

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

Fabiana Cristina Donofrio

**“ISOLAMENTO e CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE ADESINA
DE *Paracoccidioides brasiliensis* LIGANTE DE FIBRONECTINA”**

ARARAQUARA

2007



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



Fabiana Cristina Donofrio

**“ISOLAMENTO e CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE ADESINA DE
Paracoccidioides brasiliensis LIGANTE DE FIBRONECTINA”**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP, Campus de Araraquara, para obtenção do título de mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Maria José Soares Mendes Giannini

ARARAQUARA

2007

“Querer, poder e conseguir”

DEUS

Alguma vez sentiste o desejo de fazer alguma coisa agradável por alguém a quem tem carinhos?

É Deus que te fala através do Espírito Santo.

Alguma vez sentiste tristeza e solidão, embora parecendo que alguém está ao teu lado?

É Deus que te acolhe através de Jesus Cristo.

Alguma vez ao pensares em alguém que te é querido e não vês há muito tempo, acontece que de repente encontras essa pessoa?

É Deus, porque o acaso não existe.

Alguma vez recebeste algo maravilhoso que nem tinhas pedido?

É Deus que conhece bem os segredos do teu coração.

Alguma vez estiveste numa situação muito problemática sem teres a menor idéia de como resolver e de repente a solução aparece?

É Deus que toma os nossos problemas nas suas mãos.

Alguma vez sentiste uma imensa tristeza na alma e de repente é como se um bálsamo fosse derramado e uma paz inexplicável invade teu ser?

É Deus que te consola com um abraço e te dá esperança.

Alguma vez sentiste tão cansado da vida, a ponto de querer morrer... e de repente um dia, sentes que tens força suficiente para continuar?

É Deus que te carrega nos braços e te dá descanso.

Tudo é melhor quando...

É Deus quem está à frente de tudo!!!

DEDICATÓRIA

Aos meus queridos pais, Antonio Carlos Donofrio e Maria de Lourdes M. T. Donofrio, por todo amor, carinho, atenção, dedicação, compreensão e incentivo em cada passo da minha vida profissional.

Ao meu querido irmão Marcelo, cunhada Thaís e afilhado Thales Eduardo pelo amor, amizade, e incentivo.

Aos amigos, pelos “ombros” fornecidos nos momentos mais difíceis, carinho, atenção e compreensão.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

*À Prof^a. Dr^a. Maria José Soares Mendes Giannini pela orientação
segura, apoio e confiança sempre.*

AGRADECIMENTOS

A Deus acima de tudo.

À minha amiga “irmã” Juliana Cristina da Silva pelo ombro fornecido em todos os momentos de dificuldade, ajuda, amizade, carinho e incentivo.

À minha amiga do “peito” Michelle Côrrea da Rocha por toda ajuda, amizade, alegria, atenção, carinho e incentivo.

Às amigas Elaine Miranda Toscano e Rosângela A. Moraes da Silva, por toda ajuda, amizade, alegria, atenção e pela contribuição para a realização deste trabalho.

À amiga Ana Carolina Alvarez Calil por toda ajuda, amizade, carinho, “mau humor” e pela contribuição para a realização deste trabalho.

Ao Marcos Dangona, Marisa C. P. Placeres, Cleni Mara Marzocchi Machado por toda ajuda e pela contribuição para a realização deste trabalho.

À Susana D’Ávila por toda ajuda, amizade e todos os momentos que passamos juntas - “horas extras”.

Ao Marcelo T. Matsumoto por toda ajuda, amizade, alegria, atenção e pela contribuição para a realização deste trabalho.

À Profa. Dra. Adelaide José Vaz pela grande colaboração e disponibilidade do laboratório para a produção de anticorpos monoclonais.

Aos amigos do Laboratório de Imunologia da USP - São Paulo: Noeli Espindola, Fabiana Érica, Fabiana dos Anjos, Cristiane e Alberto por toda ajuda, ensinamentos, amizade e carinho.

À minha prima Denyze Martins pela amizade e alojamento durante minha estadia em São Paulo.

À Lilian Cristiane Baeza por toda ajuda, amizade, alegria e atenção.

Aos amigos do Laboratório de Micologia Clínica: Adriana Del Vecchio, Aline Voltan, Ana Carolina A. P. Silva, Ana Marisa F. Almeida, Bruna M. Castilho, Fábio Galvão, Flávia R. Santos, Gabriela D. Merussi, Juliana G. Muniz, Juliana Monteiro, Juliany F. Silva, José Nelson Diniz, Lílíana Scorzoni, Marciano P. Costa, Mariana Queiroz, Marina Nakamura, Natália Girofa, Patrícia F. Andreotti, Roberta Silva, Tatiane Benaducci por toda ajuda, amizade e carinho.

Aos amigos Danielle Maia, Ana Paula Munhoz, Oedem Almeida Jr, Sandra Ananias, Angela Mikawa, Flávia Lopes e Cleso Jordão por toda ajuda, amizade e carinho.

Às minhas amigonas da parasitologia Elzinha, Isabel, Lucy, Márcia e Leila pela amizade, alegria, carinho, atenção e incentivo.

Às meninas da portaria Angélica, Lúzia, Márcia, Rita, Rosemira pela amizade e carinho.

Aos funcionários do NAC: Ana Elisa, Cida, Dalva, Edson, Flávia, Flavinha, Jamile, Marisa, Matilde, Milton, Sônia, Tatiana, pelos ensinamentos, amizade, ajuda e carinho.

Aos docentes pelos ensinamentos, ajuda e carinho.

À Eliana Cainelli Godoy e Tírene Pavanelli pela ajuda, amizade e atenção.

Aos funcionários da Seção de Pós Graduação e Biblioteca, pela amizade, ajuda e atenção.

À FAPESP pela bolsa de mestrado concedida.

A todos que estiveram comigo em todos os momentos, agradeço de coração.

**Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Micologia Clínica da
Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP Araraquara.**

**Recebeu apoio financeiro da FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa
do Estado de São Paulo – Processo: 05/53477-2), CAPES (Coordenação
de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior) e CNPq (Conselho
Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico).**

LISTA DE ABREVIATURAS

AfD	<i>Aspergillus fumigatus diffusate</i>
ALA1	<i>Agglutinin-like adhesin</i>
ALS1	<i>Agglutinin-like sequence 1</i>
APS	Persulfato de amônio
ATV	Solução de tripsina-EDTA-versene (Adolfo Lutz)
BHI	Infusão-cérebro-coração
C3	Componente do complemento
DAB	Diaminobenzidina
D.O.	Densidade ótica
DMSO	Dimetilsulfóxido
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
Fase L	Fase leveduriforme de <i>P. brasiliensis</i>
FBA	1,6-bifosfato aldolase
FM-USP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
GAPDH	<i>Glyseraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>
Gp	Glicoproteína
HAM F12	<i>F-12 Nutrient Mixture</i>
HAT	Hipoxantina, aminopterina e timidina
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HSP	<i>Heat shock protein</i>
ICAM-1	Moléculas de adesão
IgG	Imunoglobulina G
kDa	Kilodalton
M	Molaridade
MEC	Matriz extracelular
mA	Miliâmpere
mg	Miligrama
µg	Micrograma
mL	Mililitro
µL	Microlitro
mM	Milimolar
m/vol	Massa/volume
N	Normal
nm	Nanômetro
PBS	Tampão salina fosfato
PBS-T	Tampão salina fosfato com 0,1% de tween-20
PCM	Paracoccidiodomicose
pI	Ponto isoelétrico
PPLO	<i>Pleuropneumoniae like organisms</i>
PRRs	Regiões ricas em prolina
RGD	Arg-Gly-Asp
rpm	Rotações por minuto
SBF	Soro bovino fetal
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poli(acrilamida com dodecil sulfato de sódio
TEMED	Tetra metil etileno diamino
TIP	Triose fosfato Isomerase

TNF-α	Fator de necrose tumoral- α
UFC	Unidade formadora de colônia
V	Volume
V/V	Volume/Volume
X g	Gravidade

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** SDS-PAGE dos extratos *cell-free* de *P. brasiliensis* isolado 18 antes do reisolamento (1) e depois do reisolamento (2) cultivados em meio de Fava Netto. **49**
- Figura 2:** SDS-PAGE dos extratos *cell-free* de *P. brasiliensis* do isolado 18 antes (18a) e depois do reisolamento (18b) cultivados em meios sólidos e líquidos acrescidos e não de sangue de carneiro a 5%, corado pelo nitrato de prata. Extrato de *P. brasiliensis* da amostra 18a: (1) cultivada em meio sólido acrescido de sangue de carneiro 5%; (2) em meio sólido sem sangue de carneiro 5%; (3) em meio líquido acrescido de sangue de carneiro 5%; (4) em meio líquido sem sangue de carneiro 5%. Extrato de *P. brasiliensis* da amostra 18b: (5) cultivada em meio sólido acrescido de sangue de carneiro 10%; (6) em meio sólido com sangue de carneiro 5%; (7) em meio sólido sem sangue de carneiro; (8) em meio líquido acrescido de sangue de carneiro 5%; (9) em meio líquido sem sangue de carneiro 5%. **50**
- Figura 3:** SDS-PAGE dos extratos *cell-free* de *P. brasiliensis* de diferentes isolados: Pb18 antes do reisolamento (1) e depois do reisolamento de animal (2); isolado 113 (3); isolado 339 (4); isolado 2663-R3 (5); isolado 2681 (6); isolado PB01 (7); isolado 1934 (8) cultivados em meio de Fava Netto. **51**
- Figura 4:** SDS-PAGE dos extratos *cell-free* de *P. brasiliensis*: isolado 18 antes do reisolamento cultivado em meio de Fava Netto (1); em meio acrescido de 5% de sangue de carneiro (2); isolado 113 em meio de Fava Netto (3); isolado 113 em meio acrescido de 5% de sangue de carneiro (4); isolado 339 em meio de Fava Netto (5); isolado 339 em meio acrescido de 5% de sangue de carneiro (6). **52**
- Figura 5:** Eletroforese bidimensional do extrato *cell-free* do isolado 18, antes do reisolamento, cultivado em meio de Fava Netto, corada por nitrato de prata. **53**
- Figura 6:** Eletroforese bidimensional do extrato *cell-free* do isolado 18b, depois do reisolamento, cultivado em meio de Fava Netto, corada por nitrato de prata. **54**
- Figura 7:** Eletroforese bidimensional do extrato *cell-free* do isolado 18b de *P. brasiliensis*, depois do reisolamento, cultivado em meio líquido (BHI) acrescido de sangue de carneiro a 5%, corada por nitrato de prata. **55**
- Figura 8:** *Imunoblot* do soro anti-*cell-free* de *P. brasiliensis* frente aos antígenos do extrato *cell-free* do isolado 18 antes do **57**

reisolamento (1); controle negativo (2) e controle positivo (3).

Figura 9: *Imunoblot* do soro policlonal anti-54 kDa de *P. brasiliensis* (diluição 1:20) frente a sua proteína purificada (1) e ao extrato *cell-free* misto das amostras 18a e 18b cultivadas em meio sólido contendo 5% de sangue (2). **58**

Figura 10: A: Caracterização como adesina das proteínas do extrato *cell-free* da amostra 18a cultivada em meio sólido contendo 5% de sangue de carneiro, utilizando a reação de afinidade biotina-streptavidina em membrana de nitrocelulose. **(1A)** Células lisadas tratadas com as proteínas *cell-free* biotiniladas da amostra 18a cultivada em meio sólido contendo 5% de sangue de carneiro; **(2A)** controle negativo: células lisadas sem adição do extrato *cell-free*. **B:** Proteínas *cell-free* da amostra 18a cultivada em meio líquido contendo 5% de sangue de carneiro. **(1B)** Células lisadas tratadas com as proteínas *cell-free* biotiniladas da amostra 18a cultivado em meio líquido contendo 5% de sangue de carneiro; **(2B)** controle negativo: células lisadas sem adição do extrato *cell-free*. **59**

Figura 11: Eletroforese bidimensional da fração semi-purificada da amostra 18a, cultivada em meio líquido BHI acrescido de sangue de carneiro 5% obtida em coluna de gelatina sepharose 4B evidenciando a presença das proteínas de 60 kDa e pl de 6,3; 58 kDa e pl de 5,9; e 54 kDa com pl de 5,6 (setas), corada pelo nitrato de prata (11A) e por Comassie blue R-250 (11B). **61**

Figura 12: *Imunoblot* dos extratos *cell-free* da amostra 18a, quando cultivada em meio líquido contendo 5% de sangue de carneiro (1) e em meio líquido sem sangue de carneiro (2), tratado com fibronectina e soro anti-fibronectina. Controle negativo anticorpo primário anti-fibronectina (3); controle do extrato: soro de coelho anti-*cell-free* de *P. brasiliensis* (4). **62**

Figura 13: *Imunoblot* da fração semi-purificada, da amostra 18a cultivada em meio líquido BHI acrescido de sangue de carneiro 5%, obtida em coluna de gelatina Sepharose 4B, evidenciando as proteínas de 60 kDa e pl de 6,3; 58 kDa e pl de 5,9; e 54 kDa com pl de 5,6 (setas), tratado com fibronectina e soro anti-fibronectina. **63**

Figura 14: Eletroforese bidimensional da proteína de 54 kDa obtida por eletroeluição e gel corado pelo método com nitrato de prata. **64**

Figura 15: Cinética da interação da amostra 18 de *P. brasiliensis* antes (18a) e depois (18b) da passagem em animal (cultivadas em meio de Fava Netto) em função do período de incubação (horas) com células da linhagem pulmonar A549. A cinética da interação está representada por histogramas. Resultados expressos a partir **68**

da média e desvio padrão de experimentos realizados em duplicata com contagem em triplicata.

Figura 16: Cinética da interação da amostra 18 de *P. brasiliensis* antes (18a) e depois (18b) da passagem em animal (cultivadas em meio sólido (ágar base) contendo 5% de sangue de carneiro) em função do período de incubação (horas) com células da linhagem A549. A cinética está representada por histogramas. Resultados expressos a partir da média e desvio padrão de experimentos realizados em duplicata com contagem em triplicata. **69**

Figura 17: Cinética da interação da amostra 18 de *P. brasiliensis* antes (18a) da passagem em animal cultivada em meio de Fava Netto e em meio sólido (ágar base) contendo 5% de sangue de carneiro em função do período de incubação (horas) com células da linhagem A549. A cinética da interação está representada por histogramas. Resultados expressos a partir da média e desvio padrão de experimentos realizados em duplicata com contagem em triplicata. **70**

Figura 18: Cinética da interação da amostra 18 de *P. brasiliensis* depois (18b) da passagem em animal cultivada em meio de Fava Netto e cultivada em meio sólido (ágar base) contendo 5% de sangue de carneiro em função do período de incubação (horas) com células da linhagem A549. A cinética da interação está representada por histogramas. Resultados expressos a partir da média e desvio padrão de experimentos realizados em duplicata com contagem em triplicata. **71**

Figura 19: Cinética da infecção total (fungos aderidos e internalizados) da amostra 18 de *P. brasiliensis* antes (18a) e depois (18b) da passagem em animal, seguido do cultivado em meio de Fava Netto, em função do período de incubação (horas) com células da linhagem A549. Resultados expressos a partir da média e desvio padrão de experimentos realizados em triplicata. **72**

Figura 20: Cinética da infecção total (fungos aderidos e internalizados) da amostra 18 de *P. brasiliensis* antes (18a) e depois (18b) da passagem em animal, cultivadas em meio sólido (ágar base) contendo 5% de sangue de carneiro em função do período de incubação (horas) com células da linhagem A549. Resultados expressos a partir da média e desvio padrão de experimentos realizados em triplicata. **73**

Figura 21: Cinética da infecção total (fungos aderidos e internalizados) da amostra 18 de *P. brasiliensis* antes (18a) da passagem em animal, seguido do cultivo em meio de Fava Netto e 18a cultivada em meio sólido contendo 5% de sangue de carneiro em função do período de incubação (horas) com células da linhagem A549. Resultados expressos a partir da média e desvio **74**

padrão de experimentos realizados em triplicata.

Figura 22: Cinética da infecção total (fungos aderidos e internalizados) da amostra 18 de *P. brasiliensis* depois (18b) da passagem em animal cultivada em meio de Fava Netto e 18b cultivada meio sólido contendo 5% de sangue de carneiro em função do período de incubação (horas) com células da linhagem A549. Resultados expressos a partir da média e desvio padrão de experimentos realizados em triplicata. **75**

Figura 23: Cinética da invasão (fungos internalizados) da amostra 18 de *P. brasiliensis* depois (18b) da passagem em animal cultivada em meio de Fava Netto e 18b cultivada meio sólido contendo 5% de sangue de carneiro em função do período de incubação (horas) com células da linhagem A549. Experimentos realizados em triplicata. **76**

Figura 24: Índice de inibição da adesão e invasão da amostra 18 de *P. brasiliensis* antes (18a) e depois (18b) da passagem em animal cultivados em meio de Fava Netto, com anticorpo policlonal anti-54 kDa na diluição 1:100 com células epiteliais. Os índices de inibição da adesão e invasão em 2 h e 5 h são representados por mediana e desvio padrão (\pm S.D.) de três experimentos independentes (triplicata). **78**

Figura 25: Índice de inibição da adesão e invasão da amostra 18 de *P. brasiliensis* antes (18a) e depois (18b) da passagem em animal cultivados em meio sólido contendo 5% de sangue de carneiro com anticorpo policlonal anti-54 kDa na diluição 1:100 com células epiteliais. Os índices de inibição da adesão e invasão em 2 h e 5 h são representados por mediana e desvio padrão (\pm S.D.) de três experimentos independentes (triplicata). **79**

Figura 26: Índice de inibição da adesão e invasão da amostra 18a de *P. brasiliensis* cultivada em meio de Fava Netto e da 18a cultivada em meio sólido contendo 5% de sangue de carneiro, com anticorpo policlonal anti-54 kDa na diluição 1:100 com células epiteliais. Os índices de inibição da adesão e invasão 2 h e 5 h são representados por mediana e desvio padrão (\pm S.D.) de três experimentos independentes (triplicata). **80**

Figura 27: Índice de inibição da adesão e invasão da amostra 18b de *P. brasiliensis* cultivada em meio de Fava Netto e da 18b cultivada em meio sólido contendo 5% de sangue de carneiro, com anticorpo policlonal anti-54 kDa na diluição 1:100 com células epiteliais. Os índices de inibição da adesão e invasão 2 h e 5 h são representados por mediana e desvio padrão (\pm S.D.) de três experimentos independentes (triplicata). **81**

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Avaliação da produção de anticorpos anti-proteína de 54 kDa de *P. brasiliensis*, obtidos em camundongos Balb/c, através da técnica ELISA direto. Controle Positivo: soro de coelho anti-*cell-free* de *P. brasiliensis* diluição 1:100; Controle Negativo: soro normal de camundongo diluição 1:20. **65**

TABELA 2: Avaliação da produção de anticorpos anti-adesina de 54 kDa de *P. brasiliensis* pelos hibridomas formados através da técnica ELISA direto. Controle Positivo: soro de coelho anti-*cell-free* de *P. brasiliensis* diluição 1:100; Controle Negativo: soro normal de camundongo diluição 1:20. **67**

RESUMO

A capacidade de *Paracoccidioides brasiliensis*, agente etiológico da paracoccidioidomicose (PCM), de causar doença com manifestações clínicas variadas, depende de seus fatores de virulência, em particular daqueles envolvidos na interação celular. Neste estudo pretendeu-se isolar e caracterizar adesina(s) de *P. brasiliensis* ligante(s) de fibronectina relacionadas à interação do fungo com células epiteliais de origem pulmonar, comparando amostras de *P. brasiliensis*, antes (18a) e depois (18b) da passagem em animal, posteriormente cultivadas em meio de Fava Netto e em meio sólido (ágar base) e líquido (BHI) contendo 5% de sangue de carneiro. Os extratos 18a e 18b obtidos dos diferentes meios apresentaram proteínas variando de 106 a 12 kDa. Os extratos da amostra 18a e 18b cultivados em meios sólido e líquido acrescidos de sangue demonstraram maior expressão de algumas proteínas, quando comparado às amostras 18a e 18b cultivadas apenas em meio de Fava Netto. Aparentemente, o uso de meios de cultura acrescidos de sangue é semelhante ao verificado após a passagem em animal. As proteínas com massas moleculares de 54 kDa e pI de 5,6; 58 kDa e pI de 5,9 e 60 kDa com pI de 6,3 foram caracterizadas como adesinas ligantes de fibronectina. Uma delas, a proteína de 54 kDa foi purificada por cromatografia de afinidade e eluída por eletroeluição. O sobrenadante contendo a proteína purificada foi avaliado por eletroforese bidimensional, confirmando a presença da proteína de 54 kDa e pI de 5,6 e seu papel como adesina. Os extratos *cell-free* dos isolados 113, 339, 2663-R3, 2681, PB01, 1934 de *P. brasiliensis*, na fase leveduriforme (L) também apresentaram a expressão da proteína de 54 kDa,

sendo mais evidente nos isolados 113 e 339. Nossos experimentos com células A549 revelaram que a amostra Pb18b tanto cultivada em meio de Fava Netto ou em meio acrescido de sangue de carneiro foi capaz de aderir e invadir mais eficientemente quando comparada à amostra Pb18a cultivada em ambos meios. O anticorpo policlonal anti-54 kDa na diluição de 1:100 foi capaz de inibir principalmente a adesão às células A549. Assim, podemos concluir com os resultados apresentados que *P. brasiliensis* independente do meio de cultura em que foi cultivado produz uma adesina ligante de fibronectina e que esta pode ser inibida por anticorpo específico, influenciando na adesão do fungo as células pulmonares, podendo-se constituir em importante adjuvante no tratamento da doença.

ABSTRACT

The capacity of *Paracoccidioides brasiliensis*, the etiological agent of paracoccidioidomycosis (PCM), to provoke illnesses with great variety of clinical manifestations depends on its virulence factors, particularly on those involved in the cellular interaction. The present study was designed to isolate and characterize the adhesin fibronectin-binding related to the capacity of this fungus to adhere to the host by comparing *P. brasiliensis* samples, taken before (18a) and after (18b) animal inoculation and cultured on Fava Netto's medium and on blood base agar solid medium and liquid (BHI) medium with 5% sheep blood. The 18a and 18b extracts, independent of the medium, presented proteins with the molecular weights of 106 and 12 kDa. Extracts from Pb18a and 18b cultured in blood agar solid and liquid (BHI) medium showed higher levels of protein expression than that from samples cultured on Fava Netto. Apparently, the use of the sheep blood in the medium is similar to the animal passage. Ligand affinity binding assays showed that proteins of 54 kDa, pI 5.6; 58 kDa and pI of 5.9 and 60 kDa and pI de 6.3 were evident in all *P. brasiliensis cell-free* extracts, and all had properties of adhesin fibronectin-binding. A fibronectin-binding protein of 54 kDa was purified by affinity chromatography and by electro elution. The protein purified was evaluated by isoelectric focusing, confirming the presence of protein of 54 kDa and pI of 5.6 and its role as an adhesin. The *cell-free* extracts from 113, 339, 2663-R3, 2681, PB01, 1934 *P. brasiliensis* isolates, also showed the expression of 54 kDa protein, and it was more evident in 113 and 339 isolates. Our experiments with A549 cells showed that the Pb18b sample cultivated in Fava Netto medium and in blood

agar solid medium was able to adhere and to invade more efficiently than 18a sample. The anti-54 kDa serum diluted 1:100 was able to inhibit mainly the adhesion to A549 cells. Like this, we can conclude that *P.brasiliensis* independent of the culture medium produces an adhesin fibronectin-binding. The adhesion could be inhibited by specific antibody, influencing in the adhesion of the fungal to the lung cells, and it could be outline an important adjuvant in the treatment of the disease.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	1
2. OBJETIVOS GERAIS	15
2.1. Objetivos Específicos	15
3. MATERIAIS E MÉTODOS	16
3.1. Microrganismo	16
3.1.2. Reisolamento de <i>P. brasiliensis</i>	16
3.2. Cultura de células	17
3.2.1. Cultivo contínuo e tripsinização	17
3.2.2. Detecção de contaminantes nas linhagens celulares	18
3.2.2.1. Bactérias e fungos	18
3.2.2.2. Micoplasmas	18
3.2.3. Estocagem de células à baixa temperatura	19
3.2.3.1. Técnica de congelamento das linhagens	20
3.2.3.2. Descongelamento das linhagens	21
3.3. Testes de infecção de <i>P. brasiliensis</i> às células A549	21
3.3.1. Cultivo de células A549 em lamínula e placas de 24 orifícios	21
3.3.1.1. Preparo e padronização do inóculo de <i>P. brasiliensis</i>	22
3.3.1.2. Realização dos testes de adesão, infecção total e invasão	23
3.3.1.3. Períodos de infecção	23
3.3.1.4. Coloração das lamínulas	24
3.3.1.5. Avaliação do processo de adesão	25
3.3.1.6. Avaliação do processo de invasão	25
3.3.1.7. Avaliação do processo de infecção total	26

3.3.1.8. Ensaio de inibição da interação de <i>P.brasiliensis</i> com anticorpos policlonais anti-54 kDa	26
3.4. Preparo dos antígenos de <i>P. brasiliensis</i>	27
3.5. Preparo de soros policlonais	28
3.5.1. Soro policlonal anti-<i>cell-free</i> de <i>P. brasiliensis</i>	28
3.5.2. Soro policlonal anti-54 kDa de <i>P. brasiliensis</i>	29
3.6. Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)	30
3.6.1. Coloração dos géis pelo nitrato de prata	31
3.6.2. <i>Imunoblot</i>	32
3.7. Análise protéica por eletroforese bidimensional	34
3.8. Marcação dos extratos <i>cell-free</i> de <i>P. brasiliensis</i> com biotina	35
3.9. Fracionamento de proteínas ligantes de fibronectina de <i>P. brasiliensis</i>	36
3.10. Caracterização de proteínas de <i>P. brasiliensis</i> como ligantes de proteínas da matriz extracelular por <i>imunoblot</i>	37
3.11. Purificação da proteína de 54 kDa por eletroeluição	38
3.12. Preparo do anticorpo monoclonal (AcMo)	39
3.12.1. Animais	39
3.12.2. Imunização de camundongos BALB/c e produção de anticorpo monoclonal anti-adesina de <i>P. brasiliensis</i> ligante de fibronectina	39
3.12.3. Obtenção das células esplênicas e de linfonodo poplíteo	40
3.12.4. Cultivo das células de mieloma	40
3.12.5. Preparo do <i>Feeder layer</i>	41
3.12.6. Obtenção dos hibridomas (Fusão Celular)	41

3.12.7. Clonagem dos hibridomas	43
3.12.8. Avaliação de anticorpo monoclonal anti-adesina de <i>P. brasiliensis</i> por ELISA direto	43
3.12.9. Avaliação de anticorpo monoclonal anti-adesina de <i>P. brasiliensis</i> por DOT-ELISA	45
3.13. Análise estatística	46
4. RESULTADOS	48
4.1. Extratos de <i>P. brasiliensis</i>	48
4.1.1. Perfil eletroforético dos extratos <i>cell-free</i> de <i>P. brasiliensis</i>	48
4.1.2. Análise protéica por eletroforese bidimensional de extratos <i>cell-free</i> de <i>P. brasiliensis</i>	53
4.1.3. Titulação do soro anti-<i>cell-free</i> de <i>P. brasiliensis</i> por <i>imunoblot</i>	56
4.1.4. Soro anti-proteína de 54 kDa de <i>P. brasiliensis</i> por <i>imunoblot</i>	57
4.2. Marcação dos extratos <i>cell-free</i> de <i>P. brasiliensis</i> com biotina	58
4.3. Fracionamento de proteínas ligantes de fibronectina de <i>P. brasiliensis</i> e caracterização dos pls (ponto isoelétrico) por eletroforese bidimensional	60
4.4. Caracterização de ligantes de proteínas da matriz extracelular por <i>imunoblot</i>	61
4.5. Purificação da proteína de 54 kDa por eletroeluição	64
4.6. Produção de Anticorpos IgG em Balb/c	65
4.6.1. Resultados da fusão celular e obtenção dos hibridomas	66

4.7. Cinética da interação de <i>P. brasiliensis</i> à cultura de células epiteliais A549	67
4.8. Ensaio de inibição da interação de <i>P. brasiliensis</i> com anticorpo policlonal anti-54 kDa	76
5. DISCUSSÃO	82
6. CONCLUSÕES	91
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	92
8. ARTIGO	108

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O estudo da paracoccidioidomicose (PCM), antigamente chamada de blastomicose brasileira, assume importância cada vez maior, dado o aumento crescente dessa micose e, em razão da gravidade de algumas de suas formas anátomo-clínicas e das taxas de mortalidade (COUTINHO et al., 2002; LACAZ et al., 2002).

O agente etiológico *Paracoccidioides brasiliensis* é classificado taxonomicamente no Reino Fungi, Divisão Eumycota, Subdivisão Ascomycota, gênero *Paracoccidioides* e espécie *brasiliensis* (GUARRO et al., 1999; UNTEREINER et al., 2004). O fungo apresenta 4-5 cromossomos, com variações de 2-10 Mb (MONTROYA et al., 1997; FEITOSA et al., 2003). O tamanho do genoma foi calculado em 30 Mb (CANO et al., 1998), com aproximadamente 7.500 a 9.000 genes, número este de acordo com o calculado em genomas de fungos pertencentes aos ascomicetos. Recentemente, foi proposta a existência de três diferentes espécies filogenéticas (S1, PS2 e PS3) em *P. brasiliensis* (MATUTE et al., 2006). Este se apresenta como fungo filamentososo na fase saprobiótica, com a forma de micélio septado, hialino, clamidoconídios e conídios que podem estar presentes no solo, água e em plantas à temperatura ambiente; esses últimos pelo seu tamanho seriam compatíveis com as formas infectantes (McEWEN et al., 1987). Na fase leveduriforme (L) apresenta multibrotamentos em aspecto de “roda de leme” quando cultivado a 37°C ou no tecido do hospedeiro (fase parasitária) (RESTREPO, 1985; ARISTIZABAL et al. 1998; DISMUKES, 2001).

A PCM é doença que pode afetar diferentes órgãos e conseqüentemente, *P. brasiliensis* pode ter desenvolvido mecanismos que o capacitam a aderir, extravasar e invadir barreiras impostas pelos tecidos do hospedeiro (LOPES et al., 1985; MENDES-GIANNINI et al., 1994; LENZI et al., 2000).

A infecção é endêmica na América Latina, com alta incidência no Brasil, Colômbia e Venezuela. De acordo com McEwen et al. (1995), aproximadamente 10 milhões de pessoas podem estar infectadas com este fungo e, até 2% destas podem desenvolver a forma disseminada da doença. No Brasil, a maior prevalência ocorre nas regiões Sul e Sudeste (WANKE & LONDERO, 1994; COUTINHO et al., 2002). Estudos recentes demonstram que indivíduos residentes na zona rural, em área endêmica para PCM, estão mais expostos ao *P. brasiliensis* do que os da zona urbana, adquirindo a forma subclínica da PCM (BOTTEON et al., 2002).

Acredita-se que *P. brasiliensis* encontre seu habitat natural no reino vegetal e no solo (FRANCO et al., 2000). Segundo Londero et al. (1972), a chamada “reservárea” da PCM localiza-se em áreas cobertas de matas com altitudes entre 150 a 400 metros, distribuídas pelas vertentes das maiores elevações da planície fluvial, vertentes do maciço cristalino e encosta do planalto, com seus prolongamentos pelos vales dos rios. Além do solo, *P. brasiliensis* também foi isolado do trato intestinal de morcegos (GROSE & TAMSITT, 1965), em fígado e baço de tatus (*Dasypus novemcinctus*) (NAIFF et al., 1986; PERACOLI et al., 1999; VERGARA & MARTINEZ, 1998; TANAKA et al., 2001; BAGAGLI et al., 2003; HEBELER-BARBOSA et al., 2003; FERNANDES et al., 2004), em lesões hepáticas e cólon de sagüi (*Saimiri*

sciureus) (JOHNSON & LANG, 1977), em fezes de pingüins antárticos (*Pyzoscelis adeliae*) (GEZUELE, 1989; GARCIA et al., 1993) e em cães (ONO et al., 2003; RICCI et al., 2004).

A PCM manifesta-se em indivíduos com faixa etária entre 30 e 50 anos, com predomínio de homens infectados na proporção aproximada de 15:1 em relação às mulheres. A incidência baixa no sexo feminino pode ser explicada pelo efeito inibitório dos estrógenos (17 β -estradiol) na transformação do fungo da fase micelial (forma infectante) para a fase leveduriforme (forma parasitária). O mecanismo envolvido seria o bloqueio da síntese de proteínas que se expressam durante essa transformação (LOOSE et al., 1983; RESTREPO et al., 1984; STOVER et al., 1986 SALAZAR et al., 1988). Todas as raças são suscetíveis a essa doença e fatores genéticos podem estar associados, além da má nutrição e do alcoolismo (WANKE & LONDERO, 1994; MENDES-GIANNINI & MELHEM, 2001). *P. brasiliensis* é um importante patógeno humano com habilidade para infectar diversos sítios anatômicos causando assim diferentes manifestações clínicas da doença (FRANCO, 1987).

A PCM é uma doença de início pulmonar, e a entrada do fungo é feita por via respiratória com a inalação de conídios sésseis da forma filamentosa de *P. brasiliensis*. Este foco primário da infecção pode ser eliminado formando o complexo primário, ou pode formar focos que se mantêm quiescentes até a alteração do sistema imunológico do hospedeiro, podendo ocorrer disseminação para outros órgãos e tecidos, através das vias hematogênica e linfática (FRANCO et al., 1989; MONTENEGRO & FRANCO, 1994). A maioria dos indivíduos expostos a propágulos do fungo desenvolve uma infecção

assintomática, com lesões granulomatosas estabelecidas nos pulmões e linfonodos (FRANCO et al., 1989).

As formas, aguda e subaguda da doença, predominam em pessoas jovens de ambos os sexos, tendo início abrupto, com deterioração das condições do hospedeiro, afetando principalmente o sistema linfático (FRANCO, 1986; FRANCO et al., 1987).

A forma crônica da doença é mais freqüente em adultos do sexo masculino com idade entre 30 e 50 anos, com predominância do envolvimento pulmonar e/ou envolvimento muco-cutâneo. Esta forma distingue-se em dois subtipos: unifocal que se manifesta por sinais e sintomas referidos a um único órgão ou sistema (pulmões, supra-renais, pele, sistema nervoso), imunidade celular pouco alterada ou conservada e anticorpos presentes em níveis moderados, e multifocal que se caracteriza por sinais e sintomas referidos a mais de um órgão (pele, mucosas e pulmões, supra-renais e pulmões etc) com alterações da resposta celular e humoral (FRANCO, 1986; FRANCO et al., 1987; MENDES-GIANNINI & MELHEM, 2001; LACAZ et al., 2002). Independentemente do órgão afetado, a doença é usualmente associada à formação de fibrose, o que pode interferir permanentemente com a qualidade de vida dos pacientes (FRANCO, 1987). A forma disseminada da PCM caracteriza-se por lesões mucosas e ganglionares, e nos casos com evolução mais severa podem ser observadas lesões do sistema nervoso central, hepáticas, esplênicas e das supra-renais (SIDRIM & OLIVEIRA, 1999; BENARD & DUARTE, 2000). Pacientes com ambas as formas aguda e crônica apresentam alteração na resposta imune.

Por muitos anos, a associação entre PCM e portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV) tem sido descrita (BAKOS et al., 1989; GOLDANI et al., 1989; PEDRO et al., 1989; HADAD et al., 1992; MARQUES et al., 1995; BENARD & DUARTE, 2000) e nestes pacientes, a PCM foi mais freqüente em homens que em mulheres, na proporção de 3:1 (BENARD & DUARTE, 2000). Estudos sobre a epidemiologia da PCM entre pacientes aidéticos têm revelado que a doença pode ocorrer como resultado de reativação de focos quiescentes, em consequência da imunossupressão induzida pelo vírus HIV (MARQUES & SHIKANAI-YASUDA, 1994; BENARD & DUARTE, 2000). No Brasil, o aumento de novos casos foi atribuído a vários fatores, incluindo a expansão progressiva da Aids para áreas urbanas pequenas, próximas às áreas rurais onde a PCM é endêmica. As manifestações clínicas da doença, em casos de associação Aids e PCM, dificultam a classificação dos pacientes nas formas convencionais como aguda ou crônica, sendo, a forma disseminada, com características de forma aguda, presente em 77% dos pacientes estudados, embora quando da reativação de formas latentes, a ocorrência da forma crônica de baixa gravidade seria a apresentação mais comum (BENARD & DUARTE, 2000). Outras doenças que induzem a imunossupressão também são descritas em associação à PCM (LEÃO & MENDES, 1980; SHIKANAI-YASUDA et al., 1992) e todas levam a quadros disseminados que mimetizam a forma aguda.

P. brasiliensis, como muitos outros microrganismos, sintetiza vários componentes que participam direta ou indiretamente da relação parasita-hospedeiro. A estrutura antigênica deste fungo é bastante complexa, e cerca de 60 componentes solúveis foram descritos, incluindo glicoproteínas e

proteínas com e sem atividade enzimática (MENDES-GIANNINI et al., 1994). A gp 43 é o antígeno imunodominante de *P. brasiliensis*, e provoca uma forte resposta imune celular e humoral no hospedeiro (MONTENEGRO & FRANCO, 1994; TRAVASSOS et al., 1995; BENARD et al., 1997).

O sucesso de colonização dos tecidos do hospedeiro pelo fungo é um evento complexo, geralmente envolvendo um ligante codificado pelo patógeno (adesina) e um receptor da célula. O entendimento e identificação de moléculas envolvidas na adesão de microrganismos a diferentes componentes do hospedeiro podem redundar na descoberta de tratamentos eficientes para as micoses sistêmicas. Sabe-se que durante a disseminação por via hematogênica, interações desta natureza constituem as primeiras etapas para o desenvolvimento de inúmeras infecções (OFEK et al., 1996; FOSTER & HOOK, 1998; CASADEVALL & PIROFSKI, 2001; CALDERONE, 2002; NOUGAYREDE et al., 2003).

Muitos genes foram descritos como necessários para um microrganismo sobreviver no hospedeiro. Entre eles incluem-se genes codificantes para proteínas essenciais para a vida celular, além daqueles que codificam proteínas necessárias à interação com o hospedeiro, conferindo um fenótipo patogênico, por permitir ao organismo aderir a tecidos do hospedeiro, invadir novos compartimentos, evadir da resposta imune do hospedeiro, bem como outras interações hospedeiro-específicas (FELIPE et al., 2003; GOLDMANN et al., 2003).

A adesão de microrganismos a tecidos do hospedeiro é um evento crucial no desenvolvimento da infecção e é relacionada como o primeiro e principal passo na colonização por microrganismos patogênicos. A adesão

implica que o patógeno reconheça ligantes na superfície do hospedeiro ou um constituinte de membrana basal, tais como fibrinogênio, laminina, colágeno ou fibronectina (FURTADO et al., 1992; VICENTINI et al., 1994; MC MAHON et al., 1995; MENDES-GIANNINI et al., 2000; SULLIVAN et al., 2004; MENDES-GIANNINI et al., 2006).

Existem dois tipos principais de matriz extracelular (MEC), o interstício e a membrana basal, e seus componentes estão intimamente associados com as superfícies das células do hospedeiro nos tecidos. A laminina é encontrada principalmente na membrana basal subendotelial, enquanto a fibronectina e os vários tipos de colágeno estão presentes no interstício, particularmente como parte das fibras reticulares, e na lâmina basal pode-se encontrar colágeno tipo IV, sulfato de heparana e entactina (LIAKRA & ARTIO-HARMERNEN, 1992).

A fibronectina é uma proteína multifuncional formada por um dímero composto de duas subunidades unidas por um par de pontes dissulfeto próximos às suas extremidades C-terminais, que desempenha um importante papel na adesão e migração celular, sendo sintetizada por células epiteliais e endoteliais e encontrada nos fluidos corporais, tecido conjuntivo, membrana basal entre outros (PANKOV & YAMADA, 2002). Pierschbacher e Ruoslahti (1984) demonstraram que um destes domínios liga-se ao colágeno, outro à heparina e o outro a receptores específicos na superfície de vários tipos celulares. Este domínio que se liga às células foi isolado, e identificado como uma seqüência de tripeptídeos (Arg-Gly-Asp ou RGD) com característica central de sítio de ligação e a retirada desses três aminoácidos ou mesmo a mudança do aspartato por glutamato leva a perda significativa da capacidade adesiva (OBARA et al., 1988). A seqüência RGD não é limitada a fibronectina,

sendo também encontrada em várias proteínas da MEC e reconhecida por vários receptores da superfície celular da família das integrinas (FUJITA et al., 1995).

O grande número de tecidos que os fungos podem colonizar e infectar sugere que eles possuem um grande número de moléculas de superfície para adesão (SULLIVAN et al., 2004). Em particular, *P. brasiliensis* é capaz de penetrar a mucosa pulmonar, o que possibilita acesso ao interior das células para colonização e crescimento (LENZI et al., 2000). *P. brasiliensis* tem a capacidade de invadir células epiteliais de linhagens humanas e animais, e o seu grau de virulência foi correlacionado com a capacidade de adesão dos isolados (MENDES-GIANNINI et al., 1994; MENDES-GIANNINI et al., 2000; MENDES-GIANNINI et al., 2006). Por outro lado, foi verificado que adesão a componentes da MEC, como colágeno tipo I e IV, laminina, fibronectina e entactina, foi também diferencial para amostras com diferentes graus de virulência (VINCENZI, 2000; MENDES-GIANNINI et al., 2006).

As prováveis adesinas de *P. brasiliensis* e seus receptores celulares têm sido estudados e alguns identificados. A glicoproteína de 43 kDa foi implicada como ligante para laminina (VICENTINI et al., 1994; HANNA et al., 2000). Nosso grupo verificou que outros componentes da matriz como colágeno I e IV, fibronectina e entactina estão envolvidos na adesão aos tecidos do hospedeiro, e pela primeira vez, foi demonstrado um padrão de reconhecimento diferencial ao se compararem estes componentes da MEC frente aos componentes antigênicos das cepas Pb18 e Pb265 (MENDES-GIANNINI et al., 2000; VINCENZI, 2000), e a gp 43 foi também adicionalmente reconhecida como provável adesina para fibronectina, entre outros componentes que necessitam

ainda serem melhor caracterizados (MENDES-GIANNINI et al., 2000; MONTEIRO DA SILVA, 2000; MENDES-GIANNINI et al., 2006). Recentemente, Andreotti et al. (2005) descreveram uma nova adesina, de massa molecular de 30 kDa, que se liga a laminina. Gonzalez et al. (2005) analisaram extratos da fase micelar e leveduriforme de *P. brasiliensis* e detectaram também em ambas, dois polipeptídeos com massas moleculares de 19 e 32 kDa capazes de interagir com proteínas da MEC como laminina, fibronectina e fibrinogênio. Recentemente, o envolvimento de ICAM-1 foi demonstrado na migração e na organização de lesões granulomatosas causadas por *P. brasiliensis* (MOREIRA et al., 2006).

Várias proteínas, algumas imunogênicas (presumivelmente intracelulares), têm sido identificadas, como as enzimas da via glicolítica Gliceraldeído-3-fostato desidrogenase (GAPDH), Triose fosfato Isomerase (TIP), Frutose, 1,6-bifosfato aldolase (FBA) (FONSECA et al., 2001; BARBOSA et al., 2004; PEREIRA et al., 2004; CARNEIRO et al., 2005), proteínas de choque térmico, HSP60 (IZACC et al, 2001; CUNHA et al., 2002), a enzima formamidase (BORGES et al., 2002), uma catalase peroxissomal (MOREIRA et al., 2004). Algumas destas como as enzimas GAPDH, TIP e FBA são moléculas associadas à superfície celular de *Candida albicans* (PITARCH et al., 2002), assim como a *P. brasiliensis*, sendo esta última também descrita como adesina (BARBOSA et al., 2006). Coltri et al. (2006) estudaram uma proteína de 70 kDa, que foi designada como “paracoccin”, ligante de n-acetil glucosamina (GlcNAc) que se liga à laminina e induz a produção de fator de necrose tumoral- α (TNF- α) por macrófagos, com aumento de óxido nítrico, suprimindo as células do sistema imunológico e, conseqüentemente,

favorecendo a adesão e invasão das células do hospedeiro, sugerindo ser um fator importante na patogênese da PCM.

No entanto, o estudo de moléculas de adesão em *P. brasiliensis* é ainda incipiente, face às complexas relações com o hospedeiro e ao que se conhece de outros fungos como *C. albicans* e *Aspergillus fumigatus*. As adesinas até agora identificadas de *C. albicans* incluem receptores para os fragmentos do componente C3 do complemento iC3b e C3d (ALAEI et al., 1993, CALDERONE et al., 1993), laminina (BOUCHARA et al., 1990; LOPEZ-RIBOT et al., 1994a), fibrinogênio (BOUALI et al., 1987, CASANOVA et al., 1992), fibronectina (SKERL et al., 1983; KALO et al., 1988, KLOTZ & SMITH, 1991) e diferentes componentes da matriz extracelular incluindo colágeno tipo IV (KLOTZ, 1990; KLOTZ et al., 1992) e ainda a entactina (LOPEZ-RIBOT et al., 1994b). O gene ALA1 de *C. albicans* foi clonado e caracterizado e este codifica proteínas adesivas à matriz extracelular (GAUR & KLOTZ, 1997). O gene ALS1 que codifica a adesina Als1p de *C. albicans* é responsável pela aderência às células epiteliais e endoteliais (FU et al., 1998; FU et al., 2002). Gozalbo et al. (1998) demonstraram que GAPDH (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase) é capaz de se ligar à fibronectina e laminina e teria papel na adesão de *C. albicans* e disseminação da candidíase.

Yan et al. (1998) observaram que a adição de hemoglobina ao meio de cultura aumenta a expressão de receptores de superfície ligantes de fibronectina em *C. albicans* e também aos seus fragmentos proteolíticos contendo a região de 120 kDa (domínio de ligação celular, que inclui uma seqüência RGD) e 40 kDa (domínio de ligação à heparina), modificando a afinidade do fungo pelos domínios de adesão celular. Pendrak et al. (2000)

demonstraram que *C. albicans* liga-se à hemoglobina sendo esta interação suficiente para induzir a expressão de receptor para fibronectina (PENDRAK et al., 2004).

A habilidade de conídios de *A. fumigatus* de ligar-se às proteínas da matriz extracelular como fibrinogênio, fibronectina, laminina, colágeno tipo I e IV envolve adesinas e uma de 37 kDa foi identificada e se ligou tanto à laminina quanto à fibronectina (GIL et al., 1996). Um outro componente superficial de conídios de *A. fumigatus* (AfD) foi estudado mostrando seu papel na adesão deste fungo às células epiteliais pulmonares (A549) e as proteínas da matriz extracelular (YAN et al., 2000). Carboidratos presentes na superfície de conídios em *A. fumigatus* podem mediar sua adesão à fibronectina e outras proteínas da lâmina basal (WASYLNKA & MOORE, 2000). Fungos e bactérias expressam na sua parede celular, proteínas com regiões ricas em prolina (PRRs), e estas devem estar envolvidas no processo de adesão aos tecidos do hospedeiro (PERFECT et al., 1998; STAAB et al., 1999). Estudos de um gene (SOWgp) que codifica uma glicoproteína presente na parede celular da fase parasitária de *Coccidioides immitis*, demonstraram que esta proteína contém PRRs e o peptídeo recombinante (rSOWgp) foi capaz de se ligar às proteínas da matriz extracelular *in vitro* (laminina>fibronectina>colágeno IV), sugerindo que este antígeno de superfície celular pode funcionar como uma adesina, e a deleção do gene SOWgp resultou na diminuição da adesão do fungo às proteínas da matriz extracelular e uma significativa redução na virulência destes isolados mutantes (HUNG et al., 2002).

Outro fungo atualmente estudado é o *Penicillium marneffe*, e conídios do fungo exibem ligantes de laminina (HAMILTON et al., 1998) e fibronectina

(HAMILTON et al., 1999) em sua superfície. Uma proteína de 20 kDa foi identificada em extrato de parede celular deste fungo e posteriormente, caracterizada como ligante tanto de laminina como de fibronectina, sugerindo que estas duas proteínas compartilham o mesmo receptor (HAMILTON et al., 1999). Em *Histoplasma capsulatum* foi identificada uma adesina de 50 kDa que reconhece laminina (MC MAHON et al., 1995).

A adesão de *Sporothrix schenckii* a diferentes proteínas da matriz extracelular demonstrou que ambas as fases morfológicas do fungo (conídios e leveduras) podem ligar-se significativamente ao colágeno tipo II, laminina e fibronectina (LIMA et al., 1998a). Em outros estudos envolvendo fragmentos proteolíticos de fibronectina contendo a região de 120 kDa e 40 kDa foi observado que as leveduras e conídios aderiram de forma similar (LIMA et al., 1998b).

O estudo de ligantes de fungos e sua interação com células do hospedeiro podem ser realizados com auxílio de anticorpos monoclonais. A produção destes foi descrita pela primeira vez por Köhler e Milstein em 1975. Desde então estes anticorpos são utilizados como ferramentas na identificação de estruturas protéicas, em testes de identificação de antígenos de histocompatibilidade, técnicas de purificação de moléculas por cromatografia de afinidade, no diagnóstico clínico para a pesquisa de antígenos tumorais, classificação de tumores, imunoterapia, e no diagnóstico de doenças parasitárias, virais, bacterianas e fúngicas, e na identificação de diferentes moléculas de superfície celular (MCMICHAEL & FABRE, 1982).

O desenvolvimento e emprego de anticorpos monoclonais em micologia têm-se intensificado nos últimos anos e sua aplicabilidade é grande em várias

áreas, podendo ser utilizado no imunodiagnóstico para pesquisa de anticorpos e antígenos, em métodos de purificação, em imunohistoquímica, e para o conhecimento do papel das adesinas na interação do fungo com as células epiteliais do hospedeiro e nos mecanismos de invasão (MENDES-GIANNINI, 2002). Estes são altamente específicos, minimizando o risco de reações cruzadas que freqüentemente ocorrem quando se utilizam anticorpos policlonais.

Anticorpos monoclonais contra antígenos de *P. brasiliensis* foram produzidos, mas alguns não tiveram maior utilidade no sorodiagnóstico e/ou em outros estudos. CAMARGO et al. (1994) descreveram os primeiros anticorpos monoclonais anti-gp 43 (17C, 21A, 21F e 32B) que foram capazes de detectar anticorpos específicos em soro de pacientes com PCM através do teste *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay* (ELISA) de captura, e análises por *Western blot* demonstraram que esses anticorpos não foram capazes de reconhecer componentes antigênicos de *Histoplasma capsulatum*, *A. fumigatus* ou *C. albicans*, apontando grande aplicabilidade em imunodiagnóstico. MARQUES DA SILVA et al. (2003; 2004) empregaram anticorpos monoclonais anti-gp 43 para a detecção de antígeno circulante através do teste de ELISA de inibição. Outros anticorpos monoclonais anti-gp 43 (8a, 17c, 24a, 27a, 40d7) foram empregados em ensaios de imunoeletrônica, para verificar a distribuição desta glicoproteína na célula (STRAUSS et al., 1996); em ensaios *in vivo* na modulação da rede idiotípica (SOUZA et al., 1998; SOUZA et al., 2000; SOUZA et al., 2004) e na interação parasita-hospedeiro mediada por laminina (GESZTEZI et al., 1996).

Por outro lado, anticorpos monoclonais contra outras proteínas de *P. brasiliensis* foram produzidos, como o empregado no teste ELISA de inibição para a detecção de antígeno circulante de 87 kDa em pacientes com PCM, apresentando sensibilidade de 80,4% e especificidade de 81,4% (GOMEZ et al., 1997), e o anticorpo monoclonal MEST-1 contra o antígeno glicolípido denominado banda 1 da fase leveduriforme de *P. brasiliensis* (SUZUKI et al., 1997). Para avaliação de antígenos deste fungo e caracterização quanto ao seu papel na patogênese da PCM, anticorpos monoclonais foram produzidos contra a fração de 22, 58 e de 70 kDa (FIGUEROA et al., 1994; FIGUEROA et al., 1995; MATTOS GROSSO et al., 2003).

O aspecto central deste projeto foi ampliar estudos existentes em nosso laboratório sobre moléculas de *P. brasiliensis* prováveis alvos de interação do fungo com o hospedeiro humano. Neste contexto, moléculas de superfície celular constituem-se em alvos interessantes para a modificação das interações fungo-hospedeiro, através da inibição ou bloqueio de possíveis fatores de virulência, o que pode levar ao impedimento da colonização no hospedeiro e ao progresso do processo infeccioso.

2. OBJETIVOS GERAIS

Neste estudo pretendeu-se isolar e caracterizar adesina(s) de *P. brasiliensis* ligante(s) de fibronectina, bem como verificar o seu papel na interação do fungo com células epiteliais de origem pulmonar.

2.1. Objetivos Específicos

- Isolar e caracterizar adesina(s) de *P. brasiliensis*, ligantes de fibronectina;
- Avaliar a expressão diferencial de proteínas por *P. brasiliensis* utilizando-se meios de cultura comuns e meios enriquecidos com 5% de sangue de carneiro;
- Procurar desenvolver anticorpo monoclonal e/ou policlonal, anti-adesina ligante de fibronectina, com o intuito de estudar o papel desta na interação de *P. brasiliensis* com as células epiteliais;
- Estudar comparativamente as amostras 18a e 18b cultivadas em meio de Fava Netto e também em meios com ágar base sangue com 5% de sangue de carneiro quanto à adesão, infecção total e invasão às células epiteliais.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Microrganismo

Foi empregado o isolado 18 de *P. brasiliensis* na fase leveduriforme, procedente da micoteca da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FM-USP), e também os isolados 113, 339, 2663-R3, 2681, PB01 e 1934 de *P. brasiliensis* obtidos de casos de paracoccidioomicose de várias regiões do Brasil. Durante a realização deste trabalho o isolado 18 de *P. brasiliensis* foi mantido em meio de Fava Netto (proteose peptona 3g; neopeptona 10g; extrato de carne 5g; cloreto de sódio 5g; dextrose 40g; ágar bacteriológico 18g; água Milli-Q 1000mL, pH 7.2-7.4) a 35⁰C e repicado a cada 7 dias por 72 vezes, e denominado 18a. Foi também cultivado em meios com Ágar Base Sangue (DIFCO) e líquido BHI (infusão-cérebro-coração-DIFCO) com e sem 5% de sangue de carneiro.

3.1.2. Reisolamento de *P. brasiliensis*

O isolado 18 de *P. brasiliensis* foi recuperado a partir da inoculação intratesticular em ratos machos, provenientes do Biotério da UNESP-Araraquara, de 0,2mL de uma suspensão do fungo na fase leveduriforme, com turvação correspondente ao tubo nº 6 da escala MacFarland. Após 15 a 20 dias, os animais que apresentaram o desenvolvimento de orquite foram sacrificados e os testículos macerados e cultivados em ágar Sabouraud acrescidos de cloranfenicol a 25⁰C até o desenvolvimento de colônias

características de *P. brasiliensis*. Após seu isolamento, as colônias foram identificadas e incubadas a 35°C em meio de Fava Netto para a reversão da fase miceliar para a fase leveduriforme (LACAZ et al., 1991), procurando-se realizar poucos repiques desta amostra (18b). A amostra de *P. brasiliensis* (18b) foi também cultivada em meios com Ágar Base Sangue (DIFCO) e líquido BHI (infusão-cérebro-coração-DIFCO) com e sem 5% de sangue de carneiro.

3.2. Cultura de células

Neste estudo, foi selecionada a linhagem de pneumócitos A549, células epiteliais de pulmão humano.

3.2.1. Cultivo contínuo e tripsinização

A linhagem celular foi mantida em cultivo contínuo, isto é, em monocamadas. As células foram cultivadas em garrafas de plástico estéreis, em meio *F-12 Nutrient Mixture* (HAM F12) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SBF). A cultura foi mantida em estufa a 36,5°C. Decorridos 3-4 dias, as garrafas de células foram submetidas à tripsinização. Para isto, a monocamada celular formada foi lavada com 1mL de ATV-solução de tripsina 0,2% e EDTA 0,02% (Adolfo Lutz) e, após a lavagem, esta foi desprezada e acrescentado mais 1mL de ATV. Seguidos 1-2 minutos, as células foram homogeneizadas com volumes variáveis de meio HAM F12 acrescido de 10%

de SFB. Nesta etapa, a tripsina (ATV) foi neutralizada pelo SFB presente no meio de cultura. O volume total da suspensão celular obtida foi diluída em meio HAM F12 acrescido de 10% de SFB e transferido para outras garrafas, de modo a se obter uma concentração celular de 10^6 células/mL.

3.2.2. Detecção de contaminantes nas linhagens celulares

3.2.2.1. Bactérias e fungos

Para o controle de esterilidade das garrafas contendo as culturas celulares foram preparados esfregaços corados pelo Gram de amostras de sobrenadantes de cultura e observados em microscopia óptica.

O meio de cultivo HAM F12, o SFB e o ATV (solução de tripsina e EDTA) foram semeados em ágar Sabouraud, em tioglicolado e em ágar sangue para detecção de um possível contaminante. Os tubos foram mantidos, no mínimo, por uma semana, verificando-se a possível ocorrência de crescimento de colônias.

3.2.2.2. Micoplasmas

Os micoplasmas são os menores organismos de vida livre existentes e, durante muito tempo, foram conhecidos como PPLO (*pleuropneumonie like*

organisms). São os contaminantes mais frequentes das linhagens celulares (57 a 92%), originários de fonte humana, bovina e suína.

A possível presença de micoplasmas em amostras provenientes de culturas de células ou lotes de soros fetais bovinos foi pesquisada tanto através do cultivo em caldo PPLO enriquecido, como pelo PPLO ágar (1%).

Inicialmente, para se pesquisar a presença de micoplasma nas células A549 mantidas em meio HAM F12, tomou-se cerca de 0,5mL do sobrenadante da cultura e semeou-se em caldo PPLO.

Em relação ao lote do SFB, cerca de 20mL deste foi centrifugado e o sedimento obtido foi semeado em tubos contendo 5mL de meio PPLO enriquecido. Os tubos foram incubados por 1 semana a 37°C, verificando-se a possível viragem do ponto de pH do meio. Em seguida, 50µL de cada cultivo foram semeados em placas de Petri contendo ágar PPLO e incubadas novamente a 37°C em anaerobiose por 1 semana. Após este período as placas foram examinadas em microscópio invertido para se observar a presença ou não, de colônias típicas de *Mycoplasma* (aspecto de “ovo frito”). Culturas contaminadas foram, imediatamente, descartadas e substituídas por novas.

3.2.3. Estocagem de células à baixa temperatura

As linhagens foram estocadas através da técnica de congelamento em nitrogênio líquido (N₂ líquido). Para isto foi necessária a adição de

Dimetilsulfóxido (DMSO – SIGMA D8418), substância preservadora não tóxica às células.

3.2.3.1. Técnica de congelamento das linhagens

Foi utilizada a técnica de congelamento lento das linhagens para evitar a formação de cristais de gelo no interior das células.

As células que foram congeladas encontravam-se em fase logarítmica de crescimento e livres de contaminantes. As garrafas contendo o cultivo celular foram tripsinizadas, como já descrito no item 3.2.1 e diluídas em meio HAM F12 acrescido de 10% de SFB na concentração de 4×10^6 células/mL. Após a tripsinização, as células foram centrifugadas a 850g por 15 min, desprezou-se o sobrenadante e ao *pellet* foram adicionados: Soro Fetal Bovino 20% + 4mL meio HAM F12 e DMSO + 4mL meio HAM F12 (o DMSO deve ser esterilizado por filtração e a mistura deixada em banho de gelo).

A suspensão celular acrescida de meio HAM F12, SFB e DMSO, foi aliquoteada em volumes de 2,0mL, acondicionada em ampolas especiais para congelamento (Cryotube Nunc - 340711/50) e congelada em freezer -20°C por 24 h, sendo após transferida para freezer -70°C por 24 horas e, finalmente, transferida para o tambor de nitrogênio líquido.

3.2.3.2. Descongelamento das linhagens

O descongelamento das células foi feito rapidamente. Para isto, as ampolas foram retiradas do recipiente de nitrogênio líquido, usando luvas protetoras, e deixadas a 37°C, até o descongelamento. Após o descongelamento, as suspensões celulares foram transferidas das ampolas para as garrafas de cultivo e o volume completado com meio HAM F12 acrescido de 10% de SFB e incubadas em estufa a 36.5°C até que se formasse o tapete celular. Células viáveis aderiram-se às garrafas algumas horas após o descongelamento e semeadura, com a primeira troca de meio, as não viáveis foram eliminadas.

3.3. Testes de infecção de *P. brasiliensis* às células A549

3.3.1. Cultivo de células A549 em lamínula e placas de 24 orifícios

Os ensaios de adesão foram realizados em placas de 24 orifícios contendo no interior uma lamínula redonda (*deckglaser*) e os ensaios de infecção total e invasão foram realizados em placas de 24 orifícios. Para os testes, uma suspensão celular de 10⁶ células/mL foi padronizada. Assim, após a tripsinização e homogeneização da suspensão celular, 0,2mL desta foi retirada da garrafa, e diluída em 1,8mL de meio HAM F12 e foi feita a

contagem das células em hemocitômetro, para que, através de diluições adequadas, fosse ajustada a concentração desejada. Ao término desta etapa, 0,5mL dessa suspensão de células foi dispensado em cada orifício das placas e estas incubadas a 36.5°C por 24 horas, para que a monocamada celular se formasse sobre a lamínula, sendo, a partir daí, utilizada para os testes de adesão, infecção total e invasão.

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

Os isolados 18 de *P. brasiliensis*, na fase leveduriforme (L) antes (18a) e depois do reisolamento do fungo em ratos (18b) (item 3.1.2) foram cultivados em meio de Fava Netto e em meio ágar base sangue contendo 5% de sangue de carneiro durante três dias, a 35°C. A suspensão foi feita em tampão salina fosfato (PBS) estéril. Foi adicionado a um volume de 10mL de PBS estéril, quantidade suficiente do fungo para obtenção de uma suspensão turva e homogênea, correspondente a 10^6 células/mL, de acordo com a escala de Mc Farland e ajustada também através de leitura em espectrofotômetro (D.O.= 0.5 a 550nm).

3.3.1.2. Realização dos testes de adesão, infecção total e invasão

Após a formação do tapete celular sobre as lamínulas e sobre os orifícios da placa de 24 orifícios, por aproximadamente 24 h, o sobrenadante da cultura foi desprezado e as células lavadas por três vezes com 1mL cada de PBS 0.05M, pH 7.2 estéril. Em seguida, cada poço foi inoculado com 300µL da suspensão padronizada de *P. brasiliensis* em PBS acrescida de 300µL de meio HAM F12. A seguir, as células infectadas foram incubadas em estufa a 36.5°C, em diferentes períodos de tempo.

3.3.1.3. Períodos de infecção

Foi padronizado como período mínimo de infecção o menor tempo de contato do patógeno com as células, através de que foi possível à observação da adesão, infecção e invasão de células fúngicas às células epiteliais. Foram avaliados os tempos de 30 minutos, 1 h, 3 h, 5 h, 10 h e 24 h. Em todos os testes foram feitos controles de células normais (não infectadas).

Após o período de infecção, todos os orifícios das placas contendo as células foram lavados três vezes com PBS 0,05M pH 7.2, eliminando-se, desta forma, células fúngicas não aderentes às culturas celulares e também restos celulares. Para avaliação de adesão, as células infectadas sob as lamínulas foram fixadas com paraformaldeído a 4% por um período de 1 hora à temperatura ambiente. Para o ensaio de invasão, nos orifícios contendo

apenas células infectadas, foram adicionados 300µL de cetoconazol na concentração de 15µg/mL e 300µL de meio HAM F12, e deixados agir por 1 h para matar os fungos que estavam somente aderidos nas células A549. Em seguida, os orifícios foram lavados novamente três vezes com PBS estéril, e foi adicionado 300µL de água ultrapura estéril em cada orifício para que as células fossem lisadas. O lisado de cada orifício foi recolhido e plaqueado em meio Fava Netto contendo 4% de SBF e incubado a 35°C. Para o ensaio de infecção total, após lavagem das células, foi adicionado 300µL de água ultra pura estéril em cada orifício para que as células fossem lisadas. O lisado de cada orifício foi recolhido e plaqueado em meio Fava Netto contendo 4% de SBF e incubado a 35°C.

3.3.1.4. Coloração das lamínulas

Após o tempo de fixação das células com paraformaldeído a 4%, as lamínulas foram lavadas três vezes com PBS 0.05M, pH 7.2, e secas à temperatura ambiente. A seguir, foram coradas pelo May Grünwald-Giemsa. Foram acrescentados 300µL de metanol absoluto em cada poço e deixados 5 minutos. Após esse tempo, o metanol foi retirado e acrescentado 300µL de corante Giemsa em cada poço, por 15 minutos. Em seguida, o corante foi retirado de cada poço e estes foram lavados três vezes com água destilada, e as lamínulas foram retiradas de cada poço e deixadas sob papel absorvente para secarem.

3.3.1.5. Avaliação do processo de adesão

Após as colorações, as lamínulas foram montadas sobre lâminas com Bálsamo do Canadá e observadas em microscópio óptico comum para avaliar a quantidade de fungos que infectaram as células e diferenciar a virulência de cada uma das amostras em relação à adesão à monocamada de células epiteliais. Foram contados os fungos aderentes à monocamada e um gráfico foi montado para avaliar a cinética da adesão de *P. brasiliensis* (antes e após reisolamento cultivado em meio de Fava Netto e em meio acrescido de 5% de sangue de carneiro) com células A549.

3.3.1.6. Avaliação do processo de invasão

Após incubação das placas contendo os lisados, foi realizada a contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) para avaliar a quantidade de fungos que invadiram as células e assim diferenciar a virulência de cada uma das amostras em relação à invasão à monocamada de células epiteliais. Foram contadas as UFC e um gráfico foi montado para avaliar a cinética da invasão de *P. brasiliensis* (antes e após reisolamento cultivado em meio de Fava Netto e em meio acrescido de 5% de sangue de carneiro) com células A549.

3.3.1.7. Avaliação do processo de infecção total

Após incubação das placas contendo os lisados, foi realizada a contagem de UFC para avaliar a quantidade de fungos que infectaram as células e assim diferenciar a virulência de cada uma das amostras em relação à adesão e invasão à monocamada de células epiteliais. Foram contadas as UFC e um gráfico foi montado para avaliar a cinética da infecção total de *P. brasiliensis* (antes e após reisolamento cultivado em meio de Fava Netto e em meio acrescido de 5% de sangue de carneiro) com células A549.

3.3.1.8. Ensaio de inibição da interação de *P.brasiliensis* com anticorpos policlonais anti-54 kDa

Para a realização do teste de inibição com anticorpos foi preparado o inóculo de *P. brasiliensis* como descrito no item 3.3.1.1. Em seguida, foi acrescentado 300µL de cada suspensão em microtubos estéreis, e centrifugado por 5 minutos a 850g. O sobrenadante foi desprezado e ao *pellet* foi adicionado 300µL do soro anti-54 kDa obtido de um *pool* de extratos das amostras 18a e 18b cultivadas em meio sólido contendo sangue de carneiro na diluição de 1:100. Os microtubos foram homogeneizados e incubados por 1 hora a 37°C sob agitação. Após, foram lavados três vezes com PBS estéril, centrifugando 5 min a 850g. Em seguida, os *pellets* foram ressuspensos em 300µL de PBS estéril, e foi realizado o teste de infecção como descrito no item 3.3., e os períodos de infecção foram 2 e 5 horas para avaliação da inibição.

Como controle foi utilizado orifícios com o fungo não tratado com anticorpo policlonal anti-54 kDa. A seguir, as células epiteliais foram coradas pelo May Grünwald-Giemsa. Cada ensaio foi feito em duplicata e a porcentagem das células infectadas foi determinada por contagem aleatória de um mínimo de 300 células em cada lamínula, repetida por três vezes. O índice de adesão foi calculado pela divisão da média do número de leveduras aderidas pela porcentagem de células epiteliais infectadas, observadas em microscópio óptico comum com objetiva de 100x. O índice de invasão foi determinado da mesma forma, mas usando o número de leveduras internalizadas (ESQUENAZI et al., 2003). A mediana e o desvio padrão de três experimentos distintos foram determinados.

3.4. Preparo dos antígenos de *P. brasiliensis*

Os extratos *cell-free* foram obtidos do isolado 18 de *P. brasiliensis*, na fase leveduriforme (L) antes (18a) e depois do reisolamento do fungo em ratos (18b) (item 3.1.2) e também foram obtidos das cepas 113, 339, 2663-R3, 2681, PB01 e 1934 de *P. brasiliensis* crescidas em meio de Fava Netto. Cerca de 300mg de crescimento de cada isolado foi retirado do meio e adicionado em 1mL de PBS, pH 7.4, 0,01M, estéril. Esta mistura foi agitada em “vortex” por 30 segundos e, em seguida, centrifugada a 550g por 1 minuto. O sobrenadante (extrato *cell-free*) foi retirado, aliquotado e armazenado a -20°C.

Os extratos *cell-free* foram também obtidos do isolado 18a, 18b, 113 e 339, após cultivo em meios sólido e líquido (infusão-cérebro-coração) BHI contendo 5% de sangue de carneiro e em meios sólido e líquido sem sangue.

Os meios BHI com e sem 5% de sangue de carneiro foram adicionados em tubos cônicos de 50mL estéreis e centrifugados a 5000g por 1 minuto. Os sobrenadantes foram descartados e os sedimentos lavados duas vezes com PBS estéril e centrifugados a 13000g por 5 minutos cada, para retirada total dos resíduos de meio de cultura e sangue de carneiro. Em seguida, os sedimentos foram pesados e foi realizado o procedimento descrito acima para os meios sólidos. Os sobrenadantes dos antígenos *cell-free* foram retirados, aliquotados e armazenados a -20 °C.

A concentração protéica dos antígenos foi quantificada pelo método de Lowry et al. (1951), e em seguida, os isolados avaliados por eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio, SDS-PAGE, sob condições redutoras, usando sistema tampão descontínuo de Laemmli (1970) e Studier (1973).

3.5. Preparo de soros policlonais

3.5.1. Soro policlonal anti-*cell-free* de *P. brasiliensis*

Soro anti-*cell-free* de *P. brasiliensis* foi produzido a partir dos extratos *cell-free* do isolado 18, antes e depois do reisolamento, cultivado em meio líquido BHI contendo 5% de sangue de carneiro. Cerca de 0,3, 0,6, 0,9 e 1,0mL de ambos antígenos foram inoculados intradermicamente em coelhos machos albino provenientes do Biotério Central da UNESP-Botucatu, intercaladas as inoculações a cada 4 dias, sendo que na primeira a suspensão foi emulsificada

com adjuvante completo de Freund e nas seguintes com o adjuvante incompleto de Freund. Decorridos 15 dias da última inoculação foi realizada uma sangria de prova e a avaliação do título de anticorpos produzidos foi feita através da técnica de *imunoblot*, e em seguida, foi realizada a sangria total.

Para a separação da fração do soro rica em imunoglobulinas, foi realizada a precipitação com sulfato de amônio 1,56M, pH 6.5. O soro foi diluído 1:2 em PBS, e colocado em banho de gelo sobre um agitador magnético, adicionando-se o mesmo volume de sulfato de amônio saturado gota a gota. Esse soro foi incubado a 4°C *overnight*. Após esse tempo, o sedimento formado foi ressuscitado e posteriormente centrifugado a 850g por 30 minutos a 4°C. Em seguida, o sobrenadante foi guardado para nova precipitação, e o sedimento formado foi ressuscitado em sulfato de amônio 40%, e novamente centrifugado. Após centrifugação, o sobrenadante formado foi descartado e o sedimento foi ressuscitado em PBS na metade do volume do soro, e dialisado em PBS *overnight* a 4°C. O título do soro foi novamente avaliado por *imunoblot*, aliquoteado e estocado a -70°C.

3.5.2. Soro policlonal anti-54 kDa de *P. brasiliensis*

Para a produção de soro policlonal anti-54 kDa de *P. brasiliensis*, foram realizadas oito inoculações intradermicamente intercaladas a cada 4 dias em coelhos machos albino provenientes do Biotério Central da UNESP-Botucatu com géis de SDS-PAGE contendo a banda de 54 kDa *P. brasiliensis* provenientes dos extratos *cell-free* do isolado 18, antes e depois do

reisolamento, cultivados em meio sólido contendo 5% de sangue de carneiro. A primeira suspensão foi emulsificada com adjuvante completo de Freund e nas seguintes com o adjuvante incompleto de Freund. Decorridos 15 dias da última inoculação foi realizada uma sangria de prova e a avaliação do título de anticorpos produzidos foi feita através da técnica de *imunoblot*, e em seguida, foi realizada a sangria total. A separação da fração do soro rica em imunoglobulinas foi realizada como descrito no item 3.5.1.

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

Os componentes protéicos dos extratos foram separados por SDS-PAGE, segundo Laemmli (1970) e Studier (1973).

A separação dos componentes foi efetuada em gel de corrida a 10%, e em gel de empilhamento a 5% de acrilamida. O gel foi preparado a partir de uma solução estoque contendo 30% por peso de acrilamida e 0,8% por peso de bis-acrilamida. No gel de separação a polimerização foi feita em solução contendo 1,5M de Tris-ácido clorídrico (HCl), pH 8.8 e 0,4% de SDS, em presença de 0,1% v/v de N,N,N',N'-tetrametil-etilenodiamina (TEMED) e 0,1% de persulfato de amônio (APS). O gel de empilhamento foi polimerizado em presença de 0,5M de Tris-HCl pH 6.8 e 0,4% de SDS, além de 0,1% de persulfato de amônio e 0,05% v/v de TEMED. Para o preparo da amostra foram utilizados 64 μ L de antígeno diluído em tampão de amostra (1:5), consistindo de 62,5mM de Tris-HCl [tris (hidroxi-metil) aminometano] pH 6.8, 2% de SDS, 10%

de glicerol, 0,5M de ditioneitol e 0,002% de azul de bromofenol. As proteínas foram dissociadas pelo aquecimento da amostra em banho-maria com água fervente por 3 minutos.

Paralelamente à amostra, em cada corrida eletroforética, uma mistura de proteínas de peso molecular conhecido foi utilizada, a saber, fosforilase b (94 kDa), albumina bovina (67 kDa), ovoalbumina (43 kDa), anidrase carbônica (30 Da), inibidor de tripsina (20 kDa) e lacto-albumina (14 kDa). A partir da análise da migração destes padrões, os pesos moleculares das proteínas antigênicas foram calculados.

A corrida eletroforética foi realizada a 10mA (80V) até que o corante penetrasse no gel de separação e a 20mA (120V) até que atingisse o fim do gel. O tampão de corrida é constituído de Tris 0,075M, glicina 0,57M e SDS 0,1%, pH 8.3.

3.6.1. Coloração dos géis pelo nitrato de prata

Esta coloração foi utilizada segundo o método descrito por Nielsen e Brown (1984) para o gel de poliacrilamida acrescido de dodecil sulfato de sódio. Após a corrida eletroforética, para a fixação do gel foi utilizada uma solução de ácido tricloroacético a 10% por 30 minutos a 4°C. Em seguida, foram feitas três lavagens de 10 minutos cada, com solução de 10% de etanol mais 5% de ácido acético. A solução oxidante, consistindo de 0,0034M de dicromato de potássio e 0,0032N de ácido cítrico, foi adicionada e mantida por 5 minutos. A seguir esta solução foi retirada e o gel foi lavado duas vezes por

cinco minutos cada com água Milli-Q. Em seguida, foi adicionada uma solução de nitrato de prata 0,012M e incubada por 20 minutos no escuro. Nova lavagem foi realizada com água Milli-Q por 1 minuto, e foi adicionada a solução redutora consistindo de 0,28M de carbonato de sódio e 0,0185% de formaldeído. Após o desenvolvimento da cor, a coloração foi bloqueada com solução de ácido acético a 5%, e o gel mantido nessa solução até a documentação.

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

3.6.2. *Imunoblot*

Os extratos *cell-free* do isolado 18 de *P. brasiliensis* (antes e depois do reisolamento e dos meios: sólido e líquido com e sem 5% sangue de carneiro) foram submetidos à SDS-PAGE e transferidos eletroforéticamente do gel para membranas de nitrocelulose conforme descrito por Towbin et al. (1979). Após a eletroforese, os géis foram apostos sobre membranas de nitrocelulose, recobertos com papel de filtro e comprimidos com esponjas de poliuretano. Todos os materiais foram previamente embebidos em tampão de transferência bicarbonato de sódio e metanol, pH 9.9, e em seguida, encaixados em placas

acrílicas perfuradas e mergulhados na câmara de eletroforese contendo o mesmo tampão. A transferência foi feita *overnight* à amperagem constante de 0,4mA. A membrana então foi corada por Ponceau S (0,5% p/v em 5% v/v de ácido acético) para a localização das bandas protéicas transferidas. Após lavagem de 15 minutos, as membranas de nitrocelulose contendo os antígenos foram cortadas em tiras, incubadas com solução bloqueadora (5% de leite desnatado em PBS) por 4 horas. Os soros adequados foram diluídos, colocados sobre as tiras e deixados em contato, sob agitação, *overnight* em temperatura ambiente. Como controles positivos foram utilizados soro anti-*cell-free* produzido em coelho e soro de paciente com paracoccidiodomicose diluídos 1:20, e como controle negativo soro normal de coelho e soro de indivíduo aparentemente normal também na diluição 1:20.

A seguir, as tiras foram lavadas com PBS 0,01M pH 7.2 por três vezes, com trocas a cada 10 minutos, para a retirada do excesso do soro. Então foram incubadas por 2 horas com conjugado imuno-enzimático, soro anti-IgG de coelho (SIGMA-A0545) e anti-IgG humano (SIGMA-0293) marcado com peroxidase e na diluição 1:1000. O excesso de conjugado foi retirado com novo ciclo de lavagens. As tiras foram reveladas para evidenciação dos complexos antígeno-anticorpo formados com o substrato cromógeno, consistindo de 0,012g de diaminobenzidina (DAB-SIGMA-D5637) diluída em 20mL de PBS acrescido de 200 μ L de água oxigenada. A reação foi bloqueada com água destilada.

3.7. Análise protéica por eletroforese bidimensional

A proteína purificada e os componentes do isolado 18 de *P. brasiliensis* antes e depois do reisolamento, cultivados em meios de Fava Netto e em caldos BHI acrescidos de 5% de sangue de carneiro foram submetidos à focalização isoelétrica, para a separação das proteínas de acordo com seu pI (ponto isoelétrico), como descrito por O'Farrel (1975). Assim, 500µg/mL de extratos protéicos foram tratados com tampão de amostra contendo uréia 9,5M, anfolinas 5.0-8.0 1.6% (v/v), anfolinas 3.5–10.0 0.4% (v/v), nonidet P40 (10%) 2% (v/v), β-mercaptoetanol 5% (v/v) e aplicados em cada tubo contendo o gel (uréia 0,625g; Nonidet P40 (10%) 250µL; acrilamida-bisacrilamida (30%) 162µL; anfolines 3,5-10 125µL; água Milli-Q 500µL; APS 5µL; TEMED 3µL por tubo), em seguida, foi acrescentado sobre as amostras 20µL de solução K (uréia 9M; anfolinas 5-8 0,8%; anfolines 3,5-10 0,2%; nonidet P40 (10%) 1%; verde de metila 20µL). No tubo padrão foi aplicado apenas a solução K. A corrida foi realizada a 400V por 5 horas, após esse tempo a 100V *overnight*. O tampão ácido (pólo positivo) utilizado foi H₃PO₄ (ácido fosfórico) 0,01M e como básico (pólo negativo) NaOH (hidróxido de sódio) 0,02M. Após a corrida os géis foram tratados por 40 minutos com tampão desnaturante contendo Tris-HCl 1M pH 6.8, β-mercaptoetanol 100% (v/v), dodecil-sulfato de sódio (SDS) 10% (v/v), glicerol 100% (v/v), azul de bromofenol 1% (m/vol). Após esse tempo, o tampão de desnaturação foi retirado, e as amostras foram armazenadas a –20°C até a realização da segunda dimensão. O gel padrão foi cortado em pedaços de 1cm, e cada pedaço foi colocado num orifício de uma placa de 24 poços contendo 2mL de água Milli-Q e incubado *overnight* a 4°C. Após o tempo, o pH

de cada orifício (pedaço do gel) foi medido, constituindo o padrão de pH da corrida.

A segunda dimensão foi realizada em gel de poliacrilamida num gradiente de 5–15% de acordo com Laemmli (1970) (item 3.4) para a separação das proteínas de acordo com a massa molecular. Os géis foram corados com Coomassie Azul Brilhante G-250, segundo Neuhoff et al. (1988).

3.8. Marcação dos extratos *cell-free* de *P. brasiliensis* com biotina

Os extratos *cell-free* do isolado 18 de *P. brasiliensis* antes do reisolamento, cultivado em meios sólido e líquido com e sem 5% sangue de carneiro foram submetidos à biotinição, utilizando o *kit ECL protein biotinylation module* (AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH-RPN2002) e incubados com a monocamada de células A549 a 36,5 °C *overnight*. Decorrido este tempo foram feitas lavagens com PBS estéril para retirar as proteínas que não se ligaram à superfície das células. Em seguida, foi adicionado em cada monocamada de células 1mL de água Milli-Q estéril e feita incubação por 4 horas a 25°C para lise total das células. Os sobrenadantes obtidos destas células foram avaliados por SDS-PAGE, e posteriormente transferidos para membrana de nitrocelulose. A revelação foi feita utilizando o *kit Catalyzed Signal Amplification (CSA) System* (DAKO).

Como controle negativo desta reação foram utilizadas células A549 que não foram incubadas com as proteínas biotiniladas, mas foram lisadas e os respectivos sobrenadantes avaliados.

3.9. Fracionamento de proteínas ligantes de fibronectina de *P. brasiliensis*

O preparado *cell-free* da amostra 18 antes do reisolamento em animal cultivada em meio líquido com 5% sangue de carneiro foi utilizada para a obtenção dos ligantes de fibronectina. Para tanto, foi empregada a técnica de cromatografia de afinidade em gelatina sepharose 4B (BIORAD) para obtenção de proteínas ligantes de fibronectina presente neste preparado (KLOTZ et al., 1993; KLOTZ et al., 1994).

As colunas foram equilibradas e zeradas pelas análises das absorbâncias em 280nm com PBS pH 7,4, 0,01M e, em seguida, foram aplicados 2,0mL dos extratos *cell-free* em cada coluna, já avaliados por SDS-PAGE e *imunoblot*, e incubados sob agitação *overnight*. Após remoção das amostras, as colunas foram novamente zeradas com PBS pH 7,4, 0,01M. A eluição foi feita com tampão acetato de sódio 0,05M e brometo de sódio 1M pH 5,0, e alíquotas de 2,0mL coletadas e analisadas pela absorbância a 280nm e reunidas em *pool* de acordo com os picos obtidos para serem concentrados em polietilenoglicol e dialisados. A avaliação das amostras protéicas semi-purificadas foi efetuada por SDS-PAGE e *imunoblot*.

3.10. Caracterização de proteínas de *P. brasiliensis* como ligantes de proteínas da matriz extracelular por *imunoblot*

Para caracterizar proteínas envolvidas na interação *P. brasiliensis*-matriz extracelular foi realizada a técnica de *imunoblot* utilizando laminina (GIBCO-230170-015), fibronectina (GIBCO-33016-015), colágenos tipo I (SIGMA-C7661) e IV (SIGMA-C5533) e anticorpos primários monoclonais anti-fibronectina (DAKO-A0245), anti-laminina (DAKO-Z0097), anti-colágeno tipo I (SIGMA-C2456) e IV (SIGMA-C1926).

As proteínas semipurificadas e os extratos *cell-free* do isolado 18 de *P. brasiliensis* antes do reisolamento e quando cultivado em meios sólido e líquido com e sem 5% sangue de carneiro, e após o reisolamento em ratos, foram submetidas à corrida eletroforética em gel de poliacrilamida. Após as transferências eletroforéticas para as membranas de nitrocelulose, os *blots* foram incubados com tampão de bloqueio (leite desnatado 5% em PBS) por 4 horas a temperatura ambiente sob agitação. Em seguida, foram realizadas três lavagens de 10 minutos cada com tampão PBS acrescido de Tween 20 a 0,05% (PBS-T), e as tiras de nitrocelulose foram incubadas com proteínas da matriz extracelular: laminina e fibronectina, na concentração de 80µg/mL, colágenos tipo I e IV, na concentração de 70µg/mL, diluídos em PBS-T e incubados *overnight* à temperatura ambiente sob agitação. Decorrido este tempo, os *blots* foram lavados três vezes por 10 minutos com PBS-T, e foram incubados *overnight* com soro anti-laminina, anti-fibronectina, anti-colágeno tipo I e anti-colágeno tipo IV diluídos 1:100 em PBS-T contendo leite desnatado 3%. No dia seguinte, os *blots* foram lavados por mais três vezes de 10 minutos

cada com PBS-T e incubados por 2 horas com conjugado anti-IgG de coelho marcado com peroxidase e anti-IgG de camundongo marcado com peroxidase (SIGMA-A3682) no título de 1:1000 diluído em PBS-T contendo leite desnatado 3%. Após, outra série de lavagens, foi realizada a revelação com DAB 0,015g, 200 μ L de peróxido de hidrogênio diluído em 20mL de PBS.

Como controles foram utilizados *blots* incubados somente com os anticorpos primários, omitindo-se a etapa de incubação com as proteínas da matriz extracelular, uma tira de *blot* com soro de paciente com paracoccidiodomicose diluído 1:40 e uma tira com soro policlonal de coelho anti-*cell free* diluídos em PBS-T contendo leite desnatado 3%.

3.11. Purificação da proteína de 54 kDa por eletroeluição

Entre os vários componentes, optou-se em purificar a proteína de 54 kDa, pela técnica de eletroeluição segundo Neophytou et al. (1996) e Sá-Pereira et al. (2000).

Para cada eletroeluição, os extratos *cell-free* bruto dos isolados 18a e 18b cultivados em meios sólido e líquido acrescidos de 5% de sangue de carneiro foram submetidos à eletroforese com gel de poliacrilamida a 10%. Após corrida, os géis foram corados com Coomassie Azul Brilhante G-250, segundo Neuhoff et al. (1988), e a banda de 54 kDa foi removida e eletroeluída em tampão glicina (Glicina 72g/L; Tris base 15g/L, pH 8,3) em membrana de diálise a 35mA, *overnight* a 4°C. A fração eletroeluída foi concentrada em polietilenoglicol e dialisada em PBS *overnight* a 4°C. Para a verificação da

fração de 54 kDa eletroeluída, a mesma foi submetida à focalização isoelétrica, para a separação da proteína de acordo com seu pI, e assim confirmada a purificação da proteína de interesse.

3.12. Preparo do anticorpo monoclonal (AcMo)

3.12.1. Animais

Os camundongos machos BALB/c utilizados neste estudo para a produção de hibridomas por fusão dos linfócitos foram adquiridos do biotério da UNICAMP.

3.12.2. Imunização de camundongos BALB/c e produção de anticorpo monoclonal anti-adesina de *P. brasiliensis* ligante de fibronectina

Para a produção de anticorpo monoclonal anti-adesina de *P. brasiliensis*, ligante de fibronectina, camundongos machos (BALB/c) foram imunizados via sub-plantar, com adesina purificada na concentração de 10µg/mL por pata a cada quinze dias, emulsificada com adjuvante completo de Freund (v/v) na primeira inoculação, e com adjuvante incompleto de Freund (v/v) nas outras inoculações restantes. Antes de cada imunização, sangria de prova foi realizada e através da técnica ELISA direto previamente padronizada, foi verificada a resposta imunológica dos camundongos. Os que apresentaram uma resposta elevada contra adesina foram selecionados para a fusão celular.

3.12.3. Obtenção das células esplênicas e de linfonodo poplíteo

Foram utilizados dois camundongos com elevada resposta contra a adesina para cada fusão celular. Três dias antes da fusão celular, que correspondeu a dois dias após ter sido realizada a última sangria de prova, foi dado o reforço contendo a mesma dose (10µg/mL por pata) em solução salina. Os linfonodos poplíteos e os baços dos camundongos imunizados foram retirados assepticamente, e macerados com bastão de vidro sobre peneira metálica de malha fina com meio de cultura RPMI⁻, preparado com RPMI 1640 (GIBCO-11875093, BRL, Grand Island, NY, USA) suplementado com L-glutamina (GIBCO-25030081) a 1%, piruvato de sódio (GIBCO-11360070) a 2%, MEM não essenciais (GIBCO-11140050) a 1%, gentamicina (GIBCO-15710064) a 0,1% e HEPES (GIBCO-15630080) a 1,5%. Os linfócitos dos linfonodos e as células esplênicas foram reservados para a técnica de fusão celular.

3.12.4. Cultivo das células de mieloma

Cinco dias antes da fusão celular, as células de mielomas SP2-0 foram retiradas do tanque de nitrogênio líquido e rapidamente descongeladas a 37°C, sendo transferidas em seguida para um tubo cônico contendo 15mL de meio RPMI⁺, que corresponde ao RPMI⁻ acrescido de SFB a 10% (GIBCO-12657029). As células foram centrifugadas a 800g durante 5 minutos a temperatura ambiente, e em seguida, transferidas para uma garrafa de 25cm²

e expandidas para garrafas de 250cm² contendo meio RPMI⁺. As garrafas foram incubadas a 37°C em estufa de CO₂ a 5%, e expandidas de modo logarítmico de crescimento um dia antes da fusão (acertando a concentração para 5 X 10⁴ células/mL).

3.12.5. Preparo do *Feeder layer*

Um dia antes da fusão celular foi obtido o *feeder layer*. Para a produção foi injetado 5 mL de RPMI⁺ no peritônio de um camundongo, e o abdome do mesmo foi massageado por alguns minutos, e em seguida, o lavado peritoneal foi aspirado com auxílio de uma seringa. Então este lavado peritoneal foi diluído em 45mL do mesmo meio e distribuído em placas de cultura estéreis de 96 cavidades, e incubadas a 37°C em estufa de CO₂ a 5%.

3.12.6. Obtenção dos hibridomas (Fusão Celular)

A fusão celular foi realizada de acordo com Köhler e Milstein (1975), com algumas modificações (ESPINDOLA et al., 2002). Os linfócitos, as células esplênicas e as células mielomatosas foram lavadas separadamente em RPMI⁻ por centrifugação durante 5 minutos a 800g. Os sobrenadantes foram descartados e adicionados 10mL do mesmo meio, tanto nos linfócitos como nas células esplênicas e de mieloma. A contagem das células e sua viabilidade foi feita em câmara de Neubauer numa diluição 1:2 em azul de tripan (GIBCO-

15250061) a 0,1%. As células foram misturadas na proporção 2:1 ou 1:1 (linfonodo/mieloma) e na proporção 8:1 ou 4:1 (células esplênicas/mieloma) e após centrifugação foi realizada a fusão celular com o *pellet* utilizando uma solução, previamente autoclavada de 0,5g de polietilenoglicol (Merck, Darmstadt, Alemanha), diluído em 0,7mL de PBS contendo 50 μ L de DMSO (SIGMA-D5879) gota a gota, por 1 minuto a 37°C. Na seqüência as células foram mantidas em repouso por 1,5 minutos a 37°C, e foi adicionado 1mL de RPMI⁻, gota a gota por 1 minuto a 37°C, e mais 20mL do RPMI⁻, gota a gota por 4 minutos a 37°C. Em seguida foram centrifugadas e ressuspendidas em meio RPMI⁺, contendo hipoxantina, aminopterina e timidina (HAT) (GIBCO-21060017) a 3% na proporção de 1 X 10⁶ células/mL de meio. Após 2 horas de incubação a 37°C, as células foram distribuídas em volume de 200 μ L/orifício em placas contendo o *feeder layer*, e mantidas a 37°C em estufa de CO₂ a 5%.

A primeira troca do meio foi realizada após 3 dias, e as subseqüentes a cada 2 dias, e após 1 semana, o HAT foi substituído por hipoxantina e timidina (HT) (GIBCO-11067030) a 2% e mantido por mais 2 semanas, quando passou a ser utilizado RPMI⁺. A seleção dos hibridomas por ELISA foi iniciada dez dias após a fusão celular, quando os hibridomas apresentaram bom crescimento celular (ocupando 1/3 do poço). Para a seleção dos hibridomas foi realizada a técnica de ELISA feito com a adesina de 54kDa purificada e também DOT-ELISA. Para a seleção foi utilizado conjugado anti-IgG de camundongo pelo maior interesse em obter AcMo do isótipo IgG.

3.12.7. Clonagem dos hibridomas

Os hibridomas obtidos da fusão a partir de animais imunizados com a adesina de 54kDa purificada e que apresentaram reatividade por ELISA foram clonados por diluição limitante. Inicialmente, os hibridomas foram corados com o corante azul de tripan, e posteriormente contados. Na seqüência, as células foram diluídas em RPMI⁺, para que ficassem distribuídas na proporção de 1 célula por poço de placas de 96 cavidades. No dia seguinte, os hibridomas foram observados em microscópio e foram selecionados apenas os poços que apresentaram uma célula. Uma camada de *feeder layer* foi adicionada para auxiliar o crescimento celular. Os testes de ELISA foram realizados quando as células clonadas atingiram um bom crescimento (aproximadamente 8 dias).

De cada hibridoma clonado, o poço que apresentou maior densidade óptica por ELISA foi selecionado para ser reclonado, e esta segunda clonagem foi calculada de modo que as células ficassem distribuídas na proporção 0,5 célula/poço nas placas de 96 cavidades.

3.12.8. Avaliação de anticorpo monoclonal anti-adesina de *P. brasiliensis* por ELISA direto

A avaliação do anticorpo monoclonal anti-adesina de 54 kDa de *P. brasiliensis* foi feita por ELISA direto frente adesina de 54 kDa de *P. brasiliensis* purificada, além dos testes de caracterização.

Para a realização do teste ELISA direto, placas com fundo chato da marca CORNING de 96 poços, foram sensibilizadas com 100µL em cada orifício da adesina diluída em tampão carbonato-bicarbonato 0,2M pH 9,6, e incubada por 2 horas a 37°C em câmara úmida e depois *overnight* a 4°C. Após incubação, as placas foram lavadas 3 vezes com PBS-T, e em seguida, seus sítios livres foram bloqueados com 200µL/orifício de PBS-T-5% leite desnatado e incubadas por 1 hora e meia a 37°C em câmara úmida. Após 3 lavagens com PBS-T, 100µL de soro de camundongos contendo anticorpo monoclonal anti-adesina e de controle negativo (soro de camundongo não imunizado – diluição 1:20) e positivo (soro de coelho anti-*cell free* de *P. brasiliensis* – diluição 1:100) diluídos em PBS-T-1% leite desnatado foram adicionados em cada orifício e incubadas por 2 horas a 37°C em câmara úmida. Após lavagens das placas, foram adicionados 100µL/orifício de conjugado IgG anti-camundongo marcado com peroxidase diluído 1:1000 em PBS-T-1% leite desnatado e incubadas por mais 2 horas a 37°C em câmara úmida. Após lavagens, foi adicionado nas placas 100µL/orifício de substrato da peroxidase constituído de 5mg de o-fenilenodiamino (SIGMA-P9029), 5mL de tampão citrato-fosfato 0,1M e 5µL de água oxigenada 30% e, incubadas por 15 minutos a 37°C. A reação enzimática foi interrompida pela adição de 50µL/orifício de ácido sulfúrico 4N. As densidades óticas foram medidas em leitor automático de ELISA em comprimento de onda de 492nm.

3.12.9. Avaliação de anticorpo monoclonal anti-adesina de *P. brasiliensis* por DOT-ELISA

Os extratos *cell-free* do isolado 18 de *P. brasiliensis* (antes e depois do reisolamento e dos meios: sólido e líquido com e sem 5% sangue de carneiro) foram submetidos à SDS-PAGE e transferidos eletroforéticamente do gel para membranas de nitrocelulose conforme descrito por Towbin et al. (1979). Após a eletroforese, os géis foram apostos sobre membranas de nitrocelulose, recobertos com papel de filtro e comprimidos com esponjas de poliuretano. Todos os materiais foram previamente embebidos em tampão de transferência bicarbonato de sódio e metanol, pH 9.9, e em seguida, encaixados em placas acrílicas perfuradas e mergulhados na câmara de eletroforese contendo o mesmo tampão. A transferência foi feita *overnight* à amperagem constante de 0,4mA. A membrana então foi corada por Ponceau S (0,5% p/v em 5% v/v de ácido acético) para a localização da banda protéica de 54 kDa e após lavagem de 15 minutos, as membranas de nitrocelulose contendo a banda protéica de 54 kDa foram cortadas em pequenas tiras, colocadas em cada poço de placas com fundo chato da marca CORNING de 96 poços e incubadas com solução bloqueadora (5% de leite desnatado em PBS) por 4 horas. Os sobrenadantes dos hibridomas escolhidos (com crescimento adequado) foram colocados sobre as pequenas tiras e deixados em contato, sob agitação, *overnight* em temperatura ambiente. Como controles positivos foram utilizados soro anti-*cell-free* produzido em coelho diluído 1:100 e soro anti-*cell-free* produzido em camundongo diluído 1:20, e como controle negativo soro normal de camundongo diluído 1:20.

A seguir, os poços contendo as tiras foram lavados com PBS 0.01M pH 7.2 por três vezes, com trocas a cada 10 minutos, para a retirada do excesso dos sobrenadantes e soros. Então foram incubadas por 2 horas com conjugado imuno-enzimático, soro anti-IgG de camundongo marcado com peroxidase na diluição 1:200 e soro anti-IgG de coelho na diluição 1:1000. O excesso de conjugado foi retirado com novo ciclo de lavagens. Os poços foram revelados para evidenciação do complexo antígeno-anticorpo formado com o substrato cromógeno, consistindo de 0,012g de DAB diluída em 20mL de PBS acrescido de 200µL de água oxigenada. A reação foi bloqueada com água destilada.

3.13. Análise estatística

Os ensaios de adesão foram feitos em duplicata e o número de células infectadas pelo fungo foi determinada por contagem total de cada lamínula, repetida por três vezes. A partir desses dados foi calculada a porcentagem total de cada infecção e os resultados foram expressos segundo os valores de média acrescidos do desvio padrão.

Os ensaios de infecção total e invasão foram feitos em triplicata, através da contagem de UFC e os resultados foram expressos segundo os valores de média acrescidos do desvio padrão.

A interpretação dos resultados da cinética da adesão entre o isolado 18 de *P. brasiliensis*, na fase leveduriforme (L) antes (18a) e depois (18b) da passagem em animal cultivados em meio de Fava Netto e o isolado 18a e 18b cultivados em meio sólido (ágar base) contendo 5% de sangue de carneiro foi

realizada pelo teste “t” de *student* (paramétrico) e o valor de $p < 0,05$ obtido foi considerado como significativo.

Os ensaios de inibição da interação de *P.brasiliensis* com anticorpos policlonais anti-54 kDa entre as amostras 18a e 18b cultivados em meio de Fava Netto e em meio sólido (ágar base) contendo 5% de sangue de carneiro foram feitos em duplicata e a contagem repetida por três vezes. A partir desses dados foram calculados os índices de adesão e invasão e as porcentagens de inibição e os resultados foram expressos segundo os valores da mediana acrescidos do desvio padrão.

A interpretação dos resultados do ensaio de inibição da interação de *P.brasiliensis* com anticorpos policlonais anti-54 kDa entre as amostras 18a e 18b cultivados em meio de Fava Netto e em meio sólido contendo 5% de sangue de carneiro foi realizada pelo teste “t” de *student* (não-paramétrico) e o valor de $p < 0,05$ obtido foi considerado como significativo.

4. RESULTADOS

4.1. Extratos de *P. brasiliensis*

4.1.1. Perfil eletroforético dos extratos *cell-free* de *P. brasiliensis*

Os extratos *cell-free* foram obtidos do isolado 18 de *P. brasiliensis*, na fase leveduriforme (L) antes (18a) e depois (18b) do reisolamento de animal. Posteriormente, estas amostras foram cultivadas em meio de Fava Netto, em meios sólido (ágar base) e líquido BHI contendo 5% de sangue de carneiro e em meios sólido e líquido sem sangue. O perfil eletroforético desses extratos mostrou bandas que variaram de 106 a 12 kDa, em geral.

Os extratos *cell-free* obtidos do isolado 18 de *P. brasiliensis* antes e depois do reisolamento do fungo em meio de Fava Netto apresentaram diferenças em relação à intensidade e ao número de bandas majoritárias. No extrato 18a, as bandas majoritárias foram de 84, 67, 54 e 43 kDa, enquanto que no 18b as bandas mais evidentes que predominaram foram as de 94, 84, 67, 54, 43, 41, 39, 37, 34, 30, 27, 20 e 16 kDa (Figura 1).

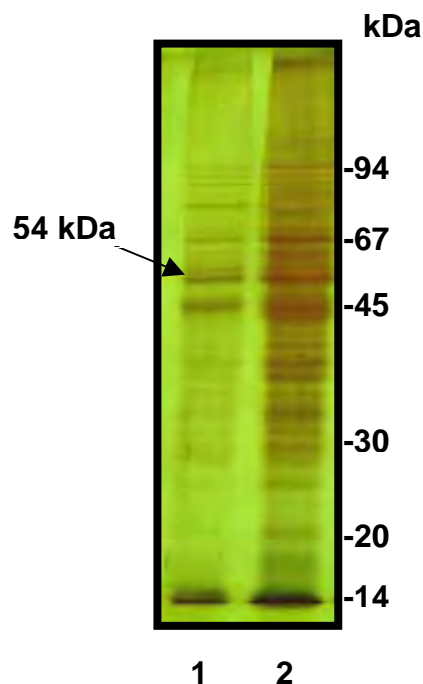


Figura 1: SDS-PAGE dos extratos *cell-free* de *P. brasiliensis* isolado 18 antes do reisolamento (1) e depois do reisolamento (2) cultivados em meio de Fava Netto.

O extrato da amostra 18a cultivada em meios acrescidos de sangue de carneiro 5% (Figura 2 – canaletas 1, 2, 3 e 4) apresentou diferenças em relação à intensidade e ao número de bandas majoritárias e as massas moleculares mais evidentes foram 100, 76, 67, 54 e 30 kDa, demonstrando maior expressão de algumas proteínas, quando comparado as amostras 18a e 18b cultivadas apenas em meio de Fava Netto e sem sangue. Quando a amostra 18b foi cultivada em meios acrescidos de sangue de carneiro (Figura 2 – canaletas 5, 6, 7, 8 e 9), o seu extrato apresentou bandas semelhantes ao 18a também cultivado em meio com sangue, e as massas moleculares mais evidentes foram 76, 67, 54 e 30 kDa, demonstrando assim que a adição de sangue de carneiro aos meios de cultivo para *P. brasiliensis* induzem maior expressão de proteínas. As bandas de 54 kDa e a de 30 kDa foram mais

evidentes em meios com sangue de carneiro (Figura 2). Assim, passou-se a verificar a expressão desta proteína em outros isolados, desde que a de 30 kDa já foi isolada e caracterizada como adesina, por nosso grupo.

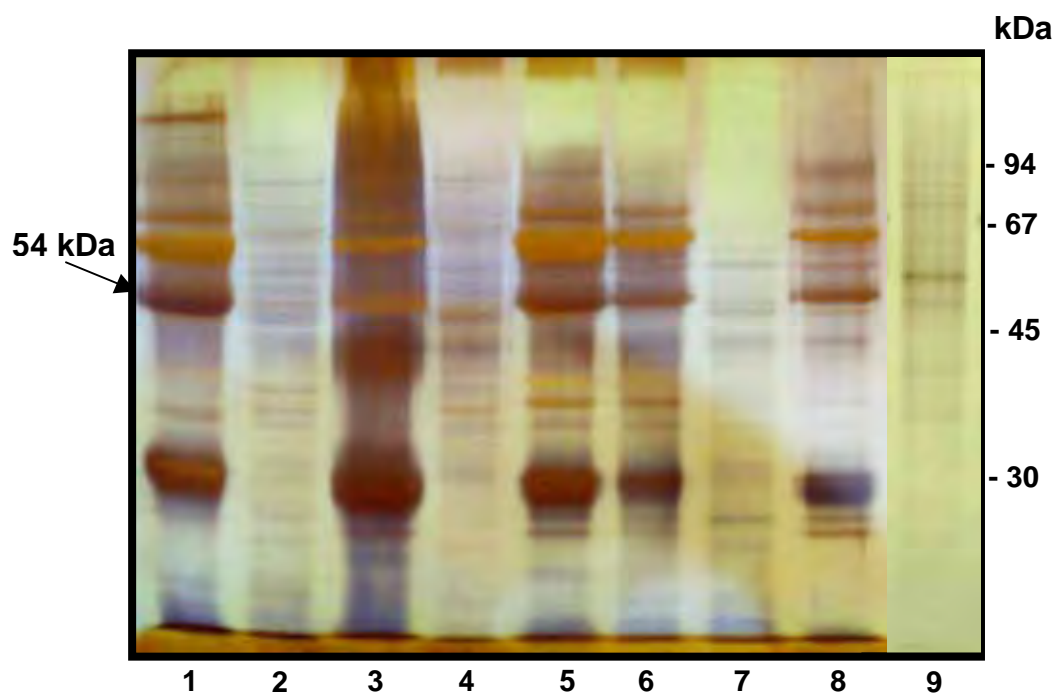


Figura 2: SDS-PAGE dos extratos *cell-free* de *P. brasiliensis* do isolado 18 antes (18a) e depois do reisolamento (18b) cultivados em meios sólidos e líquidos acrescidos e não de sangue de carneiro a 5%, corado pelo nitrato de prata. Extrato de *P. brasiliensis* da amostra 18a: (1) cultivada em meio sólido acrescido de sangue de carneiro 5%; (2) em meio sólido sem sangue de carneiro 5%; (3) em meio líquido acrescido de sangue de carneiro 5%; (4) em meio líquido sem sangue de carneiro 5%. Extrato de *P. brasiliensis* da amostra 18b: (5) cultivada em meio sólido acrescido de sangue de carneiro 10%; (6) em meio sólido com sangue de carneiro 5%; (7) em meio sólido sem sangue de carneiro; (8) em meio líquido acrescido de sangue de carneiro 5%; (9) em meio líquido sem sangue de carneiro 5%.

Extratos *cell-free* dos isolados Pb113, Pb339, Pb2663-R3, Pb2681, PB01, Pb1934, na fase leveduriforme (L), foram inicialmente cultivados em meio de Fava Netto. Todos estes isolados apresentaram esta proteína como demonstrado na Figura 3.

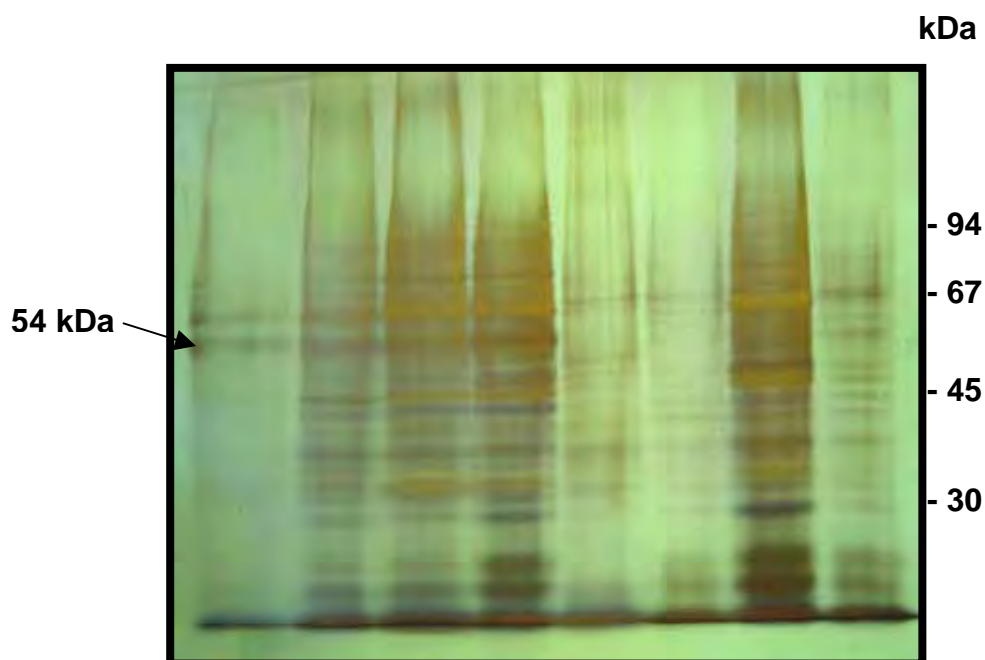


Figura 3: SDS-PAGE dos extratos *cell-free* de *P. brasiliensis* de diferentes isolados: Pb18 antes do reisolamento (1) e depois do reisolamento de animal (2); isolado 113 (3); isolado 339 (4); isolado 2663-R3 (5); isolado 2681 (6); isolado PB01 (7); isolado 1934 (8) cultivados em meio de Fava Netto.

Os isolados 113 e 339 de *P. brasiliensis* cultivados em meios acrescidos de sangue de carneiro 5% apresentaram semelhanças em relação à intensidade e ao número de bandas majoritárias, comparado ao isolado 18a cultivado em meio acrescido de sangue de carneiro 5%, e as massas

moleculares mais evidentes foram 76, 67, 54 e 30 kDa como demonstrado na Figura 4.

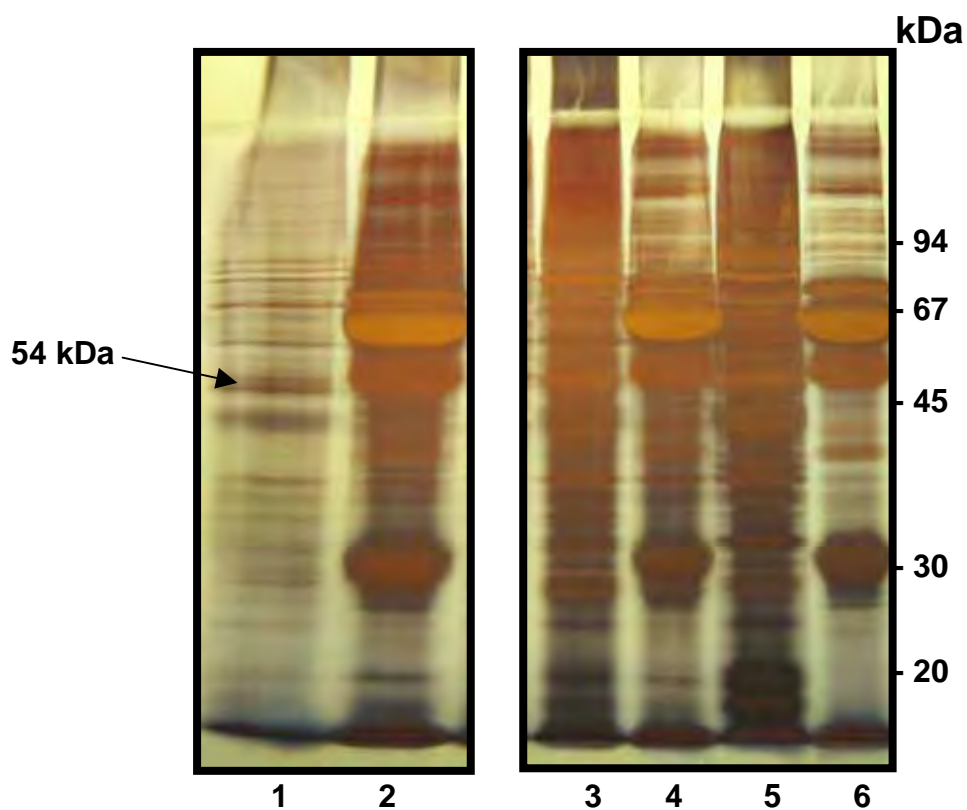


Figura 4: SDS-PAGE dos extratos *cell-free* de *P. brasiliensis*: isolado 18 antes do reisolamento cultivado em meio de Fava Netto (1); em meio acrescido de 5% de sangue de carneiro (2); isolado 113 em meio de Fava Netto (3); isolado 113 em meio acrescido de 5% de sangue de carneiro (4); isolado 339 em meio de Fava Netto (5); isolado 339 em meio acrescido de 5% de sangue de carneiro (6).

4.1.2. Análise protéica por eletroforese bidimensional de extratos *cell-free* de *P. brasiliensis*

Os extratos *cell-free* do isolado 18 antes e depois do reisolamento cultivados em meio de Fava Netto e em meios acrescidos de sangue de carneiro a 5% foram submetidos à eletroforese bidimensional para verificar a diferença de expressão de proteínas e seus respectivos pls (ponto isoelétrico).

O extrato *cell-free* do isolado 18a cultivado em meio de Fava Netto apresentou proteínas variando de 54 a 100 kDa e pls de 5,0 a 6,8. As proteínas mais expressas foram 54 kDa e pl 5,6; 58 kDa e pl 5,9; 60 kDa e pls 5,2 e 6,3; 67 kDa e pls 6,3 e 6,8; 70 kDa e pl 5,3; 86 kDa e pls 5,0 e 5,2; 88 kDa e pl 5,6; 94 kDa e pl 5,2 e 100 kDa e pl 5,2 como demonstrado na Figura 5.

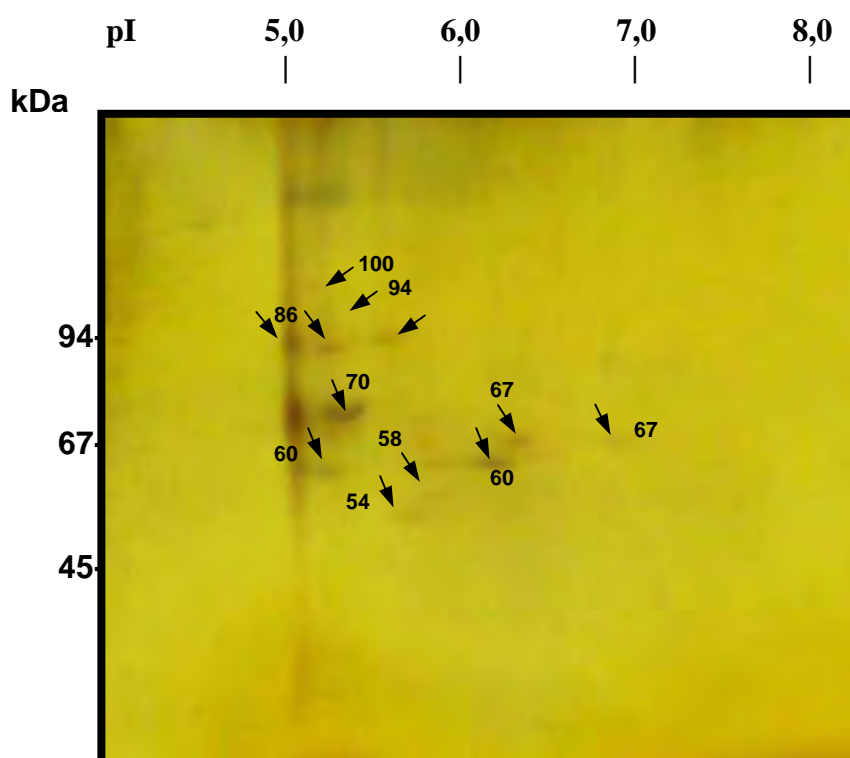


Figura 5: Eletroforese bidimensional do extrato *cell-free* do isolado 18, antes do reisolamento, cultivado em meio de Fava Netto, corada por nitrato de prata.

O extrato *cell-free* do isolado 18b cultivado em meio Fava Netto apresentou proteínas variando de 32 a 102 kDa e as proteínas mais expressas foram 32 kDa e pI 3,5; 45 kDa e pI 7,6; 54 kDa e pI 5,6; 60 kDa e pIs 6,3 e 7,5; 70 kDa e pI 5,3; 96 kDa e pI 5,3; 98 kDa e pI 5,5; 100 kDa e pI 5,2; 101 kDa e pI 5,3 e 102 kDa e pI 5,2 como demonstrado na Figura 6.

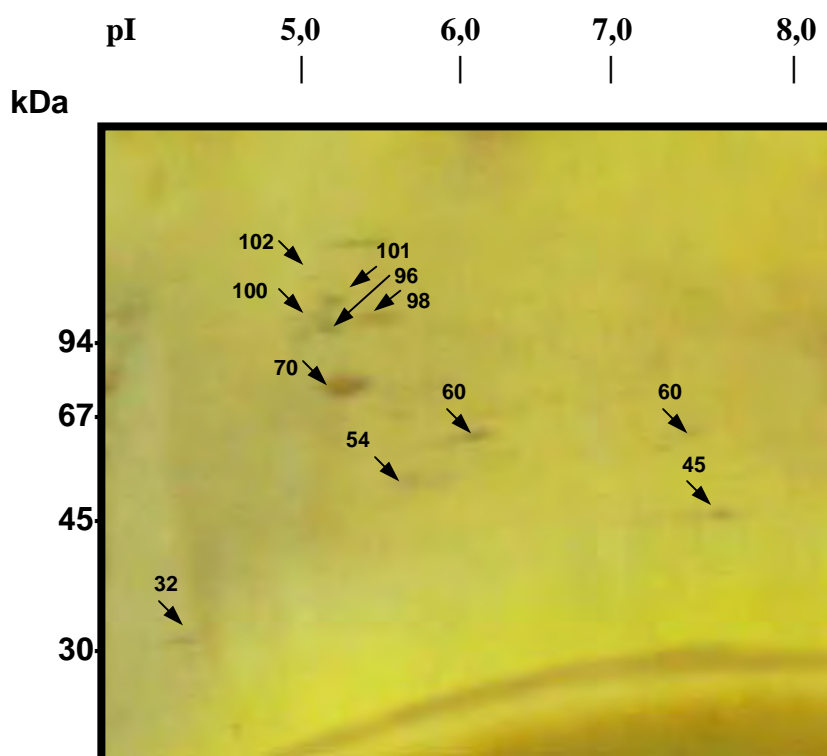


Figura 6: Eletroforese bidimensional do extrato *cell-free* do isolado 18b, depois do reisolamento, cultivado em meio de Fava Netto, corada por nitrato de prata.

Os extratos *cell-free* do isolado 18a e 18b cultivados em meios líquidos (BHI) acrescidos de sangue de carneiro a 5% apresentaram expressão de proteínas semelhantes, variando de 26 a 102 kDa e as proteínas mais expressas foram 26 kDa e pI 5,0; 32 kDa e pls 6,5 e 6,8; 34 kDa e pI 6,8; 50 kDa e pI 6,5; 54 kDa e pI 5,6; 56 kDa e pI 6,3; 60 kDa e pls 5,6; 5,8; 6,0; 6,3; 6,5 e 6,7; 67 kDa e pI 5,0; 70 kDa e pI 5,3; 86 kDa e pls 5,0; 6,2 e 6,5; 96 kDa e pI 5,1 e 98 kDa e pI 5,1 como demonstrado na Figura 7.

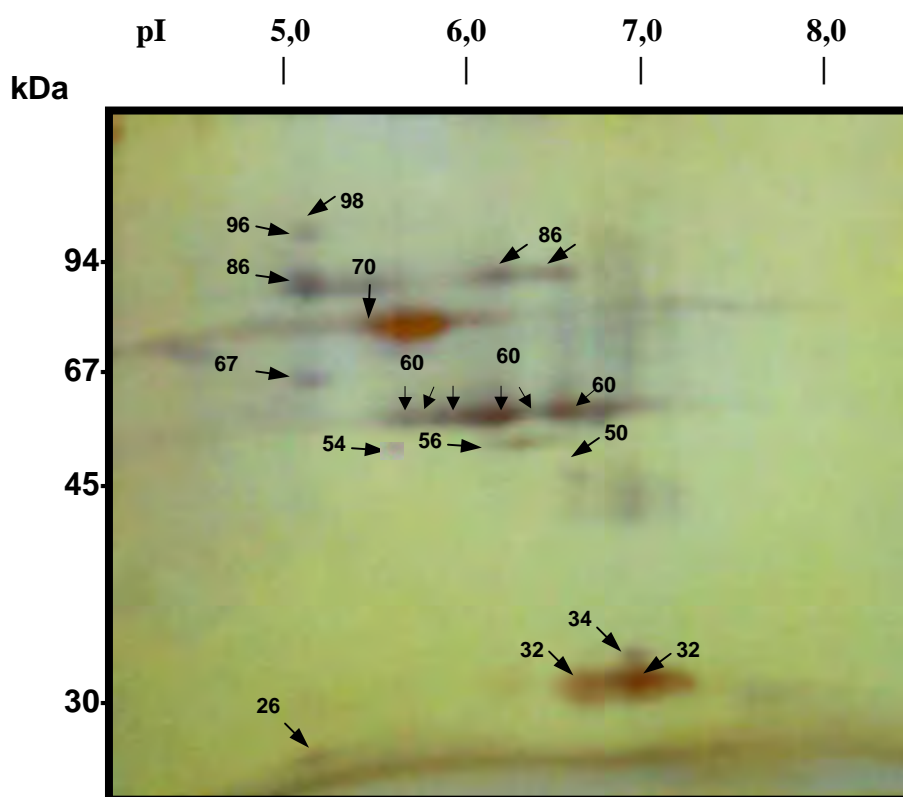


Figura 7: Eletroforese bidimensional do extrato *cell-free* do isolado 18b de *P.brasiliensis*, depois do reisolamento, cultivado em meio líquido (BHI) acrescido de sangue de carneiro a 5%, corada por nitrato de prata.

4.1.3. Titulação do soro anti-*cell-free* de *P. brasiliensis* por *imunoblot*

O soro anti-*cell-free*, obtido da inoculação das amostras 18a e 18b cultivadas em meio líquido BHI contendo 5% de sangue de carneiro, apresentou título de 1:800, sendo capaz de reconhecer 24 frações antigênicas que variaram de 86 a 14 kDa, e destas, oito frações antigênicas foram mais intensas com massas moleculares de 64, 54, 43, 34, 28, 22 e 16 kDa. Controle positivo foi feito com soro de paciente com paracoccidioidomicose (1:20) e controle negativo com soro de coelho normal (1:20). O resultado da reatividade do soro anti-*cell-free* de *P. brasiliensis* frente ao extrato *cell-free* do isolado 18a está demonstrado na Figura 8. Como pode ser observado, este anti-soro reagia contra a fração de 54 kDa, independente da amostra avaliada.

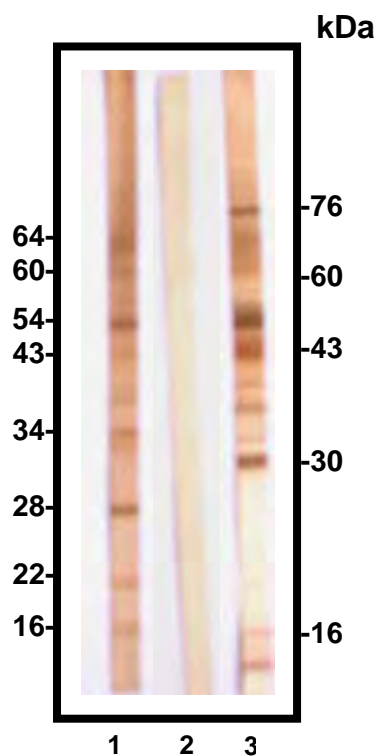


Figura 8: *Imunoblot* do soro anti-*cell-free* de *P. brasiliensis* frente aos antígenos do extrato *cell-free* do isolado 18 antes do reisolamento (1); controle negativo (2) e controle positivo (3).

4.1.4. Soro anti-proteína de 54 kDa de *P. brasiliensis* por *imunoblot*

O soro policlonal anti-proteína de 54 kDa, isolada das amostras 18a e 18b de *P. brasiliensis*, cultivadas em meio sólido contendo 5% de sangue de carneiro apresentou reatividade até diluição de 1:200 (dado não mostrado).

O resultado da reatividade do soro policlonal anti-proteína de 54 kDa de *P. brasiliensis* na diluição 1:20 frente sua proteína purificada e ao extrato *cell-free* misto das amostras 18a e 18b cultivadas em meio sólido contendo 5% de sangue está demonstrado na Figura 9.

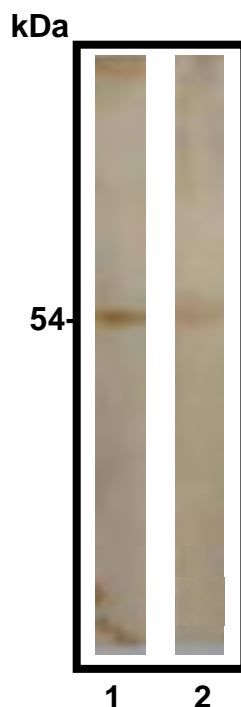


Figura 9: *Imunoblot* do soro policlonal anti-54 kDa de *P. brasiliensis* (diluição 1:20) frente a sua proteína purificada (1) e ao extrato *cell-free* misto das amostras 18a e 18b cultivadas em meio sólido contendo 5% de sangue (2).

4.2. Marcação com biotina dos extratos *cell-free* de *P. brasiliensis*

Para caracterizar as proteínas do extrato *cell-free* da amostra 18a (cultivada em meios sólido e líquido contendo 5% de sangue de carneiro) foi realizado o ensaio de ligação (*binding*). Aparentemente, houve diferença de apenas uma banda quando se cultivou em meio sólido. As proteínas com as respectivas massas moleculares de 67, 64, 60, 58 e 54 kDa demonstraram que possuem características de adesina (Figura 10A e 10B).

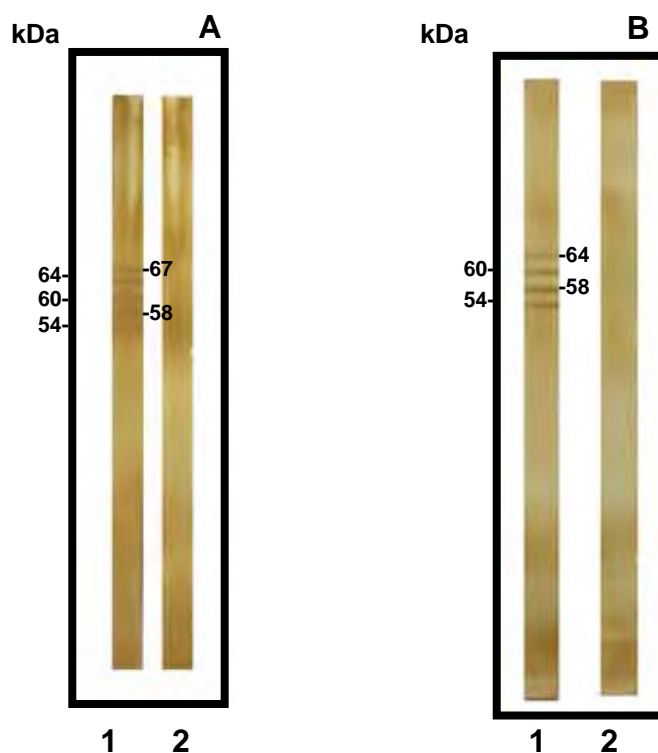


Figura 10: A: Caracterização como adesina das proteínas do extrato *cell-free* da amostra 18a cultivada em meio sólido contendo 5% de sangue de carneiro, utilizando a reação de afinidade biotina-streptavidina em membrana de nitrocelulose. **(1A)** Células lisadas tratadas com as proteínas *cell-free* biotiniladas da amostra 18a cultivada em meio sólido contendo 5% de sangue de carneiro; **(2A)** controle negativo: células lisadas sem adição do extrato *cell-free*. **B:** Proteínas *cell-free* da amostra 18a cultivada em meio líquido contendo 5% de sangue de carneiro. **(1B)** Células lisadas tratadas com as proteínas *cell-free* biotiniladas da amostra 18a cultivado em meio líquido contendo 5% de sangue de carneiro; **(2B)** controle negativo: células lisadas sem adição do extrato *cell-free*.

4.3. Fracionamento de proteínas ligantes de fibronectina de *P. brasiliensis* e caracterização dos pls por eletroforese bidimensional

Os extratos *cell-free* da amostra 18a, cultivadas em meio líquido BHI com 5% sangue de carneiro foi fracionada em coluna gelatina sepharose 4B (BIORAD) para obtenção de ligantes de fibronectina. As frações semi-purificadas que apresentaram valores de absorbância a 280nm foram avaliadas por SDS-PAGE e as massa moleculares mais evidentes foram 60, 58 e 54 kDa (dado não mostrado). Essas frações foram também avaliadas por *imunoblot* frente ao soro anti-*cell-free* produzido em coelho e maior reatividade foi observada para as bandas de 60, 58 e 54 kDa (dado não mostrado).

A fração semi-purificada do extrato *cell-free* da amostra 18a (cultivada em meio líquido BHI acrescido de sangue de carneiro a 5%), obtida em coluna gelatina sepharose 4B (BIORAD), foi avaliada por eletroforese bidimensional demonstrando presença marcante de proteínas com massa molecular de 60 kDa e pl de 6,3; 58 kDa e pl de 5,9; e 54 kDa com pl de 5,6 (Figura 11). Em vista deste resultado passou-se a usar para sua caracterização extrato da amostra 18a.

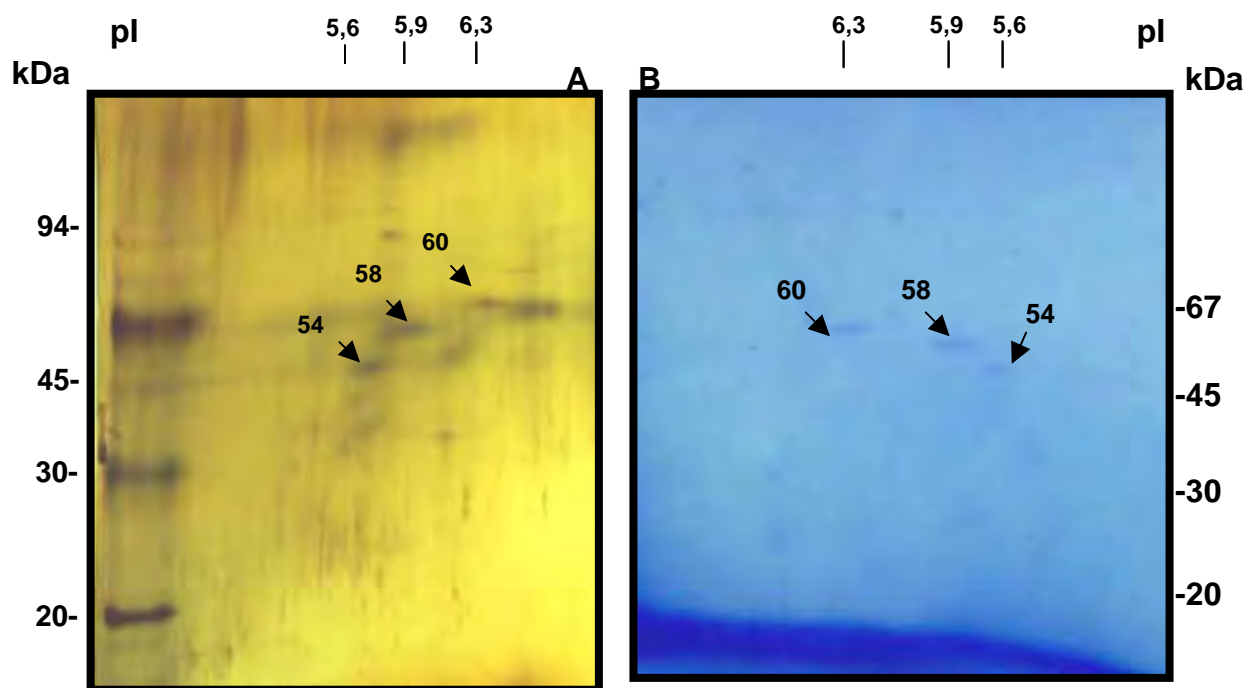


Figura 11: Eletroforese bidimensional da fração semi-purificada da amostra 18a, cultivada em meio líquido BHI acrescido de sangue de carneiro 5% obtida em coluna de gelatina sepharose 4B evidenciando a presença das proteínas de 60 kDa e pI de 6,3; 58 kDa e pI de 5,9; e 54 kDa com pI de 5,6 (setas), corada pelo nitrato de prata (11A) e por Coomassie blue R-250 (11B).

4.4. Caracterização de ligantes de proteínas da matriz extracelular por *imunoblot*

A identificação de adesina de *P. brasiliensis* ligante de fibronectina nos extratos *cell-free* da amostra 18a cultivada em meios líquidos com e sem 5% de sangue de carneiro foi feita por *imunoblot*. A fibronectina humana foi reconhecida fortemente pelos componentes desta, cultivada em meio líquido contendo 5% de sangue de carneiro, com as massas moleculares de 72, 60, 58, 54, 50, 43 e 26 kDa, quando comparado ao cultivo em meio líquido sem

sangue. As proteínas de 50, 54 e 58 kDa foram capazes de se ligar a fibronectina como demonstrado na Figura 12. Como controle negativo foi realizada a reação somente com anticorpo primário (anti-fibronectina humana) no título de 1:100 e como controle do extrato, soro de coelho anti-*cell-free* de *P. brasiliensis* no título de 1:40.

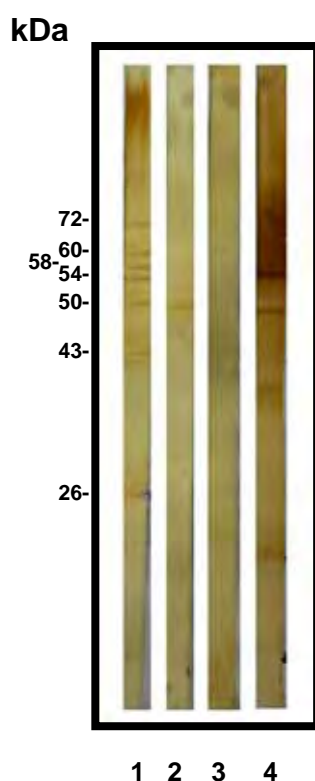


Figura 12: *Imunoblot* dos extratos *cell-free* da amostra 18a, quando cultivada em meio líquido contendo 5% de sangue de carneiro (1) e em meio líquido sem sangue de carneiro (2), tratado com fibronectina e soro anti-fibronectina. Controle negativo anticorpo primário anti-fibronectina (3); controle do extrato: soro de coelho anti-*cell-free* de *P. brasiliensis* (4).

As proteínas de 60, 58 e 54 kDa, presentes na fração semi-purificada do extrato *cell-free* da amostra 18a cultivada em meio líquido BHI contendo 5% de sangue de carneiro, foram separadas por eletroforese bidimensional e apresentaram características de adesinas, ligantes de fibronectina como demonstrado em ensaio de *immunoblot* (Figura 13).

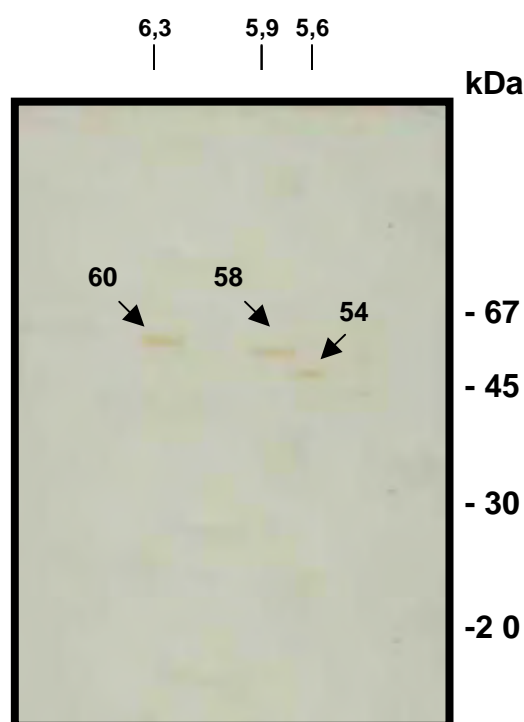


Figura 13: *Immunoblot* da fração semi-purificada, da amostra 18a cultivada em meio líquido BHI acrescido de sangue de carneiro 5%, obtida em coluna de gelatina Sepharose 4B, evidenciando as proteínas de 60 kDa e pI de 6,3; 58 kDa e pI de 5,9; e 54 kDa com pI de 5,6 (setas), tratado com fibronectina e soro anti-fibronectina.

4.5. Purificação da proteína de 54 kDa por eletroeluição

Nesta etapa do trabalho, foi feita a purificação da proteína de 54 kDa. Para tanto, após a análise em SDS-PAGE, esta proteína foi removida do gel e submetida ao método de purificação por eletroeluição. O sobrenadante contendo a proteína purificada foi avaliado por eletroforese bidimensional, confirmando a presença da proteína como demonstrado na Figura 14.

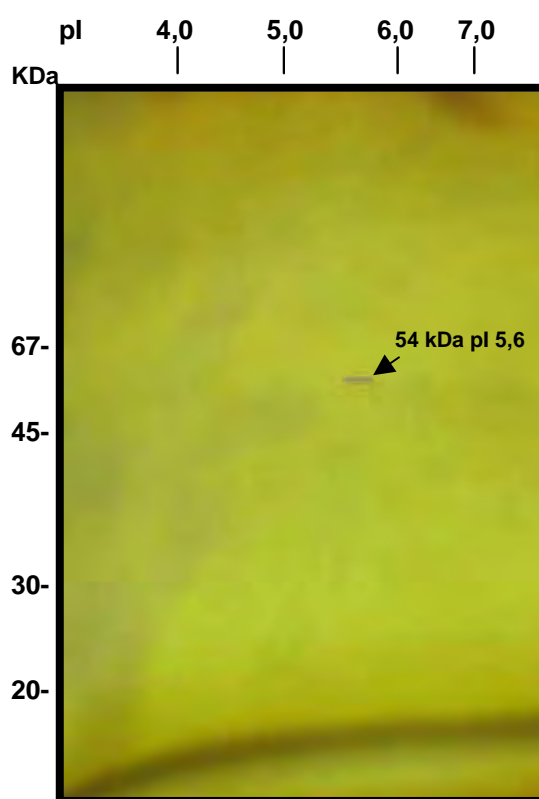


Figura 14: Eletroforese bidimensional da proteína de 54 kDa obtida por eletroeluição e gel corado pelo método com nitrato de prata.

4.6. Produção de Anticorpos IgG em camundongos Balb/c

Após a purificação da proteína de 54 kDa ligante de fibronectina, quatro camundongos machos (Balb/c) foram imunizados via sub-plantar e subcutânea para a produção de anticorpo monoclonal. Destes, apenas dois camundongos apresentaram uma resposta elevada contra a proteína através da técnica ELISA direto, e foram selecionados para a fusão celular como demonstrado na Tabela 1.

TABELA 1: Avaliação da produção de anticorpos anti-proteína de 54 kDa de *P. brasiliensis*, obtidos em camundongos Balb/c, através da técnica ELISA direto. Controle Positivo: soro de coelho anti-*cell-free* de *P. brasiliensis* diluição 1/100; Controle Negativo: soro normal de camundongo diluição 1/20.

Etapas de Imunização	Balb/c 1 D.O.	Balb/c 3 D.O.	Controle + D.O.	Controle - D.O.	Branco D.O.
Primeira	0,197	0,147	0,855	0,131	0,079
Segunda	0,433	0,420	1,029	0,147	0,188
Terceira	1,007	1,087	1,604	0,180	0,118
Quarta	1,970	1,420	1,840	0,260	0,163
Dose reforço					

D.O. - Densidade óptica.

4.6.1. Resultados da fusão celular e obtenção dos hibridomas

Foram realizadas quatro fusões celulares, utilizando-se os linfonodos poplíteos e as células esplênicas dos camundongos 1 e 3. Após fusão celular dos materiais do camundongo 1 foram obtidos 137 hibridomas resistentes ao meio HAT, e os sobrenadantes desses hibridomas foram analisados pela técnica de ELISA direto e DOT-ELISA, e apenas três hibridomas, 2A, 18M e 19M foram positivos para adesina de 54 kDa de *P. brasiliensis*, como demonstrado na Tabela 2, e o restante dos hibridomas não apresentaram reatividade. Após seleção, os hibridomas 18M e 19M positivos para adesina de 54 kDa de *P. brasiliensis* foram clonados por diluição limitante para se obter anticorpos monoclonais anti-adesina de 54 kDa de *P. brasiliensis*.

Na fusão celular realizada com o camundongo 3 foram obtidos 149 hibridomas, e os sobrenadantes destes estão em processo de triagem através da técnica de ELISA direto e DOT-ELISA, para avaliar suas reatividades com a adesina de 54 kDa de *P. brasiliensis*.

TABELA 2: Avaliação da produção de anticorpos anti-adesina de 54 kDa de *P. brasiliensis* pelos hibridomas formados através da técnica ELISA direto. Controle Positivo: soro de coelho anti-*cell-free* de *P. brasiliensis* diluição 1:100; Controle Negativo: soro normal de camundongo diluição 1:20.

Balb/c 1 HIBRIDOMAS	Sobrenadante Ac anti-54kDa de <i>P. brasiliensis</i> D.O.	Controle + D.O.	Controle - D.O.	Branco D.O.
2A	0,519	0,812	0,271	0,221
18M	2,219	1,049	0,477	0,127
19M	3,469	1,049	0,477	0,127

D.O.- Densidade óptica.

4.7. Cinética da interação de *P. brasiliensis* à cultura de células epiteliais A549

O ensaio de infecção foi realizado com as amostras 18a e 18b de *P. brasiliensis*, na fase leveduriforme (L), seguido de cultivo em meio de Fava Netto, bem como com os mesmos cultivados em meio sólido (ágar base) contendo 5% de sangue de carneiro. Os períodos de infecção analisados foram de 30 minutos, 1, 3, 5, 10 e 24 horas. A cinética de interação fungo-célula foi feita através de contagens dos fungos em 3000 células, determinando-se a porcentagem total de infecção.

A adesão ocorreu a partir de 30 minutos de contato, em ambas as amostras 18a e 18b cultivadas em meio de Fava Netto e também em meio sólido contendo 5% de sangue de carneiro. Nos tempos subsequentes foi observado um acréscimo no número de formas leveduriformes aderidas nas

células A549. A amostra 18b foi significativamente ($p < 0,05$) mais adesiva nos tempos de 30 minutos, 1, 3 e 10 horas que a 18a quando cultivada em meio de Fava Netto como demonstrado na Figura 15. Já 18b cultivada em meio sólido contendo 5% de sangue de carneiro foi significativamente ($p < 0,05$) mais adesiva nos tempos de 30 minutos, 1 e 10 horas que 18a cultivada em meio sólido contendo 5% de sangue como demonstrado na Figura 16.

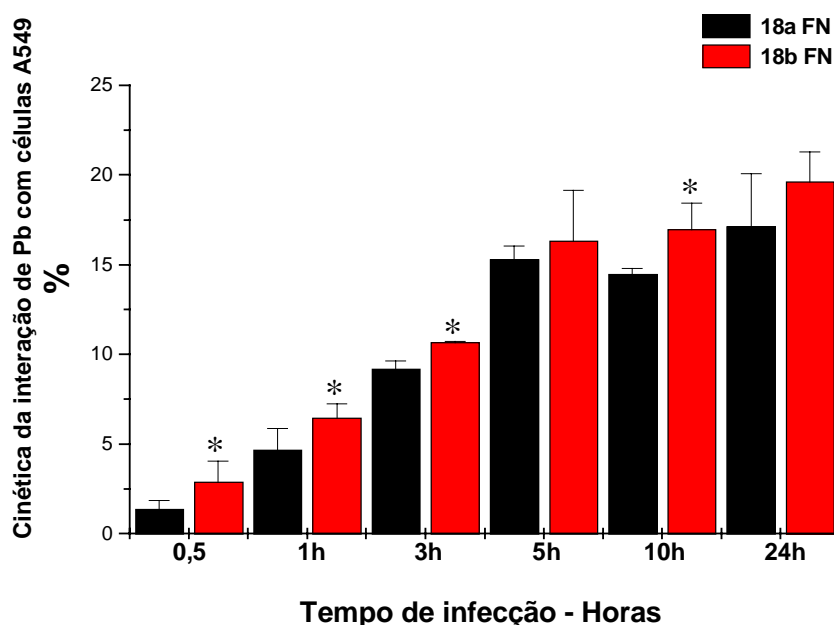


Figura 15: Cinética da interação da amostra 18 de *P. brasiliensis* antes (18a) e depois (18b) da passagem em animal (cultivadas em meio de Fava Netto) em função do período de incubação (horas) com células da linhagem pulmonar A549. A cinética da interação está representada por histogramas. Resultados expressos a partir da média e desvio padrão de experimentos realizados em duplicata com contagem em triplicata.

* diferença estatisticamente significante $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

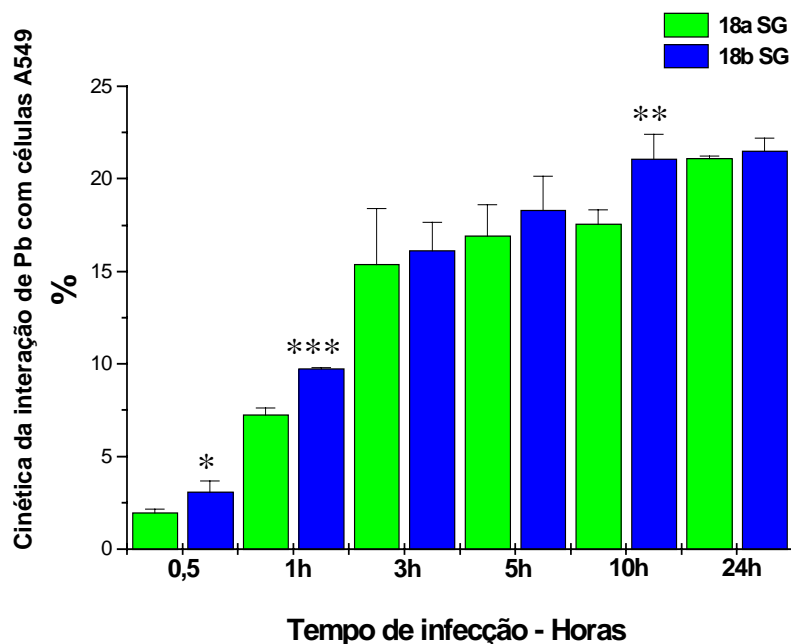


Figura 16: Cinética da interação da amostra 18 de *P. brasiliensis* antes (18a) e depois (18b) da passagem em animal (cultivadas em meio sólido (ágar base) contendo 5% de sangue de carneiro) em função do período de incubação (horas) com células da linhagem A549. A cinética está representada por histogramas. Resultados expressos a partir da média e desvio padrão de experimentos realizados em duplicata com contagem em triplicata.

* diferença estatisticamente significativa $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

A amostra 18a cultivada em meio sólido contendo 5% de sangue foi significativamente ($p < 0,05$) mais adesiva nos tempos de 30 minutos, 1, 3 e 10 horas que a mesma cultivada em meio de Fava Netto (Figura 17), e 18b cultivada em meio sólido contendo 5% de sangue foi significativamente ($p < 0,05$) mais adesiva nos tempos de 1, 3 e 10 horas que 18b cultivada em meio de Fava Netto (Figura 18), demonstrando assim que a adição de sangue

ao meio de cultura influenciou diretamente na capacidade adesiva do fungo, com dados semelhantes ao fungo que foi reisolado após passagem em animal.

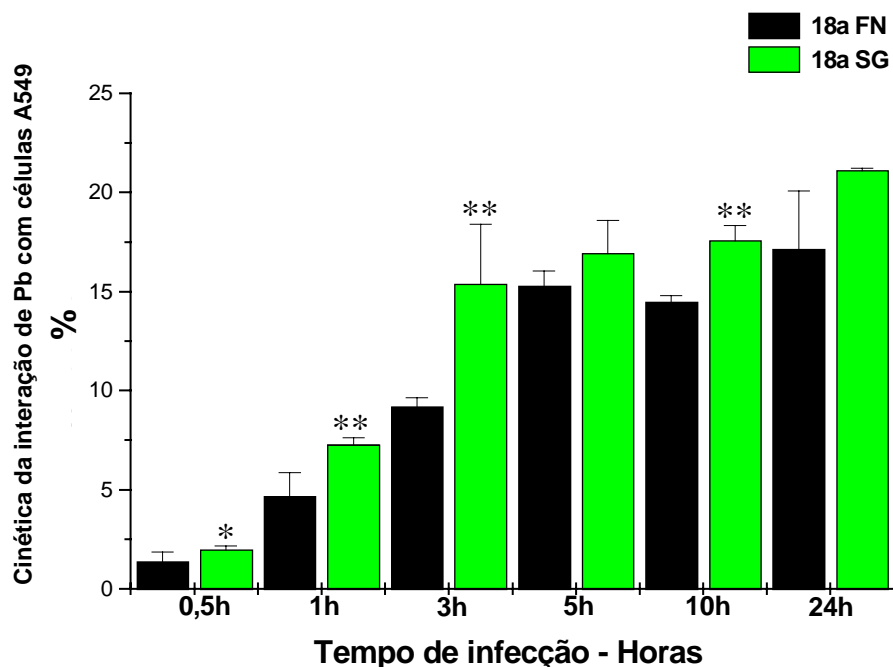


Figura 17: Cinética da interação da amostra 18 de *P. brasiliensis* antes (18a) da passagem em animal cultivada em meio de Fava Netto e em meio sólido (ágar base) contendo 5% de sangue de carneiro em função do período de incubação (horas) com células da linhagem A549. A cinética da interação está representada por histogramas. Resultados expressos a partir da média e desvio padrão de experimentos realizados em duplicata com contagem em triplicata.

* diferença estatisticamente significante $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

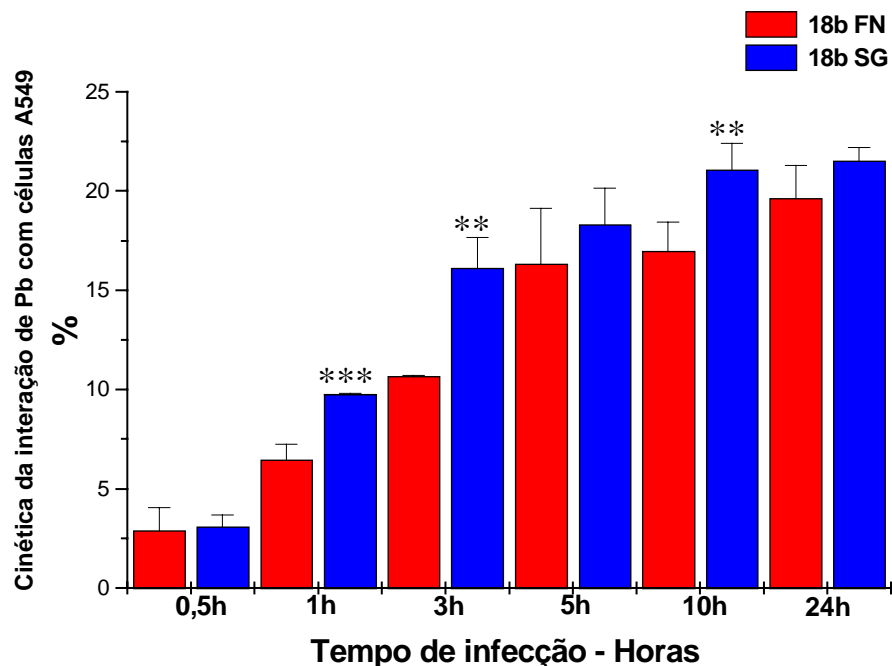


Figura 18: Cinética da interação da amostra 18 de *P. brasiliensis* depois (18b) da passagem em animal cultivada em meio de Fava Netto e cultivada em meio sólido (ágar base) contendo 5% de sangue de carneiro em função do período de incubação (horas) com células da linhagem A549. A cinética da interação está representada por histogramas. Resultados expressos a partir da média e desvio padrão de experimentos realizados em duplicata com contagem em triplicata.

* diferença estatisticamente significativa $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Os resultados da infecção total, através da contagem de unidades formadoras de colônias que avalia o total de fungos aderidos e invadidos, demonstraram que a amostra 18b cultivada em meio de Fava Netto teve maior capacidade de adesão e invasão ($p < 0,05$) nos tempos de 10 e 24 horas do que a 18a cultivada em meio de Fava Netto como demonstrado na Figura 19. Já a amostra 18b cultivada em meio sólido contendo 5% de sangue de carneiro foi

($p < 0,05$) capaz de aderir e invadir significativamente nos tempos de 3, 10 e 24 horas que 18a cultivada em meio sólido contendo 5% de sangue como demonstrado na Figura 20.

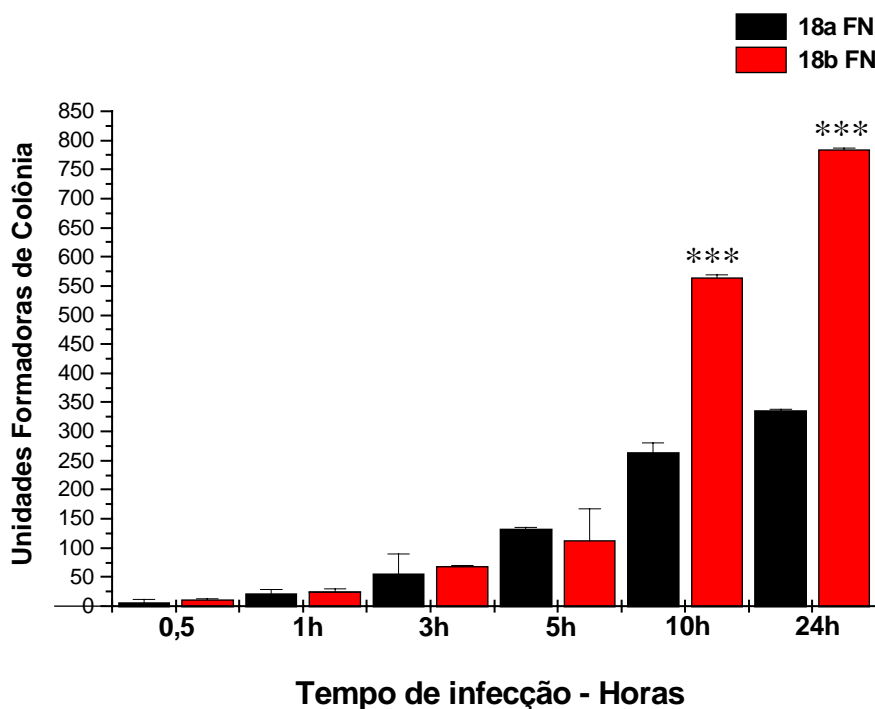


Figura 19: Cinética da infecção total (fungos aderidos e internalizados) da amostra 18 de *P. brasiliensis* antes (18a) e depois (18b) da passagem em animal, seguido do cultivado em meio de Fava Netto, em função do período de incubação (horas) com células da linhagem A549. Resultados expressos a partir da média e desvio padrão de experimentos realizados em triplicata.

* diferença estatisticamente significante $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

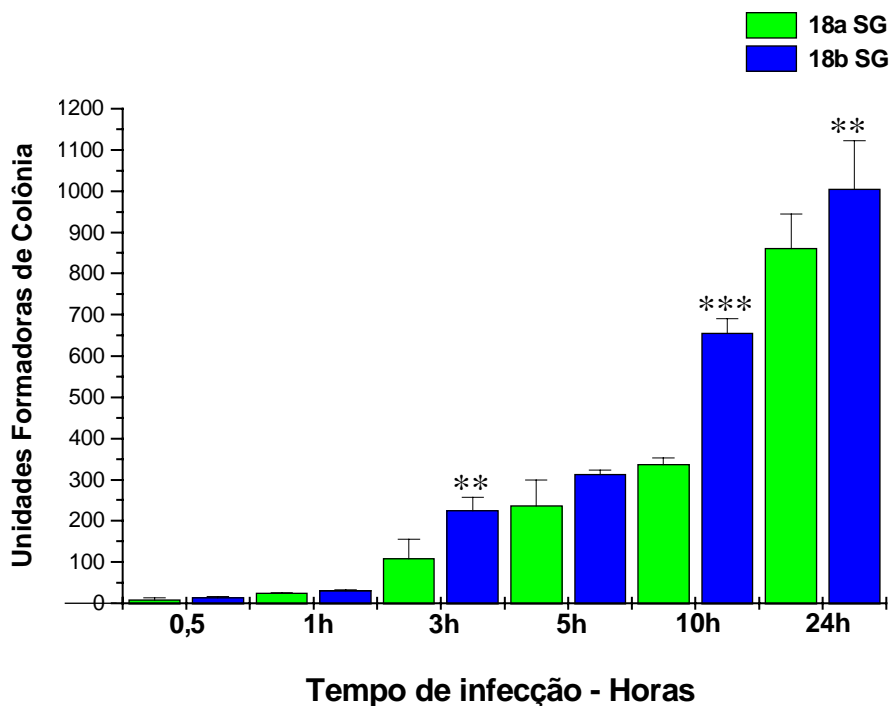


Figura 20: Cinética da infecção total (fungos aderidos e internalizados) da amostra 18 de *P. brasiliensis* antes (18a) e depois (18b) da passagem em animal, cultivadas em meio sólido (ágar base) contendo 5% de sangue de carneiro em função do período de incubação (horas) com células da linhagem A549. Resultados expressos a partir da média e desvio padrão de experimentos realizados em triplicata.

* diferença estatisticamente significante $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

A amostra 18a cultivada em meio sólido contendo 5% de sangue foi significativamente ($p < 0,05$) mais adesiva e invasiva nos tempos de 5 e 24 horas que 18a cultivada em meio de Fava Netto (Figura 21), e 18b cultivada em meio sólido contendo 5% de sangue foi significativamente ($p < 0,05$) mais adesiva e invasiva nos tempos de 3, 5, 10 e 24 horas que 18b cultivada em meio de Fava Netto (Figura 22), demonstrando assim que a adição de sangue

ao meio de cultura influenciou diretamente na capacidade adesiva e invasiva do fungo.

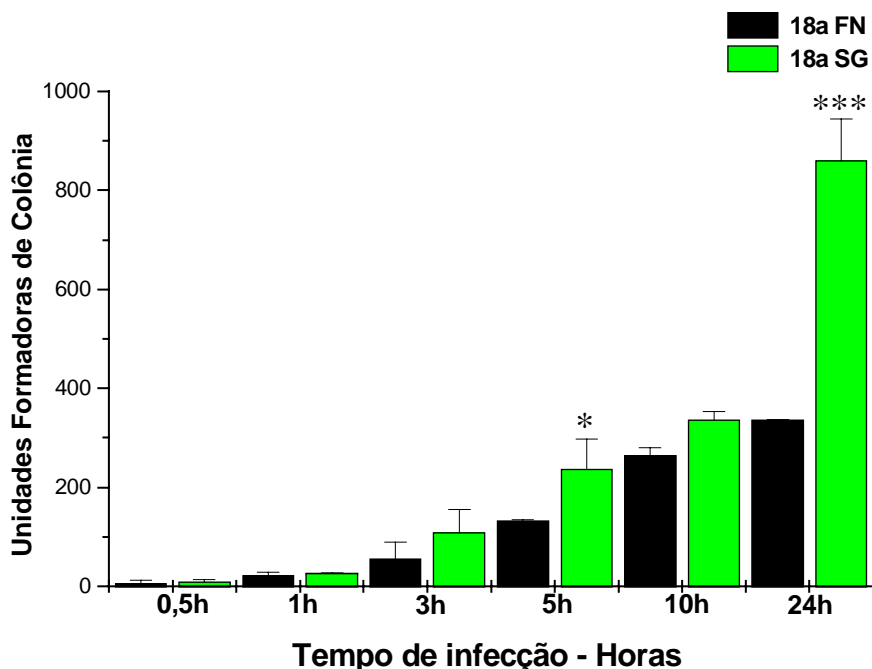


Figura 21: Cinética da infecção total (fungos aderidos e internalizados) da amostra 18 de *P. brasiliensis* antes (18a) da passagem em animal, seguido do cultivo em meio de Fava Netto e 18a cultivada em meio sólido contendo 5% de sangue de carneiro em função do período de incubação (horas) com células da linhagem A549. Resultados expressos a partir da média e desvio padrão de experimentos realizados em triplicata.

* diferença estatisticamente significante $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

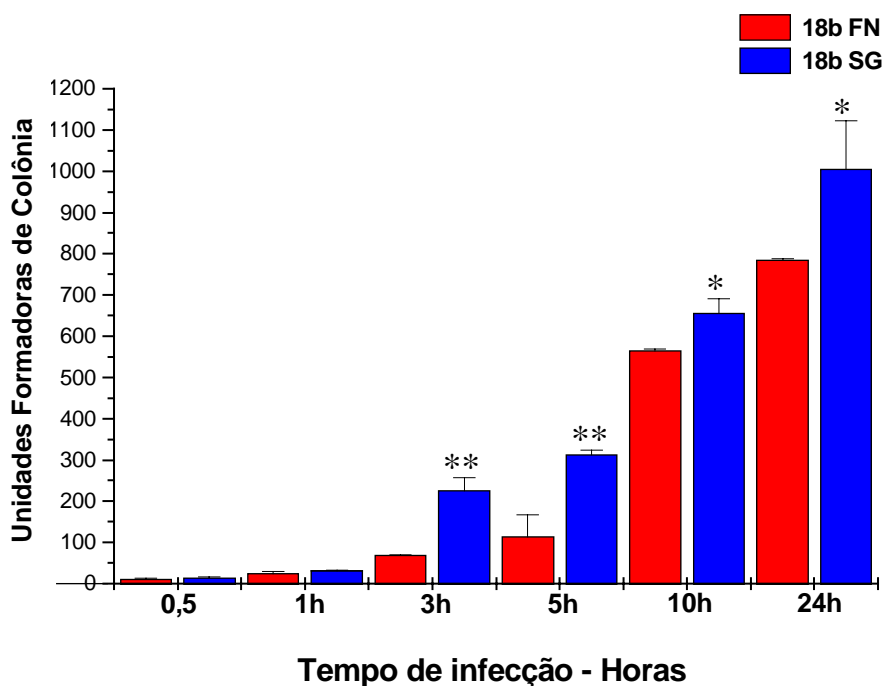


Figura 22: Cinética da infecção total (fungos aderidos e internalizados) da amostra 18 de *P. brasiliensis* depois (18b) da passagem em animal cultivada em meio de Fava Netto e 18b cultivada meio sólido contendo 5% de sangue de carneiro em função do período de incubação (horas) com células da linhagem A549. Resultados expressos a partir da média e desvio padrão de experimentos realizados em triplicata.

* diferença estatisticamente significante $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Os resultados do teste de invasão, através da contagem de unidades formadoras de colônia que avalia o total de fungos capazes de invadir as células A549, demonstraram que a amostra 18b cultivada em meio sólido contendo 5% de sangue foi mais invasivo nos tempos de 3, 5, 10 e 24 horas que 18b cultivada em meio de Fava Netto (Figura 23), demonstrando assim que a adição de sangue ao meio de cultura influenciou na capacidade invasiva do fungo, principalmente no período de 10 horas.

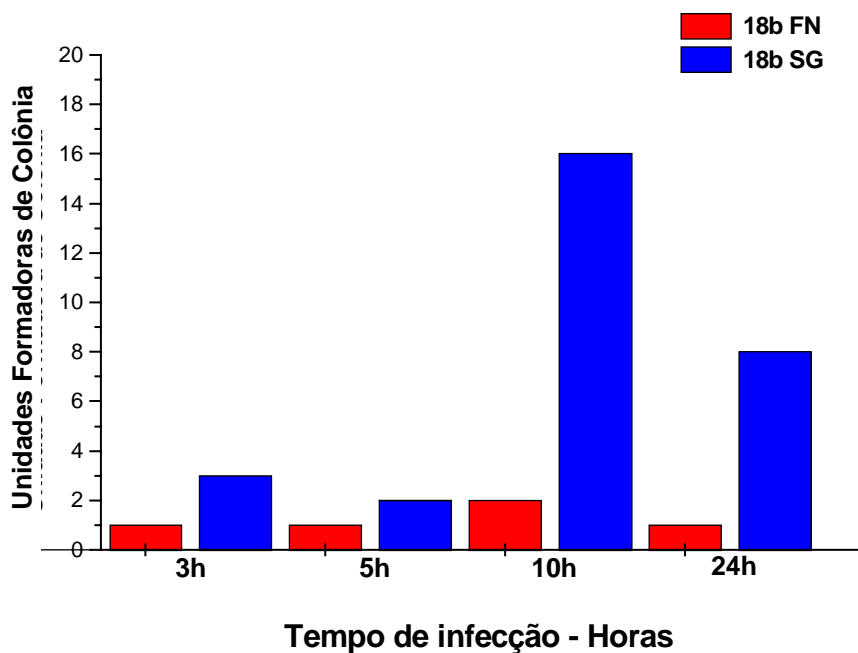


Figura 23: Cinética da invasão (fungos internalizados) da amostra 18 de *P. brasiliensis* depois (18b) da passagem em animal cultivada em meio de Fava Netto e 18b cultivada meio sólido contendo 5% de sangue de carneiro em função do período de incubação (horas) com células da linhagem A549. Experimentos realizados em triplicata.

4.8. Ensaio de inibição da interação de *P. brasiliensis* com anticorpo policlonal anti-54 kDa

O índice de inibição da interação de *P. brasiliensis* (cultivados em diferentes meios) tratados com anticorpo policlonal anti-54 kDa na diluição 1:100 nos períodos de 2 e 5 horas com células epiteliais A549 foram comparados com o controle positivo (células epiteliais em contato direto com o

fungo), para calcular a porcentagem de inibição da adesão e invasão do fungo às células por este anticorpo.

As amostras 18a e 18b cultivadas em meio de Fava Netto, tratadas com anticorpo policlonal anti-54 kDa na diluição 1:100, apresentaram índice de inibição da adesão e invasão em 2 h e 5 h semelhantes, não havendo diferença significativa entre eles. A porcentagem de inibição da adesão e da invasão em 2 h na diluição 1:100 foi de 81% e 45%, respectivamente, para a amostra 18a cultivada em meio de Fava Netto, e em 5 h foi de 78 e 55%, respectivamente. A porcentagem de inibição da adesão em 2 h para a amostra 18b cultivada em meio de Fava Netto foi de 86% e a inibição da invasão foi de 36%, e em 5 h houve 79% de inibição da adesão e 54% de inibição da invasão (Figura 24).

Quando 18a e 18b cultivadas em meio sólido contendo 5% de sangue de carneiro, foram tratadas com anticorpo policlonal anti-54 kDa na diluição 1:100, 18a apresentou inibição da adesão em 2 h de 83 %, e a inibição da invasão 44%, e em 5 h, 82% de inibição da adesão e 55% de inibição da invasão. A porcentagem de inibição da adesão em 2 h na diluição 1:100 para a amostra 18b foi de 85% e a inibição da invasão foi de 31%, e em 5 h, houve 86% de inibição da adesão e 38% de inibição da invasão (Figura 25).

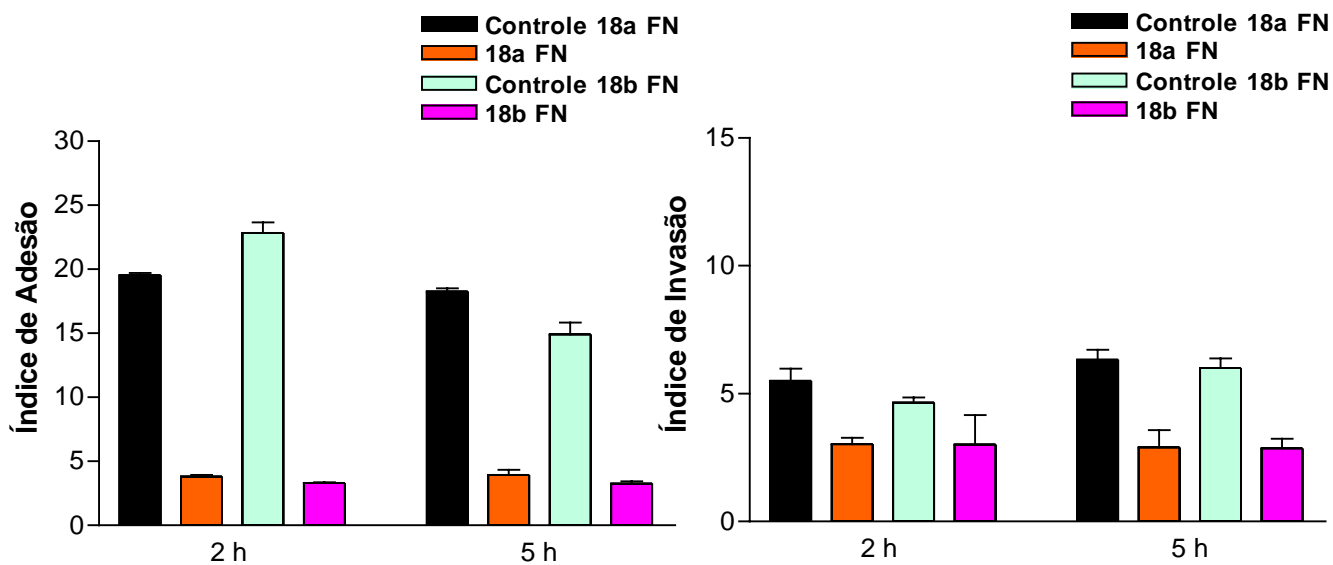


Figura 24: Índice de inibição da adesão e invasão da amostra 18 de *P. brasiliensis* antes (18a) e depois (18b) da passagem em animal cultivados em meio de Fava Netto, com anticorpo policlonal anti-54 kDa na diluição 1:100 com células epiteliais. Os índices de inibição da adesão e invasão em 2 h e 5 h são representados por mediana e desvio padrão (\pm S.D.) de três experimentos independentes (triplicata).

* diferença estatisticamente significante $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

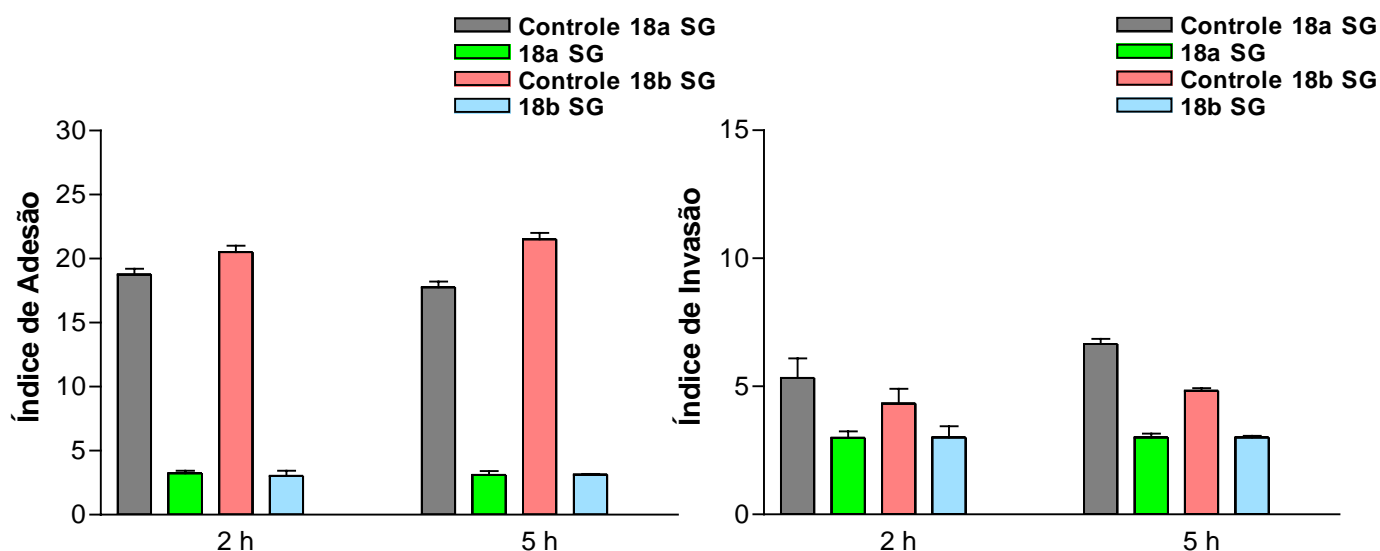


Figura 25: Índice de inibição da adesão e invasão da amostra 18 de *P. brasiliensis* antes (18a) e depois (18b) da passagem em animal cultivados em meio sólido contendo 5% de sangue de carneiro com anticorpo policlonal anti-54 kDa na diluição 1:100 com células epiteliais. Os índices de inibição da adesão e invasão em 2 h e 5 h são representados por mediana e desvio padrão (\pm S.D.) de três experimentos independentes (triplicata).

* diferença estatisticamente significante $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Quando a amostra 18a foi cultivada em meio de Fava Netto comparada a 18a cultivada em sangue de carneiro, as inibições da adesão e da invasão em 2 h foram semelhantes, assim como em 5 h (Figura 26).

Quando a amostra 18b foi cultivada em meio de Fava Netto comparada a 18b em meio contendo de sangue de carneiro, a inibição da adesão em 2 h e 5 h foram semelhantes variando de 79% a 86%. Por outro lado, a inibição da invasão em 5 h foi maior na amostra cultivada em meio comum (54%) do que a amostra 18b cultivada em meio contendo sangue de carneiro (38%) (Figura 27).

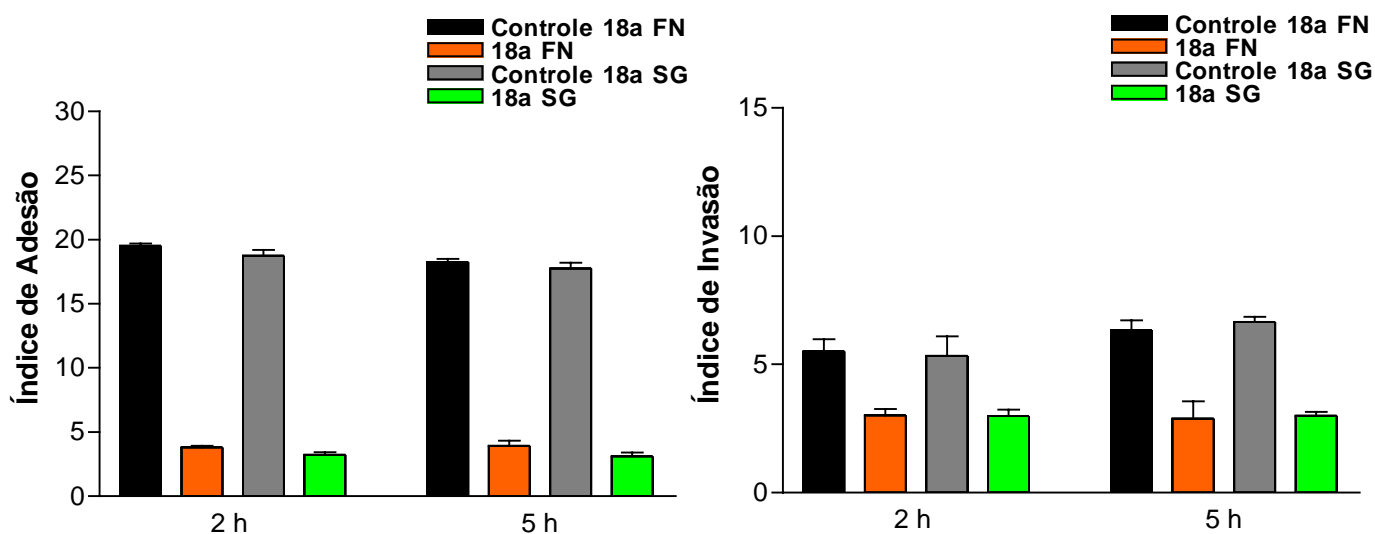


Figura 26: Índice de inibição da adesão e invasão da amostra 18a de *P. brasiliensis* cultivada em meio de Fava Netto e da 18a cultivada em meio sólido contendo 5% de sangue de carneiro, com anticorpo policlonal anti-54 kDa na diluição 1:100 com células epiteliais. Os índices de inibição da adesão e invasão 2 h e 5 h são representados por mediana e desvio padrão (\pm S.D.) de três experimentos independentes (triplicata).

* diferença estatisticamente significante $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

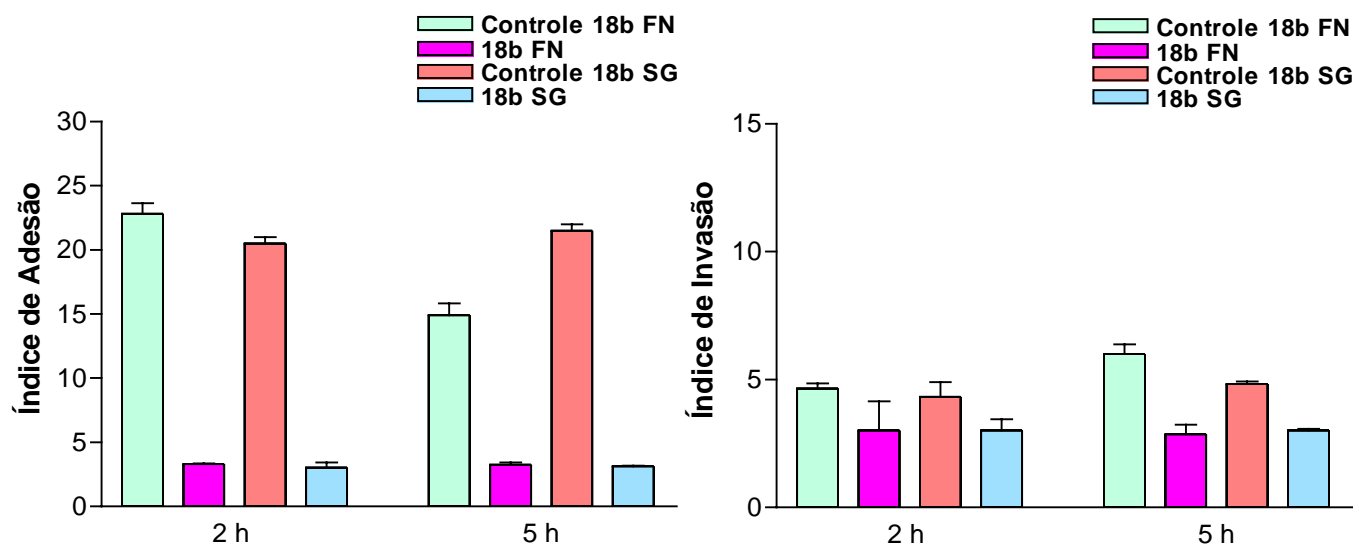


Figura 27: Índice de inibição da adesão e invasão da amostra 18b de *P. brasiliensis* cultivada em meio de Fava Netto e da 18b cultivada em meio sólido contendo 5% de sangue de carneiro, com anticorpo policlonal anti-54 kDa na diluição 1:100 com células epiteliais. Os índices de inibição da adesão e invasão 2 h e 5 h são representados por mediana e desvio padrão (\pm S.D.) de três experimentos independentes (triplicata).

* diferença estatisticamente significante $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

5. DISCUSSÃO

A virulência de *P. brasiliensis* não está completamente esclarecida. Fatores como composição da parede celular (α -1,3-glucana), capacidade de crescimento a 37°C, dimorfismo, produção da gp43 e proteinases, e capacidade de adesão às células do hospedeiro são relevantes e podem exercer um papel crítico na infecção (SAN-BLAS & SAN-BLAS, 1994; KUROKAWA et al., 1998; HOGAN et al., 1996). Por outro lado, subcultivos sucessivos deste fungo acarretam a perda de sua patogenicidade, que pode ser revertida pelo reisolamento do agente após passagem em animal, recuperando assim alguns fatores de virulência (BRUMMER et al., 1990; ANDREOTTI et al., 2005).

Neste estudo pretendeu-se isolar e caracterizar adesina(s) de *P. brasiliensis* ligante(s) de fibronectina.

Há estudos na literatura indicando que meios com hemoglobina induzem a expressão de adesinas com características de ligar-se à fibronectina (YAN et al., 1998; PENDRAK et al., 2000; PENDRAK et al., 2004). Assim, foi avaliada a expressão diferencial de proteínas por *P. brasiliensis* utilizando-se meios de cultura comuns e meios enriquecidos com 5% de sangue de carneiro.

Os efeitos dos meios de cultura empregados no crescimento de *P. brasiliensis* e seu padrão de interação às células pulmonares foram inicialmente estudados. Nossos experimentos com células A549 revelaram que tanto a amostra Pb18a como a Pb18b quando cultivadas em meio acrescido de sangue de carneiro foram capazes de aderir e invadir mais eficientemente quando comparadas às mesmas em meio livre de sangue. Estes dados

confirmam os achados de Andreotti et al. (2005), em que este fungo tem seu padrão alterado de adesão em função das condições de crescimento. Os primeiros estudos indicaram que isolados de *P. brasiliensis* foram capazes de aderir às células epiteliais após 30 minutos e que os mais virulentos para animais (SINGER-VERMES et al., 1989) tinham também maior capacidade de adesão (HANNA et al., 2000; MENDES-GIANNINI et al., 2006). *P. brasiliensis* recentemente isolado após passagem por inoculação em animais de experimentação teve sua capacidade de adesão aumentada, comparada ao isolado cultivado por 72 vezes. Aparentemente, o cultivo com sangue possibilitaria as mesmas condições encontradas no ambiente do hospedeiro.

P. brasiliensis produz uma série de componentes que interagem com o hospedeiro de várias maneiras, provavelmente nos processos adesivos e/ou com o sistema imune, induzindo resposta celular e humoral. Entre estes, destacam-se as glicoproteínas de 43 kDa (gp43) e a de 70 kDa (gp70) obtidas a partir de filtrado de cultura. Os estudos com a gp43 indicaram tratar-se de molécula antigênica com alta especificidade e de grande importância como marcador sorológico (MENDES-GIANNINI et al., 1989), e por estar envolvida no processo de adesão e invasão as células epiteliais (VICENTINI et al., 1994; HANNA et al., 2000; MENDES-GIANNINI et al., 2000; MENDES-GIANNINI et al., 2006). Diferentes componentes estão presentes no extrato denominado *cell-free* utilizado por Blotta e Camargo (1993). Este extrato *cell-free* de *P. brasiliensis* corresponde aos componentes superficiais da célula fúngica e provavelmente entram diretamente em contato com as células do hospedeiro. Em nosso estudo foram obtidos os extratos *cell-free* do isolado 18 de *P. brasiliensis*, na fase leveduriforme (L) antes (18a) e depois (18b) da passagem

em animal, seguido do cultivo em meio de Fava Netto, e também em meios sólido (ágar base) e líquido BHI contendo 5% de sangue de carneiro e em meios sólido e líquido sem sangue. O perfil eletroforético desses extratos mostrou diferenças em relação à intensidade e ao número de bandas majoritárias e as bandas variaram de 106 a 12 kDa, em geral. Quando as amostras 18a e 18b foram cultivadas em meios contendo 5% de sangue de carneiro, estas apresentaram diferenças em relação à intensidade e ao número de bandas majoritárias demonstrando maior concentração de algumas proteínas como as de 100, 76, 67, 54 e 30 kDa, quando comparado a 18a e 18b cultivados apenas em meio de Fava Netto e sem sangue, demonstrando assim que a adição de sangue de carneiro aos meios de cultivo para *P. brasiliensis* induzem maior expressão de proteínas, semelhante ao verificado após a passagem em animal (ANDREOTTI et al., 2005).

Para melhor caracterizar extratos protéicos de diferentes microrganismos tem sido utilizada a eletroforese bidimensional que além de diferenciar proteínas por massa molecular, também as separam de acordo com seu ponto isoelétrico (pI). Em nosso estudo, esta metodologia foi empregada no intuito de melhor caracterizar e diferenciar os perfis protéicos dos extratos *cell-free* das amostras 18a e 18b cultivadas em diferentes meios. Houve maior expressão de proteínas nos extratos *cell-free* das amostras 18a e 18b cultivadas em meio líquido (BHI) acrescido de sangue de carneiro a 5% em relação às amostras cultivadas em meio de Fava Netto. Três proteínas apresentavam-se expressas diferencialmente entre todos os extratos, sendo estas de 54 kDa e pI 5,6, 60 kDa e pI 6,3 e 70 kDa e pI 5,3, porém as amostras 18a e 18b cultivadas em meios com sangue demonstraram mais uma vez pela

metodologia de eletroforese bidimensional maior expressão de proteínas, semelhante ao verificado após a passagem em animal (ANDREOTTI et al., 2005). A partir deste momento começamos a estudar a proteína de 54 kDa, por ser mais expressa nestes extratos.

Todos os extratos *cell-free* obtidos dos isolados 113, 339, 2663-R3, 2681, PB01, 1934 de *P. brasiliensis*, na fase leveduriforme (L) cultivados em meio de Fava Netto possuíam a proteína de 54 kDa, e quando os isolados 113 e 339 de *P. brasiliensis* foram cultivados em meios acrescidos de sangue de carneiro a 5% também apresentaram semelhanças em relação à intensidade e ao número de bandas majoritárias, comparada a amostra 18a cultivada em meio acrescido de sangue de carneiro, demonstrando assim que dependendo do meio de cultura utilizado há uma expressão diferencial de proteínas semelhante ao reisolado após passagem em animal. 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). Também foi verificado que uma adesina de 30 kDa foi diferencialmente expressa após *P. brasiliensis* ser reisolado de animal de experimentação em comparação com amostra subcultivada mais de 72 vezes (ANDREOTTI et al., 2005).

A habilidade de vários fungos de aderir a uma variedade de superfícies do hospedeiro representa uma fase crítica no desenvolvimento da infecção fúngica e na patogênese de micoses. Esta adesão é mediada por componentes superficiais da célula fúngica chamadas de adesinas, que freqüentemente se ligam a componentes da matriz extracelular (MEC) (LENZI et al., 1991; PATTI et al., 1994). Desta forma, proteínas do hospedeiro como laminina, colágeno,

fibronectina, fibrinogênio e o componente C3 do complemento são estudadas como possíveis pontes entre os microrganismos (PATTI et al.,1994).

Assim, no presente trabalho foi isolada e caracterizada uma proteína de 54 kDa de pI 5,6 expressa em maior concentração nas amostras 18a e 18b de *P. brasiliensis* quando cultivadas em meios acrescidos de 5% de sangue de carneiro. Esta foi reconhecida pelo anticorpo produzido contra o antígeno *cell-free* destes isolados, pelo anticorpo policlonal anti-54 kDa e também por soro de paciente com paracoccidiodomicose. Neste estudo foi demonstrado que esta proteína tem característica de adesina ligante de fibronectina conforme ensaio de ligação e por *imunoblot* quando se fez ensaio com proteínas da matriz extracelular. Esta proteína foi capaz de se ligar a fibronectina, mas não a outros componentes da MEC como laminina, colágenos tipo I e IV.

A fibronectina é uma glicoproteína multifuncional, consistindo de duas subunidades similares (α e β) ligadas por pontes dissulfetos próximas ao C terminal, compreendendo vários domínios.

O aumento da expressão de receptores de superfície ligantes de fibronectina e também aos seus fragmentos proteolíticos contendo a região de 120 kDa (domínio de ligação celular, que inclui uma seqüência RDG) e 40 kDa (domínio de ligação a heparina) foi observado por Yan et al. (1998) em *C. albicans*. A adição de hemoglobina ao meio de cultura fez com que fosse modificada a afinidade desta levedura pelos domínios de adesão celular. Pendrak et al. (2000) demonstraram que *C. albicans* ao interagir com hemoglobina, foi capaz de induzir a expressão de receptor para fibronectina. A fibronectina é uma proteína multifuncional, sintetizada por células epiteliais e endoteliais, e encontrada nos fluidos corporais, tecido conjuntivo, membrana

basal entre outros, que desempenha um importante papel tanto na adesão quanto na migração celular (PANKOV & YAMADA, 2002). Portanto, proteínas ligantes da fibronectina podem contribuir para a patogênese da infecção por mediar adesão aos ligantes do hospedeiro e retenção do fungo nos tecidos. Com base em nossos resultados, podemos concluir que *P. brasiliensis* utiliza esta proteína no processo de adesão e invasão às células hospedeiras e provavelmente tenha papel na virulência.

Em trabalhos anteriores, a glicoproteína de 43 kDa, um dos mais importantes exoantígenos de *P. brasiliensis*, foi implicada como ligante para laminina e fibronectina (VICENTINI et al., 1994; HANNA et al., 2000; MENDES-GIANNINI et al., 2006). Tem-se verificado que outros componentes da matriz como colágeno I e IV, fibronectina e entactina estão envolvidos na adesão aos tecidos do hospedeiro, e pela primeira vez, foi demonstrado um padrão de reconhecimento diferencial ao se compararem estes componentes da MEC frente aos componentes antigênicos das cepas Pb18 e Pb265 (VINCENZI, 2000; MENDES-GIANNINI et al., 2000), e a gp 43 foi também reconhecida como provável adesina para fibronectina, entre outros componentes (HANNA et al., 2000; MENDES-GIANNINI et al., 1994; MONTEIRO DA SILVA, 2000; MENDES-GIANNINI et al., 2000; MENDES-GIANNINI et al., 2006). Experimentos de inibição mostraram que o tratamento do fungo com laminina e fibronectina e seus peptídeos sintéticos reduziram a aderência a células Vero (MENDES-GIANNINI et al., 2000; MENDES-GIANNINI et al., 2006). Quando antígenos *cell-free* das amostras 18 e 265 de *P. brasiliensis* foram testados com componentes da MEC, interações distintas foram observadas entre estes componentes e o antígeno do isolado Pb18 teve uma maior capacidade de se

ligar a componentes da MEC quando comparado com o antígeno de Pb 265 (VINCENZI, 2000), provavelmente, componentes diferenciais também estão presentes nestes dois isolados levando à diferença na adesão e conseqüentemente na sua virulência. Andreotti et al. (2005) descreveram uma nova adesina, de massa molecular de 30 kDa, que se liga a laminina. Gonzalez et al. (2005) analisaram extratos da fase micelar e leveduriforme de *P. brasiliensis* e detectaram também em ambas, dois polipeptídeos com massas moleculares de 19 e 32 kDa capazes de interagir com proteínas da MEC como laminina, fibronectina e fibrinogênio.

Tanto em bactérias como em fungos, as adesinas têm papel fundamental nos vários processos infectivos. Vários trabalhos têm procurado elucidar os mecanismos e as prováveis adesinas de fungos como em *Candida albicans* (COTTER et al., 1998; GAUR et al., 1999; GAUR et al., 1997), *Aspergillus fumigatus* (BOUCHARA et al., 1997; COULOT et al., 1994; GIL et al., 1996; PENÁLVER et al., 1996; WASYLKA et al., 2000); *Histoplasma capsulatum* (MCMAHON et al., 1995); *Cryptococcus neoformans* (RODRIGUES et al., 2003); *Pneumocystis carinii* (KOTTOM et al., 2003); *Sporothrix schenckii* (LIMA et al., 2001); *Penicillium marneffeii* (HAMILTON et al., 1998, HAMILTON et al., 1999) e *P. brasiliensis* (MENDES-GIANNINI et al., 1994, VICENTINI et al., 1994; HANNA et al., 2000; MENDES-GIANNINI et al., 2000, ANDREOTTI et al., 2005, GONZALEZ et al., 2005, BARBOSA et al., 2006; MENDES-GIANNINI et al., 2006).

O entendimento das interações entre *P. brasiliensis* com os tecidos do hospedeiro depende do estudo dos diferentes passos que permeiam o processo de colonização, especialmente a adesão celular a proteínas do

hospedeiro. A susceptibilidade do hospedeiro depende em parte do dano epitelial que expõe a membrana basal. Levando-se em consideração a arquitetura da matriz extracelular, temos que a membrana basal logo abaixo do epitélio e células endoteliais pode ser exposta por injúria tecidual, aumentando o acesso para a laminina e colágeno tipo IV. Depois disso, uma vez que o fungo transpassa a membrana basal, encontra a fibronectina e colágeno tipo I no espaço intersticial. Se o fungo ganhar acesso ao espaço intravascular, ele encontrará fibronectina plasmática (GIL et al., 1996).

Esses resultados demonstram que *P.brasiliensis* pode aderir, invadir e multiplicar-se ativamente em células epiteliais, indicando mecanismos de sobrevivência e virulência e que o reconhecimento da fibronectina poderia ser o primeiro passo no ataque, migração e subsequente invasão.

Com o intuito de se estudar o papel da adesina na interação de *P. brasiliensis* com as células epiteliais através de ensaios de inibição, tentou-se desenvolver seu respectivo anticorpo monoclonal anti-adesina de 54 kDa ligante de fibronectina. Foram realizadas quatro fusões celulares, utilizando-se os linfonodos poplíteos e as células esplênicas dos camundongos imunizados com a adesina ligante de fibronectina de 54 kDa, resultando na obtenção de 137 hibridomas resistentes ao meio HAT, nas duas primeiras fusões, e o sobrenadante de apenas três desses hibridomas, 2A, 18M e 19M reagiram especificamente com adesina ligante de fibronectina de 54 kDa de *P. brasiliensis*. Após clonagem, estes hibridomas não apresentaram mais reatividade, não dando positividade em nenhum dos ensaios realizados como ELISA e DOT-ELISA. Os fatores que podem ter interferido no sucesso da obtenção de hibridomas secretores de anticorpos monoclonais são: após a

formação desses híbridos, a mitose dá condições de formar cromossomos que são distribuídos nas células filhas, e estas formadas podem perder os cromossomos ou até mesmo apresentar cromossomos responsáveis pelo rearranjo das cadeias leves ou pesadas das imunoglobulinas, cuja função é perdida e, conseqüentemente, sem capacidade de produzir anticorpo monoclonal; a eficiência de imunização dos camundongos, a incompatibilidade entre as células de mieloma e as linhagens de camundongos BALB/c, os procedimentos de fusão e a manutenção dos clones (HARLOW & LANE, 1988). Portanto, para a realização dos ensaios de inibição da adesão e da invasão foi realizada a produção de anticorpo policlonal anti-54 kDa de *P. brasiliensis* em coelhos. Neste trabalho foi verificado que o uso de soro específico anti-54 kDa na diluição 1:100, inibia a adesão e a invasão nos tempos 2 h e 5 h às células A549 de ambas amostras 18a e 18b cultivadas em meio de Fava Netto e 18a e 18b cultivadas em meio contendo 5% de sangue de carneiro quando comparados com as células epiteliais em contato direto com o fungo. Esses resultados demonstram que *P. brasiliensis* pode aderir, invadir e multiplicar-se ativamente em células epiteliais, indicando mecanismos de sobrevivência e virulência e que o reconhecimento da fibronectina poderia ser o primeiro passo no ataque, migração e subsequente invasão.

Assim, podemos concluir com os resultados apresentados que *P. brasiliensis*, independente do meio de cultura em que foi cultivado produz, uma adesina ligante de fibronectina e que esta pode ser inibida por anticorpo específico, influenciando na adesão do fungo as células pulmonares, podendo-se constituir em importante adjuvante no tratamento da doença.

6. CONCLUSÕES

Pelos resultados obtidos podemos concluir que:

1. Dependendo do meio de cultura há expressão diferencial de proteínas fúngicas.
2. O fungo cultivado em meio acrescido de sangue apresenta expressão de proteínas semelhante ao reisolado após passagem em animal.
3. Foram identificadas três proteínas (54, 58 e 60 kDa) com características de adesinas, ligantes de fibronectina. A proteína de 54 kDa foi isolada e caracterizada como adesina ligante de fibronectina.
5. A adesina de 54 kDa também é expressa em outros isolados.
6. A cinética da interação entre *P. brasiliensis* às células A549 foi diferente dependendo das condições de cultivo das amostras.
7. O soro anti-proteína de 54 kDa inibiu adesão de *P. brasiliensis* às células A549 em aproximadamente 85%.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALAEI, S.; LARCHER, C.; EBENBICHLER, C. Isolation and biochemical characterization of the iC_{3b} receptor of *Candida albicans*. **Infect. Immun.**, v. 61, p.1395-99, 1993.

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

ARISTIZABAL, B.H.; CLEMONS, K. V.; STEVENS, D.A.; RESTREPO, A. Morphological transition of *Paracoccidioides brasiliensis* conidia to yeast cell: in vivo inhibition in females. **Infect. Immun.**, v. 66, p.5587-5591, 1998.

BAGAGLI, E.; FRANCO, M.; BOSCO SDE, M.; HEBELER-BARBOSA, F.; TRINCA, L. A.; MONTENEGRO, M. R. High frequency of *Paracoccidioides brasiliensis* infection in armadillos (*Dasypus novemcinctus*) na ecological study. **Med. Mycol.**, v. 41, p. 217-223, 2003.

BAKOS, L.; KRONFELD, M.; HAMPE, S.; CASTRO, I.; ZAMPESE, M. Disseminated paracoccidioidomycosis with skin lesions in a patient with acquired immunodeficiency syndrome. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v. 20, p. 855-865, 1989.

BARBOSA, M.S.; CUNHA PASSOS, D.A.; FELIPE, M.S.; JESUÍNO, R.S.; PEREIRA, M.; DE ALMEIDA SOARES, C.M. The glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase homologue is differentially regulated in phases of *Paracoccidioides brasiliensis*: molecular and phylogenetic analysis. **Fungal Genet. Biol.**, v. 41, p. 667-675, 2004.

BARBOSA, M. S.; BAO, 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. 74, p. 382-389, 2006.

BENARD, G.; DUARTE, A. J. S. Paracoccidioidomycosis: a model for evaluation of the effects of human immunodeficiency virus infection of the natural history of endemic tropical diseases. **Clin. Inf. Dis.**, v.31, p. 1032-1039, 2000.

BENARD, G.; MENDES-GIANNINI, M. J. S.; JUVENALE, M.; MIRANDA, E. T.; DUARTE, A. J. S. Immunosuppression in paracoccidioidomycosis: T cell hyporesponsiveness to two *Paracoccidioides brasiliensis* glycoproteins that elicit strong humoral immune response. **J. Infect. Dis.**, v.175, p. 1263-1267, 1997.

BLOTTA, M.H.; CAMARGO, Z.P. Immunological response to cell-free antigens of *Paracoccidioides brasiliensis*: relationship with clinical forms of paracoccidioidomycosis. **J. Clin. Microbiol.**, v. 31, p.671-676, 1993.

BORGES-WALMSLEY, M.I.; CHEN, D.; SHU, X.; WALMSLEY, A.R. The pathobiology of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Trends Microbiol.**, v.10, p. 80-7, 2002.

BOTTEON, F. A.; CAMARGO, Z. P.; BERNARD, G.; COELHO, R. F.; CHAMONE, D. A.; ITANO, E. N. *Paracoccidioides brasiliensis*-reactive antibodies in Brazilian blood donors **Med. Mycol.**, v. 40, p. 387-391, 2002.

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

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

BOUCHARA, J.P.; SANCHEZ, M.; CHEVAILLER, A.; MAROT-LEBLOND, A.; LISSITZKY, J.C.; TRONCHIN, G.; CHABASSE, D. Sialic acid-dependent recognition of laminin and fibrinogen by *Aspergillus fumigatus* conidia. **Infect. Immun.**, v. 65, 2717-2724, 1997.

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

CALDERONE, R.A. ***Candida and Candidiasis***. Washington, DC: ASM Press, 2002.

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

CAMARGO, Z.P.; GESZTESI, J.L.; SARAIVA, E.C.O.; TABORDA, C.P.; VICENTINI, A.P.; LOPES, J.D. Monoclonal antibody capture enzyme immunoassay for detection of *Paracoccidioides brasiliensis* antibodies in paracoccidioidomycosis. **J. Clin. Microbiol.**, v. 32, p. 2377-2381, 1994.

CANO, M. I.; CISALPINO, O. S.; GALINDO, I.; RAMIREZ, J. L.; MORTARA, R. A.; SILVEIRA, J. F. Electrophoretic karyotypes and genome sizing of the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 36, p. 742-747, 1998.

CARNEIRO, L.C.; DE FARIA, F.P, FELIPE, M.S.; PEREIRA, M.; DE ALMEIDA SOARES, C.M. *Paracoccidioides brasiliensis* presents two different cDNAs encoding homologues of the fructose 1,6-biphosphate aldolase: protein isolation, cloning of the cDNAs and genes, structural, phylogenetic, and expression analysis. **Fungal Genet. Biol.**, v. 42, p. 51-60, 2005.

CASADEVALL, A.; PIROFSKI, L. Host-pathogen interactions: the attributes of virulence. **J. Infect. Dis.**, v. 184, p. 337-344, 2001.

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

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

COTTER, G.; WEEDLE, R.; KAVANAGH, K. Monoclonal antibodies directed against extracellular matrix proteins reduce the adherence of *Candida albicans* to HEP-2 cells. **Mycopathologia**. v. 141, p. 137-42, 1998.

COULOT, P.; BOUCHARA, J.P.; RENIER, G.; ANNAIX, V.; PLANCHENAU, C.; TRONCHIN, G.; CHABASSE, D. Specific interaction of *Aspergillus fumigatus* with fibrinogen and its role in cell adhesion. **Infect. Immun.**, v. 62, p. 2169-2177, 1994.

COUTINHO, Z. F.; SILVA, D.; LAZERA, M.; PETRI, V.; OLIVEIRA, R. M.; SABROZA, P.C.; WANKE, B. Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980-1995). **Cad. Saude Publica**, v. 18, p. 1441-1454, 2002.

CUNHA, D. A.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R.M.; SUELI, M.; FELIPE, S.; SALEM-IZAAC, S. M.; DEEPE, G. S. Jr.; SOARES C. M. Heterologous expression, purification, and immunological reactivity of a recombinant HSP60 from *Paracoccidioides brasiliensis*. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, v.9, p.374-377, 2002.

DISMUKES, W. E. As micoses: Paracoccidioidomicose. In: GOLDMAN, L.; BENNETT, J. C. **Cecil tratado de medicina interna**. 21. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. v. 3, p. 2082-2083.

ESQUENAZI, D.; DE SOUZA, W.; ALVIANO, C.S.; ROZENTAL, S. The role of surface carbohydrates on the interaction of microconidia of *Trichophyton mentagrophytes* with epithelial cells. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v. 35, p.113-123, 2003.

ESPINDOLA, N. M.; VAZ, A. J.; PARDINI, A. X.; FERNANDES, I. Excretory/secretory antigens (ES) from in-vitro cultures of *Taenia crassiceps cysticerci*, and use of an anti-ES monoclonal antibody for antigen detection in samples of cerebrospinal fluid from patients with neurocysticercosis. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v. 96, p. 361-368, 2002.

FEITOSA, L. S.; CISALPINO, O. S.; SANTOS, M. R.; MORTARA, R. A.; BARROS, T. F.; MORAIS, F. V.; PUCCIA, R.; SILVEIRA, J. F.; CAMARGO, Z.

P.. Chromosomal polymorphism, syntenic relationships, and ploidy in the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **Fungal Genet. Biol.**, v. 39, p. 60-69, 2003.

FELIPE, M.S.; ANDRADE, R.V.; PETROFEZA, S.S. et al. Transcriptome characterization of the dimorphic and pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* by EST analysis. **Yeast.**, v. 20, p. 263-271, 2003.

FERNANDES, G. F.; DEPS, P.; TOMIMORI-YAMASHITA, J.; CAMARGO, Z. P. Ig M e Ig G antibody response to *Paracoccidioides brasiliensis* in naturally infected wild armadillos (*Dasypus novemcinctus*). **Med. Mycol.**, v. 42, p. 363-368, 2004.

FIGUEROA, J. I.; HAMILTON, A. J.; ALLEN, M. H.; HAY, R. Immunohistochemical detection of a novel 22- to 25-kilodalton glycoprotein of *Paracoccidioides brasiliensis* in biopsy material and partial characterization by using species-specific monoclonal antibodies. **J. Clin. Microbiol.**, v. 32, p. 1566–1574, 1994.

FIGUEROA, J. I.; HAMILTON, A. J.; ALLEN, M. H.; HAY, R. Isolation and partial characterization of a *Paracoccidioides brasiliensis* 58 kDa extracellular glycoprotein which is recognized by human immune sera. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 89, p. 566-572, 1995.

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.

FOSTER, T. J.; HOOK, M. Surface protein adhesins of *Staphylococcus aureus*. **Trends Microbiol.**, v. 6, 484-488, 1998.

FRANCO, M. Host-parasite relationships in paracoccidioidomycoses. **J. Med. Vet. Mycol.**, v. 25, p. 5-18, 1986.

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

FRANCO, M.; MONTENEGRO, M. R.; MENDES, R. P.; MARQUES, S. A.; DILLON, N. L.; MOTA, N. G. S. Paracoccidioidomycosis a recently proposed classification of its clinical forms. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.20, p. 129-132, 1987.

FRANCO, M. F. Host-parasite relationship in paracoccidioidomycosis. **J. Med. Vet. Mycol.**, v. 25, p. 548, 1987.

FRANCO, M.F.; MENDES, R.P.; MOSCARDI-BACHI, M. **Bailliere's Clin. Trop. Med. Commun. Dis.**, p.185-220, 1989.

FU, Y.; RIEG, G.; FONZI, W.A.; BELANGER, P.H.; EDWARDS JR., J.E.; FILLER, S.G. Expression of the *Candida albicans* gene ALS1 in *Saccharomyces cerevisiae* induces adherence to endothelial and epithelial cells. **Infect. Immun.**, v. 66, p.1783-1786, 1998.

FU, Y.; IBRAHIM, A.S.; SHEPPARD, D.C.; CHEN, Y.C.; FRENCH, S.W.; CUTLER, J.E.; FILLER, S.G.; EDWARDS JR., J.E. *Candida albicans* Als1p: an adhesin that is a downstream effector of the EFG1 filamentation pathway. **Mol. Microbiol.**, v. 44, p. 61-72, 2002.

FUJITA, H.; MOHRI, H.; KANAMORI, H. et al. Binding site in human plasma fibronectin to HI-60 cells localizes in the C-terminal heparin-binding region independently of RGD and CS1. **Exp. Cell. Res.**, v. 217, p. 484-489, 1995.

FURTADO, G.C.; CAO, Y.; JOINER, K.A. Laminin on *Toxoplasma gondii* mediates parasite binding to the beta 1 integrin receptor alpha 6 beta 1 on human foreskin fibroblasts and chinese hamster ovary cells. **Infect Immun.**, v. 60, p. 4925-4931, 1992.

GARCIA, N. M.; DEL NEGRO, G. M.; HEINS-VACCARI, E. M.; DE MELO, N. T.; DE ASSIS, C. M.; LACAZ, C. S. *Paracoccidioides brasiliensis*, a new sample isolated from feces of a penguin (*Pygoscelis adeliae*). **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, v. 35, p. 227-235, 1993.

GAUR, N.K.; KLOTZ, S.A. Expression, cloning, and characterization of a *Candida albicans* gene, ALA1, that confers adherence properties upon *Saccharomyces cerevisiae* for extracellular matrix proteins. **Infect. Immun.**, v. 65, p. 5289-5294, 1997.

GAUR, N.K.; KLOTZ, S.A.; HENDERSON, R.L. Overexpression of the *Candida albicans* ALA1 gene in *Saccharomyces cerevisiae* results in aggregation following attachment of yeast cells to extracellular matrix proteins, adherence properties similar to those of *Candida albicans*. **Infect Immun.**, v. 67, p. 6040-6047, 1999.

GESZTESI, J. L.; PUCCIA, R.; TRAVASSOS, L. R.; VICENTINI, A. P.; DE MORAES, J. Z.; FRANCO, M. F.; LOPES, J. D. Monoclonal antibodies against the 43,000 Da glycoprotein from *Paracoccidioides brasiliensis* modulate laminin-mediated fungal adhesion to epithelial cells and pathogenesis. **Hybridoma**, v. 15, p. 415-422, 1996.

GEZUELE, E. Aislamiento de *Paracoccidioides* sp de heces de pinguino de la Antártida, res. B2. In: ENCUESTRO INTERNACIONAL SOBRE PARACOCCIDIOIDOMICOSIS, 4., 1989, Caracas. **Resúmenes...** Caracas, 1989. p. 18.

GIL, M.L.; PENALVER, M.C.; LOPEZ-RIBOT, J.L.; O'CONNOR, J.E.; MARTINEZ, J.P. Binding of extracellular proteins to *Aspergillus fumigatus* conidia. **Infect. Immun.**, v. 64, p. 5239-5247, 1996.

GOLDANI, L.Z.; MARTINEZ, R.; LANDELL, G.A.M.; MACHADO, A.A.; COUTINHO, V. Paracoccidioidomycosis in patient with acquired immunodeficiency. **Mycopathologia**, v. 105, p. 71-74, 1989.

GOLDMANN, G.H., DOS REIS MARQUES, E., DUARTE RIBEIRO, D.C. et al. 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, p. 34-48, 2003.

GÓMEZ, B. L.; FIGUEROA, J. I.; HAMILTON, A. J.; ORTIZ, B.; ROBLEDO, M. A.; HAY, R. J.; RESTREPO, A. Use of monoclonal antibodies in diagnosis of paracoccidioidomycosis: new strategies for detection of circulating antigens. **J. Clin. Microbiol.**, v. 35, p. 3278-3283, 1997.

GONZALEZ, A.; GOMEZ, B. L.; DIEZ, S.; HERNANDEZ, O.; RESTREPO, A.; HAMILTON, A. J.; CANO, L. E. Purification and partial characterization of a *Paracoccidioides brasiliensis* proteins with capacity to bind to extracellular matrix proteins. **Infect. Immun.**, v. 73, p. 2486-2495, 2005.

GOZALBO, D.; GIL-NAVARRO, I.; AZORIN, I.; RENAUI-PIQUERAS, J.; MARTINEZ, J.P.; GIL, M.L. The cell wall-associated glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Candida albicans* is also a fibronectin and laminin binding protein. **Infect. Immun.**, v. 66, p. 2052-2059, 1998.

GROSE, E; TAMSITT, J. R. *Paracoccidioides brasiliensis* recovered from the intestinal tract of three bats (*Artibeus lituratus*) in Colombia, S.A. **Sabouraudia**, v. 4, n.2, p. 124 - 125, 1965.

GUARRO, J.; GENÉ, J.; STCHIGEL, A. M. Developments in fungal taxonomy. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 12, p. 454-500, 1999.

HADAD, D.; PIRES, M.F.C.; PETRI, T.C.; ORAZCO, S.F.; MELHEM, M.S.C.; PAES, R.A.C.; MENDES-GIANNINI, M.J.S. *Paracoccidioides brasiliensis* (Lutz 1908) isolado por meio de hemocultura em um paciente portador de imunodeficiência adquirida (SIDA). **Rev.Inst.Med.Trop.**, v. 34, p. 565-567, 1992.

HAMILTON, A.J., JEAUVONS, L., YOUNGCHIM, S., VANITTANATON, N., HAY, R. Sialic acid-dependent recognition of laminin by *Penicillium marneffe* conidia. **Infect. Immun.**, v. 66, p. 6024-6, 1998.

HAMILTON, A.J., JEAUVONS, L., YOUNGCHIM, S., VANITTANATON, N. Recognition of fibronectin by *Penicillium marneffe* conidia via sialic acid-dependent process and its relationship to the interaction between conidia and laminin. **Infect. Immun.**, v. 67, p. 5200-5, 1999.

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

HANNA, S.A.; 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.

HARLOW, E.; LANE, D. **Antibodies: a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1988. 726p.

HEBELER-BARBOSA, F.; MONTENEGRO, M. R.; BAGAGLI, E. Virulence profiles of tem *Paracoccidioides brasiliensis* isolates obtained from armadillos (*Dasypus novemcinctus*). **Med. Mycol.**, v. 41, p. 89-96, 2003.

HOGAN, L.H.; KLEIN, B.S.; LEVITZ, S.M. Virulence factors of medically important fungi. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 9, p. 469-488, 1996.

HUNG, C.Y.; YU, J.J.; SESHAN, K.R.; REICHARD, U.; COLE, G.T. A parasitic phase-specific adhesin of *Coccidioides immitis* contributes to the virulence of this respiratory fungal pathogen. **Infect. Immun.**, v. 70, p.3443-3456, 2002.

IZACC, S.M.; GOMEZ, F.J.; JESUINO, R.S.; FONSECA, C.A.; FELIPE, M.S.; DEEPE, G.S.; SOARES, C.M. Molecular cloning, characterization and expression of the heat shock protein 60 gene from the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **Med. Mycol.**, v. 39, p. 445-455, 2001.

JOHNSON, W. D.; LANG, C. M. Paracoccidioidomycosis (South American blastomycosis) in a squirrel monkey (*Saimiri sciureus*). **Vet. Pathol.**, v. 14, n. 4, p. 368-371, 1977.

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

KLOTZ, S. A. Adherence of *Candida albicans* to components of the subendothelial extracellular matrix. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 68, p. 249-254, 1990.

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

KLOTZ, S. A.; SMITH, R.L.; STEWART, B.W. Effect of an arginine-glycine-aspartic acid-containing peptide on hematogenous candidal infections in rabbits. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 36, p. 132-6, 1992.

KLOTZ, S. A; HEIN, R.C.; SMITH, R.L.; ROUSE, J.B. The fibronectin adhesin of *Candida albicans*. **Infect Immun.**, v. 62, p. 4679-4681, 1994.

KLOTZ, S. A.; RUTTEN, M. J.; SMITH, R. L.; BABCOCK, S. R.; CUNNINGHAM, M. D. Adherence of *Candida albicans* to immobilized

extracellular matrix proteins is mediated by calcium-dependent surface glycoproteins. **Microb. Pathog.**, v. 14, p. 133-147, 1993.

KÖHLER, G.; MILSTEIN, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. **Nature**, v. 256, p. 495-497, 1975.

KOTTOM, T.J.; KOHLER, J.R.; THOMAS, C.F. JR.; FINK, G.R.; LIMPER, A.H. Lung epithelial cells and extracellular matrix components induce expression of *Pneumocystis carinii* STE20, a gene complementing the mating and pseudohyphal growth defects of STE20 mutant yeast. **Infect. Immun.**, v. 71, p. 6463-6471, 2003.

KUROKAWA, C. S.; SUGIZAKI, M. F.; PERACOLI, M. T. Virulence factors in fungi of systemic mycoses. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 40, p. 125-135, 1998.

LACAZ, C.S.; PORTO, E.; MARTINS, J.E.C. **Tratado de micologia médica Lacaz**. São Paulo: SARVIER, 1991. cap. 13. p. 248-297.

LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C.; HEINS-VACCARI, E. M.; MELO, N. T. **Tratado de micologia médica Lacaz**. São Paulo: SARVIER, 2002. cap. 27, p. 639-729.

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

LEÃO, R.C.; MENDES, E. Paracoccidioidomycosis, neoplasia and associated infections. **Allergol. Immunopathol.**, v. 7, p. 185-188, 1980.

LENZI, H.L.; LENZI, J.A.; KERR, I.B.; ANTUNES, S.L.; MOTA, E.M.; OLIVEIRA, D.N. Extracellular matrix in parasitic and infectious diseases. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, v. 86, p. 77-90, 1991.

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.

LIAKRA, K. A.; ARTIO-HARMERNEN, H. Distribution of the extracellular matrix proteins tenascin, fibronectin and vitronectin in fetal infant and adult human spleens. **J. Histochem. Cytochem.**, v. 40, p. 1203-1210, 1992.

LIMA, O.C., FIGUEREDO, C.C., MORANDI, V., LOPES-BEZERRA, L.M. Adhesion of *Sporothrix schenckii* to several extracellular matrix proteins. In: SIMEC – SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE MATRIZ EXTRACELULAR, 5, 1998, **Anais...** Angra dos Reis, RJ, 1998a.

LIMA, O.C., FIGUEREDO, C.C., MORANDI, V., LOPES-BEZERRA, L.M. Binding of the human pathogen *Sporothrix schenckii* to fibronectin and its fragments. In: SIMEC – SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE MATRIZ EXTRACELULAR, 5, 1998, **Anais...** Angra dos Reis, RJ, 1998b.

LONDERO, A. T.; RAMOS, C. D. "Reservárea" da paracoccidiodomicose no Rio Grande do Sul, Brasil. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, v. 14, p. 377-380, 1972.

LOOSE, D. S.; STOVER, E. P.; RESTREPO, A.; STEVENS, D. A.; FELDMAN, D. Estradiol binds to a receptor-like cytosol binding protein and initiates a biological response in *Paracoccidioides brasiliensis*. **Proc. Natl. Acad. Sci USA**, v. 80, p. 7659-7663, 1983.

LOPES, J.D., dos REIS, M.D., BRETANI, R.R. Presence of laminin receptors in *Staphylococcus aureus*. **Science.**, v. 229, p. 275-277, 1985.

LOPEZ-RIBOT, J.L., CASANOVA, M., MONTEAGUDO, C. SEPULVEDA, P., MARTINEZ, J. P. Evidence for the presence of a high-affinity laminin-receptor-like molecule on the surface of *Candida albicans* yeast cells. **Infect. Immun.**, v. 62, p. 742-6, 1994a.

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

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.

MARQUES, S.A.; SHIKANAI-YASUDA, M.A. Paracoccidiodomycosis associated with immunosuppression, AIDS, and cancer. In: FRANCO, M.; LACAZ, C.S.; RESTREPO-MORENO, A.; DEL NEGRO, G. (Ed.). **Paracoccidiodomycosis**. Boca Ratón: CRC, 1994. cap. 30, p. 393-405.

MARQUES, S.A.; CONTERNO, L.O.; SGARBI, L.P.; VILLAGRA, A.M.P.C.; SABONGI, V.P.G.; BAGATIN, E.; GONÇALVES, V.L.C. Paracoccidiodomycosis associated with acquired immunodeficiency syndrome. Report of seven cases. **Rev. Inst. Med. Trop.**, v. 37, p. 261-265, 1995.

MARQUES DA SILVA, S.H.; COLOMBO, A.L.; BLOTTA, M.H.S.L.; LOPES, J.D.; QUEIROZ-TELLES, F.; CAMARGO, Z.P. Detection of circulating gp 43 KDa antigen in serum, cerebrospinal fluid, and bronchoalveolar lavage fluid of patients with paracoccidiodomycosis. **J. Clin. Microbiol.**, v. 41, p. 3675-3680, 2003.

MARQUES DA SILVA, S.H.; QUEIROZ-TELLES, F.; COLOMBO, A.L.; BLOTTA, M. H.S.L.; LOPES, J.D.; CAMARGO, Z.P. Monitoring gp 43 KDa antigenemia in paracoccidiodomycosis patients during therapy. **J. Clin. Microbiol.**, v. 42, p. 2419-2424, 2004.

MATTOS GROSSO, D.; ALMEIDA, S. R.; MARIANO, M.; LOPES, J. D. Characterization of gp 70 and anti-gp 70 monoclonal antibodies in *Paracoccidioides brasiliensis* pathogenesis. **Infect. Immun.**, v. 71, p. 6534-6542, 2003.

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, p. 2153-2157, 2006.

MC EWEN, J. G.; BEDOYA, V.; PATIÑO, M. M.; SALAZAR, M. E.; RESTREPO, A. Experimental paracoccidioidomycosis induced by the inhalation of conidia. **J. Med. Vet. Mycol.**, v. 25, p. 165–175, 1987.

MC EWEN, J. G.; GARCIA, A. M.; ORTIZ, B. L.; BOTERO, S. RESTREPO, A. In search of the natural habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Arch. Med. Res.**, v. 26, p. 305-306, 1995.

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

MCMICHAEL, A. J.; FABRE, J. W. **Monoclonal antibodies in clinical medicine**. London: Academic Press, 1982. 663 p.

MENDES-GIANNINI, M.J.S. Anticorpos monoclonais em micologia médica. In: LACAZ, C.S.; PORTO, E.; MARTINS, J.E.C.; HEINS-VACCARI, E.M.; MELO, N.T. **Tratado de micologia médica Lacaz**. São Paulo: SARVIER, 2002. p. 850-854.

MENDES-GIANNINI, M. J. S.; MELHEM, M. S. C. Infecções fúngicas. In: FERREIRA, A. W.; ÁVILA, S. L. M. **Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imunes**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. cap. 33, p. 377.

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, p. 2842-2845, 1989.

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

MENDES-GIANNINI, M. J.; 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. 8, p. 1550-1559, 2006.

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. 113-123, 2000.

MONTEIRO DA SILVA, J. L. **Aderência, ligação à fibronectina e invasão deparacoccidioides brasiliensis em cultura de células vero.** 2000. 121f. Dissertação (Mestrado em Análises Clínicas), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2000.

MONTENEGRO, M. R.; FRANCO, M. Pathology. In: FRANCO, M.; LACAZ, C. S.; RESTREPO-MORENO, A.; DEL NEGRO, G. (Ed.). **Paracoccidioidomycosis.** Boca Ratón: CRC, 1994. cap. 9, p. 131-150.

MONTOYA, A. E.; MORENO, M. N.; RESTREPO, A.; MCEWEN, J. G. Electrophoretic karyotype of clinical isolates of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Fungal Genet. Biol.**, v. 21, p. 223-227, 1997.

MOREIRA, A. P.; CAMPANELLI, A. P.; CAVASSANI, K. A.; SOUTO, J. T.; FERREIRA, B. R.; MARTINEZ, R.; ROSSI, M. A.; SILVA, J. S. Intercellular adhesion molecule-1 is required for the early formation of granulomas and participates in the resistance of mice to the infection with the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **Am. J. Pathol.**, v. 169, p. 1270-1281, 2006.

MOREIRA, S.F.; BAILAO, A.M.; BARBOSA, M.S.; JESUINO, R.S.; FELIPE, M.S.; PEREIRA, M.; DE ALMEIDA SOARES, C.M. Monofunctional catalase P of *Paracoccidioides brasiliensis*: identification, characterization, molecular cloning and expression analysis. **Yeast.**, v. 21, p. 173-182, 2004.

NAIFF, R. D.; FERREIRA, L. C.; BARRETT, T. V.; NAIFF, M. F.; ARIAS, J. R. Paracoccidioidomycose enzoótica em tatus (*Dasypus novemcinctus*) no Estado do Pará. **Rev. Inst. Méd. Trop. S. Paulo**, v. 28, p. 19-27, 1986.

NEOPHYTOU, P.I.; OZEGBE, P.; HEALEY, D.; QUARTEY-PAPAFIO, R.; COOKE, A.; HUTTON, J. C. Development of a procedure for the direct cloning of T-cell epitopes using bacterial expression systems. **J. Immunol. Methods.** v. 196, p. 63-72, 1996.

NEUHOFF, V.; AROLD, N.; TAUBE, D.; EHRHARDT, W. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. **Electrophoresis**, v. 9, p. 255-262, 1988.

NIELSEN, B.L.; BROWN, L.R. The bases for colored silver protein complex formation in stained polyacrylamide gels. **Anal. Biochem.**, v. 141, p. 311-5, 1984.

NOUGAYREDE, J. P.; FERNANDES, P. J.; DONNENBERG, M. S. Adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to host cells. **Cell Microbiol.**, v. 5, p. 359-372, 2003.

OBARA, M.; KANG, M. S.; YAMADA, K. M. Site-directed mutagenesis of the cell-binding domain of human fibronectin: separable, synergistic sites mediate adhesive function. **Cell**, v. 53, p. 497-504, 1988.

O'FARRELL, P.H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. **J. Biol. Chem.** v.250, p. 4007-21, 1975.

OFEK, I.; KAHANE, I.; SHARON, N. Toward anti-adhesion therapy for microbial diseases. **Trends in Microbiol.**, v. 4, p. 297-299, 1996.

ONO, M. A.; KISHIMA, M. O.; ITANO, E. N.; BRACARENSE, A. P.; CAMARGO, Z. P. Experimental paracoccidioidomycosis in dogs. **Med. Mycol.**, v. 41, p. 265-268, 2003.

PANKOV, R.; YAMADA, K. M. Fibronectin at a glance. **J. Cell. Sci.**, v. 115, p. 3861-3863, 2002.

PATTI, J.M.; ALLEN, B.L.; MCGAVIN, M.J.; HÖÖK, M. MSCRAMM-mediated adherence of microorganisms to host tissues. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 48, p. 585-617, 1994.

PEDRO, R.J.; AOKI, F.H.; BOCCATO, R.S.B.S.; BRANCHINI, M.L.M.; JUNIOR, F.L.G.; PAPAORDANOU, P.M.O.; RAMOS, M.C. Paracoccidioidomycose e infecção pelo vírus da Imunodeficiência humana. **Rev.Inst.Med.Trop.**, v. 31, p. 119-125, 1989.

PENALVER, M.C.; O'CONNOR, J.E.; MARTINEZ, J.P.; GIL, M.L. Binding of human fibronectin to *Aspergillus fumigatus* conidia. **Infect. Immun.**, v. 64, p. 1146-53, 1996.

PENDRAK, M. L.; KRUTZSCH, H. C.; ROBERTS, D. D. Structural requirements for hemoglobin to induce fibronectin receptor expression in *Candida albicans*. **Biochemistry**, v. 39, p. 16110-16118, 2000.

PENDRAK, M. L.; YAN, S. S.; ROBERTS, D. D. Sensing the host environment: recognition of hemoglobin by the pathogenic yeast *Candida albicans*. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 426, p. 148-156, 2004.

PERACOLI, M. T.; SUGIZAKI, M. F.; MENDES, R. P.; NAIFF, R.; MONTENEGRO, M. R. *Paracoccidioides brasiliensis* isolated from armadillos is virulent to Syrian hamsters. **Mycopathologia**, v. 148, p. 123-130, 1999.

PEREIRA, L.A.; PEREIRA, M.; FELIPE, M.S.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R.M.; SOARES, C.M. Proteomic identification, nucleotide sequence, heterologous expression and immunological reactivity of the triosephosphate isomerase of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Microbes Infect.**, v. 6, p. 892-900, 2004.

PERFECT, S.E.; O'CONNELL, R.J.; GREEN, E.F.; DOERING-SAAD, C.; GREEN, J.R. Expression cloning of a fungal proline-rich glycoprotein specific to

the biotrophic interface formed in the *Colletotrichum*-bean interaction. **Plant. J.**, v. 15, p.273-279, 1998.

PIERSCHBACHER, M. D.; RUOSLAHTI, E. Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule. **Nature**, v. 309, p. 30-33, 1984.

PITARCH, A.; SANCHEZ, M.; NOMBELA, C.; GIL, C. Sequential fractionation and two-dimensional gel analysis unravels the complexity of the dimorphic fungus *Candida albicans* cell wall proteome. **Mol Cell Proteomics.**, v. 1, p. 967-982, 2002.

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

RICCI, G.; MOTA, F. T.; WAKAMATSU, A.; SERAFIM, R. C.; BORRA, R. C.; FRANCO, M. Canine paracoccidioidomycosis. **Med. Mycol.**, v. 42, p. 379-383, 2004.

RODRIGUES, M.L.; DOS REIS, F.C.; PUCCIA, R.; TRAVASSOS, L.R.; ALVIANO, C.S. Cleavage of human fibronectin and other basement membrane-associated proteins by a *Cryptococcus neoformans* serine proteinase. **Microb. Pathog.**, v. 34, p. 65-71, 2003.

SA-PEREIRA, P.; DUARTE, J.; COSTA-FERREIRA, M. Electroelution as a simple and fast protein purification method: isolation of an extracellular xylanase from *Bacillus* sp. CCM 966. **Enzyme Microb Technol.**, v. 27, p. 95-99, 2000.

SALAZAR, M. E.; RESTREPO, A.; STEVENS, D. A. Inhibitions by estrogens of conidium-to-yeast conversion in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **Infect. Immun.**, v. 56, p. 711-713, 1988.

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

SHIKANAI-YASUDA, M.A.; ANTEGHINI, H.J.; ARRUDA, E.A.G.; BERNARD, G.; DUARTE, M.I.S.; BARONE, A.A.; AMATO NETO, V. Adenocarcinoma e paracoccidioidomycose. **Rev. Argent. Micol.**, v. 15, p. 67, 1992.

SIDRIM, J. J. C.; OLIVEIRA, F. G. M. Micoses profundas: paracoccidioidomycose. In: SIDRIM, J. J. C.; MOREIRA, J. L. B. **Fundamentos clínicos e laboratoriais da micologia médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. cap. 14, p. 154-156.

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

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

SOUZA, E. B.; LOPES, J. D.; ALMEIDA, S. R. B and T cell responses elicited by monoclonal anti-idiotypic antibody (Ab2b) mimicking gp43 from *Paracoccidioides brasiliensis*. **Clin. Exp. Immunol.**; v.137, p.123–128, 2004.

SOUZA, A.R.; GESZTESI, J.L.; MORAES, J.Z.; CRUZ, C.R.; SATO, J.; MARIANO, M.; LOPES, J.D. Evidence of idiotypic modulation in the immune response to gp43, the major antigenic component of *Paracoccidioides brasiliensis* in both mice and humans. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 114, p. 40-48, 1998.

SOUZA, A.R.; GESZTESI, J.L.; DEL NEGRO, G.M.; BENARD, G.; SATO, J.; SANTOS, M.V.; ABRAHAO, T.B.; LOPES, J.D. Anti-idiotypic antibodies in patients with different clinical forms of paracoccidioidomycosis. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, v. 7, p. 175-181, 2000.

STAAB, J.F.; BRADWAY, S.D.; FIDEL, P.L.; SUNDSTROM, P. Adhesive and mammalian transglutaminase substrate properties of *Candida albicans* Hwp1. **Science**, v. 283, p.1535-1538, 1999.

STOVER E. P.; SCHAR, G.; CLEMONS, K. V.; STEVENS, D. A.; FELDMAN, D. Estradiol-binding proteins from mycelial and yeast-form cultures of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Infect. Immun.**, v. 51, p. 199-203, 1986.

STRAUSS, A. H.; FREYMULLER, E.; TRAVASSOS, L. R.; TAKAHASHI, H. K. Immunochemical and subcellular localization of the 43 kDa glycoprotein antigen of *Paracoccidioides brasiliensis* with monoclonal antibodies. **J. Med. Vet. Mycol.**, v. 34, p. 181-186, 1996.

STUDIER, F.W. Analysis of bacteriophage T7 early RNAs and proteins on slab gels. **J. Mol. Biol.**, v. 79, p. 237-48, 1973.

SULLIVAN, D.J.; MORAN, G.P.; PINJON, E.; AL-MOSAID, A.; STOKES, C.; VAUGHAN, C.; COLEMAN, D.C. Comparison of the epidemiology, drug resistance mechanisms, and virulence of *Candida dubliniensis* and *Candida albicans*. **FEMS Yeast Res.**, v. 4, p. 369-376, 2004.

SUZUKI, E.; TOLEDO, M. S.; TAKAHASHI, H. K.; STRAUS, A. H. A monoclonal antibody directed to terminal residue of beta-galactofuranose of a glycolipid antigen isolated from *Paracoccidioides brasiliensis*: cross-reactivity

with *Leishmania major* and *Trypanosoma cruzi*. **Glycobiology**, v. 7, p. 463-468, 1997.

TANAKA, R.; SANO, A.; FRANCO, M.; BAGAGLI, E.; MONTENEGRO, M. R.; NISHIMURA, K.; MIYAJI, M. Cerebriform colonies of *Paracoccidioides brasiliensis* isolated from nine-banded armadillos (*Dasypus novemcinctus*) at room temperature. **Mycoses**, v. 44, p. 9-12, 2001.

TRAVASSOS, L. R.; PUCCIA, R.; CISALPINO, P.; TABORDA, C.; RODRIGUES, E. G.; RODRIGUES, M.; SILVEIRA, J. F.; ALMEIDA, I. C. Biochemistry and molecular biology of the main diagnostic antigen of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Arch. Med. Res.**, v. 26, p. 297-304, 1995.

TOWBIN, H., STACHELIN, T., GORDON, J. Eletrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. Procedure and some applications. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 76, p. 4350-52, 1979.

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.

VERGARA, M. L.; MARTINEZ, R. Role of the armadillo *Dasypus novemcinctus* in the epidemiology of paracoccidioidomycosis. **Mycopathologia**, v. 144, p. 131-133, 1998.

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.**, vacabou a. 62, p. 1465-1469, 1994.

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

WANKE, B.; LONDERO, A. T. Epidemiology and paracoccidioidomycosis infection. In FRANCO, M.; LACAZ, C. S.; RESTREPO, A. et al. (eds.): **Paracoccidioidomycosis.** Boca Raton: CRC Press, 1994, p. 109-120.

WASYLNKA, J.A.; MOORE, M.M. Adhesion of *Aspergillus* species to extracellular matrix proteins: evidence for involvement of negatively charged carbohydrates on the conidial surface. **Infect. Immun.**, v. 68, p.3377-3384, 2000.

YAN, S.; RODRIGUES, R. G.; ROBERTS, D. D. Hemoglobin-induced binding of *Candida albicans* to the cell-binding domain of fibronectin is independent of the Arg-Gly-Asp sequence. **Infect. Immun.**, v. 66, p.1904-1909, 1998.

YANG, Z.; JAECKISCH, S.M.; MITCHELL, C.G. Enhanced binding of *Aspergillus fumigatus* spores to A549 epithelial cells and extracellular matrix proteins by a component from the spore surface and inhibition by rat lung lavage fluid. **Thorax.**, v.55, p.579-584, 2000.

8. ARTIGO

ISOLATION AND PARTIAL CHARACTERIZATION OF FIBRONECTIN-BINDING PROTEIN FROM *Paracoccidioides brasiliensis*

Author: Fabiana Cristina Donofrio

Co-authors: Ana Carolina Alvarez Calil

Elaine Toscano Miranda

Gil Benard**

Maria José Soares Mendes Giannini*

Departamento de Análises Clínicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Unesp, Araraquara, SP, Brazil.

Laboratório de Dermatologia e Imunodeficiências, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, SP, Brazil. **

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

Tel.: +55 (16) 33016556

Fax: +55 (16) 33016547

Address: Rua Expedicionários do Brasil, 1621.

Araraquara - São Paulo - Brazil

CEP - 14801-902

E-mail: giannini@fctar.unesp.br

ABSTRACT

Paracoccidioides brasiliensis yeast cells can enter mammalian cells and probably manipulate the host cell environment to favor their own growth and survival. Fibronectin, as well as, other ECM proteins, was also recognized by various components of *P. brasiliensis* extracts. Thus, the present study was designed to isolate, characterize an adhesin fibronectin-binding and produced its antiserum. Besides that, we compare Pb18 strain, before (18a) and after animal inoculation (18b), both cultured in different medium, in relation to adhesion and invasion process. Extracts from Pb18a and 18b samples cultured in blood agar solid and liquid medium showed higher levels of protein expression than that from samples cultured on Fava Netto solid medium, when SDS-PAGE and two-dimensional electrophoresis gels were compared. Ligand affinity binding assays showed that a protein of 54 kDa, pI 5.6 was evident in all *P. brasiliensis* cell-free extracts and had properties of adhesin fibronectin-binding. Pb18a and 18b cultured in medium with blood exhibited significant differences ($P < 0,05$) in relation to adhesion for 1 h, 3 h and 10 h when compared with 18a and 18b cultured in common medium (Fava Netto). The serum anti-54 kDa abolished 80 % of *P. brasiliensis* binding activity. *P. brasiliensis* independent of the culture medium produces this adhesin and it can be inhibited by specific antibody, influencing in the adhesion of the fungus to the pulmonary cells. This serum may be an important adjuvant in the treatment of the disease.

Keywords: *Paracoccidioides brasiliensis*, extracellular matrix, adhesins, epithelial cells.

1. Introduction

Paracoccidioidomycosis (PCM) is one of the most prevalent human systemic mycoses in Latin America caused by the dimorphic fungus *P. brasiliensis* [1]. The disease primarily involves the lungs and then disseminates, arising from the lymphohematogenic dissemination of the fungus. Secondary lesions frequently appear in the mucous membranes, skin, lymph nodes, and adrenals. Two main clinical forms are recognized: the acute or subacute form (juvenile type) and the chronic form (adult type) [2]. The existence of different clinical forms of this disease and the occurrence of asymptomatic infection may be a result of host-related factors, immunological status and characteristics of the infecting agent, mainly its virulence [3].

The successful colonization of the host by this fungus is, therefore, a complex event, generally involving ligands coded by the pathogen (adhesins) and cell receptors. The identification of these molecules would represent a step towards the discovery of efficient treatments for systemic mycoses. It is known that during hematogenic dissemination, such interactions of this nature constitute the first stages in the development of innumerable infectious diseases [4].

The ability of this fungus to adhere several components of the extracellular matrix (ECM) including laminin, fibronectin, type I and IV collagens was investigated and may involve colonization and establishment of the infection [5].

Adhesins have been described in *P. brasiliensis* [6-10]. Previous studies have shown the presence of a laminin receptor on the surface of the Pb yeast

form and gp 43, which has been shown to behave as an adhesin molecule [10,11]. Other fungal components has also role in the adhesion process [12]. Recently, a *P. brasiliensis* adhesin of 30 kDa, with capacity of binding to the laminin was isolated. This protein was more expressed in *P. brasiliensis* isolate, which exhibited higher adhesion capacity. The monolayer treatment with the laminin adhesins (30 and 43 kDa) inhibited the *P. brasiliensis* adhesion to epithelial cells [6]. *P. brasiliensis* also presents in its cellular surface two proteins with 32 and 19 kDa molecular masses that they interact with different MEC proteins, such as laminin, fibronectin and fibrinogen [8]. The *P. brasiliensis* recombinant protein 3-gliceraldeyde phosphate dehydrogenase (GAPDH) was capable to binding to laminin, collagen I and fibronectin. Either treatment of *P. brasiliensis* yeast forms with anti-GAPDH or treatment of pneumocytes with recombinant GAPDH leads to the inhibition of the fungal infection to epithelial cells [7]. Paracoccin, a recently described adhesion, was also able to interact with laminin in a dose-dependent manner. This interaction was inhibited by GlcNAc, followed by D-glucose and D-mannose, but not by D-galactose, N-acetyl-galactosamine or L-fucose [13].

The ECM composition varies in different tissues and during phases of injury, inflammation, and repair [14]. Fibronectin is a disulfide-linked dimeric glycoprotein present in a soluble form in blood plasma and other body fluids and in a fibrillar form in ECM. The major function of fibronectin is probably related to its ability to mediate adhesion to mammalian cells, a process that involves the binding of specific cell surface receptors to discrete domains in the fibronectin molecule [15,16]. Previous studies has shown that *P. brasiliensis* cell-free components (Pb 18a or 18b) adhered differently to 40 kDa and 120 kDa

fibronectin fragments and Pb18b interacted significantly with the 120 kDa fragment [5].

The present study was designed to isolate, characterize an adhesin fibronectin-binding and produced its antiserum. Besides that, we compare Pb18 strain, before (18a) and after animal inoculation (18b), both cultured in different medium, in relation to adhesion and invasion process.

2. Materials and methods

2.1. Microorganism

Strain 18 of *P. brasiliensis* (Pb18) was isolated from a clinical case of paracoccidioidomycosis (PCM) and maintained at the Faculty of Medicine of the University of Sao Paulo (FM-USP), Brazil. Pb18 was grown in Fava Netto medium at 35 °C and subcultured each 7 days, 72 times, to yield sample Pb18a. Pb18 was inoculated into male hamster intratesticularly, and after 30 days the animal was sacrificed and testicles macerated and cultured on Sabouraud agar with chloramphenicol at 25 °C until the development of characteristic *P. brasiliensis* mycelial colonies [6]. These were identified and incubated at 35 °C in Fava Netto medium, to obtain the yeast phase, and the resulting sample was labeled Pb18b.

2.2. Cell-free extracts

Cell-free extracts were prepared from the 18a and 18b isolates in yeast form, as described elsewhere [17]. Both samples were cultured on Fava Netto solid medium and Blood Agar solid and liquid (BHI) medium with 5 % sheep blood.

2.3. Anti-cell-free and anti-54 kDa polyclonal sera

Polyclonal antisera to *P. brasiliensis cell-free* antigen (Pb18b) and 54 kDa fraction were generated by immunizing rabbits with intradermal injections of 1.0 ml of antigens (respectively, 1.2 and 1.0 mg/ml) mixed with 1.0 ml of Freund's complete adjuvant. Subsequent injections of extract or fraction mixed with incomplete adjuvant were given weekly for a period of 4 weeks and then monthly for a period of 3 months. The rabbits were bled 7 days after the last dose. The immunoglobulin fractions of the both sera were separated by precipitation with ammonium sulfate and stored at $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.4. Fractionation and purification of fibronectin-binding adhesins from *P. brasiliensis*

Previous, the 18a and 18b samples were cultured on Fava Netto solid medium, blood base agar solid and liquid (BHI) medium with 5 % sheep blood. *Cell-free* extracts were prepared from both samples in yeast form and was further semi-purified in gelatin-agarose affinity column (BIORAD). The fractions

semi-purified were pooled and dialyzed against the phosphate-buffered saline (PBS 0.01 M; pH 7.4) overnight, then analyzed by SDS-PAGE (using 10 % gels) and immunoblotting. The 54 kDa fraction was further purified by electroelution [18,19].

2.5. Epithelial cells

The type II pneumocyte cell line A549 was obtained from the American Type Culture Collection (Manassas, VA). The cells were seeded overnight in HAM F-12 Nutrient (Cultilab, Brazil), supplemented with 10 % heat-inactivated fetal calf serum (Cultilab, Brazil) at 36.5 °C.

2.6. Assay of *P. brasiliensis*-mammalian cell interaction

Cultures of type II pneumocyte cell line A549 obtained from the American Type Culture Collection (Manassas, VA) were maintained in HAM F-12 Nutrient (Cultilab, Brazil) supplemented with 10 % heat-inactivated fetal calf serum (Cultilab, Brazil). Cells were cultured at 36.5 °C in 24-well plates, with the well-bottoms covered with coverslips, and adjusted to 1.0×10^6 cells per well. Next, 1.0×10^6 yeast cells per ml of *P. brasiliensis* (18a and 18b isolates cultivated on Fava Netto solid medium and Blood Base Agar solid with 5 % sheep blood) were added to the epithelial cells and incubated for from 30 min, 1 h, 3 h, 5 h, 8 h, 10 h, 24 h and 48 h at 36.5 °C, to observe adhesion, total infection and invasion process. After each period of incubation, the medium was discarded, the cells washed with PBS and the coverslips fixed with 2 % paraformaldehyde

and stained in May Grünwald–Giemsa. The coverslips were examined by conventional microscopy and the adherent fungal cells were counted and a graph produced, to evaluate the kinetics of interaction of *P. brasiliensis* with cell line A549. All experiments were performed in triplicate. The mean and \pm S.D. of at least three separate experiments were determined. Statistical analysis was calculated by using Student's *t* test data. *P* values of 0.05 or less were considered statistically significant.

2.7. Two-dimensional electrophoresis protein separation

The Pb18a extract partially purified was submitted to isoelectric focusing, as described by O'Farrell [20]. The second dimension was performed on a 5–15 % gradient polyacrylamide gel, as described by Laemmli [21]. Gels were loaded with the proteins in sample buffer, containing 9.5 M urea, 1.6 % (v/v) ampholines 5.0–8.0, 0.4 % (v/v) ampholines 3.5–10.0, 2 % (v/v) non-ionic detergent Nonidet P-40, 5.0 % (v/v) *b*-mercaptoethanol. The strips were treated for 30 min with equilibration buffer (0.08 M Tris–HCl pH 6.0, 5 % (v/v) *b*-mercaptoethanol, 2.3 % (w/v) sodium dodecyl sulfate (SDS), 1 % (v/v) glycerol, 0.01 % (w/v) bromophenol blue). The second dimension was performed on a 5–15 % gradient polyacrylamide gel, as described by Laemmli [21]. Gels were washed and the proteins stained with Coomassie blue [22].

2.8. Affinity ligands assays

The Pb 18a *cell-free* extracts, from liquid (BHI) medium with and without 5% sheep blood, were characterized by immunoblotting, as well as one of the fractions, containing the Pb18a semi-purified fraction from BHI medium with 5 % sheep blood. Blotted proteins were assayed for fibronectin as follows. The membranes were incubated with 1 % BSA in 10 mM PBS (pH 7.4) containing 0.9 % NaCl for 4 h at room temperature and then for 90 min in PBS-T-BSA (PBS, 1 % BSA, 0.05 % Tween 20) containing fibronectin (30 µg/ml). After washing four times (10 min each time) in PBS buffer containing 0.05 % Tween 20 (PBS-T buffer), the sheets were incubated for 1 h with either rabbit anti-fibronectin antibody (diluted 1:1000). As control, the blots were incubated with anti-fibronectin, in the absence of ECM protein (fibronectin). The positive controls were developed with a PCM patient serum (1:20) and anti-*P. brasiliensis cell-free* (1:20) serum.

2.9. Biotinylation of the protein

Pb18a *cell-free* extracts, liquid (BHI) medium or from blood agar base content 5 % sheep blood, were biotinylated with the ECL protein biotinylation kit (Amersham Pharmacia Biotech) as recommended by the manufacturer. Monolayers of A549 cells were incubated with the biotinylated protein at 37 °C, overnight and washed with PBS, to remove unbound protein. Next, double-distilled water was added and the cells incubated for 4 h at room temperature, to obtain total lysis. The lysates were centrifuged at 1400 × g for 5 min, and the

supernatant was submitted to electrophoresis by SDS-PAGE. Proteins in the gel were transferred to a membrane of nitrocellulose and the membrane strips were incubated with blocking buffer (PBS-T with 2 % BSA) for 4 h at room temperature. Supernatants of lysed pulmonary cells (without incubation with the biotinylated protein) were used as controls. Patterns were revealed with a kit, the Catalyzed Signal Amplification (CSA) System (DAKO).

2.10. Inhibition assays

The serum anti-54 kDa fraction was employed in the adherence inhibition assay. A standard suspension of *P. brasiliensis* (18a and 18b samples cultivated on Fava Netto solid medium and blood base agar solid with 5 % sheep blood) was incubated for 1 h at 37 °C with rabbit preimmune serum or rabbit anti-54 kDa serum diluted 1:100 in PBS (pH 7.2). After this incubation, 300µL of each sample was transferred to the plate coated with epithelial cells and incubated for 2 and 5 h at 37 °C, as described above. As positive control, epithelial cells were assayed with *P. brasiliensis* without previous treatment and as a negative control it was included. The percentage of infected cells was determined by randomly counting a minimum of 300 cells on each duplicate coverslip, and experiments were repeated at least three times. The adhesion index was calculated by multiplying the mean number of attached fungi per pneumocyte cell by percentage of infected cells, observed by microscopic examination with an oil-immersion objective. The invasion index was determined in the same way, but using the number of internalized fungi [23]. All experiments were performed in triplicate. The median and \pm S.D. of at least

three separate or independent experiments were determined. Statistical analysis was calculated by using Student's *t* test data. *P* values of 0.05 or less were considered statistically significant.

2.11. Statistical analysis

The results of the interaction of *P. brasiliensis* (18a and 18b samples cultivated on Fava Netto solid medium and blood base agar with 5 % sheep blood) with cell line A549 are expressed as mean \pm standard deviations and the results of the adherence inhibition assays are expressed as median \pm standard deviations. Statistical comparisons were performed using Student's *t* test data. Statistical significance was accepted for $P < 0.05$.

3. Results

3.1. Electrophoresis analysis of *P. brasiliensis* cell-free extracts

Extract from Pb 18b, from Fava Netto solid medium, showed a higher total protein expression than Pb18a (Figure 1A). On the other hand, both (18a and 18b) extracts, from the samples cultured in medium with blood, showed a higher proteins expression when compared with the same samples cultured in common medium (Fava Netto) or medium without blood (solid base agar and BHI medium). The highly expressed proteins, in the 18b and 18a isolates, had 100, 76, 67, 54 and 30 kDa as demonstrated in Figure 1B. The protein of 54 kDa was expressed in both samples when cultured on blood medium.

Apparently, culturing in blood medium has the same effect as animal passage with respect to 54 kDa expression. For this reason all subsequent experiments were performed with the Pb18a isolate cultured on liquid (BHI) medium with blood.

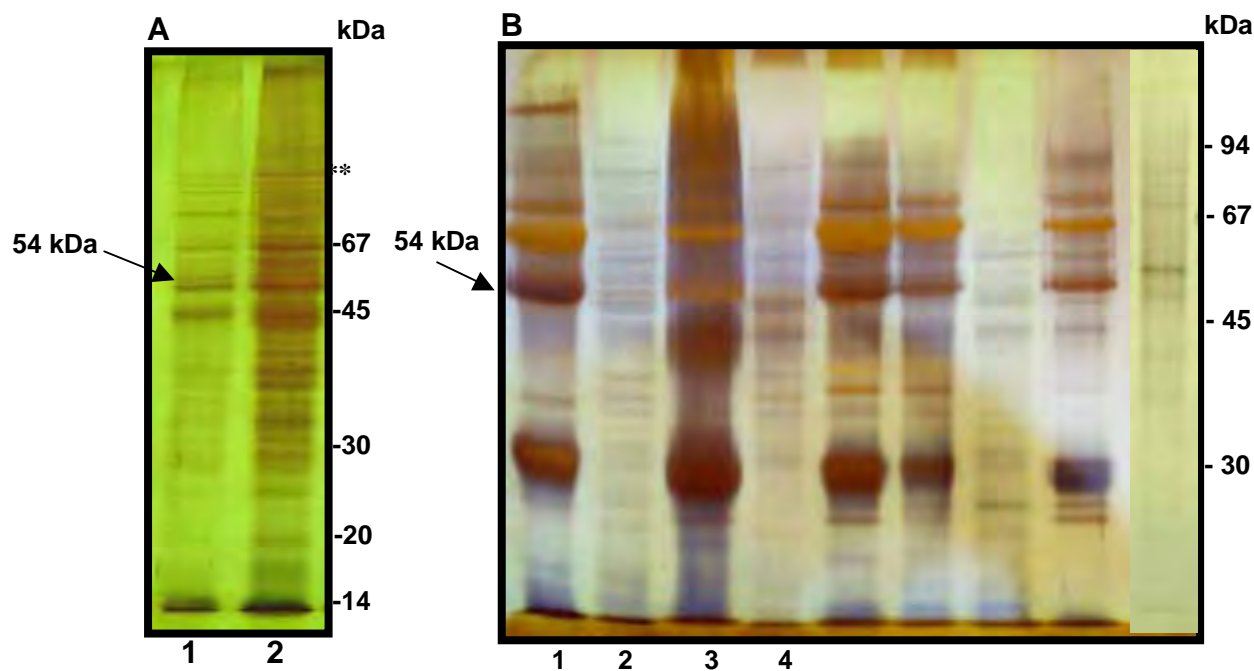


Fig. 1. A. SDS-PAGE of *P. brasiliensis* cell-free antigens of isolate 18 before Reisolation (18a) cultured on Fava Netto solid medium and after reisolation (18b) cultured on Fava Netto solid medium stained with silver stain. **B.** SDS-PAGE of *P. brasiliensis* cell-free extract from two samples cultured in different mediums. **(1)** Pb18a sample cultured on blood base agar with 5% blood; **(2)** 18a cultured without blood; **(3)** 18a cultured on liquid (BHI) medium with 5% blood; **(4)** 18a cultured on liquid (BHI) medium without blood; **(5)** 18b sample cultured on blood base agar with 10% blood; **(6)** with 5% sheep blood; **(7)** 18b cultured without blood; **(8)** 18b cultured on liquid (BHI) medium with 5% sheep blood; **(9)** 18b cultured on liquid (BHI) medium without blood.

3.2. Characterization of adhesin-like proteins

Various proteins (72, 60, 58, 54, 50, 43 and 26 kDa) from Pb18a extract were able to bind to fibronectin when cultured on liquid (BHI) medium with 5 % blood, and when this isolate was cultured without blood a small number of proteins (58, 54 and 50 kDa) retained the capacity to bind to this ECM component (data not shown). The proteins of 67, 64, 60, 58 and 54 kDa behaved as adhesins, binding to the pulmonary cells in the biotinylation experiment (Figure 2). An additional adhesin of 67 kDa appeared in *cell-free* extract, from solid medium with blood (Figure 2A).

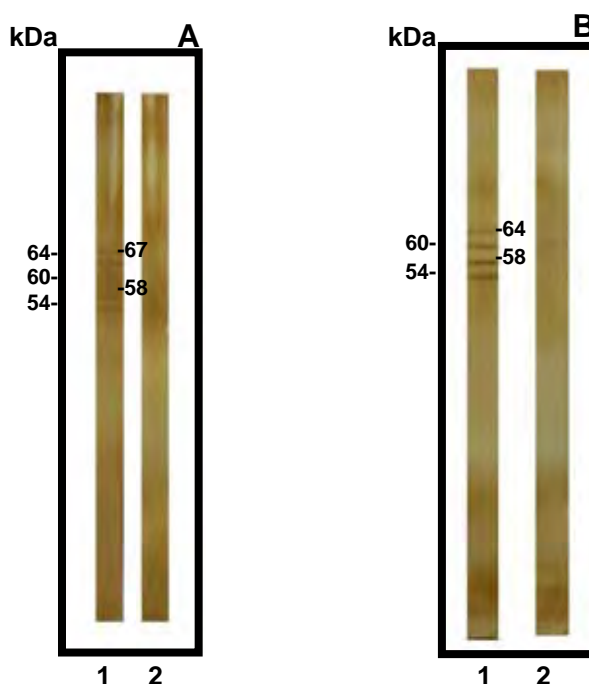


Fig. 2. Characterization of some proteins from *cell free* extracts as adhesins. **(1A)** Lysed pulmonary cells treated with biotinylated *cell-free* extracts from Pb18a sample cultured on blood agar medium **(2A)** Negative control: lysed pulmonary cells not treated with biotinylated extracts. **(1B)** Lysed pulmonary cells treated with biotinylated *cell-free* extracts from Pb18a cultured on liquid

(BHI) medium with 5 % blood. **(2B)** Negative control: supernatant of lysed pulmonary cells without treatment with biotinylated extracts.

3.2. Two-dimensional electrophoresis analysis of *P. brasiliensis* cell-free extracts

The cell-free extract from the Pb18a sample, cultured in BHI medium with 5% blood, was fractionated in gelatin-agarose affinity column. After, the fraction was analyzed by two-dimensional gel electrophoresis and a higher protein expression of 60 kDa protein of pI 6.3, 58 kDa and pI 5.9 and 54 kDa of pI 5.6 was demonstrated as in Figure 3A. These proteins display the capacity to bind to fibronectin (Figure 3B).

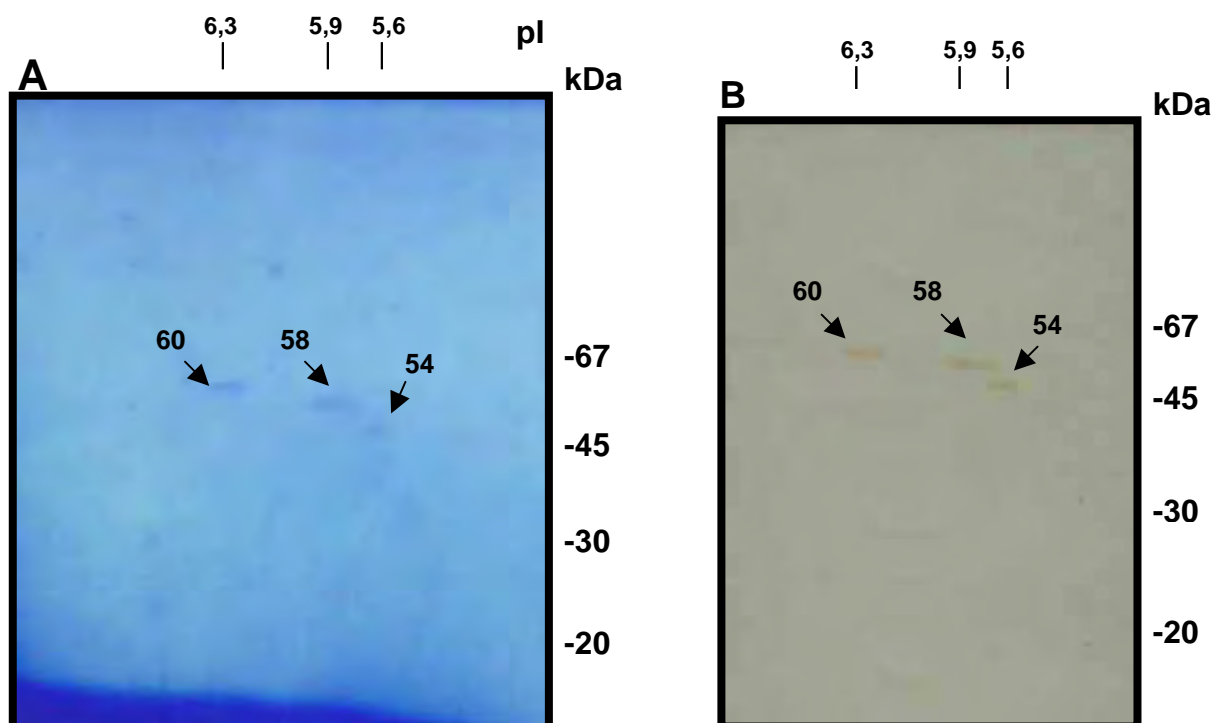


Fig. 3. A. Two-dimensional gel electrophoresis of partially purified fraction from Pb18a sample cultured in liquid (BHI) medium with 5 % blood after fractionated

in gelatin-agarose affinity column. Gel stained with Coomassie brilliant blue G250. The arrow points to the proteins of 60 kDa of pI 6.3; 58 kDa of pI 5.9; and 54 kDa of pI 5.6. **B.** *Immunoblotting* of the same fraction, treated with fibronectin and anti-fibronectin serum and peroxidase conjugate anti-rabbit immunoglobulin G.

3.5. Fractionation, purification of the 54 kDa protein by electro-elution and reactivity of antiserum

After electrophoresis analysis, the protein of 54 kDa was removed from the gel and submitted to the electro-elution protein purification method. The supernatant was analyzed by two-dimensional electrophoresis and the 54 kDa protein had an isoelectric point of 5.6 (Figure 4A). The purified protein was used to generate polyclonal antibody. A pool of cell-free extracts from the Pb18a and 18b cultivated in 5 % blood medium and the purified protein were subjected to SD-PAGE analysis, blotted to nitrocellulose membrane and reacted to the polyclonal antibody (Figure 4B). As demonstrated, a single band of 54 kDa reacted with the purified protein and *P. brasiliensis* cell-free extract (Figure 4B, lanes 1 and 2). No cross-reactivity to the rabbit preimmune serum was evidenced.

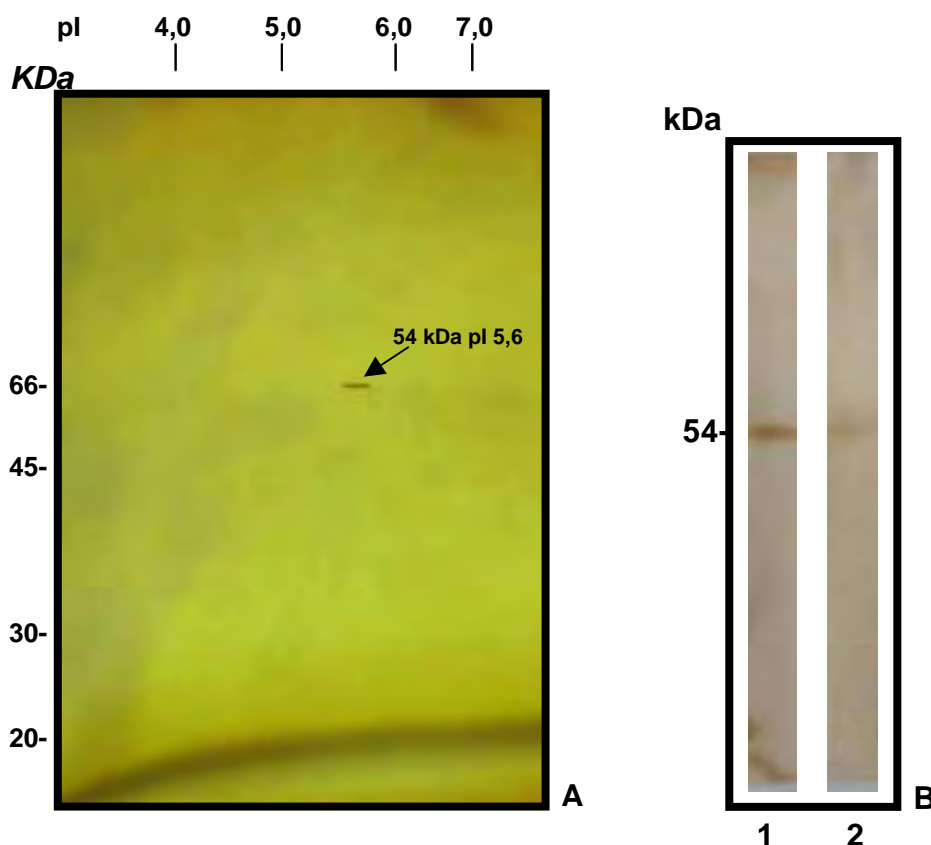


Fig. 4. A. Analysis of the 54 kDa protein by two-dimensional gel electrophoresis after electro-elution purification method. **B.** *Immunoblotting* analysis the purified protein and *P. brasiliensis* cell-free extract. Purified protein (1) and a pool cell-free extracts of the 18a and 18b cultivated in 5 % of blood (2) were fractioned by one-dimensional gel electrophoresis, blotted onto a nitrocellulose membrane and detected by using rabbit polyclonal anti 54 kDa antibody.

3.6. Kinetics of interaction of *P. brasiliensis* with epithelial cell culture

P. brasiliensis adhesion was observed, after 30 min of contact, with both Pb18a and 18b. However, both samples exhibited numerical differences in relation to adhesion, as demonstrated in Figure 5 A-B, independently of the medium. Sample 18b was able to adhere to pulmonary cells more efficiently than 18a.

Pb18a and 18b cultured in blood medium exhibited significant numerical differences in adhesion process ($P < 0.05$) when compared 18a and 18b samples cultured in common medium (Fava Netto) as demonstrated in Figure 5 C-D.

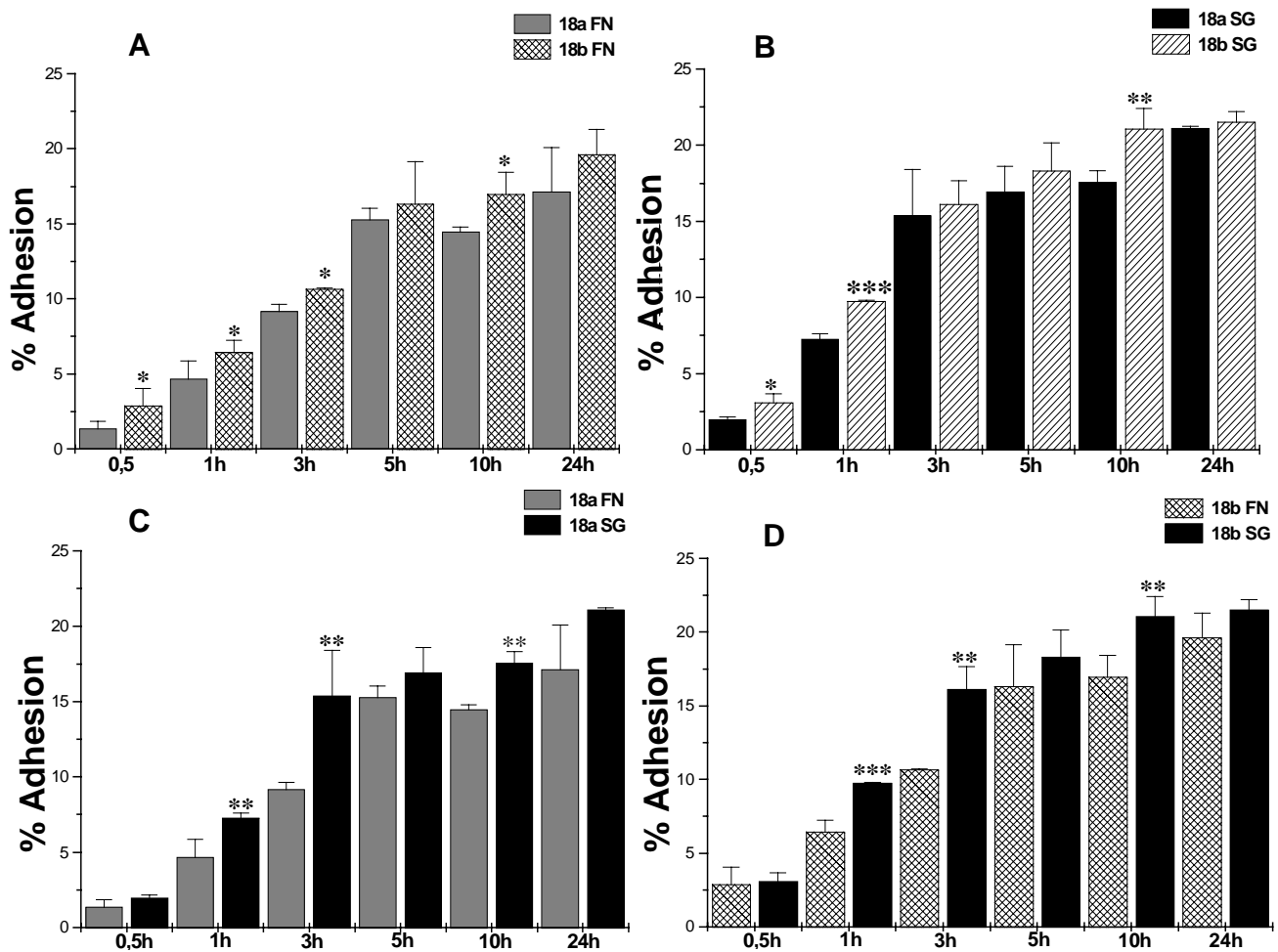


Fig. 5. Percentage of A549 cells showing yeast adhesion (histograms) plotted against incubation time (hours) with Pb18a and 18b samples cultured in common medium (Fava Netto) or blood medium. Data represent means and standard deviations of three independent experiments. One asterisk denotes values statistically different from samples ($p < 0,05$), two asterisks denote $P < 0,01$ and three asterisks $P < 0,001$. **18a FN:** Pb18a subcultured on Fava Netto solid medium; **18b FN:** Pb18b after reisolation from animal cultivated on Fava

Netto solid medium; **18a SG**: Pb18a subcultured on blood base agar with 5 % blood; **18b SG**: Pb18b after reisolation from animal cultured on blood base agar with 5 % blood.

3.7. Inhibition of interaction of *P. brasiliensis* with epithelial cell by specific serum

The adhesion and invasion indices obtained following the interaction of *P. brasiliensis* yeast cells, pretreated with rabbit polyclonal anti-54 kDa antibody, with A549 cells were compared with the control (less pretreated with anti-54 kDa antibody), to calculate the percentage of adhesion and invasion inhibition by this polyclonal antiserum (Figure 6). Both Pb18a and Pb18b samples pretreated with anti-54 kDa antibody after 2 h and 5 h, irrespective of the culture medium employed, markedly inhibited (up to 82 %) the interaction with the pulmonary cells as well as the invasion process (~ 45 %). No inhibition was observed with rabbit preimmune serum.

When Pb18a cultivated on Fava Netto solid medium was compared with Pb18a cultured on blood, as well as, Pb18b, the inhibition of adhesion and invasion were also similar to that described above.

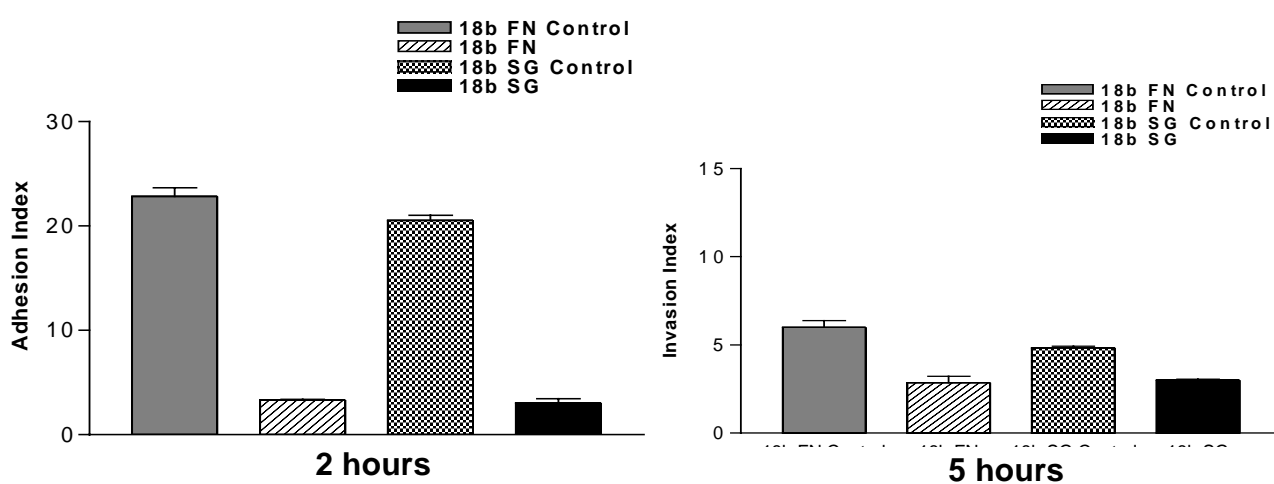
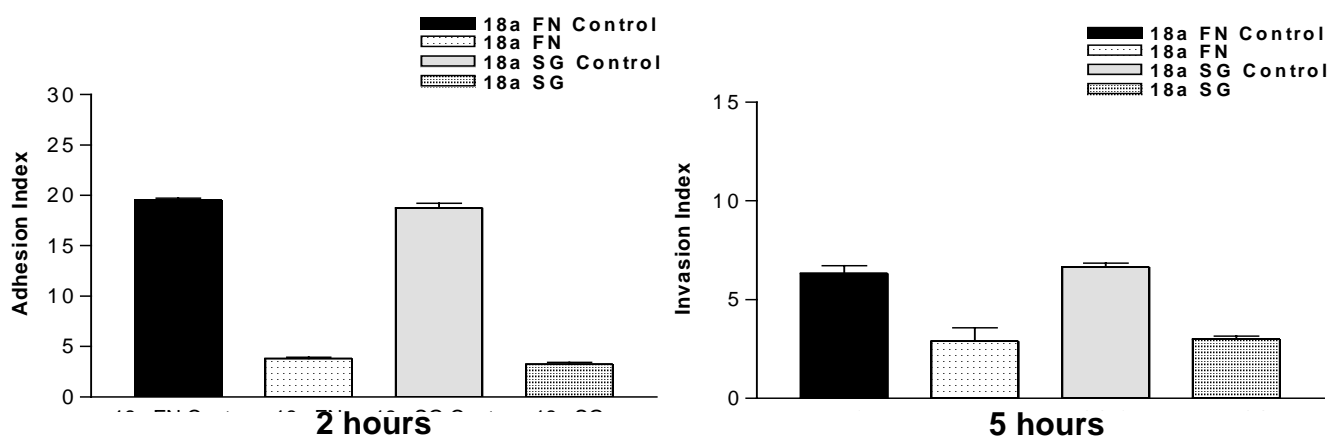
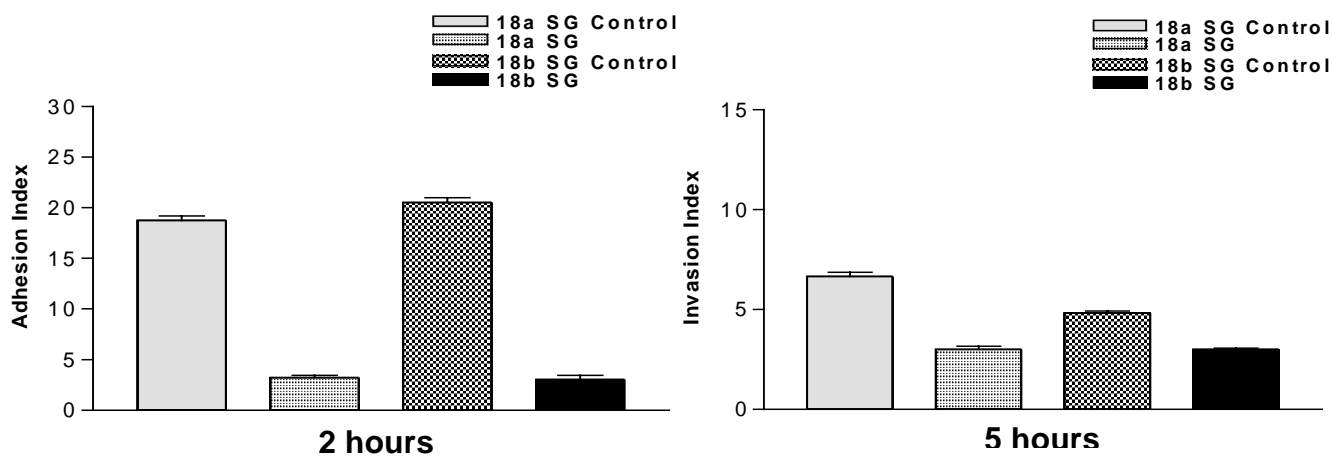
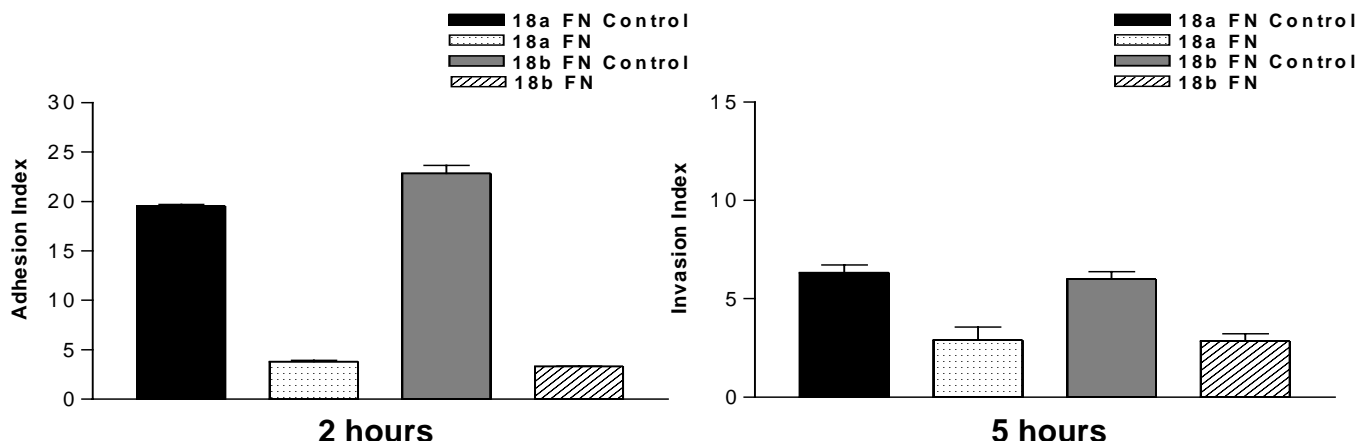


Fig. 6. Assay of inhibition of the interaction between *P. brasiliensis* yeast cells (pretreated with polyclonal anti-54 kDa antibody) and A549 cells. Pb18a and 18b were pretreated or not (control) for 1 h with antiserum, before the interaction with pulmonary cells for 2 and 5 h. Data represent median and standard deviations of three independent experiments. **18a FN:** Pb18a subcultured on Fava Netto solid medium; **18b FN:** Pb18b after reisolation from animal cultured on Fava Netto solid medium; **18a SG:** Pb18a subcultured on 5 % blood; **18b SG:** Pb18b after reisolation from animal cultured on 5 % blood. **C+:** Positive control (epithelial cells with each one of suspension of *P. brasiliensis* without previous treatment).

4. Discussion

The virulence factors of *P. brasiliensis* are not completely understood. Many pathogenic microbes, like *P. brasiliensis*, have multiple virulence factors that can damage the host and thus contribute to an overall virulence phenotype for that organism. Specific characteristic of this fungus that may play a critical role in infection include cell-wall composition (α - 1,3 glucan), ability to grow at 37 °C, dimorphism, production of 43 kDa glycoproteins (gp 43), proteinases, and the ability to adhere to host tissues [24-26]. On the other hand, long periods of repeated subculturing of this fungal leads to loss of its pathogenicity, which can be reestablished after animal inoculation [6,27]. In this study was designed to isolate and characterize adhesin fibronectin-binding related to the capacity of this fungus to adhere to the host by comparing *P. brasiliensis* samples, taken before (18a) and after (18b) animal inoculation and cultured on Fava Netto's medium and on blood base agar medium and liquid (BHI) medium with 5 % blood. There are studies in literature indicating that hemoglobin supplemented

into a chemically defined medium induces the expression of adhesin fibronectin-binding [28-30]. Thus, the differential expression of proteins of *P. brasiliensis* was compared using common media and media with 5 % blood. Analysis by SDS-PAGE showed that the *P. brasiliensis* extracts expressed proteins ranging from 106 to 12 kDa. When Pb18a and 18b samples were cultured on medium with 5 % blood, a higher protein expression was observed when compared with the same samples cultured in common medium (Fava Netto) or medium without blood (solid base agar and BHI medium). The subsequent experiments were developed using the Pb18a sample cultured on liquid (BHI) medium with 5 % blood, as all proteins, including gp 43, was more expressed in this medium. The proteins of 100, 76, 67, 54 and 30 kDa (18a) and 76, 67, 54 and 30 kDa (18b) were more expressed. The 54 kDa protein was expressed by both samples when cultured on blood, as well as in other isolates, mainly 113 and 339 strains (data not shown). Apparently, the use of media with blood has a similar effect to animal passage.

The *cell-free* extracts of Pb18a cultured in BHI medium with 5 % blood were fractionated and analyzed by two-dimensional electrophoresis and ligand affinity binding assays. One of the fractions was rich in three proteins: one with 60 kDa of *pI* 6.3, one with 58 kDa and *pI* 5.9 and one with 54 kDa of *pI* 5.6. These had properties of fibronectin-binding adhesins. Further purification was made and we isolated and characterized a protein of 54 kDa and *pI* of 5.6 that is highly expressed in Pb18a and 18b when cultivated on medium with 5 % blood. This protein behaves as a fibronectin binding adhesin, but not to the other extracellular matrix components (ECM), such as laminin, I and IV collagen. The ability of some fungi to adhere to host surfaces and components

of the ECM is an important factor in pathogenesis. Therefore, ligand proteins of fibronectin can contribute to the pathogenesis of the infection by mediating adhesion to host's ligands and maintenance of fungi in tissues. From these results, we suggest that *P. brasiliensis* may use this protein to adhere to and invade host cells, probably acting a virulence factor. The pathogen may regulate adhesin expression so as to survive and to produce illness. In *P. brasiliensis*, some adhesins have been described and it is believed that all can play important roles in pathogenesis [6-11]. Although *P. brasiliensis* is considered an extracellular pathogen, the fibronectin (Fn) binding adhesions may also mediate invasion of cells, such as demonstrated in some bacteria, the adhesins FnBPA and -B crucially determine interaction of *S. aureus* with endothelial cells *in vivo* and *in vitro* [31,32]. Further experiments may provide evidence of the role of 54 kDa fibronectin-ligand in invasion process.

We also aimed to study the factors involved in the adherence by comparing Pb18a and Pb18b cultivated on Fava Netto's medium and solid base agar medium with 5 % blood. Our experiments with A549 cells revealed that the Pb18b cultivated on Fava Netto's medium and on medium with 5 % blood was capable to adhere to and to invade more efficiently than Pb18a in both media. These data confirm the findings of Andreotti [6] and Mendes-Giannini [9]. *P. brasiliensis* was able to adhere to the epithelial cells after 30 minutes, with the high virulence strain [33] being more efficient than the low virulence one, consistent with the data presented here [9,11]. Pb18a and 18b cultured in medium with blood exhibited significant differences ($P < 0,05$) in relation to adhesion for 1 h, 3 h and 10 h when compared with 18a and 18b cultured in common medium (Fava Netto). On the other hand, Pb18a cultured in the blood

media has the adhesion profile similar to Pb18b, showing the hemoglobin component is important to higher expression of proteins involved in the adhesion. Previous, Yan [28] demonstrated that hemoglobin in defined medium induces the expression of a specific receptor in *C. albicans* that interacts with the cell-binding domain of fibronectin, but not by the collagen-binding or fibrin I domain. Therefore, hemoglobin both induces FN binding and changes the relative affinities of *C. albicans* for the cell- and collagen-binding domains of FN. Pendrak [29] also demonstrated that hemoglobin is a host factor that induces expression of a promiscuous receptor on *Candida albicans* for fibronectin and several other extracellular matrix proteins. The fibronectin is a multifunctional protein, synthesized for epithelial and endothelial cells, and found in corporal fluids, conjunctive tissue, basal membrane among others, that plays an important role in the adhesion and in the cellular migration [34], as demonstrated in this study. These results demonstrate that *P. brasiliensis* can adhere, invade and multiplied in epithelial cells, indicating mechanisms of survival and virulence and that the recognition of the fibronectin could be the first step in the attack, migration and subsequent invasion.

In this work, inhibition of the adhesion of *P. brasiliensis* to the epithelial cell cultures was achieved by using rabbit polyclonal 54 kDa antibody. This antiserum abolished 82 % of the binding activity of *P. brasiliensis*, irrespective of the medium and sample used. Previously, gp 43 antiserum also inhibited the adhesion of this fungus to Vero cells [11]. Future studies are envisaged with, the use of both anti-sera as an attempt to abolish the infective process.

P. brasiliensis surface molecules that bind to host cell receptors during adhesion and invasion may be of interest for developing vaccines and receptor-

blocking therapies. *P. brasiliensis* independent of the culture medium produced this adhesin and it can be inhibited by specific antibody, influencing in the adhesion of the fungus to the pulmonary cells. This serum may be an important adjuvant in the treatment of the disease.

5. Acknowledgements

This investigation was financially supported by FAPESP, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), CAPES and FCF-UNESP. We thank Elaine Toscano Miranda and Rosângela Aparecida Moraes da Silva for their technical assistance.

6. References

- [1] E. Brummer, E. Castaneda, A Restrepo, Paracoccidioidomycosis: an update, *Clin. Microbiol. Rev.* 6 (1993) 89–117.
- [2] M. FRANCO, M.R. MONTENEGRO, R.P. MENDES, S.A. MARQUES, N.L. DILLON, N.G.S. MOTA, Paracoccidioidomycosis a recently proposed classification of its clinical forms, *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 20 (1987) 129-132.
- [3] M. Franco, C.S. Lacaz, A. Restrepo-Moreno, G. Del Negro, Paracoccidioidomycosis, in: CRC Press, Boca Raton, 1994.
- [4] I. Ofek, I. Kahane, N. Sharon, Toward anti-adhesion therapy for microbial diseases, *Trends in Microbiol.* 4 (1996) 297-299.
- [5] M.J.S. Mendes-Giannini, C.P. Soares, J.L.M. da Silva, P.F. Andreotti, Interaction of pathogenic fungi with host cells: Molecular and cellular approaches, *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 45 (2005) 383-394.
- [6] P.F. Andreotti, J.L.M. da Silva, A.M. Bailão, C.M. de Almeida Soares, G. Benard, C.P. Soares, M.J.S. Mendes-Giannini, Isolation and partial characterization of a 30 kDa adhesin from *Paracoccidioides brasiliensis*, *Micr. Infect.* 7 (2005) 875-881.

- [7] M.S. Barbosa, S.N. Bao, P.F. Andreotti, F.P. de Faria, M.S. Felipe, L. dos Santos Feitosa, M.J.S. Mendes-Giannini, C.M. Soares, Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Paracoccidioides brasiliensis* is a cell surface protein involved in fungal adhesion to extracellular matrix proteins and interaction with cells, *Infect. Immun.* 74 (2006) 382-389.
- [8] A. Gonzalez, B.L. Gomez, S. Diez, O. Hernandez, A. Restrepo, A.J. Hamilton, L.E. Cano, Purification and partial characterization of a *Paracoccidioides brasiliensis* proteins with capacity to bind to extracellular matrix proteins, *Infect. Immun.* 73 (2005) 2486-2495.
- [9] M.J.S. Mendes-Giannini, P.F. Andreotti, L.R. Vincenzi, J.L.M. da Silva, H.L. Lenzi, G. Benard, R. Zancope´-Oliveira, H.L. Matos Guedes, C.P. Soares, Binding of extracellular matrix proteins to *Paracoccidioides brasiliensis*, *Microbes and Infection* 8 (2006) 1550-1559.
- [10] A.P. Vicentini, J.L. Gesztesi, M.F. Franco, W. Souza, J.Z. Moraes, L.R. Travassos, J.D. Lopes, Binding of *Paracoccidioides brasiliensis* to laminin through surface glycoprotein gp43 leads to enhancement of fungal pathogenesis, *Infect. Immun.* 62 (1994) 1465–1469.
- [11] S.A. Hanna, J.L. Monteiro da Silva, M.J.S. Mendes-Giannini, Adherence and intracellular parasitism of *Paracoccidioides brasiliensis* in Vero cells, *Microbes Infect.* 2 (2000) 1–8.
- [12] M.J.S. Mendes-Giannini, M.L. Taylor, J.B. Bouchara, E. Burger, V.L.G. Calich, E.D. Escalante, S.A. Hanna, H.L. Lenzi, M.P. Machado, M. Miyaji, J.L. Monteiro Da Silva, E.M. Mota, A. Restrepo, S. Restrepo, G. Tronchin, L.R. Vincenzi, C.F. Xidieh, E. Zenteno, Pathogenesis II: fungal responses to host responses: interaction of host cells with fungi, *Med. Mycol.* 38 (2000) 113–123.
- [13] K.C. Coltri, A.S.C. Fortunato, M.L.G. Cardoso, C.F. Pinzan, L.P. Ruas, V.S. Mariano, J.C.R. Martinez, A. Panunto-Castelo, M.C. Roque-Barreira, Paracoccin, a GlcNac-binding lectin from *Paracoccidioides brasiliensis*, binds to laminin and induces TNF- α production by macrophages, *Microb. Infect.* 8 (2006) 704-713.
- [14] T.J. Kottom, J.R. Kohler, C.F. Jr. Thomas, G.R. Fink, A.H. Limper, Lung epithelial cells and extracellular matrix components induce expression of *Pneumocystis carinii* STE20, a gene complementing the mating and pseudohyphal growth defects of STE20 mutant yeast, *Infect. Immun.* 71 (2003) 6463-6471.
- [15] E. Pearlstein, L.I. Gold, A. Garcia-Pardo, Fibronectin: a review of its structure and biological activity, *Mol. Cell. Biochem.* 29 (1980) 103–128.
- [16] E. Ruoslahti, Fibronectin and its receptors, *Annu. Rev. Biochem.* 57 (1988) 375–413.

- [17] M.H.S. Blotta, Z.P. Camargo, Immunological response to cell-free antigens of *Paracoccidioides brasiliensis*: relationship with clinical forms, *J. Clin. Microbiol.* 31 (1993) 671–676.
- [18] P.I. Neophytou, P. Ozegbe, D. Healey, R. Quartey-Papafio, A. Cooke, J.C. Hutton, Development of a procedure for the direct cloning of T-cell epitopes using bacterial expression systems, *J. Immunol. Methods.* 196 (1996) 63-72.
- [19] P. Sa-Pereira, J. Duarte, M. Costa-Ferreira, Electroelution as a simple and fast protein purification method: isolation of an extracellular xylanase from *Bacillus* sp. CCMI 966, *Enzyme Microb Technol.* 27 (2000) 95-99.
- [20] P.H. O'Farrell, High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins, *J. Biol. Chem.* 250 (1975) 4007–4021.
- [21] U.K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227 (1970) 680–685.
- [22] V. Neuhoff, N. Arold, D. Taube, W. Ehrhardt, 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* 9 (1988) 255–262.
- [23] D. Esquenazi, W. de Souza, C.S. Alviano, S. Rozental, The role of surface carbohydrates on the interaction of microconidia of *Trichophyton mentagrophytes* with epithelial cells, *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 30 (2003) 113–123.
- [24] F. San-Blas, G. San-Blas, Biochemistry of *Paracoccidioides brasiliensis* dimorphism, in *Paracoccidioidomycosis*, M. Franco, C.S. Lacaz, A. Restrepo-Moreno, G. Del Negro (Eds), Boca raton, CRC Press, London, 1994, pp. 49-66.
- [25] C.S. Kurokawa, M.F. Sugizaki, M.T. Peracoli, Virulence factors in fungi of systemic mycoses, *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 40 (1998) 125-135.
- [26] L.H. Hogan, B.S. Klein, S.M. Levitz, Virulence factors of medically important fungi, *Clin. Microbiol. Rev* 9 (1996) 469-488.
- [27] E. Brummer, A. Restrepo, L.H. Hanson, D.A. Stevens, Virulence of *Paracoccidioides brasiliensis*: the influence of in vitro passage and storage, *Mycopathologia* 109 (1990) 13–18.
- [28] S. Yan, R.G. Rodrigues, D.D. Roberts, Hemoglobin-induced binding of *Candida albicans* to the cell-binding domain of fibronectin is independent of the Arg-Gly-Asp sequence, *Infect. Immun.* 66 (1998) 1904-1909.
- [29] M.L. Pendrak, H.C. Krutzsch, D.D. Roberts, Structural requirements for hemoglobin to induce fibronectin receptor expression in *Candida albicans*, *Biochemistry* 39 (2000) 16110-16118.

- [30] M.L. Pendrak, S. Yan, D.D. Roberts, Sensing the host environment: recognition of hemoglobin by the pathogenic yeast *Candida albicans*, Arch. Biochem. Biophys. 426 (2004) 148-156.
- [31] Y.A. Que, J.A. Haefliger, L. Piroth, P. François, E. Widmer, J.M. Entenza, B. Sinha, M. Herrmann, P. Francioli, P. Vaudaux, P. Moreillon, Fibrinogen and fibronectin binding cooperate for valve infection and invasion in *Staphylococcus aureus* experimental endocarditis, J. Exp. Med. 201 (2005) 1627–1635.
- [32] A. Schröder, B. Schröder, B. Roppenser, S. Linder, B. Sinha, R. Fässler, M. Aepfelbacher, *Staphylococcus aureus* fibronectin binding protein-A induces motile attachment sites and complex actin remodeling in living endothelial cells, Mol. Biol. Cell 17 (2006) 5198–5210.
- [33] L.M. Singer-Vermes, E. Burger, M.J. Franco, M. Moscardi Bachi, M.J.S. Mendes-Giannini, V.L.G. Calich, Evaluation of the pathogenicity and immunogenicity of seven *Paracoccidioides brasiliensis* isolates in susceptible inbred mice, J. Med. Vet. Mycol. 27 (1989) 71-82.
- [34] R. Pankov, K.M. Yamada, Fibronectin at a glance, J. Cell. Sci. 115 (2002) 3861-3863.