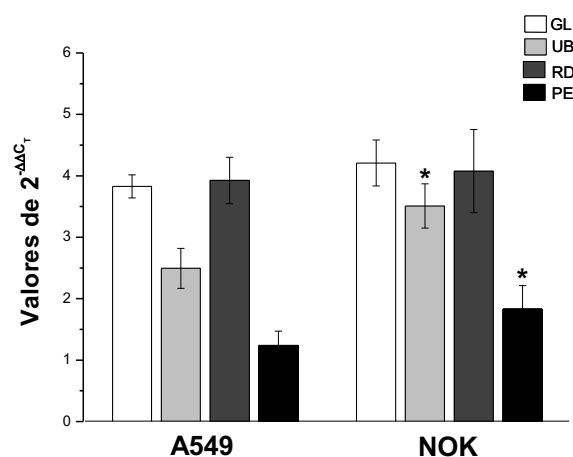
Para confirmação dos resultados por RT-PCR, foram desenhados iniciadores específicos para as ESTs Glicosamina 6 fosfato, PenR2 e Ubiquitina-MMS2, além do controle L34 . Após a amplificação dos produtos das duas condições, infecção de *P. brasiliensis* em A549 e NOK, foi possível comprovar a regulação aumentada dos transcritos nas situações de infecção em relação ao mantido em meio de cultura, para os genes testados (Figura 10).



**Figura 10:** Confirmação dos resultados do RDA pela técnica de RT-PCR: controle (L34); Glicosamina 6 Fosfato Isomerase; (GL), Enzima de conjugação de ubiquitina variante MMS2 (UB); PenR2; (PE).

### 5.1.2.PCR em tempo real.

Para estimar os níveis relativos de transcritos diferencialmente expressos foi realizada a PCR em tempo real. A Figura 11 mostra a quantificação relativa dos transcritos de quatro genes avaliados, glicosamina, ubiquitina, RDS e PenR2



**Figura 11:** Quantificação dos níveis de transcritos de genes diferencialmente expressos durante a infecção de *P. brasiliensis* as células A549 e NOK relativos ao fungo cultivado em meio Fava Netto. Os valores representam os níveis de expressão dos genes normalizados para Glicosamina 6P isomerase (GL), Enzima de conjugação de ubiquitina variante MMS2 (UB), RDS (RD) e PenR2(PE). O \* representa o nível de significância para valores de  $p < 0,05$ .

## VI. DISCUSSÃO:

No presente trabalho foi observado um perfil bastante semelhante de infecção de *P. brasiliensis* as células A549 e NOK. Pode-se confirmar a sua capacidade de adesão, invasão e modificações no citoesqueleto para células NOK, semelhante ao observado anteriormente as A549 e outras células epiteliais (Hanna, 2000), além de ser observada a presença de uma adesina de 70kDa para ambas as células. O padrão de genes transcritos diferencialmente também foi bastante semelhante entre as células, demonstrando ser prevalente a capacidade de *P. brasiliensis* de metabolizar fontes alternativas de carbono e responder ao estresse gerado para a adaptação ao novo ambiente em tempos iniciais de infecção.

A infecção de *P. brasiliensis* aos diferentes tipos celulares pode auxiliar no melhor entendimento dos mecanismos envolvidos na paracoccidiodomicose e o papel dos diferentes fatores de virulência deste fungo. Estudos têm demonstrado a

capacidade de adesão e invasão de *P. brasiliensis* (MENDES-GIANNINI et al., 2008), sendo o fenômeno de aderência variável dependendo do isolado (HANNA et al., 2000). Em estudos empregando cultura de células epiteliais foi observado que o isolado 18 de *P. brasiliensis*, considerado mais patogênico para animais e com maior capacidade de adesão, após vários subcultivos perdia esta capacidade, havendo, portanto relação entre virulência e capacidade de adesão. Amostras recém isoladas, tanto de animais como de culturas celulares, recuperavam a capacidade de aderir e invadir células epiteliais (ANDREOTTI et al., 2005). Neste estudo, na parte inicial foi verificada a capacidade de infecção do isolado 18 de *P. brasiliensis* à cultura de células epiteliais pulmonares e queratinócitos de mucosa bucal. Pela primeira vez, a linhagem NOK foi empregada no modelo de interação *P.brasiliensis*-célula. Nossos dados mostram um padrão semelhante de infecção entre os tipos celulares, em relação ao tempo e intensidade. Em até cinco horas, os índices de infecção foram em torno de 30% e em oito horas estavam ao redor de 25%. Estes índices estão de acordo com dados de trabalhos anteriores (Hanna et al., 2000; Andreotti et al., 2005). A adesão de células de *P. brasiliensis* aos tecidos do hospedeiro deve ser um dos passos cruciais no estabelecimento da paracoccidioidomicose.

Esta doença é sistêmica, com comprometimento pulmonar no início, mas sítios extrapulmonares, tais como a pele, a mucosa bucal (estomatite moriforme), a faringe ou laringe (ou uma combinação das duas) e a região apical dos dentes podem ser também afetados. Portanto, esta doença apresenta diversos quadros clínicos com repercussões na cavidade bucal e camada cutânea (BENARD & MENDES GIANNINI, 2009). Como e porque este fungo atinge a cavidade bucal, fruto de disseminação do fungo, causando sérias conseqüências, não se conhece. Neste trabalho, a interação de *P.brasiliensis* com os queratinócitos foi realizada também por microscopia de varredura, em que se observou que o fungo adere, e invade as células, sinalizando alterações provavelmente ligadas ao citoesqueleto actínico. Da mesma forma em trabalhos anteriores foi demonstrado que este fungo pode circunscrever e alterar células normalmente não fagocíticas e invadi-las (MENDES-GIANNINI et al., 2008).

A adesão de *P. brasiliensis* aos queratinócitos foi feita aparentemente por uma estrutura similar a um pequeno tubo, como descrito por HANNA, 1995 e UEMURA, 1996, respectivamente em células VERO e HeLa. Alterações nas membranas celulares foram observadas em torno da área de adesão, com a presença de elementos fúngicos circunscritos e cavitações provavelmente resultantes de seus produtos extracelulares. Este mecanismo parece exigir grandes modificações, tanto das células do hospedeiro como no citoesqueleto do fungo. O mecanismo de internalização em queratinócitos bucais descrito pela primeira vez sugere que essa capacidade pode ser importante no desenvolvimento da doença. *P. brasiliensis* não é essencialmente parasita intracelular (Tuder et al., 1985), mas células epiteliais e endoteliais podem ser usadas como local de escape das células de defesa, como demonstrado em outras doenças.

*P. brasiliensis*, como outros patógenos (Sebghati et al., 2000) é capaz de penetrar mucosas, principalmente dos pulmões, alcançando o interior de células eucarióticas, ou invadindo tecidos para posterior colonização e crescimento (Franco et al., 1989; Lenzi et al., 2000). Nossos dados confirmaram dados anteriores em relação ao comportamento da actina para a infecção de pneumócitos por *P. brasiliensis* (MENDES GIANNINI, et al., 2008). Pela primeira vez na literatura foi verificada a infecção em células epiteliais NOK. O mesmo padrão foi observado em queratinócitos, pois, aparentemente, após a infecção com o fungo, as células perderam parte dos filamentos ao redor da célula aparecendo uma intensidade diminuída de fluorescência e nos tempos maiores houve a recuperação da organização da actina celular. Esses resultados sugerem que a ligação de *P. brasiliensis* aos queratinócitos, aparentemente, induz sinais levando a mudanças no citoesqueleto, tais como a desorganização dos filamentos de actina próximos à área de contato e sua redistribuição sob a forma de feixes na periferia das células epiteliais, sugerindo a participação dos microfilamentos no processo de internalização de *P. brasiliensis*.

Um aspecto essencial no ciclo de vida de muitos patógenos é sua habilidade de entrar e se manter no hospedeiro para facilitar sua contínua



infecção. Portanto, vários patógenos dispõem de mecanismos que utilizam a polimerização de actina a seu favor para entrar ou sair das células do hospedeiro. Em circunstâncias normais, a polimerização de actina e a mobilidade celular são reguladas via cascatas de transdução de sinais. Patógenos não somente usam o citoesqueleto de actina para facilitar sua entrada, mas desenvolvem também mecanismos para subverter os sistemas regulatórios normais que controlam a polimerização da actina na célula. Os patógenos com capacidade de invasão freqüentemente alteram os componentes do citoesqueleto para promover a sua entrada na célula e isto é feito pelo rearranjo da actina e vários fatores de virulência que são reguladores fundamentais da reorganização de actina. Muitos patógenos entéricos invadem células de mamíferos em cultura, influenciando os rearranjos de actina que resultam na formação de pseudópodes (lamelipódios) e na internalização da bactéria (SWANSON e BAER, 1995). Os organismos invasores ligam-se diretamente ou via componentes da MEC as integrinas ou suas assemelhadas na superfície do hospedeiro. Após esta ligação, um sinal é disparado na célula hospedeira para que os filamentos de actina liguem-se ao receptor da membrana e assim possibilitem a entrada do microrganismo na célula. Uma vez dentro, estes são capazes de causar significativa rearranjo no citoesqueleto (FINLAY e FALKOW, 1988; ROSENSHINE et al., 1992).

No presente trabalho pretendeu-se ampliar este conhecimento, estudando extratos “cell free” do isolado 18 em contato com queratinócitos, além de pneumócitos. E desta forma tentar verificar se o fungo expressa diferentes proteínas frente aos diferentes tipos celulares. Além dos constituintes protéicos antigênicos, *P. brasiliensis* possui uma variedade de outros componentes, cujo papel na patogenia da doença e na resposta inflamatória do hospedeiro é ainda desconhecido. Diferentes componentes estão presentes no extrato denominado “cell-free” que foi primeiro utilizado por Blotta e Camargo (1993). Este preparado corresponde aos componentes mais superficiais da célula fúngica e são provavelmente os que mais diretamente entram em contato com as células do hospedeiro. Em nosso estudo foram preparados três extratos, a partir do isolado 18 cultivado em meio de Fava Netto, reisolado de pneumócitos e de

queratinócitos. Os padrões eletroforéticos mostraram primeiramente diferenças em relação ao número e à intensidade de bandas majoritárias. Extratos protéicos de diferentes microrganismos têm sido caracterizados por eletroforese bidimensional, que além de diferenciar proteínas por massa molecular, também as separam de acordo com seu pI (ponto isoelétrico). Em *P. brasiliensis* esta metodologia foi utilizada para caracterizar novos antígenos da fase leveduriforme do fungo e comparar a expressão destes com a fase miceliana (FONSECA et al., 2001), na descrição da adesina de 30kDa (ANDREOTTI et al., 2005). Neste trabalho, a eletroforese bidimensional foi utilizada no intuito de verificar a expressão de proteínas do isolado Pb 18 quando em contato com diferentes tipos celulares. Foi observada uma heterogeneidade da expressão de proteínas do isolado dependendo da condição. Aparentemente, o contato do fungo com as células induziu a maior expressão de proteínas, principalmente com queratinócitos (143 spots exclusivos em relação ao isolado subcultivado). Também nessa condição observa-se a presença de proteínas com maior massa molecular. Assim, estes dados iniciais indicam a heterogeneidade de resposta deste fungo quando submetido às diferentes condições, o que pode sugerir mudanças também no padrão de expressão de adesinas. Em ensaio de binding, uma proteína em torno de 70kDa foi observada tanto nos queratinócitos como nos pneumócitos. Coltri et al., 2006 descreveram a paracoccina, molécula de 70 kDa e pI aproximado de 5.63 que está relacionada a adesão a matriz extracelular, principalmente a laminina. Maricato et al., 2010 também descreveram uma proteína de 70 kDa encontrada principalmente no citoplasma e pertencente a família das flavoproteínas. Assim, moléculas com esta massa molecular foram descritas e estão relacionadas a imunidade humoral, celular e como provável adesina (Coltri et al., 2006; Maricato et al., 2010). Futuramente será realizado o seqüenciamento da proteína de 70kDa, descrita em nosso estudo e poder-se-á verificar qual a sua relação com as já descritas na literatura. Também se pretende seqüenciar aquelas que apresentam uma expressão mais acentuada e diferencial em relação às condições estudadas.

O estudo da expressão de genes durante o processo infeccioso por *P. brasiliensis*, pode trazer diversas informações sobre as moléculas envolvidas no desenvolvimento da patogênese durante o contato parasito/hospedeiro. Costa *et al.*, 2007, encontraram 4.932 ESTs, sendo deste total, 35,47% relacionadas a novos genes e 23,75% pertencentes a genes induzidos durante o processo infeccioso em fígado de animais experimentais, enzimas de várias vias metabólicas, como fermentação alcoólica, biossíntese de aminoácidos, metabolismo de nitrogênio e biossíntese de lipídeos e esteróis, importantes na biossíntese/remodelamento da membrana, que devem ser relevantes para o processo infeccioso. A aquisição de ferro tem sido descrita como fator de virulência em patógenos (RATLEDGE & DOVER 2000), uma vez que a captação de ferro é importante para a sobrevivência destes nos tecidos do hospedeiro onde a quantidade de ferro deve ser limitante. Transcritos codificantes para transportadores de ferro de alta e baixa afinidade, para membros da família das cobre oxidases foram encontrados com alta redundância em ensaios de RDA de células recuperadas de fígado de camundongo infectado (BAILAO *et al.*, 2006). Por outro lado, a síntese de melanina está implicada na patogênese de fungos (HAMILTON & GOMEZ 2002, TABORDA *et al.*, 2008). O crescimento de *P. brasiliensis* com L-DOPA (precursor da melanina) resulta na melanização das células fúngicas (GOMEZ *et al.*, 2001), bem como a melanina protege *P. brasiliensis* de fagocitose (SILVA *et al.*, 2006). Os transcritos que codificam para L-amino ácido descarboxilase aromática, para tirosinase e para policetídeo sintase foram induzidos em células leveduriformes de *P. brasiliensis* recuperadas de fígado de camundongos e demonstraram a relevância da síntese de melanina no processo (BAILÃO *et al.*, 2006).

Em nossos estudos, a condição de subtração para os dois tipos celulares, resultou em aumento da expressão de genes para a produção de energia e crescimento, incluindo enzimas que participam, indiretamente, da gliconeogênese, via glicolítica e do ciclo do TCA. Das 28 proteínas expressas diferencialmente, cinco foram hipotéticas, nove na condição diferencial com células NOK, oito com as células A549 e as demais com ambas as linhagens. Durante a infecção, os

nutrientes são limitados, os desvios em vias metabólicas são necessários para substituir a glicose utilizada na síntese de muitas macromoléculas necessárias para a proliferação. Os ácidos graxos podem servir como fonte única de carbono e energia, acil-CoA é um importante intermediário em diversas funções metabólicas, como o transporte de ácidos graxos, degradação oxidativa de ácidos graxos e biossíntese de fosfolípidios, bem como a ativação enzimática, sinalização celular e regulação da transcrição (MORGAN-KISS & CRONAN, 2004). Metabolismo dos ácidos graxos é importante no desenvolvimento e patogenicidade de muitos fungos, no processo de infecção de *C. albicans* em macrófagos, a aquisição e utilização de ácidos graxos no fagolisossomo, ambiente pobre em compostos complexos de carbono, é a resposta metabólica predominante sobre qualquer resposta ao estresse convencional, sugerindo que a privação de nutrientes é o principal estresse sofrido por essas leveduras. Mas durante a infecção no sangue, a glicose está presente em níveis suficientemente elevados (0,06-0,1%) para limitar a expressão de enzimas responsáveis pela utilização de fontes alternativas de carbono, indicando que *C. albicans* regula diferencialmente as vias de assimilação de carbono, dependendo do estágio de infecção (BARELLE et al. 2006, LORENZ & FINK 2001), este fato é semelhante à informação registrada em *C. neoformans*, porque os padrões de expressão gênica e adaptação foram tecidos específicos, tanto à infecção pulmonar, como em um modelo experimental de meningite em coelho (HU et al 2008). Diversos estudos têm focado os caminhos da gliconeogênese, do ciclo glicoxilato e da  $\beta$ -oxidação dos ácidos graxos, uma vez que estes caminhos são positivamente regulados durante o contato com o hospedeiro em uma variedade de microrganismos patogênicos humanos, *P. brasiliensis* (DERENGOWSKI, et al 2008), *C. neoformans* (HU et al, 2008, RUDE, et al 2002 e FAN et al, 2005), *C. albicans* (RAMÍREZ & LORENZ, 2009, BARELLE, et al 2006 e FRADIN, et al 2005), *Mycobacterium tuberculosis* (MCKINNEY, et al 2000 e MUNOZ-ELIAS & MCKINNEY, 2005), *S. cerevisiae* (SCHULLER, 2003) e *A. fumigatus* (EBEL, et al 2006, OLIVAS, et al 2008).

A N-acetilglicosamina (GlcNAc) é a unidade de formação de quitina, o principal componente das paredes celulares de fungos e outros microorganismos.

Em *P. brasiliensis* a hidrólise da quitina pode ser essencial a sobrevivência do patógeno durante a deficiência nutricional no novo microambiente. A GlcNAc é precursora de glucosamina (GlcN), um substrato de glucosamina 6 fosfato isomerase, proteína que apresentou um elevado número de clones em nosso trabalho, capaz de formar frutose-6-P a partir de GlcN, e pode assim suprir a deficiência de glicose, alimentando a via glicolítica. Espécies de *Candida* são capazes de usar os aminoaçúcares como GlcNAc e GlcN como fontes de carbono alternativas (SINGH & DATTA, 1979). *C. albicans* necessita de um caminho funcional para o catabólico GlcNAc para que desta forma possa estabelecer infecções sistêmicas com sucesso, havendo, portanto, uma correlação entre adaptações específicas e a virulência do organismo, (SINGH, et al 2001).

HSPs estão envolvidos na adaptação a tensões térmicas, estresse oxidativo, pH baixo e tratamento com drogas citotóxicas. HSP90 é uma chaperona molecular que *in vivo* auxilia um pequeno conjunto de proteínas, dependentes de ATP, para que suas funções sejam executadas corretamente (NATHAN et al 1997), como tirosina e serina / treonina quinases, receptores de esteróides e fatores de transcrição (BUCHNER 1999). HSP90 é conhecida por ser essencial para a função de quinases de transdução de sinal em vários organismos (CUTFORTH et al 1994, MILLSON et al 2005 e PERDEW et al 1997), incluindo os membros das MAPK, PKA e famílias envolvidas na morfogênese fúngica (DHILLON et al 2003). Pbhsp90 é um gene altamente expresso durante sinais de estresse oxidativo e mudanças morfológicas, tais como outras chaperonas moleculares, é essencial para garantir a viabilidade das células do patógeno durante a adaptação dimórfica de *P. brasiliensis* e sobrevivência dentro do hospedeiro mamífero (NICOLA, et al 2008).

A proteína RDS1, também muito expressa principalmente na infecção em NOK, já foi identificada em vários fungos como *Neurospora crassa*, *Magnaporthe grisea*, *Aspergillus nidulans*, *Fusarium graminearum* e *Ustilago maydis* parece e parece estar relacionada à resposta do fungo a situações de estresse. Em *Schizosaccharomyces pombe*, alterações de sua expressão foram observadas quando o fungo foi submetido a diferentes condições como privação de glicose,

amônia e fosfato, além de mudanças na concentração de CO<sub>2</sub> e temperatura (LUDIN et al., 1995). KRAUS et al. (2004), verificaram pela técnica de microarranjo, uma expressão aumentada dessa proteína em *C. neofomans* mantidos a 37°C e de forma similar, Rosa e Silva et al. (2008), comparando a levedura mantida a 25 e a 37°C, verificaram pela técnica de RDA, aumento de sua expressão.

A célula é dotada de sistemas enzimáticos complexos que sinalizam e controlam, de forma precisa, a resposta celular a uma determinada condição do meio. Proteínas relacionadas ao controle celular também foram encontradas em nosso estudo. Proteassomas são complexos proteolíticos encontrados em células eucarióticas responsáveis pela degradação de muitas proteínas celulares (DEMASI et al. 2003). Este complexo tem papel importante na regulação do ciclo e da sinalização celular, incluindo apoptose, eliminação de proteínas anormais geradas por mutação e danos oxidativos (GIULIVI et al., 1994; COUX et al., 1996; BERLETT et al., 1997; BOCHTLER et al., 1999; ULLRICH et al., 1999; DEMASI et al. 2003). Por outro lado, estudos têm demonstrado que os proteassomas são controlados por proteínas S-glutationadas relacionadas ao controle de reações de oxido redução e produção de fatores de transcrição (DEMASI et al. 2003; SILVA et al., 2008). Por fim, têm-se verificado que a atividade proteolítica controlada por proteassomas está aumentada na fase proliferativa (logarítmica) e gradativamente diminui à medida que vai entrando na fase estacionária (BAJOREK et al., 2003; LAPORTE et al., 2008). Esses achados sugerem que, nas condições testadas no presente trabalho, a forma leveduriforme do fungo está em situação de estresse, mas metabolicamente ativa.

O zinco é nutriente essencial para a célula, compondo estruturalmente os *motifs* de muitos cofatores transcricionais, bem como, exercendo papel de cofator de enzimas diversas como, por exemplo, RNA polimerase (BIRD et al., 2000; RUTHERFORD et al., 2004; LIEU et al., 2006; KIM et al., 2008). O zinco é importante nutriente que, embora em pequena quantidade, é necessário para a proliferação e viabilidade celular (LULLOFF et al., 2004). Por outro lado, a disponibilidade deste nutriente em condição de infecção, é grandemente

diminuída por ação de neutrófilos que apresentam em seu citoplasma, uma proteína com atividade antimicrobiana que se liga ao zinco, privando a sua utilização pelo microorganismo (MAMBULA et al., 2000; LULLOFF et al., 2004). Em *Saccharomyces cerevisiae*, o fator de transcrição Zap1 é considerada a peça chave na resposta celular à privação de zinco, controlando expressão de vários genes, muitos destes, presentes em outras leveduras (ZHAO et al., 1997; EIDE et al., 2009). Em condições de privação de zinco, Zap1 induz a expressão de genes envolvidos no transporte (transportadores ZRT1, ZRT2 e FET4) e armazenamento em vacúolos (ZRC1 e ZRT3) (ZHAO et al., 1998; MACDIARMID et al., 2000; WATERS et al., 2002; MACDIARMID et al., 2003). Adicionalmente, Zap1 regula a expressão de genes responsáveis pelo transporte em vias secretórias (ZRG17) e controla o nível de enzimas envolvidas na biossíntese de lipídios com finalidade de manter a integridade da membrana fosfolipídica (PIS1 e EK11) (LYONS et al., 2000; ELLIS et al., 2005; HAN et al., 2005; KERSTING et al., 2006). Genes homólogos para o fator Zap1 já foram descritos para *C. albicans* demonstrando serem importantes para o processo de filamentação e em *Aspergillus fumigatus*, os fatores de transcrição têm sido considerados como fatores de virulência e candidatos promissores para elucidar os mecanismos de patogenicidade (KRAPPMANN et al., 2004; BIGNELL et al., 2005; MORENO et al., 2007). Em *C. neoformans*, podemos citar como exemplo, o fator de transcrição calcineurina que é uma fosfatase ativada por  $Ca^{+2}$ /calmodulina. Vários estudos têm demonstrado que a atividade de calcineurina e o influxo de cálcio na célula são interrelacionados e rigorosamente controlados para que possam exercer suas funções na adaptação do fungo frente às mudanças do ambiente, na regulação da morfogênese e na patogenia (FOX e HEITMAN, 2002). Por fim, o transporte de zinco, assim como de ferro e cobre, é importante para a função de muitas proteínas, pois eles estabilizam a estrutura protéica e facilitam as reações de oxiredução (RADISKY e KAPLAN, 1999). Estudos têm demonstrado que a deficiência de zinco pode levar a um aumento intracelular de espécies reativas de oxigênio, causando oxidação de lipídios e proteínas além de danos ao DNA e mutação (Eide et al., 2009). Neste sentido, embora, em nosso

estudo, não tenhamos encontrado nenhuma enzima relacionada à detoxificação celular, é possível que, indiretamente, a expressão aumentada de transportador de zinco seja reflexo de uma maior necessidade de enzimas que eliminem espécies reativas de oxigênio, tais como a superóxido dismutase citosólica que é uma enzima Cu/Zn dependente importante para detoxificação da célula durante o metabolismo oxidativo, sendo considerado também como um fator de virulência em potencial (COX et al., 2003; NARASIPURA et al., 2003; NARASIPURA et al., 2005; DIAS et al., 2006).

Por fim, outra proteína com expressão aumentada encontrada neste estudo foi o carreador de ADP/ATP. Esta proteína parece ter papel crítico no transporte e fornecimento de ATP gerados na mitocôndria transportados para o citosol (TRABA et al., 2009). Mais recentemente, estudos têm sugerido que os carreadores de ADP/ATP teriam participação importante para a ocorrência de apoptose. Neste processo, os carreadores seriam um dos constituintes dos chamados poros de permeabilidade transitória que controlaria a liberação de fatores apoptogênicos como o citocromo c (PEREIRA et al., 2007; LAWEN, 2007; TRABA et al., 2009). Portanto neste estudo têm-se dados adicionais da interação *P.brasiliensis*-células. E pela primeira vez a observação da interação deste fungo com queratinócitos, abrindo-se a oportunidade de estudar mais profundamente a patogenia desta importante doença.

## VII. CONCLUSÃO:

A interação fungo-hospedeiro abrange uma rede complexa de vias metabólicas e de sinalização que se interligam para responder a uma determinada situação ou condição do meio. Um dos objetivos deste trabalho foi caracterizar os perfis de infecção em dois tipos celulares, queratinócitos e pneumócitos. Pode-se avaliar que embora a porcentagem de fungos que interagem seja bastante semelhante, é bastante provável que o mecanismo de interação com estas células apresentem diferenças, uma vez que as proteínas encontradas ligadas fracamente a parede do fungo apresentaram diferenças significativas no perfil eletroforético.



Por outro lado, a técnica de RDA foi extremamente útil, fornecendo-nos uma visão global da situação da célula nas horas iniciais de contato entre *P. brasiliensis*, pneumócitos e queratinócitos. Foram encontradas proteínas que sugerem que a levedura está numa situação de estresse (RDS1), mas apesar da situação de estresse, esta parece estar proliferando e metabolicamente ativa (proteassoma, acetiladores de cadeia curta, glicosamina isomerase e carreadores de ADP/ATP). Adicionalmente, vias metabólicas estão sendo ativadas com o objetivo de eliminar substâncias tóxicas à célula (Transportador de Zinco), sendo este último, alvo potencial para o desenvolvimento de futuras drogas.

## VIII. REFERÊNCIAS:

- ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHAFFER, A.A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Res**, v. 25, p. 3389-3402, 1997.
- AMARAL, A.C.; FERNANDES, L.; GALDINO, A.S.; FELIPE, M.S.; SOARES, C.M.; PEREIRA, M. Therapeutic targets in *Paracoccidioides brasiliensis*: post-transcriptome perspectives. **Genet Mol Res**, v.2, p.430-49, 2005.
- ANDREOTTI, P.F. Isolamento e caracterização de adesina envolvida na interação de *Paracoccidioides brasiliensis* com células epiteliais. 2002. 121f. Dissertação (Mestrado em Análises Clínicas) Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2002.
- ANDRADE, R.V.; DA SILVA, S.P.; TORRES, F.A.; POÇAS-FONSECA, M.J.; SILVA-PEREIRA, I.; MARANHÃO, A.Q.; CAMPOS, E.G.; MORAES, L.M.; JESUÍNO, R.S.; PEREIRA, M.; SOARES, C.M.; WALTER, M.E.; CARVALHO, M.J.; ALMEIDA, N.F.; BRIGIDO, M.M.; FELIPE, M.S. Overview and perspectives the transcriptome of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Rev Iberoam Micol**, v.4, p.203-12, 2005.
- ANDRÉ, D.C.; LOPES, J.D.; FRANCO, M.F.; VAZ, C.A.; CALICH, V.L. Binding of laminin to *Paracoccidioides brasiliensis* induces a less severe pulmonary paracoccidioidomycosis caused by virulent and low-virulence isolates. **Microbes Infect**, v.6, p.549-58, 2004.
- ANDREOTTI, P.F.; MONTEIRO DA SILVA, J.L.; BILAO, A.M.; SOARES, C.M.; BENARD, G.; SOARES, C.P.; MENDES-GIANNINI, M.J. Isolation and partial characterization of a 30 kDa adhesin from *Paracoccidioides brasiliensis*. **Microbes Infect**, v.5, p.875-81, 2005.
- ARISTIZABAL, B.H.; CLEMONS, K.V.; STEVENS, D.A.; RESTREPO, A. Morphological transition of *Paracoccidioides brasiliensis* conidia to yeast cells: in vivo inhibition in females. **Infect Immun**, v.11, p.5587-91, 1998.
- AUFIERO, B.; GUO, M.; YOUNG, C.; DUANMU, Z.; TALWAR, H.; LEE, H.K.; MURAKAWA, G.J. *Staphylococcus aureus* induces the expression of tumor

necrosis factor-alpha in primary human keratinocytes. **Int J Dermatol**, v.7, p.687-94, 2007.

-BAEZA, L.C.; BAILÃO, A.M.; BORGES, C.L.; PEREIRA, M.; SOARES, C.M., MENDES-GIANNINI, M.J. cDNA representational difference analysis used in the identification of genes expressed by *Trichophyton rubrum* during contact with keratin. **Microbes Infect**, v.12-13, p.1415-21, 2007.

-BAGAGLI, E.; BOSCO, S.M.; THEODORO, R.C.; FRANCO, M. Phylogenetic and evolutionary aspects of *Paracoccidioides brasiliensis* reveal a long coexistence with animal hosts that explain several biological features of the pathogen. **Infect Genet Evol**, v.5, p.344, 2006.

-BAILAO, A.M. ; SCHRANK, A. ; BORGES, C.L. ; DUTRA, V. ; MOLINARI-MADLUM, E.E.W.I ; FELIPE, M.S. ; MENDES-GIANNINI, M.J.S. ; MARTINS, W.S. ; PEREIRA, M. ; SOARES C.M.A. Differential gene expression by *Paracoccidioides brasiliensis* in host interaction conditions: representational difference analysis identifies candidate genes associated with fungal pathogenesis. **Microbes Infect**, v.8, p.2686-97, 2006.

-BAILAO, A.M.; SHRANK, A.; BORGES, C.L.; PARENTE, J.A.; DUTRA, V.; FELIPE, M.S.; FIUZA, R.B.; PEREIRA, M., SOARES C.M.A. The transcriptional profile of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast cells is influenced by human plasma. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v.51, p.43-57, 2007.

-BAJOREK , M. ; FINLEY, D.; GLICKMAN, M.H. Proteasome disassembly and downregulation is correlated with viability during stationary phase. **Curr. Biol**, v.13, p.1140 – 1144, 2003.

-BARBOSA, M.S.; BÁO, S.N.; ANDREOTTI, P.F.; DE FARIA, F.P.; FELIPE, M.S.; DOS SANTOS FEITOSA, L.; MENDES-GIANNINI, M.J.; SOARES, C.M. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Paracoccidioides brasiliensis* is a cell surface protein involved in fungal adhesion to extracellular matrix proteins and interaction with cells. **Infect Immun**, v. 1, n.74, p.382-9, 2006.

-BARELLE, C. J.; PRIEST, C. L.; MACCALLUM, D. M.; GOW, N. A.; ODDS, F. C.; BROWN, A. J. Niche-specific regulation of central metabolic pathways in a fungal pathogen. **Cell Microbiol** , v.8, p.961-971, 2006.

- BARROZO, L.V.; BENARD, G.; SILVA, M.E.; BAGAGLI, E.; MARQUES, S.A.; MENDES, R.P. First description of a cluster of acute/subacute paracoccidioidomycosis cases and its association with a climatic anomaly. **PLoS Negl Trop Dis**, v.4, n.3, p.643, 2010.
- BASTOS, K.P.; BILAO, A.M.; BORGES, C.L.; FARIA, F.P.; FELIPE, M.S.; SILVA, M.G.; MARTINS, W.S.; FIUZA, R.B.; PEREIRA, M.; SOARES, C.M. The transcriptome analysis of early morphogenesis in *Paracoccidioides brasiliensis* mycelium reveals novel and induced genes potentially associated to the dimorphic process. **BMC Microbiol**, v.10, p.729, 2010.
- BENARD, G.; MENDES-GIANNINI, M.J.S. Textbook of Pediatric Infections Diseases. In: Ralph D. Feigin; James D. Cherry; Gail J. Demmler-Harrison; Sheldon L. Kaplan. (Org.). Paracoccidioidomycosis. 6 ed. Philadelphia: **Elsevier Science**, v. 2, p. 2762-2776, 2009.
- BERLETT, B.S.; STADTMAN, E.R. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. **J Biol Chem**, v.15, p.20313-6, 1997.
- BIGNELL, E.; NEGRETE-URTASUN, S.; CALCAGNO, A.M.; HAYNES, K.; ARST, H.N.; JR ROGERS, T. The Aspergillus pH-responsive transcription factor PacC regulates virulence. **Mol Microbiol**, v.55, p.1072–1084, 2005.
- BIRD, A.; ZHAO, J.H.; LUO ,H.; JENSEN, L.T.; SRINIVASAN, C.; EVANS-GALEA, M.; WINGE, D.R.; EIDE, D.J. A dual role for zinc fingers in both DNA binding and zinc sensing by the Zap1 transcriptional activator. **EMBO J.**, v.19, p.3704-3713, 2000.
- BLOTTA, M.H.; CAMARGO, Z. Immunological response to cell-free antigens of *Paracoccidioides brasiliensis*: relationship with clinical forms of paracoccidioidomycosis. **J Clin Microbiol**, v.31, p.671-6, 1993.
- BLUMER, S.O.; JALBERT, M.; KAUFMAN, L. Rapid and reliable method for production of a specific *Paracoccidioides brasiliensis* immunodiffusion test antigen. **J Clin Microbiol**, v.19, n.3, p.404-7,1984.
- BOCHTLER, M.; DITZEL, L.; GROLL, M.; HARTMANN, C.; HUBER, R. The proteasome. **Annu Rev Biophys Biomol Struct.**, v.28, p.295-317, 1999.

- BONFIM, S.M.; CRUZ, A.H.; JESUINO, R.S.; ULHOA, C.J.; MOLINARI-MADLUM E.E., SOARES, C.M., PEREIRA, M. Chitinase from *Paracoccidioides brasiliensis*: molecular cloning, structural, phylogenetic, expression and activity analysis. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v.46, p.269-83, 2006.
- BORGES-WALMSLEY, M.I.; CHEN, D.; SHU, X.; WALMSLEY, A.R. The pathobiology of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Microbiol**, v.10, n.2, p.80-7, 2002.
- BUCHNER, J. Hsp90 & Co. – a holding for folding. **Trends Biochem Sci**, v.24, p.136-141, 1999.
- CARRERO, L.L.; NIÑO-VEJA, G.; TEIXEIRA, M.M.; CARVALHO, M.J.; SOARES, C.M.; PEREIRA, M.; JESUINO, R.S.; MCEWEN, J.G.; MENDOZA, L.; TAYLOR, J.W.; FELIPE, M.S.; SAN-BLAS, G. New *Paracoccidioides brasiliensis* isolate reveals unexpected genomic variability in this human pathogen. **Fungal Genet Biol**, v.45, n.5, p.605-12, 2008.
- CASTRO, N.S.; MAIA, Z.A.; PEREIRA, M.; SOARES, C.M. Screening for glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins in the *Paracoccidioides brasiliensis* transcriptome. **Genet Mol Res**, v.2, p.326-45, 2005.
- CISALPINO, P.S.; PUCCIA, R.; YAMAUCHI, L.M.; CANO, M.I.; DA SILVEIRA, J.F.; TRAVASSOS, L.R. Cloning, characterization, and epitope expression of the major diagnostic antigen of *Paracoccidioides brasiliensis*. **J Biol Chem**, v.271, n.8, p.4553-60, 1996.
- COLTRI, K.C.; CASABONA-FORTUNATO, A.S.; GENNARI-CARDOSO, M.L.; PINZAN, C.F.; RUAS, L.P.; MARIANO, V.S.; MARTINEZ, R.; ROSA, J.C.; PANUNTO-CASTELO, A.; ROQUE-BARREIRA, M.C. Paracoccin, a GlcNAc-binding lectin from *Paracoccidioides brasiliensis*, binds to laminin and induces TNF-alpha production by macrophages. **Microbes Infect**, v.3, p.704-13, 2006.
- COSTA, D.L.; DIAS-MELICIO, L.A.; ACORCI, M.J.; BORDON, A.P.; TAVIAN, E.G.; PERACOLI, M.T.; SOARES, A.M. Effect of interleukin-10 on the *Paracoccidioides brasiliensis* killing by gamma-interferon activated human neutrophils. **Microbiol Immunol**, v.51, p. 73-80, 2007.
- COUX, O.; TANAKA, K.; GOLDBERG, A.L. Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. **Annu Rev Biochem**, v.65, p.801-47, 1996.

COX, G.M.; HARRISON, T.S.; MCDADE, H.C.; TABORDA, C.P.; HEINRICH, G.; CASADEVALL, A.; PERFECT, J.R. Superoxide dismutase influences the virulence of *Cryptococcus neoformans* by affecting growth within macrophages. **Infect Immun**, v.71, p.173–180, 2003.

CUTFORTH, T.; RUBIN, G.M. Mutations in Hsp83 and cdc37 impair signaling by the sevenless receptor tyrosine kinase in *Drosophila*. **Cell**, v.77, p.1027-1036, 1994.

-DEMASI, M.; SILVA, G.M.; NETTO, L.E. 20 S proteasome from *Saccharomyces cerevisiae* is responsive to redox modifications and is S-glutathionylated. **J Biol Chem**, v.278, p.679-85, 2003.

-DERENGOWSKI, L.S.; TAVARES, A.H.; SILVA, S.; PROCOPIO, L. S.; FELIPE, M.S.; SILVA-PEREIRA, I.. Upregulation of glyoxylate cycle genes upon *Paracoccidioides brasiliensis* internalization by murine macrophages and in vitro nutritional stress condition. **Med Mycol**, v.46, p.125-134, 2008.

-DE BRITO, T.; FURTADO, J.S.; CASTRO, R.M.; MANINI, M. Intraepithelial parasitism as an infection mechanism in human paracoccidioidomycosis (South American blastomycosis). **Virchows Arch A Pathol Pathol Anat**, v.361, n.2,p.129-38, 1973.

-DE CAMARGO, Z.; UNTERKIRCHER, C.; CAMPOY, S.P.; TRAVASSOS, L.R. Production of *Paracoccidioides brasiliensis* exoantigens for immunodiffusion tests. **J Clin Microbiol**, v.26, n.10, p.2147-51, 1988.

-DHILLON, N.K.; SHARMA, S.; KHULLER, G.K. Signaling through protein kinases and transcriptional regulators in *Candida albicans*. **Crit Rev Microbiol**, v.29, p.259-275, 2003.

-DIAS, A.L.; BRIGAGAO, M.R.; COLEPICOLO, P.; SIQUEIRA, A.M.; SILVA, E.G.; PAULA, C.R. Superoxide dismutase in *Cryptococcus neoformans* varieties *gattii*, *grubii*, and *neoformans*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 101, p. 107-109, 2006.

DIATCHENKO, L.; LAU, Y.F.; CAMPBELL, A.P.; CHENCHIK, A.; MOQADAM, F.; HUANG, B.; LUKYANOV, S.; LUKYANOV, K.; GURSKAYA, N.; SVERDLOV, E.D.; SIEBERT, P.D. Suppression subtractive hybridization: a method for generating

- differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 93, p. 6025-6030, 1996.
- DUEK, L.; KAUFMAN, G.; ULMAN, Y.; BERDICEVSKY, I. The pathogenesis of dermatophyte infections in human skin sections. **J Infect**, v.48, p.175-80, 2004.
- DUTRA, V.; NAKAZATO, L.; BROETTO, L.; SILVEIRA SCHRANK, I.; HENNING VAINSTEIN, M.; SCHRANK, A. Application of representational difference analysis to identify sequence tags expressed by *Metarhizium anisopliae* during the infection process of the tick *Boophilus microplus* cuticle. **Res. Microbiol.**, v.155, p.245-51, 2004.
- EBEL, F.; SCHWIENBACHER, M.; BEYER, J.; HEESEMANN, J.; BRAKHAGE, A. A.; BROCK, M. Analysis of the regulation, expression, and localisation of the isocitrate lyase from *Aspergillus fumigatus*, a potential target for antifungal drug development. **Fungal Genet Biol**, v.43, p.476-489, 2006.
- EIDE DJ. Homeostatic and adaptive responses to zinc deficiency in *Saccharomyces cerevisiae*. **J Biol Chem**, v.284, p.18565-9, 2009.
- ELLIS, C.D.; MACDIARMID, C.W.; EIDE, D.J. Heteromeric protein complexes mediate zinc transport into the secretory pathway of eukaryotic cells. **J. Biol. Chem**, v.280, p.28811–28818, 2005.
- EWING, B.; HILLIER, L.; WENDI, M.C.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using PHRED, I. Accuracy assessment. **Genome Res.**, v. 8, p. 175-185, 1998.
- FAN, W.; KRAUS, P.R.; BOILY, M.J.; HEITMAN, J. *Cryptococcus neoformans* gene expression during murine macrophage infection. **Eukaryot Cell**, v.4, p.1420-1433, 2005.
- FELIPE, M.S.; ANDRADE, R.V.; PETROFEZA, S.S.; MARANHAO, A.Q.; TORRES, F.A.; ALBUQUERQUE, P. Transcriptome characterization of the dimorphic and pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* by EST analysis. **Yeast**, v.3, p.263-71, 2003.
- FINLAY, B.B.; FALKOW, S. Common themes in microbial pathogenicity. **Microbiol Rev**, v.53, p.210-30, 1989.

- FINLAY, B.B.; FALKOW, S. Comparison of the invasion strategies used by *Salmonella cholerae-suis*, *Shigella flexneri* and *Yersinia enterocolitica* to enter cultured animal cells: endosome acidification is not required for bacterial invasion or intracellular replication. **Biochimie**, v.70, p.1089-99, 1988.
- FONSECA, C.A.; JESUÍNO, R.S.A.; FELIPE, M.S.S.; CUNHA, D.A.; BRITO, W.A.; SOARES, C.M.A. Two-dimensional electrophoresis and characterization of antigens from *Paracoccidioides brasiliensis*. **Microb. Infect.**, v.3, p.535-42, 2001.
- FOX, D.S.; HEITMAN, J. Good fungi gone bad: the corruption of calcineurin. **Bioassays**, v. 24, p. 894-903, 2002.
- FRADIN, C.; KRETSCHMAR, M.; NICTERLEIN, T.; GAILLARDIN, C.; D'ENFERT, C.; HUBE, B. Stage-specific gene expression of *Candida albicans* in human blood. **Mol Microbiol**, v.47, p.1523–1543, 2003.
- FRADIN, C.; DE GROOT, P.; MACCALLUM, D.; SCHALLER, M.; KLIS, F., ODDS, F. C., HUBE, B. Granulocytes govern the transcriptional response, morphology and proliferation of *Candida albicans* in human blood. **Mol Microbiol**, v.56, p.397-415, 2005.
- FRANCO, M.; BAGAGLI, E.; SCAPOLIO, S.; DA SILVA LACAZ, C. A critical analysis of isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from soil. **Med Mycol**, v.38, p.185-91, 2000.
- FRANCO, M. Host-parasite relationships in paracoccidioidomycoses. **J Med Vet Mycol**, v.25, p.5–18, 1986.
- GIULIVI, C.; PACIFICI, R.E.; DAVIES, K.J. Exposure of hydrophobic moieties promotes the selective degradation of hydrogen peroxide-modified hemoglobin by the multicatalytic proteinase complex, proteasome. **Arch Biochem Biophys**, v.311, p.329-41, 1994.
- GOLDMAN, G.H.; DOS REIS MARQUES, E.; DUARTE RIBEIRO, D.C.; DE SOUZA BERNARDES, L.A.; QUIAPIN, A.C.; VITORELLI, P.M.; SAVOLDI, M.; SEMIGHINI, C.P.; DE OLIVEIRA, R.C.; NUNES, L.R.; TRAVASSOS, L.R.; PUCCIA, R.; BATISTA, W.L.; FERREIRA, L.E.; MOREIRA, J.C.; BOGOSSIAN, A.P.; TEKAIA, F.; NOBREGA, M.P.; NOBREGA, F.G.; GOLDMAN, M.H. Expressed sequence tag analysis of the human pathogen *Paracoccidioides*



- brasiliensis yeast phase: identification of putative homologues of *Candida albicans* virulence and pathogenicity genes. **Eukaryot Cell**, v.2, n.1, p.34-48, 2003.
- GOULART, L.; ROSA E SILVA, L.K.; CHIAPELLO, L.; SILVEIRA, C.; CRESTANI, J.; MASIH, D.; VAINSTEIN, M.H. *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* genes preferentially expressed during rat macrophage infection. **Medical Mycology**, 2010. [In press]
- GOMÉZ, B.L.; NOSANCHUK, J.D.; DIÉZ, S.; YOUNGCHIM, S.; AISEN, P.; CANO, L.E.; RESTREPO, A.; CASADEVALL, A.; HAMILTON, A.J. Detection of melanin-like pigments in the dimorphic fungal pathogen *Paracoccidioides brasiliensis* *in vitro* and during infection. **Infect. Immun.**, v. 69, p.5760-7, 2001.
- GONZALEZ, A.; GOMEZ, B.L.; RESTREPO, A.; HAMILTON, A.J.; CANO, L.E. Recognition of extracellular matrix proteins by *Paracoccidioides brasiliensis* yeast cells. **Med Mycol**, v.7, p.637-45, 2005.
- GREEN, P. PHRAP Documentation. University of Washington, Seattle, WA, USA. [<http://bozeman.mbt.washington.edu/phrap.docs/phrap.html>]. Acessado Dez 2009.
- HAMILTON, A. J.; GOMEZ, B. L. Melanins in fungal pathogens. **J Med Microbiol**, v.51, p.189-91, 2002.
- HAN, S. H.; HAN, G. S.; IWANYSHYN, W. M.; CARMAN, G.M. Regulation of the PIS1-encoded phosphatidylinositol synthase in *Saccharomyces cerevisiae* by zinc. **J. Biol. Chem**, v.280, p.29017–29024, 2005.
- HANNA, S.A. Estudo dos mecanismos e fatores de virulência de *Paracoccidioides brasiliensis* em culturas de células. 1995. 166f. Dissertação (Mestrado em Biologia) Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 1995.
- HANNA, S.A.; UEMURA, M.A.; MORAES, R.; RICCI, L.C.; MENDES-GIANNINI, M.J.S. Adherence and virulence of *Paracoccidioides brasiliensis*. In: ENCUESTRO INTERNACIONAL SOBRE PARACOCCIDIOIDOMICOSIS, 6, 1996, Uruguai, Anais, p. 81.
- HANNA, S.A.; MONTEIRO da SILVA, J.L.; MENDES-GIANNINI, M.J.S. Adherence and intracellular parasitism of *Paracoccidioides brasiliensis* in Vero cells. **Microb. Infect.**, v. 2, p. 1-8, 2000.

- HO, M.; WHITE, N.J.; Molecular mechanisms of cytoadherence in malaria. **Am J Physiol.**, v.276, p.1231-42, 1999.
- HOSTETTER, M.K. Adhesins and ligands involved in the interaction of *Candida* spp. with epithelial and endothelial surfaces. **Clin Microbiol Rev**, v.7, p.29-42, 1994.
- HU, G.; CHENG, P.Y.; SHAM, A.; PERFECT, J.R., KRONSTAD, J.W. Metabolic adaptation in *Cryptococcus neoformans* during early murine pulmonary infection. **Mol Microbiol**, v.69, p.1456-75, 2008.
- HUANG, X.; MADAN, A. CAP3: A DNA sequence assembly program. **Genome Res.**, v. 9, p. 868-877, 1999.
- HUBANK, M.; SCHATZ, D.G. cDNA representational difference analysis: a sensitive and flexible method for identification of differentially expressed genes. **Methods Enzymol.**, v. 303, p.325-49, 1999.
- Hubank, M.; Schatz, D.G. Identifying differences in mRNA expression by representational difference analysis of cDNA. **Nucleic. Acids Res** v.22, p.5640-48, 1994.
- ISHIBASHI, Y.; SUGITA, T.; NISHIKAWA, A. Cytokine secretion profile of human keratinocytes exposed to *Malassezia* yeasts. **FEMS Immunol Med Microbiol.** v48p.400-9, 2006.
- JARROUSSE, V.; CASTEX-RIZZI, N.; KHAMMARI, A.; CHARVERON, M.; DRENO, B. Modulation of integrins and filaggrin expression by *Propionibacterium acnes* extracts on keratinocytes. **Arch Dermatol Res**, v.8, .2007.
- KANG, M.K.; PARK, N.H. Conversion of normal to malignant phenotype: telomere shortening, telomerase activation, and genomic instability during immortalization of human oral keratinocytes. **Crit Rev Oral Biol Med**, v.12, n.1, p.38-54, 2001.
- KERSTING, M.C.; CARMAN, G.M. Regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* EK11-encoded ethanolamine kinase by zinc depletion. **J. Biol. Chem**, v.281, p.13110–13116, 2006.
- KIM, M.J.; KIL, M.; JUNG, J.H.; KIM, J. Roles of Zinc-responsive transcription factor Csr1 in filamentous growth of the pathogenic Yeast *Candida albicans*. **J Microbiol Biotechnol**, v.18, p.242-7, 2008.

- KRAPPMANN, S.; BIGNELL, E.M.; REICHARD, U.; ROGERS, T.; HAYNES, K.; BRAUS, G.H. The *Aspergillus fumigatus* transcriptional activator CpcA contributes significantly to the virulence of this fungal pathogen. **Mol Microbiol**, p.52, p.785–799, 2004.
- KRAUS, P.R.; BOILY, M.; GILES, S.S.; STAJICH, J.E.; ALLEN, A.; COX, G.M. Identification of *Cryptococcus neoformans* temperatureregulated genes with a Genomic-DNA microarray. **Eucaryotic Cell**, v.3, p.1249-1260, 2004.
- LACAZ, C.S.; RESTREPO MORENO, A.; DEL NEGRO, G. Paracoccidioidomycosis Boca Raton. **CRC Press**, 1994.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-5, 1970.
- LAPORTE, D.; SALIN, B.; DAIGNAN-FORNIER, B.; SAGOT, I. Reversible cytoplasmic localization of the proteasome in quiescent yeast cells. **J Cell Biol**, v.181, p.737-45, 2008.
- LAWEN A. Another piece of the puzzle of apoptotic cytochrome c release. **Mol Microbiol**, v.66, p.553-6, 2007.
- LENZI, H. L.; CALICH, V. L. G.; MENDES-GIANNINI, M. J. S.; XIDIEH, C. F.; MIYAJI, M.; MOTA, E. M.; MACHADO, M. P.; RESTREPO, A. Two patterns of extracellular matrix expression in experimental paracoccidioidomycosis. **Med. Mycol**, v.38, p.115-119, 2000.
- LIANG, P.; PARDEE, A.B. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. **Science**, v. 257, p. 967-971, 1992.
- LIEU, H.Y.; SONG, H.S.; YANG, S.N.; KIM, J.H.; KIM, H.J.; PARK, Y.D.; PARK, C.S.; KIM, H.Y. Identification of Zinc as an essential nutrient in the cell, functioning as a protein affected by iron in *Saccharomyces cerevisiae* using proteome analysis. **J. Microbiol. Biotechnol**, v.16, p.946-951, 2006.
- LINDBERG, K.; RHEINWALD, J.G. Three distinct keratinocyte subtypes identified in human oral epithelium by their patterns of keratin expression in culture and in xenografts. **Differentiation**, v.45, n.3, p.230-41, 1990.
- LISITSYN, N.A.; LISITSYN, N.; WIGLER, M. Representational difference analysis: finding the differences between genomes. **Science**, v. 11, p. 303-307, 1995.

- LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, v.25, n.4, p.402-8, 2001.
- LOPES, J.D.; REIS, M.D.dos; BRETANI, R.R. Presence of laminin receptors in *Staphylococcus aureus*. *Science*, v. 229, p. 275-7,1985.
- LORENZ, M.C.; FINK, G.R. The glyoxylate cycle is required for fungal virulence. **Nature**, v.412, p.83-5, 2001.
- LOWRY, D.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FAN, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, v. 193, p. 265-275, 1951.
- LUDIN, K.M.; HILTI, N.; SCHWEINGRUBER, M.E. Schizosaccharomyces pombe rds1, an adenine-repressible gene regulated by glucose, ammonium, phosphate, carbon dioxide and temperature. **Mol. Gen. Genet**, v.248, p.439–445, 1995.
- LULLOFF, S.J.; HAHN, B.L.; SOHNLE, P.G. Fungal susceptibility to zinc deprivation. **J. Lab. Clin. Med.**, v. 144, p. 208-214, 2004.
- LYONS, T.J.; GASCH, A.P.; GAITHER, L.A.; BOTSTEIN, D.; BROWN, P.O.; EIDE, D.J.Genome-wide characterization of the Zap1p zinc-responsive regulon in yeast.. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A**, v.97, p.7957–62, 2000.
- MACDIARMID, C.W.; GAITHER, L.A.; EIDE, D. Zinc transporters that regulate vacuolar zinc storage in *Saccharomyces cerevisiae*. **EMBO J.**, v.19, p.2845-55, 2000.
- MACDIARMID, C.W.; MILANICK, M.A.; EIDE, D.J. Induction of the ZRC1 metal tolerance gene in zinc-limited yeast confers resistance to zinc shock. **J. Biol. Chem**, v.278, p.15065–15072, 2003.
- MAMBULA, S.S.; SIMONS, E.R.; HASTEY, R.; SELSTED, M.E.; LEVITZ, S.M. Human neutrophil-mediated nonoxidative antifungal activity against *Cryptococcus neoformans*. **Infect. Immun.**, v. 68, p. 6257-6264, 2000.
- MANNING, B.J.; BAYLIS, B.W.; URBANSKI, S.J.; GIBB, A.P.; RABIN, H.R. Paracoccidioidomycosis: case report and review. **Clin. Infect. Dis.**, v. 23, p.1026-32, 1996.

- MARICATO, J.T.; BATISTA, W.L.; KIOSHIMA, E.S.; FEITOSA, L.S.; BRITO, R.R.; GOLDMAN, G.H.; MARIANO, M.; PUCCIA, R.; LOPES, J.D. The Paracoccidioides brasiliensis gp70 antigen is encoded by a putative member of the flavoproteins monooxygenase family. **Fungal Genet Biol.**, v.47, n.2, p.179-89, 2010.
- MATUTE, D.R.; SEPULVEDA, V.E.; QUESADA, L.M.; GOLDMAN, G.H.; TAYLOR, J.W.; RESTREPO, A.; MCEWEN, J.G. Microsatellite analysis of three phylogenetic species of Paracoccidioides brasiliensis. **J Clin Microbiol**, v.44, n.6, p.2153-7, 2006.
- MATUTE, D.R.; MCEWEN, J.G.; PUCCIA, R.; MONTES, B.A.; SAN-BLAS, G.; BAGAGLI, E.; RAUSCHER, J.T.; RESTREPO, A.; MORAIS, F.; NIÑO-VEJA, G.; TAYLOR, J.W. Cryptic speciation and recombination in the fungus Paracoccidioides brasiliensis as revealed by gene genealogies. **Mol Biol Evol**, v.23, n.1, p.65-73, 2006.
- MCKINNEY, J. D.; HONER ZU BENTRUP, K.; MUNOZ-ELIAS, E. J.; MICZAK, A.; CHEN, B.; CHAN, W.T.; SWENSON, D.; SACCHETTINI, J.C.; JACOBS, W.R.; DRUSSELL, G. Persistence of Mycobacterium tuberculosis in macrophages and mice requires the glyoxylate shunt enzyme isocitrate lyase. **Nature**, v.406, p.735-738, 2000.
- MCVEIGH, I.; MORTON, K. Nutritional studies of Histoplasma capsulatum. **Mycopathol Mycol Appl**, v.25, p.294-308, 1965.
- MENDES-GIANNINI, M.J.; MONTEIRO DA SILVA, J.L.; DE FÁTIMA DA SILVA, J.; DONOFRIO, F.C.; MIRANDA, E.T.; ANDREOTTI, P.F.; SOARES, C.P. Interactions of *Paracoccidioides brasiliensis* with host cells: recent advances. **Mycopathologia**. v.165, p.237-48, 2008.
- MENDES-GIANNINI, M. J. S.; TAYLOR, M. L.; BOUCHARA, J. B.; BURGER, E.; CALICH, V. L. G.; ESCALANTE, E. D.; HANNA, S.A.; LENZI, H. L.; MACHADO, M. P.; MIYAJI, M.; MONTEIRO DA SILVA, J. L.; MOTA, E. M.; RESTREPO, A.; RESTREPO, S.; TRONCHIN, G.; VINCENZI, L.R.; XIDIEH, C. F.; ZENTENO, E. Pathogenesis II: Fungal responses to host responses: interaction of host cells with fungi. **Med. Mycol.**, v.38, p. 113-23, 2000.

- MENDES-GIANNINI, M.J.; ANDREOTTI, P.F.; VINCENZI, L.R.; DA SILVA, J.L.; LENZI, H.L.; BENARD, G.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R.; DE MATOS GUEDES, H.L.; SOARES, C.P. Binding of extracellular matrix proteins to *Paracoccidioides brasiliensis*. **Microbes Infect.**, v.6, p.1550-9, 2006.
- MENDES-GIANNINI, M.J.S.; RICCI, L.C.; UEMURA, M.A.; TOSCANO, E.; ARNS, C.W. Infection and apparent invasion of Vero cells by *Paracoccidioides brasiliensis*. **J. Med. Vet. Mycol.**, v. 32, p. 189-97, 1994.
- MENDES-GIANNINI, M.J.S.; RICCI, L.C.; UEMURA, M.A.; TOSCANO, E.; ARNS, C.W. Invasion of Vero cells by *Paracoccidioides brasiliensis*. **Rev. Arg. Micol.**, v. 15, p. 29-36, 1992.
- MENDES-GIANNINI, M.J.; BUENO, J.P.; SHIKANAI-YASUDA, M.A.; FERREIRA, A.W.; MASUDA, A. Detection of the 43,000-molecular-weight glycoprotein in sera of patients with paracoccidioidomycosis. **J Clin Microbiol**, v.27, n.12, p.2842-5, 1989.
- MILLSON, S.H.; TRUMAN, A.W.; KING, V.; PRODROMOU, C.; PEARL, L.H.; PIPER, P.W.; A two-hybrid screen of the yeast proteome for Hsp90 interactors uncovers a novel Hsp90 chaperone requirement in the activity of a stress-activated mitogen-activated protein kinase, Slt2p (Mpk1p). **Eukaryot Cell**, v.4, p.849-860, 2005.
- MONTEIRO DA SILVA, J. L.; MENDES-GIANNINI M. J. S.; SANDOVAL, M. P.; LENZI, H. L. Adesão e invasão de *Paracoccidioides brasiliensis* em cultura de células Vero. **Rev. Ciênc. Farm**, v. 22, p. 103-29, 2001.
- MORENO, M.A.; IBRAHIM-GRANET, O.; VICENTEFRANQUEIRA, R.; AMICH, J.; AVE, P.; LEAL, F.; LATGÉ, J.P.; CALERA, J.A. The regulation of zinc homeostasis by the ZafA transcriptional activator is essential for *Aspergillus fumigatus* virulence. **Mol Microbiol**, v.64, p.1182-97, 2007.
- MORGAN-KISS, R.M.; CRONAN, J.E. The *Escherichia coli* fadK (ydiD) gene encodes an anaerobically regulated short chain acyl-CoA synthetase. **J Biol**, v.279, p.37324-33, 2004.

-MUNOZ-ELIAS, E.J.; MCKINNEY, J. D. Mycobacterium tuberculosis isocitrate lyases 1 and 2 are jointly required for in vivo growth and virulence. **Nat Med**, v.11, p.638-644, 2005.

NAGLIK, J.R.; FIDEL Jr, P.L., ODDS, F.C. Animal models of mucosal Candida infection. **FEMS Microbiol Lett.**, v.283, n.2, p.129-39, 2008.

NARASIPURA, S.D.; AULT, J.G.; BEHR, M.J.; CHATURVEDI, V.; CHATURVEDI, S. Characterization of Cu,Zn superoxide dismutase (*SOD1*) gene knockout mutant of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*: role in biology and virulence. **Mol. Microbiol.**, v. 47, p. 1681–1694, 2003.

-NARASIPURA, S.D.; CHATURVEDI, V.; CHATURVEDI, S. Characterization of *Cryptococcus neoformans* variety *gattii* SOD2 reveals distinct roles of the two superoxide dismutases in fungal biology and virulence. **Mol. Microbiol.**, v. 55, p. 1782-800, 2005.

-NATHAN, D.F.; VOS, M.H.; LINDQUIST, S. In vivo functions of the *Saccharomyces cerevisiae* Hsp90 chaperone. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.94, n.24, p.12949-56, 1997.

-NEUHOFF, V.; AROLD, N.; TAUBE, D.; EHRHARDT, W. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. **Electrophoresis**, v.9, p.255-62, 1988.

-NICOLA, A.M.; ANDRADE, R.V.; DANTAS, A.S.; ANDRADE, P.A.; ARRAES, F.B.; FERNANDES, L.; SILVA-PEREIRA, I, FELIPE, M.S. The stress responsive and morphologically regulated hsp90 gene from *Paracoccidioides brasiliensis* is essential to cell viability. **BMC Microbiol**, v.22;p. 158, 2008.

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

-NUNES, L.R.; COSTA DE OLIVEIRA, R.; LEITE, D.B.; DA SILVA, V.S.; DOS REIS MARQUES, E.; DA SILVA FERREIRA, M.E.; RIBEIRO, D.C.; DE SOUZA BERNARDES, L.A.; GOLDMAN, M.H.; PUCCIA, R.; TRAVASSOS, L.R.; BATISTA, W.L.; NÓBREGA, M.P.; NOBREGA, F.G.; YANG, D.Y.; DE BRAGANÇA PEREIRA, C.A.; GOLDMAN, G.H. Transcriptome analysis of *Paracoccidioides*

brasiliensis cells undergoing mycelium-to-yeast transition. **Eukaryot Cell.**, v.4, n.12, p.2115-28, 2005.

-OLIVAS, I.; ROYUELA, M.; ROMERO, B.; MONTEIRO, M.C.; MINGUEZ, J.M.; LABORDA, F.; DE LUCAS, J.R. Ability to grow on lipids accounts for the fully virulent phenotype in neutropenic mice of *Aspergillus fumigatus* null mutants in the key glyoxylate cycle enzymes. **Fungal Genet Biol**, v.45, p.45-60, 2008.

-OLLERT, M.W.; SÖHNCHEN, R.; KORTING, H.C.; OLLERT, U.; BRÄUTIGAM, S.; BRÄUTIGAM, W. Mechanisms of adherence of *Candida albicans* to cultured human epidermal keratinocytes. **Infect Immun**, v.61, p.4560-8, 1993.

-PARENTE, J.A.; BORGES, C.L.; BAILÃO, A.M.; FELIPE, M.S.; PEREIRA, M.; DE ALMEIDA SOARES, C.M. Comparison of transcription of multiple genes during mycelia transition to yeast cells of *Paracoccidioides brasiliensis* reveals insights to fungal differentiation and pathogenesis. **Mycopathologia**. v.165, n.4-5, p.259-73, 2008.

-PASTORIAN, K.; HAWEL, L.; BYUS, C.V. Optimization of cDNA representational difference analysis for the identification of differentially expressed mRNAs. **Anal. Biochem.**, v. 283, p. 89-98, 2000.

PERDEW, G.H.; WIEGAND, H.; HEUVEL, J.P.; VANDEN MITCHELL, C.; SINGH, S.S. A 50 kilodalton protein associated with raf and pp60(v-src) protein kinases is a mammalian homolog of the cell cycle control protein cdc37. **Biochemistry**, v.36, p.3600-07, 1997.

-PEREIRA, C.; CAMOUGRAND, N.; MANON, S.; SOUSA, M.J.; CÔRTE-REAL, M. ADP/ATP carrier is required for mitochondrial outer membrane permeabilization and cytochrome c release in yeast apoptosis. **Mol Microbiol**, v.66, p.571-82, 2007.

-PUCCIA, R.; TRAVASSOS, L.R. 43-kilodalton glycoprotein from *Paracoccidioides brasiliensis*: immunochemical reactions with sera from patients with paracoccidioidomycosis, histoplasmosis, or Jorge Lobo's disease. **J Clin Microbiol**, v.29, n.8, p.1610-5, 1991.

-RADISKY, D.; KAPLAN, J. Regulation of transition metal transport across the yeast plasma membrane. **J. Biol. Chem.**, v. 274, p. 4481-4484, 1999.



- RAMÍREZ, M.A.; LORENZ, M.C. The transcription factor homolog CTF1 regulates {beta}-oxidation in *Candida albicans*. **Eukaryot Cell**. V.8, p.1604-14, 2009.
- RATLEDGE, C.; DOVER, L. G. Iron metabolism in pathogenic bacteria. **Annu Rev Microbiol**, v.54, p.881-941, 2000.
- RESTREPO, A.; JIMÉNEZ, B.E. Growth of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast phase in a chemically defined culture medium. **J Clin Microbiol**, v.12, p.279-81, 1980.
- RESTREPO, A. The ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*: a puzzle still unsolved. **Sabouraudia**, v.23, p.323-34, 1985.
- RESTREPO, A.; SALAZAR, M. E.; CANO, L. E.; STOVER, E. P.; FELDMAN, D.; STEVENS, D. A. Estrogens inhibit mycelium to yeast transformation in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*: implications for resistance of females to paracoccidioidomycosis. **Infect. Immun.**, v. 46, p. 346-353, 1984
- RESTREPO-MORENO, A.; DEL NEGRO, G.(Eds). London: Boca raton, CRC Press., p. 49-66, 1994.
- ROSA E SILVA, L.K.; STAATS, C.C.; GOULART, L.S.; MORELLO, L.G.; PELEGRINELLI FUNGARO, M.H.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M.H. Identification of novel temperature-regulated genes in the human pathogen *Cryptococcus neoformans* using representational difference analysis. **Res Microbiol**,v.159, p.221-9, 2008.
- ROSENSHINE, I.; DURONIO, V.; FINLAY, B. B. Tyrosine protein kinase inhibitors block invasin-promoted bacterial uptake by epithelial cells. *Infect. Immun.*, v. 60, p. 2211-2217, 1992.
- RUDE, T.H.; TOFFALETTI, D.L; COX, G.M. Relationship of the glyoxylate pathway to the pathogenesis of *Cryptococcus neoformans*. **Infect Immun**, v.70, p.5684- 5694, 2002.
- RUTHERFORD, J.C.; BIRD, A.J. Metal-responsive transcription factors that regulate iron, zinc, and copper homeostasis in eukaryotic cells. **Eukaryot. Cell**, v.3, p.1-13, 2004.
- SALAZAR, G.; URIAS, J. Internal symmetries of cellular automata via their polynomial representation. **Chaos**, v.8, p.711-716, 1998.

- SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.W. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. Third edition. Cold Spring Harbor Laboratory, Londres, 2001.
- SAN-BLAS, G.; NIÑO-VEGA, G. *Paracoccidioides brasiliensis*: chemical and molecular tools for research on cell walls, antifungals, diagnosis, taxonomy. **Mycopathologia**. v.165, n.4-5, p.183-95, 2008.
- SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A.R. DNA sequencing with chain termination inhibitors. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 74, p. 5463-67, 1977.
- SCHULLER, H. J. Transcriptional control of nonfermentative metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Curr Genet**, v.43, p.139-160, 2003.
- SEBGHATI, T.S.; ENGLE, J.T.; GOLDMAN, W.E. Intracellular parasitism by *Histoplasma capsulatum*: fungal virulence and calcium dependence. **Science**, v.290, n.5495, p.1368-72, 2000.
- SHIKANAI-YASUDA, M.A., TELLES FILHO, F.D.E.Q.; MENDES, R.P.; COLOMBO, A.L.; MORETTI, M.L. Guidelines in paracoccidioidomycosis. **Rev Soc Bras Med Trop**, v39, p.:297-310, 2006.
- SHIRAKI, Y.; ISHIBASHI, Y.; HIRUMA, M.; NISHIKAWA, A.; IKEDA, S. Cytokine secretion profiles of human keratinocytes during *Trichophyton tonsurans* and *Arthroderma benhamiae* infections. **J Med Microbiol**, v55, p.1175-85, 2006.
- SILVA, G.M.; NETTO, L.E.; DISCOLA, K.F.; PIASSA-FILHO, G.M.; PIMENTA, D.C.; BÁRCENA, J.A.; DEMASI, M. Role of glutaredoxin 2 and cytosolic thioredoxins in cysteinyl-based redox modification of the 20S proteasome. **FEBS J**, v.275, p.2942-55, 2008.
- SILVA, M.B.; MARQUES, A.F.; NOSANCHUK, J.D.; CASADEVALL, A.; TRAVASSOS, L.R.; TABORDA, C.P. Melanin in the dimorphic fungal pathogen *Paracoccidioides brasiliensis*: effects on phagocytosis, intracellular resistance and drug susceptibility. **Microbes Infect**, v.8, p.197–205, 2006.
- SINGER-VERMES, L.M.; BURGER, E.; FRANCO, M.J.; MOSCARDI BACHI, M.; MENDES-GIANNINI, M.J.S.; CALICH, V.L.C. Evaluation of the *Paracoccidioides brasiliensis* isolates in susceptible in bred mice. **J. Med. Vet. Mycol.**, v.27, p.71-82, 1989.

- SINGH, B.; DATTA, A. Regulation of N-acetylglucosamine uptake in yeast. **Biochim. Biophys. Acta**, v.557, p.248–58, 1979.
- SINGH, P.; GHOSH, S.; DATTA, A. Attenuation of Virulence and Changes in Morphology in *Candida albicans* by Disruption of the N-Acetylglucosamine Catabolic Pathway. **Infection and Immunity**, Dec., p. 7898–790, 2001.
- SOKOLOVSKY, V.; KALDENHOFF, R.; RICCI, M.; RUSSO, V.E.A. Fast and reliable mini-prep RNA extraction from *Neurospora crassa*. **Fungal Genet. Newsl.**, v. 37, p. 41-43, 1990.
- STUDIER, F. W. Analysis of bacteriophage T7 early RNAs and proteins on slab gels. **J. Mol. Biol.**, v. 79, p. 237-248, 1973.
- SWANSON, JA.; BAER, S.C. Phagocytosis by zippers and triggers. **Trends Cell Biol**, v.5, p.89-93, 1995.
- TABORDA, C. P.; SILVA, M. B.; NOSANCHUK, J. D.; TRAVASSOS, L. R. Melanin as a virulence factor of *Paracoccidioides brasiliensis* and other dimorphic pathogenic fungi: aminireview. **Mycopathologia**, v.165, p.331-9, 2008.
- TOMAZETT, P.K.; CRUZ, A.H.; BONFIM, S.M.; SOARES, C.M.; PEREIRA, M. The cell wall of *Paracoccidioides brasiliensis*: insights from its transcriptome. **Genet Mol Res.**, v.2, p.309-25, 2005.
- TRABA, J.; SATRÚSTEGUI, J.; DEL ARCO, A. Transport of adenine nucleotides in the mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*: interactions between the ADP/ATP carriers and the ATP-Mg/Pi carrier. **Mitochondrion**, v.9, p.79-85, 2009.
- UEMURA, M.A.; HANNA, S.A.; RICCI, L.C.; SANDOVAL, M.; MENDES-GIANNINI, M.J.S. An electron microscopy study of *Paracoccidioides brasiliensis* adherence and invasion of culture cells. In: ENCUENTRO INTERNACIONAL SOBRE PARACOCCIDIOIDOMICOSIS, 6, 1996, Madri, Espanha.
- ULLRICH, O.; REINHECKEL, T.; SITTE, N.; HASS, R.; GRUNE, T.; DAVIES, K.J. Poly-ADP ribose polymerase activates nuclear proteasome to degrade oxidatively damaged histones. **Proc Natl Acad Sci**, v.96, p.6223-8, 1999
- UNTEREINER, W.A.; SCOTT, J.A.; NAVEAU, F.A.; SIGLER, L.; BACHEWICH, J.; ANGUS, A. The Ajellomycetaceae, a new family of vertebrate-associated *Onygenales*. **Mycology**, v. 96, p.812-861, 2004.

-VICENTINI, A.P.; GESZTESI, J.L.; FRANCO, M.F.; DE SOUZA, W.; DE MORAES, J.Z.; TRAVASSOS, L.R.; LOPES, J.D. Binding of *Paracoccidioides brasiliensis* to laminin through surface glycoprotein gp43 leads to enhancement of fungal pathogenesis. **Infect Immun.**, v.62, n.4, p.1465-9, 1994.

-WATERS, B.M.; EIDE, D.J. Combinatorial control of yeast FET4 gene expression by iron, zinc, and oxygen. **J Biol Chem.**, v.277, n.37, p.33749-57, 2002.

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

-ZHAO, H.; BUTLER, E.; RODGERS, J.; SPIZZO, T.; DUESTERHOEFT, S.; EIDE, D. Regulation of zinc homeostasis in yeast by binding of the ZAP1 transcriptional activator to zinc-responsive promoter elements. **J Biol Chem.**, v.273, n.44, p.28713-20, 1998.

ZHAO, H.; EIDE D.J. Zap1p, a metalloregulatory protein involved in zinc-responsive transcriptional regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol Cell Biol**, v.17, p.5044-52, 1997.