



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

Aline Raquel Voltan

**“Avaliação de moléculas de adesão e da via endocítica na  
interação *Paracoccidioides brasiliensis*-células do hospedeiro”**

**Araraquara**

**2008**

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

Aline Raquel Voltan

**“Avaliação de moléculas de adesão e da via endocítica na  
interação *Paracoccidioides brasiliensis*-células do hospedeiro”**

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

Orientadora: Profa. Dra. Maria José Soares Mendes Giannini

**Araraquara**

**2008**

## **Ficha Catalográfica**

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

Voltan, Aline Raquel

V935a      Avaliação de moléculas de adesão e da via endocítica na interação  
*Paracoccidioides brasiliensis*-células do hospedeiro. / Aline Raquel Voltan.  
– Araraquara, 2008.  
93 f.

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

1. *Paracoccidioides brasiliensis*. 2. Células epiteliais. 3. Macrófagos.  
4. Micologia clínica. I. Giannini, Maria José Soares Mendes, orient.  
II. Título.

# Dedicatória

## À Deus

Senhor, se eu não puder ser o desejo. Que eu seja o que desejas de mim. Se eu não puder ser a árvore que dá frutos. Que eu seja o arbusto que dá sombra. Se eu não puder ser o rio que inunda a terra. Que eu seja a fonte de dá de beber. Se eu não puder ser uma estrela no céu. Que eu seja uma luz que anima as esperanças. Se eu não puder ser o teto que abriga a todos. Que eu seja a porta que se abre a quem bate. Se eu não puder ser a roseira carregada. Que eu seja o perfume de uma flor. Se eu não puder ser o livro que ensina. Que eu seja a palavra que comove. Se eu na puder ser toda a bondade do mundo. Que eu seja bom como todo mundo espera. Se eu não puder ser o sorriso que encanta. Que eu seja a impressão que ele deixa.

Padre Orlando Gambi

## À minha família

Aos meus pais que souberam dosar os mimos me ensinando o valor do trabalho. Souberam me educar na humildade e simplicidade, respeitando o próximo e me dedicou todo amor do mundo.

A minha avó Cida e minha tia Maria pelo amor, carinho e preocupação. Amo vocês!!!

**À Profa. Dra. Maria José Soares Mendes Giannini**

Por me dar à oportunidade de aprender, a oportunidade de adquirir conhecimento em diversas metodologias até então desconhecidas. Obrigada por confiar na minha capacidade para desenvolver este trabalho e também por vibrar diante de cada resultado e assim motivar o desenvolvimento deste. Obrigada pelo incentivo, confiança, paciência, compreensão e respeito com que me tratou esses anos. Tenho profunda admiração por você!!!

## **Agradecimentos**

Ao Prof. Dr. Henrique L. Lenzi, por transmitir conhecimento a todo momento, pelos passeios culturais pelo Rio, por tantas gentilezas, paciência e humildade! E principalmente pela grandiosa colaboração com este trabalho.

À amiga Rosângela (Rô) pela paciência em passar seu conhecimento, pela ajuda nos momentos de dificuldade, por nunca negar ajuda durante a realização deste trabalho. Não poderia esquecer de agradecer pelas comidas maravilhosas preparadas, mesmo não sendo os meus pratos preferidos! Ah, e também pelas boas risadas, CLARO!!!

À amiga Elaine (Tosca) por ser meu "pé de coelho" na revelação dos "blots". Por seu incentivo, ajuda e paciência, e principalmente pelo conforto, sem contar o conhecimento transmitido no decorrer destes anos. Adoro você!

À Profa. Marisa Fusco pela prontidão e boa vontade em colaborar sempre!!!

Aos amigos da micologia: Carol (Carol T.....!!!), Fabiana, Fernada, Haroldo, Julhiany, Liliana (Lili por nossas distrações!), Marcelo (pelas leituras no citômetro!!!), Roberta (por me atormentar o tempo todo!), Tatiane (pelos eventos, claro!!!), Jú pitica e Ana Carolina (Pi) (pelas baladas!!!). Amiguinhos, daqui a pouco, nós, futuros mestres, mestres, futuros doutoures e doutoures, teremos uma tese para poder pegar!!!

À Profa. Dra. Elisabeth L. Pizzolitto, pessoa pela qual tenho muita admiração e agradeço a generosidade de permitir e colaborar para que eu pudesse realizar este trabalho.

À Benedita Reis de Abreu (Benê) por colaborar nas pequenas coisas, que por fim foram grandiosas e também por me incentivar sempre! Ah, também por alegrar nossos dias de trabalho com seu bom humor!!!

À Profa. Maria Nazaré Soeiro por nos ajudar nos momentos de dúvida e incertezas e também por nos ceder alguns anticorpos.

À Profa. Christiane P. Soares por colaborar nas técnicas e também estar sempre à disposição para tirar minhas dúvidas de citologia!!!

Aos agregados da micologia: Bel da Cito (Obrigada pela colaboração!!!) Marisinha da Imuno (Obrigada pelas dicas!!!), Rosemira, Eliana e Tirene.

Às amigas de república: Lílian (pelos nossos passeios pelas cidades da região e por cuidar de minhas enfermidades!), Natália, Daniele e Beth (pela companhia nas madrugadas!).

Às meninas da limpeza, Neide e Fran, por me fazer companhia nos feriados prolongados, aos sábados e também nas madrugadas! Aos amigos do NAC, Flavia Pavarina, Márcia Vanucci e Tânia Navarro, e também as amigas da portaria (Luzia, Márcia, Angélica e Rita).

À Plataforma de Microscopia Confocal - Fiocruz (Marcelo, Bernardo e Pedro) que nos ajudaram nas imagens e foram sempre receptivos e gentis!

À Fapesp e PADC pelo apoio financeiro.



## SUMÁRIO

Resumo .....	13
Abstract .....	15
1. Introdução.....	17
2. Fundamentação Teórica .....	17
2.1 <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> : características Gerais .....	17
2.2 Espécies de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> .....	19
2.3 Interação <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> e células .....	20
2.3.1 Adesão de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> .....	20
2.3.2 Invasão de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> .....	23
2.3.3 Via endocítica .....	25
3. Objetivos .....	33
3.1 Objetivo geral .....	33
3.2 Metas Específicas .....	33
4. Materiais e métodos .....	34
4.1 Microrganismo .....	34
4.2 Preparação de anticorpos anti - <i>P. brasiliensis</i> .....	34
4.2.1 Extrato <i>cell-free</i> .....	34
4.2.2 Produção de anticorpos policlonais anti- <i>cell free</i> .....	34
4.2.2.1 Soro anti- <i>cell-free</i> de <i>P. brasiliensis</i> .....	34
4.3 Cultura Celular .....	35
4.3.1 Cultura de células epiteliais .....	35
4.3.2 Cultura de macrófagos .....	35
4.4 Infecção de células epiteliais e macrófagos por <i>P. brasiliensis</i> .....	36
4.4.1 Preparo e padronização do inoculo .....	36
4.4.2 Períodos de infecção .....	37
4.4.3 Reação de Imunofluorescência .....	37
4.5 Imunomarcção das proteínas celulares .....	38
4.5.1 Proteínas de junções celulares .....	38
4.5.2 Proteínas de ancoramento intracelular .....	38
4.5.3 Proteínas da via endocítica .....	38
4.6 Imunoblot .....	39

4.7	Imunomarcção de <i>P. brasiliensis</i> .....	41
5.	Resultados .....	42
5.1	Imunomarcção das proteínas de junções nas células A549 .....	42
5.1.1	Junções Oclusivas.....	42
5.1.2	Junções Aderentes .....	43
5.1.3	Junções Comunicantes .....	44
5.1.4	Proteína de ancoramento intracelular .....	45
5.2.	Imunomarcção das proteínas endossomais nas células A549 infectadas e não-infectadas com <i>P. brasiliensis</i> .....	46
5.2.1	Endossomo precoce .....	47
5.2.1.1	Clatrina .....	47
5.2.1.2	Rab5 .....	47
5.2.1.3.	EEA1 .....	48
5.2.2	Endossomo tardio .....	49
5.2.3	Lisossomo .....	54
5.3.	Imunomarcção das proteínas endossomais nos macrófagos AMJ2-C11 infectados e não-infectados com <i>P. brasiliensis</i> .....	57
5.3.1	Endossomo precoce .....	57
5.3.1.1	Clatrina .....	57
5.3.1.2	EEA1 .....	58
5.3.2	Endossomo Tardio .....	59
5.3.3	Lisossomo .....	62
5.4	Expressão de proteínas em <i>P. brasiliensis</i> .....	65
6.	Discussão .....	69
7.	Conclusões .....	76
8.	Referências Bibliográficas .....	77

## LISTA DE FIGURAS

<b>Lista de Figuras</b>	<b>Pág.</b>
Figura 1: Junções Oclusivas .....	22
Figura 2: Junções Aderentes .....	22
Figura 3: Proteínas de ancoramento intracelular .....	22
Figura 4: Vias de entrada nas células .....	25
Figura 5: Função da Rab GTPases .....	28
Figura 6: Células epiteliais A549 - Controle dos anticorpos secundários Alexa Fluor®.....	42
Figura 7: Células A549 marcadas com soro anti-claudina e conjugado marcado com Alexa Fluor® 488.....	43
Figura 8: Células epiteliais A549 marcadas com soro anti-caderina e anticorpo secundário Alexa Fluor® 594 .....	44
Figura 9: Células epiteliais A549 marcadas com soro anti-vinculina e conjugado Alexa Fluor® 594.....	45
Figura 10: Células epiteliais A549 marcadas com soro anti-talina e conjugado Alexa Fluor® 594.....	46
Figura11: Células epiteliais A549 marcadas com soro anti-clatrina e conjugado Alexa Fluor® 488.....	47
Figura 12: Reação de Imunoblot revelado com anticorpo anti- Rab5.....	48
Figura 13: Reação de Imunoblot revelado com anticorpo anti-EEA1.....	49
Figura 14: Células epiteliais A549 infectadas (CI) e não-infectadas (CNI) por 3h com <i>P. brasiliensis</i> imunomarcadas com soro anti-Rab7.....	50
Figura 15: Células epiteliais A549 infectadas (CI) e não-infectadas (CNI) por 5h com <i>P. brasiliensis</i> imunomarcadas com anti-Rab7.....	51
Figura 16: Células epiteliais A549 infectadas (CI) e não-infectadas (CNI) com <i>P. brasiliensis</i> por 8h marcadas com anti-Rab7.....	52
Figura 17: Células epiteliais A549 infectadas (CI) e não-infectadas (CNI) com <i>P. brasiliensis</i> por 24h marcadas com anti-Rab7.....	53
Figura 18: Reação de Imunoblot revelado com anticorpo anti-Rab7.....	54
Figura 19: Células epiteliais A549 infectadas e não-infectadas com <i>P. brasiliensis</i> por 3h (A – C) e 5h marcadas com anti-LAMP-1(D –	

F).....	55
Figura 20: Células A549 Células epiteliais A549 infectadas (CI) e não-infectadas (CNI) com <i>P. brasiliensis</i> por 24h imunomarcadas com anti-LAMP-1.....	56
Figura 21: Reação de Imunoblot revelado com anticorpo anti-LAMP-1.....	57
Figura 22: Macrófagos infectados e não-infectados por 5h com <i>P. brasiliensis</i> imunomarcados com anti-clatrina.....	58
Figura 23: Reação de Imunoblot revelada com anticorpo anti-EEA1.....	59
Figura 24: Macrófagos AMJ2-C11 infectados (CI) e não-infectados (CNI) com <i>P. brasiliensis</i> por 5h imunomarcados com soro anti-Rab7.....	60
Figura 25: Macrófagos AMJ2-C11 infectados (CI) e não-infectados (CNI) com <i>P. brasiliensis</i> por 10h (A – C) e 24h (D – F) marcados com anti-Rab7.....	61
Figura 26: Reação de Imunoblot revelado com anticorpo anti-Rab7...	62
Figura 27: Macrófagos AMJ2-C11 infectados (CI) e não-infectados (CNI) com <i>P. brasiliensis</i> por 3h (A e B) 10h (C e D) marcados com anti-LAMP-1.....	63
Figura 28: Macrófagos AMJ2-C11 infectados e não-infectados com <i>P. brasiliensis</i> por 24h marcados com anti-LAMP-1.....	64
Figura 29: Reação de Imunoblot revelado com anticorpo anti-LAMP-1.....	65
Figura 30: Imunomarcção de <i>P. brasiliensis</i> com soro anti-clatrina...	66
Figura 31: Imunomarcção de <i>P. brasiliensis</i> com soro anti-Rab7 e anti-LAMP-1.....	67

## LISTA DE ABREVIATURAS

g	Gravidade
pH	Potencial hidrogeniônico
D.O.	Densidade ótica
PBS	Tampão salina fosfato
PBS-T	PBS-Tween-20
MEC	Matriz extracelular
GAPDH	Glicose-6-fosfato desidrogenase
TPI	Triose fosfato isomerase
JAM	Moléculas de adesão juncional
CAR	Receptor do coxsackievirus e adenovírus
PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinase
GTP	Guanosina trifosfato
GDP	Guanosina difosfato
LAMP-1	Proteína 1 de membrana associada a lisossomo
LIMPs	Proteínas integral de membrana lisosomal
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular
VCAM-1	Molécula de adesão celular vascular
CD18	<i>clusters differentiation 18</i>
Mac-1	<i>Macrophage-1 antigen</i>
CR3	Receptor para complemento 3
CD71	Receptor de transferrina
SDS-PAGE	Dodecilsulfato de sódio – Eletroforese em gel de poliacrilamida
SFB	Soro fetal bovino
BSA	Soro albumina bovina
FITC	anti-IgG conjugado com isotiocianato de fluoresceína
TRITC	anti-IgG conjugado com isotiocianato de tetrametil rodamina
PMSF	Fenilmetilsufonil fluoreto
ECL <sup>TM</sup>	<i>Enhance chemiluminescence</i>
EEA1	<i>Early Endosome antigen 1</i>
3D	Tridimensional
PCM	Paracoccidioidomicose

rDNA	DNA ribossômico
Mb	Megabase
CI	Célula infectada
CNI	Célula não-infectada

## RESUMO

*Paracoccidioides brasiliensis* é um fungo dimórfico, agente de doença granulomatosa crônica denominada de paracoccidioidomicose (PCM), com grande variedade de manifestações clínicas, desde formas localizadas até disseminadas evoluindo para letalidade. O fungo tem capacidade de aderir, extravasar e invadir barreiras impostas pelos tecidos do hospedeiro. Em ensaios *in vitro* verificou-se que *P. brasiliensis* pode aderir e invadir células epiteliais, aparecendo algumas vezes internalizado dentro de um vacúolo. A identificação do mecanismo pelo qual este fungo adere, invade e sobrevive no interior da célula hospedeira é campo fértil para a descoberta de sua patogênese. Para tanto, a análise de proteínas presentes no microrganismo e nas células do hospedeiro e também os marcadores da via endocítica para co-localizar os microrganismos no interior das mesmas é o objetivo deste estudo. Assim, foi realizada a infecção de células epiteliais A549 e macrófagos AMJ2-C11 com *P. brasiliensis* (Pb18) nos períodos de 3, 5, 8, 24 e 3, 5, 10 e 24h, respectivamente e feitas análises por técnicas de imunofluorescência para as proteínas de junções compactas, junções aderentes, junções tipo fenda e proteínas de ancoramento intracelular, bem como as proteínas da via endocítica. Entre estas, foram ensaiadas a expressão de clatrina, Rab7 e LAMP-1 por imunofluorescência e EEA1, Rab7 e LAMP-1 por imunoblot. As proteínas de junções foram expressas nas células, bem como na parede do fungo. A clatrina foi evidente na célula e aparentemente mais expressa na parede do fungo. Nas células A549 não houve alteração na expressão de Rab7 e LAMP-1, tanto na imunofluorescência quanto no imunoblot, sendo que para EEA1 e Rab5 não foi evidenciada alteração na expressão pela técnica de imunoblot. Rab7 foi expressa nos macrófagos, localizada na periferia das células e também no próprio fungo. A expressão de LAMP-1 aparentemente não foi alterada. A expressão de EEA1 apresentou diminuição nos macrófagos infectados e a expressão de Rab7 e LAMP-1 não sofreu alterações conforme dados da reação de imunoblot. Assim, concluímos que *P. brasiliensis* pode expressar proteínas de junções celulares como Claudina-1 e caderina, além de talina, podendo estas ter envolvimento no processo de adesão e invasão deste microrganismo. Também foi observada a expressão de Rab7, LAMP-1 e clatrina

no interior do mesmo, evidenciando a presença da via endocítica no fungo. A infecção por *P. brasiliensis* altera a via endocítica dos macrófagos, pois diminui proteínas relacionadas com a endocitose. A redução na expressão de EEA1 nos macrófagos infectados com *P. brasiliensis*, pode ocasionar prejuízo para a via endocítica, ou seja, pode prejudicar o tráfego, brotamento, transporte e fusão de vesículas. Portanto, este poderia ser um mecanismo do fungo para alterar a função dos macrófagos e conseqüentemente a sua efetividade durante o desenvolvimento da doença.

**Palavras-chave:** Paracoccidioides brasiliensis, macrófagos alveolares AMJ2-C11 e células epiteliais A549.



## ABSTRACT

*Paracoccidioides brasiliensis* is a thermally dimorphic fungus, the etiologic agent of paracoccidioidomycosis (PCM). PCM is a polymorphic disease manifested by an array of diverse clinical manifestations and varying organ involvement. *P. brasiliensis* may actively penetrate the mucocutaneous surface and parasitize epithelial cells, thus evading the host defenses and reaching deeper tissues. The ability of this fungus to adhere to and invade non-professional phagocyte cells has been observed. In vitro assays verify that *P. brasiliensis* can adhere and could appear internalized within vacuole. The identification of the mechanism by which this fungus adheres, invades and survives inside the host cell is a fertile area for discovering their pathogenesis. The aim of this study was to analyze the junction proteins in the fungus and the host cells, as well as the endocytic markers to co-localize the microorganisms inside the cells. Thus, the infection was performed in A549 epithelial cells and macrophages AMJ2-C11 with *P. brasiliensis* (PB18) for periods of 3, 5, 8, 24 and 3, 5, 10 and 24 h, respectively, and the immunofluorescence analysis was developed for the proteins claudin-1, claudin-4, E-cadherin, connexin 43, talin and vinculin, and the endocytic proteins. The macrophages and the cells A549 have been stained along anti-clathrin, anti-Rab7 and anti-LAMP-1. The junction proteins have been expressed at the cells, as well as on the wall from the fungus. The clathrin was present at the cells and apparently more expressed on the fungus wall. Rab7 and LAMP-1 were not expressed in the cells A549 as demonstrated by the immunofluorescence and the immunoblot. On the contrary, Rab7 was expressed in macrophages located at the periphery of the cells and also in the own fungus. The expression of LAMP-1 apparently not presented alteration both at the immunofluorescence and at the immunoblot. The expression of EEA1 was decreased in infected macrophages and expression of Rab7 and LAMP-1 remains unchanged according to the reaction of immunoblot. Thus, we concluded that *P. brasiliensis* can express proteins of cellular junctions as Claudin-1 and cadherin, in addition to talin. These proteins could have involvement in the adhesion process and invasion of this microorganism. It was also observed the expression of Rab7, LAMP-1 and clathrin indicating the presence of the endocytic pathway in this fungus. The expression of

EEA1 was decreased. The reduction in the expression of EEA1 in macrophages infected with *P. brasiliensis* can cause damage to the endocytic route and may worsen the traffic, budding, transport and fusion of vesicles. So, this could be a mechanism of the fungus to change the function of macrophages and consequently its effectiveness during development of the disease.

**Keys words:** *Paracoccidioides brasiliensis*, macrophages AMJ2-C11 and epithelial cells A549.

## 1. INTRODUÇÃO

*P. brasiliensis* é capaz de aderir e invadir as células epiteliais, e quando no interior destas, pode aparecer envolto por um aparente vacúolo sugerindo um processo de fagocitose. O estudo foi iniciado com o intuito de responder se a invasão ocorria através de vesículas endocíticas e se o fungo em algum momento dessa via rompia o endossomo ou chegava até lisossomo, podendo ou não ter algum mecanismo que o deixasse livre no citoplasma e assim pudesse sair dessas e invadir outras células. Assim, foi proposto estudar os marcadores da via endocítica em células epiteliais infectadas e não infectadas com *P. brasiliensis*, assim como em macrófagos alveolares, já que é a primeira linha de defesa do organismo e, portanto, o modelo ideal para avaliar a via endocítica.

## 2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1 *Paracoccidioides brasiliensis*: características Gerais

*Paracoccidioides brasiliensis* é um fungo dimórfico que ocasiona uma doença granulomatosa crônica denominada paracoccidioidomicose (PCM). O estudo desta micose, antigamente chamada de blastomicose brasileira, é de importância em nosso meio em face de sua prevalência e gravidade de algumas de suas formas anátomo-clínicas, de suas seqüelas e das taxas de mortalidade (COUTINHO et al., 2002; LACAZ et al., 2002; SANTO et al., 2008; TRAVASSOS et al., 2008).

*P. brasiliensis* se apresenta como fungo filamentosos na forma de micélio septado, hialino, clamidoconídios e conídios à 25°C (fase saprobiótica – fase M), que podem estar presentes no solo, água e em plantas à temperatura ambiente. Esses conídios, pelo seu tamanho, seriam compatíveis com as formas infectantes (McEWEN et al., 1987). Na fase leveduriforme a 37°C (fase parasitária - fase L) apresenta múltiplos brotamentos em aspecto de “roda de leme” no tecido do hospedeiro ou quando cultivado (RESTREPO, 1985; ARISTIZABAL et al. 1998; DISMUKES, 2001).

A maioria dos países da América Central e do Sul apresenta regiões onde a PCM é endêmica, entre eles podemos citar o Brasil, Colômbia, Venezuela e

Argentina (NEGRONI, 1993). No Brasil, a maior prevalência ocorre nas regiões Sul e Sudeste (WANKE; LONDERO, 1994; COUTINHO et al., 2002). De acordo com McEwen et al. (1995), aproximadamente 10 milhões de pessoas podem estar infectadas com esse fungo, e acima de 2% pode desenvolver a forma disseminada da doença.

Pouco se conhece sobre o reservatório de *P. brasiliensis*, ou seja, onde o fungo está presente como saprobiótico e em número capaz de produzir infecção (MARQUES, 2003). No estudo realizado por Naiff e Barret (1989), sobre o reservatório de *P. brasiliensis*, foi constatado o isolamento do agente a partir das vísceras do tatu (*Dasyurus novemcinctus*) e outros autores também obtiveram resultados semelhantes em outras localidades (BAGAGLI et al., 2003), bem como de outras fontes, como em fezes de morcego, *Artibeus lituratus*, na Colômbia (GROSE; TAMSITT, 1965); em vísceras de símio, *Saimiri sciureus*, na Bolívia (JHONSON; LANG, 1977); em fezes de pingüim, *Pygocelis adeliae*, na Antártida uruguaia (GARCIA et al., 1993) e também em cães (RICCI et al., 2002). Em consequência disso, ampliou-se a percepção da existência de outros hospedeiros de *P. brasiliensis*, além do homem, assim como o conceito de territorialidade em que *P. brasiliensis* está disponível como fungo saprobiótico (MARQUES, 2003).

Geralmente a infecção é adquirida através da inalação de conídios produzidos pela fase miceliar (FRANCO, 1987). Estudos recentes demonstram que indivíduos residentes na zona rural, 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).

A PCM manifesta-se em indivíduos com faixa etária entre 30 e 49 anos, com predomínio de homens infectados em relação às mulheres na proporção aproximada de 15:1. A alta frequência da micose em homens foi inicialmente atribuída a sua maior exposição ao agente. A doença é pouco frequente em mulheres, provavelmente devido à presença, a partir da puberdade, de estrógeno, que apresenta papel protetor. Assim os hormônios femininos inibem a transição da fase miceliar (saprobiótica) para leveduriforme (parasitária), um processo crítico para a patogênese da doença (RESTREPO et al., 1984; SALAZAR et al., 1988).

As manifestações clínicas da micose caracterizam-se como de uma doença granulomatosa que apresenta uma gama de sinais e sintomas agrupados em dois

padrões principais, as formas aguda e crônica, embora as manifestações e o curso da doença varie de paciente para paciente (FRANCO, 1994; MENDES, 1994; BRUMMER et al., 1993). Os agentes de micoses sistêmicas possuem alguns fatores que permitem o seu crescimento nas condições adversas proporcionadas pelo hospedeiro, que podem contribuir para o desenvolvimento da doença (CASADEVALL; PIROFSKI, 1999).

A capacidade de *P. brasiliensis* de não só provocar doença humana, mas também de causar micose com grande variedade de manifestações clínicas, desde formas localizadas até doença disseminada evoluindo para letalidade, depende provavelmente da relação entre o fungo, e a capacidade deste em interagir com as estruturas superficiais do hospedeiro e invadi-las, e também a presença da resposta imunológica deste último (FRANCO et al., 1989). As respostas imune celular e humoral exercem uma influência fundamental na instalação do processo infeccioso e garantem a sobrevivência do hospedeiro (BENARD et al., 1997; MONTENEGRO; FRANCO, 1994). 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).

## 2.2 Espécies de *Paracoccidioides brasiliensis*

*P. brasiliensis* está classificado taxonomicamente no Reino Fungi, Divisão Eumycota, Subdivisão Ascomycota, Ordem Onygenales e família Onygenaceae, através da subunidade de rDNA e outras seqüências gênicas (LECLERC et al., 1994; NINO-VEGA et al., 2007; SAN-BLÁS et al., 2002), e também através da estrutura de galactomananas da parede celular (SAN-BLAS et al., 2005). *P. brasiliensis* apresenta 4-5 cromossomos, com variações de 2-10 Mb (MONTROYA et al., 1997). O tamanho do genoma foi calculado em 30 Mb (CANO et al., 1998), com aproximadamente 7.500 a 9.000 genes, números que estão de acordo com o calculado em genomas de fungos pertencentes aos ascomicetos. Em 2006, Matute et al. descreveram a existência de três diferentes espécies filogenéticas (S1, PS2 e PS3) de *P. brasiliensis*. Atualmente, Carrero et al. (2008), propuseram Pb01, como uma nova espécie do gênero *Paracoccidioides*. Mas, esta nova

proposta precisa ainda ser validada.

## **2.3 Interação *Paracoccidioides brasiliensis* e células**

### **2.3.1 Adesão de *P. brasiliensis***

A adesão de *P. brasiliensis* aos tecidos do hospedeiro representa uma fase crítica no desenvolvimento da infecção fúngica. Esse tipo de adesão é mediado por componentes específicos na superfície da célula fúngica, chamadas de adesinas, as quais freqüentemente ligam-se aos componentes da matriz extracelular (MEC) (LENZI et al., 1991; PATTI et al., 1994).

A MEC consiste de uma rede tridimensional de proteínas como colágeno, glicoproteínas não-colagênicas (principalmente fibronectina e laminina) e de proteoglicanas. A capacidade de o fungo aderir a MEC pode ser explicada pela expressão de moléculas com características de adesinas expressas pelo fungo (MENDES-GIANNINI et al., 2008).

Vicentini et al. (1994) foram os primeiros a evidenciar a capacidade de o fungo aderir a laminina. Mendes-Giannini et al. (2006) verificaram também que o isolado 18 de *P. brasiliensis* (fase leveduriforme), considerado o mais virulento em animal, apresenta capacidade de aderir mais fortemente a laminina, um dos componentes da MEC, e mais fracamente com fibronectina, colágeno tipo I e tipo IV. Gonzalez et al. (2008) verificaram a interação de conídios de *P. brasiliensis* com fibronectina e fibrinogênio, evidenciando a interação entre o fungo e as células A549. Nesta interação estão envolvidas proteínas específicas da célula fúngica, como a glicoproteína de 43 kDa que é ligante de laminina (VICENTINI et al., 1994), proteínas de 19 e 32 kDa que interage com laminina, fibronectina e fibrinogênio (GONZALEZ et al., 2005a) e também a proteína de 30 kDa que demonstrou interação com laminina, mas não com fibronectina, colágeno tipo I e IV (ANDREOTTI et al., 2005). Além dessas adesinas, também foram caracterizadas enzimas de *P. brasiliensis* que interagem com moléculas do hospedeiro, sendo consideradas então adesinas, como a GAPDH (glicose-6-fosfato desidrogenase) ligantes de laminina, fibronectina e colágeno tipo I (BARBOSA et al., 2006) e TPI (triose fosfato isomerase) que também liga componentes da matriz, como laminina e fibronectina (PEREIRA et al., 2007).

Assim, a adesão do fungo às células do hospedeiro é o primeiro passo para o início da patogênese da doença.

As proteínas do hospedeiro envolvidas na adesão de microrganismos não se restringem somente aos componentes da MEC, mas a adesão pode ocorrer através de proteínas de interação célula-célula. As junções celulares, como junções aderentes e junções oclusivas, fornecem importante meio de contato entre as células epiteliais. As junções oclusivas são formadas por proteínas integrais de membrana, como demonstrado na figura 1. Estas atuam como barreiras no espaço intercelular, controlando a permeabilidade celular. As junções oclusivas são formadas por claudinas, ocludinas e membros da superfamília Ig denominadas JAM (moléculas de adesão juncional) e CAR (receptor do coxsackievirus e adenovírus). As claudinas são as principais moléculas de adesão celular das junções oclusivas, sendo considerada uma família composta de aproximadamente 24 membros em humanos e camundongos, em que cada tecido apresenta um padrão único de expressão de claudina (SAWADA et al., 2003). Já as ocludinas foram as primeiras proteínas de membrana das junções oclusivas a ser descoberta. Sabe-se pouco sobre o papel das ocludinas na regulação das junções oclusivas, embora os filamentos de actina pareçam estar mais associados às ocludinas do que as claudinas (FURUSE; TSUKITA, 2006). As junções aderentes apresentam múltiplas funções, incluindo estabilização da adesão célula-célula, regulação do citoesqueleto de actina, sinalização intracelular e regulação da transcrição. A superfamília das caderinas clássicas, como a E-caderina, interage com as proteínas membros da família das cateninas, como catenina p-120, beta-catenina e alfa-catenina, como demonstrado na figura 2. Juntas, essas proteínas controlam a formação, manutenção e função das junções aderentes (HARTSOCK; NELSON, 2007). As caderinas são constituídas por unidades adesivas básicas: o complexo caderina/catenina e o complexo nectina/afadina tanto um quanto o outro irão se ligar aos filamentos de actina (NIESSEN; GOTTARDI, 2008). Além dessas proteínas que mantêm o contato célula-célula, também existem outras proteínas relacionadas com a adesão célula-matriz, uma delas é a integrina, que se liga as proteínas da matriz extracelular e também aos filamentos de actina no interior da célula, sendo para isso necessário a presença de proteínas de ancoramento intracelular, como talina, vinculina, alfa-actinina, entre outras, como demonstrado na figura 3 (ALBERTS,

2004).

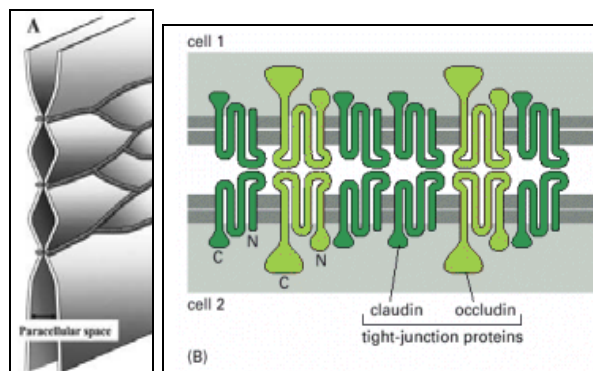


Figura 1: Junções oclusivas. A – Junções oclusivas e o espaço paracelular (SAWADA et al., 2003). B – Claudinas e Ocludinas (ALBERTS, 2004).

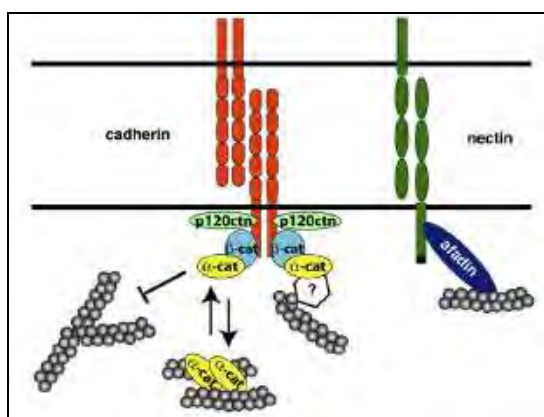


Figura 2: Junções Aderentes (NIESSEN; GOTTARDI, 2008).

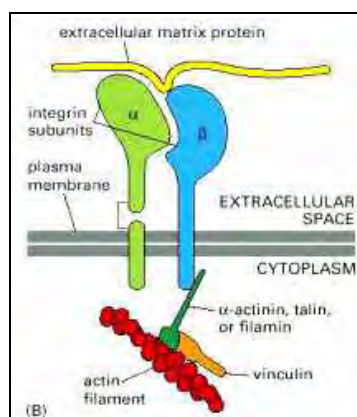


Figura 3: Proteínas de ancoramento intracelular (ALBERTS, 2004).



Depois da adesão sobre as estruturas complementares do hospedeiro, o fungo pode expressar diferentes fenótipos dependendo do isolado, do hospedeiro (susceptível ou resistente), local de inoculação e outros fatores. A estrutura tridimensional da MEC tem forte influência sobre o fenótipo da doença e também em relação à resposta às citocinas. *P. brasiliensis* tem a capacidade de espalhar-se do foco primário, invadir o sangue e os vasos linfáticos, sendo transportado através dos vasos para então disseminar-se para outras partes do organismo. A capacidade de diferentes fungos aderirem a uma variedade de superfícies do hospedeiro e componentes da MEC é um importante fator na patogênese da micose (MENDES-GIANNINI et al., 2000). Assim, o modelo de culturas celulares estuda os mecanismos envolvidos desde o contato inicial de *P. brasiliensis* até os eventos que culminam em sua entrada e saída da célula. Mendes-Giannini et al. (1994) verificaram que o isolado 113 de *P. brasiliensis* foi capaz de aderir e invadir células epiteliais de linhagem contínua, sem tratamento prévio. Hanna et al. (2000) verificaram que diferentes isolados apresentaram graus de adesão distintos, sendo o isolado Pb 18 mais aderente. Assim diferentes estudos foram realizados para avaliar a habilidade de *P. brasiliensis* se ligar às células Vero e A549, bem como a proteínas da MEC e induzir alterações do citoesqueleto (MENDES-GIANNINI et al., 2008). Em outro estudo verificaram que inicialmente pequenos brotos estavam aderidos às células, mudando aparentemente sua morfologia e, após algum tempo, estruturas esféricas foram observadas no citoplasma, com aparente migração para o núcleo (MENDES-GIANNINI et al., 1994).

Portanto, a adesão de *P. brasiliensis* às células epiteliais e alveolares constitui-se em campo importante de estudo referente aos passos iniciais de contato deste fungo com o hospedeiro, considerando que *P. brasiliensis* tem capacidade de invadir células Vero e o fenômeno de aderência é variável, dependendo do isolado (MENDES-GIANNINI et al., 2008).

### **2.3.2 Invasão de *P. brasiliensis***

O primeiro passo durante uma infecção é a adesão do fungo à superfície da célula hospedeira, para então ocorrer invasão e proliferação do mesmo. A adesão

de *P. brasiliensis* às células promove alterações nas membranas celulares, observadas ao redor da área de adesão e com presença de cavitações circunscritas ao redor do elemento fúngico, resultantes provavelmente de seus produtos extracelulares. Formas características do fungo e na forma de protoplasto foram observadas no interior da célula após 24 horas de incubação. Alguns fungos foram observados numa forma circunscrita dentro de um vacúolo, sugerindo processo de fagocitose (HANNA et al., 2000; MONTEIRO DA SILVA et al., 2001). *P. brasiliensis* não é um parasito essencialmente intracelular (TUDER et al., 1985), mas apresenta capacidade de invadir células epiteliais. A presença de *P. brasiliensis* no citoplasma de células epiteliais humanas foi verificada e esta ocorrência estaria provavelmente relacionada ao mecanismo de escape do sistema imune do hospedeiro (De BRITO et al., 1973; MENDES-GIANNINI et al., 2000). Monteiro da Silva (2004) verificou que *P. brasiliensis* é capaz de invadir células epiteliais A549 e que após sua entrada, a estrutura do citoesqueleto das células se torna alterada, interferindo nos aspectos morfológicos da actina, tubulina e citoqueratina. Assim, o tratamento das mesmas com citocalasina D e colchicina reduziu a invasão, indicando a participação funcional dos microfilamentos e microtúbulos no processo de invasão (MONTEIRO DA SILVA et al., 2007; MENDES-GIANNINI et al., 2004). O mesmo aconteceu após a internalização do vírus do oeste do Nilo por células Vero, em que Chu et al. (2004) verificaram que os filamentos de actina e microtúbulos estão envolvidos no tráfego de vesículas, assim os filamentos de actina estão envolvidos no brotamento inicial da vesícula e os microtúbulos estão envolvidos na manutenção do tráfego endossomal do endossomo precoce para o endossomo tardio.

Em 1989, Brummer et al. analisaram a presença de *P. brasiliensis* no interior de macrófagos residentes, peritoneais e pulmonares, indicando que estes não são capazes de efetuar a digestão do fungo internalizado e que esta só ocorre após ativação por linfocinas desses macrófagos. Também foi sugerido que *in vivo*, após sua ingestão por macrófagos, *P. brasiliensis* provavelmente multiplica-se no interior dos macrófagos não-ativados e quando os macrófagos estão ativados o fungo é destruído (BRUMMER et al., 1990). Assim, *P. brasiliensis* já foi observado tanto no interior dos macrófagos como em células epiteliais *in vivo* e *in vitro* (De BRITO et al., 1973; HANNA et al., 2000).

### 2.3.3 Via endocítica

Endocitose é um processo celular básico que é utilizado pelas células para internalizar uma variedade de moléculas (MAYOR; PAGANO, 2007). Macromoléculas e grandes estruturas entram nas células por endocitose, a qual é definida como invaginação de uma porção da membrana plasmática contendo proteínas e lipídeos, e ligantes extracelulares e/ou moléculas solúveis. Já íons e pequenas moléculas, como aminoácidos e açúcares, podem atravessar a membrana através de canais. Diferentes tipos de endocitose foram descritos, diferindo no tamanho da vesícula endocítica, tamanho da “carga” e do mecanismo de formação da vesícula. Isto inclui fagocitose, macropinocitose, endocitose mediada por clatrina, endocitose mediada por caveolina e endocitose independente de clatrina e caveolina (VEIGA; COSSART, 2006). A endocitose independente de clatrina e caveolina pode ocorrer através das CLICs (*Clathrin and dynamin independent carriers*), que é uma vesícula independente de clatrina e dinamina, derivada da membrana plasmática. Algumas vias podem apresentar rotas por compartimento intermediário, como os caveossomos ou endossomo precoce (MAYOR; PAGANO, 2007), ou por proteína rica em glicosilfosfatidilinositol (GEEC – *glycosyl phosphatidylinositol-anchored protein enriched early endosomal compartments*) (Figura 4).

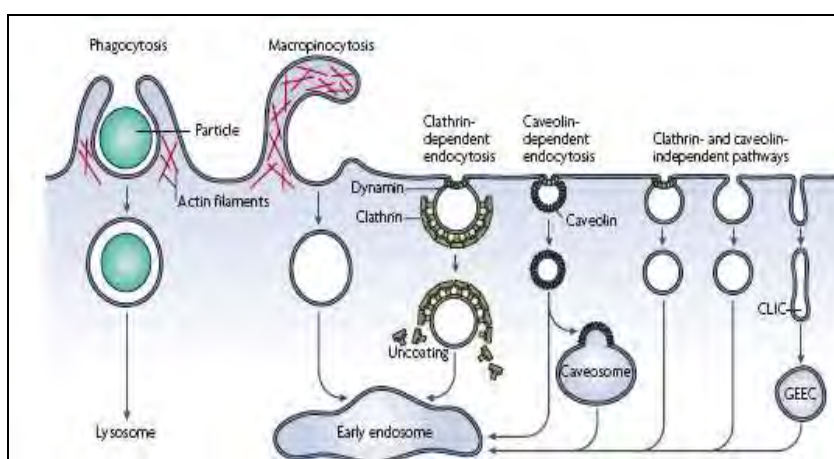


Figura 4: Vias de entrada nas células (MAYOR; PAGANO, 2007).

O processo de fagocitose é restrito a fagócitos profissionais, neutrófilos, macrófagos e células dendríticas, enquanto outros eventos de internalização

ocorrem em quase todos os tipos celulares (VEIGA; COSSART, 2006). Para o processo de internalização é necessário inicialmente o surgimento de uma vesícula, que pode ser revestida por clatrina, que facilita o englobamento de nutrientes e também muitos receptores de sinalização após sua ligação, mas existe a endocitose independente de clatrina, com estruturas revestidas por caveolina, nos casos de endocitose das células endoteliais. Existem dois outros mecanismos estritamente dependentes da actina cortical que é a fagocitose e a macropinocitose (DONALDSON et al., 2008). Na infecção das células HeLa por *Chlamydia trachomatis*, foi observado que a mesma entra nas células por endocitose mediada por clatrina, enquanto a mediada por caveolina, a fagocitose e a macropinocitose não participariam deste evento (HYBISKE; STEFHENS, 2007).

Em 2004, Monteiro da Silva verificou que *P. brasiliensis* é capaz de invadir células epiteliais Vero e A549 e que após sua entrada, a estrutura do citoesqueleto das células sofreu alterações, interferindo nos aspectos morfológicos da actina, tubulina e citoqueratina. O tratamento com citocalasina D e colchicina reduziu a invasão, indicando a participação funcional dos microfilamentos e microtúbulos neste mecanismo (MONTEIRO DA SILVA et al., 2007; MENDES-GIANNINI et al., 2004). Chu et al. (2004) analisaram a internalização do vírus do oeste do Nilo, em que verificaram que os filamentos de actina e microtúbulos estão envolvidos no tráfego de vesículas. Assim, os filamentos de actina estão envolvidos no “engolfamento” inicial e os microtúbulos estão envolvidos na manutenção do tráfego endossomal entre endossomo precoce e tardio (GIRAO et al., 2008).

A entrada de diferentes microrganismos nas células desencadeia eventos de sinalização por diferentes vias, dependendo do microrganismo. Muitos microrganismos invadem as células e estimulam proteínas tirosina-quinases, que são proteínas que desencadeiam uma cascata de fosforilações e transmitem sinais ao núcleo. Essas proteínas fosforiladas promovem na célula hospedeira o rearranjo de microfilamentos e atuam no processo de endocitose (BARBIERI et al., 2004). Belanger et al. (2002) verificaram que a fosforilação das proteínas de 80 e 82 kDa de células endoteliais, foi bloqueada quase completamente por dois inibidores de tirosina-quinases (genisteína e tirfostina 47), reduzindo assim a

endocitose de *Candida albicans*. Eles sugeriram que essa inibição incompleta pode ocorrer devido às múltiplas vias de transdução de sinal que regulam a endocitose de *C. albicans*.

Monteiro da Silva et al. (2007) avaliaram a necessidade da fosforilação da tirosina-quinase, tanto em *P. brasiliensis* como nas células epiteliais, durante o processo de invasão. Quando as células foram tratadas com genisteína, ocorreu inibição significativa da invasão fúngica, o mesmo não ocorreu quando o fungo foi tratado, concluindo que a via de sinalização nas células epiteliais, envolvendo o receptor de tirosina-quinase, é necessária para possibilitar a invasão de *P. brasiliensis*. Além dos fungos, outros microrganismos também necessitam da atividade das proteínas tirosina-quinases para a invasão de células hospedeiras.

Muitos microrganismos patogênicos podem invadir células eucarióticas e utilizar este ambiente para se multiplicar ou escapar da resposta imune do hospedeiro. Fagócitos profissionais e células normalmente não fagocíticas, como epiteliais e endoteliais podem ser invadidas. Quando os microrganismos são fagocitados, tanto podem ser destruídos, como também desenvolver diferentes estratégias que permitam sua replicação e sobrevivência no interior de células fagocíticas ou não fagocíticas (FINLAY; FALKOW, 1997). Recentemente, Alvarez e Casadevall (2007) verificaram que macrófagos infectados com *Cryptococcus* transferem a levedura para outros macrófagos não-infectados, processo aparentemente mediado por actina. Esse mecanismo de transferência protege o fungo da ação de compostos antimicrobianos e mesmo da resposta imune do hospedeiro. Assim é possível que a disseminação da infecção ocorra através desse mecanismo.

A via endocítica apresenta várias rotas entre a membrana plasmática, endossomo, lisossomo e complexo de Golgi. Assim, logo depois da internalização, as vesículas de transporte ligadas à membrana fundem-se com o endossomo precoce, enquanto que os ligantes internalizados, como proteínas e lipídeos de membrana retornam para a membrana, ou são transportados para o endossomo tardio e lisossomo para a degradação final (GRUENBERG, 2003).

Rabs são pequenas GTPases, enzimas que convertem GTP (5'-Trifosfato de guanosina) a GDP (difosfato de guanosina), da superfamília Ras, que orquestram a seqüência dos eventos de fusão. Apresentam trocas moleculares, passando pelo estado inativo (GDP ligada) e ativo (GTP ligada) (ZERIAL;

McBRIDE, 2001) (Figura 5). Rabs são proteínas utilizadas como marcadores da via fagolisossomal, assim como as proteínas de membrana associadas ao lisossomo (LAMPs) e outras proteínas presentes na membrana lisossomal. LAMPs e proteína integral de membrana lisossomal (LIMPs) representam mais de 50% das proteínas de endossomo tardio e lisossomo (MARSH et al., 1987). Considerando o tráfego de membrana, Rab GTPases e suas proteínas efetoras divalentes, por exemplo EEA1 (antígeno de endossomo precoce 1), estão implicadas na seleção da carga, brotamento, motilidade, fusão da vesícula e função das organelas (ZERIAL; McBRIDE, 2001). Rabs individuais estão localizadas em diferentes organelas da via endocítica e secretória, definindo os compartimentos. No entanto, um significativo grau de co-localização ocorre dentro de algumas organelas, por exemplo, endossomo precoce são ricos em domínios Rab5 e Rab4, com uma pequena taxa de regiões Rab11 positivas (MIACZYNSKA; ZERIAL, 2002). Enquanto, endossomos tardios são caracterizados pela presença de Rab7 e Rab9, as quais controlam o transporte entre endossomo precoce e tardio e governam a formação de transportadores destinados ao complexo de Golgi, respectivamente (RODMAN; WANDINGER-NESS, 2000).

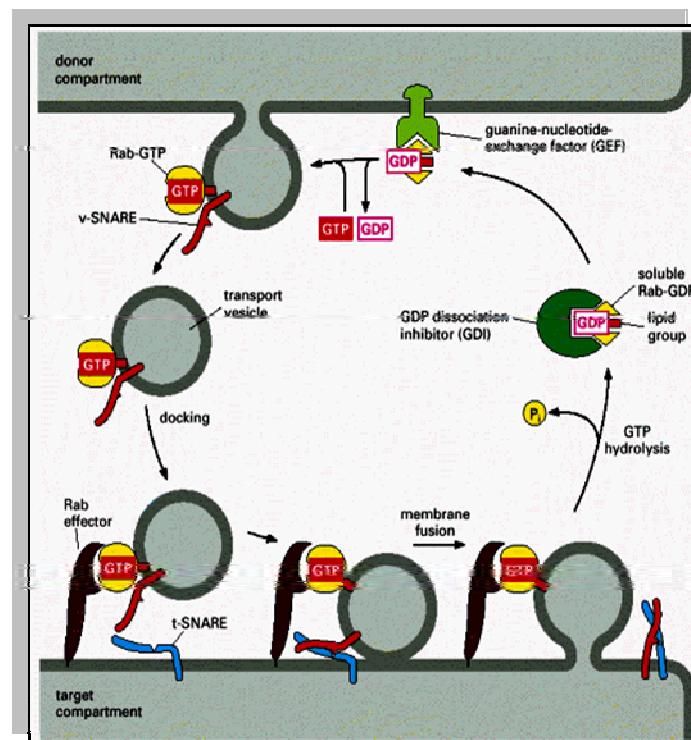


Figura 5: Função da Rab GTPases (ALBERTS, 2004).

Diferentes patógenos desenvolveram estratégias bem-sucedidas que permitem a sobrevivência e replicação dentro da célula hospedeira. *Shigella flexneri*, *Listeria monocytogenes* e *Rickettsiae* sp dissolvem a ligação membrana-vacúolo após a entrada e assim têm acesso direto ao citoplasma rico em nutrientes. Alguns organismos como a *Coxiella burnetii* apresentam mecanismos que permitem sua sobrevivência aos agentes bactericidas liberados pela célula hospedeira no fagolisossomo e assim podem crescer no ambiente lisossomal. Outros organismos como *Salmonella*, *Mycobacterium* e *Legionella* utilizam mecanismos que evitam ou inibem alvos de internalização da bactéria pela fusão da via fagolisossomo, no entanto não tem sido estabelecido o mecanismo comum utilizado por esses microrganismos (FINLAY; FALKOW, 1997; AMER; SWANSON, 2002). Outro exemplo é a *Neisseria gonorrhoeae*, que produz uma protease IgA1 que cliva proteínas LAMPs na forma glicosilada, estas, por apresentarem sítio de clivagem, são degradadas. Portanto, o fato da *Neisseria* produzir IgA1 pode possibilitar o mecanismo de escape do fagossomo para o citoplasma da célula epitelial (HAUCK; MEYER, 1997; NIKULIN et al., 2006).

Assim muitos patógenos bacterianos intracelulares criam estratégias de crescimento e sobrevivência dentro da célula hospedeira. Os organismos intracelulares podem não apenas se replicar, mas também desenvolver mecanismos específicos de escape da célula hospedeira. Aparentemente, existe uma correlação direta entre o crescimento intracelular bem sucedido e virulência (FINLAY; FALKOW, 1997).

Além disso, essas proteínas da via endocítica de células fagocíticas e não fagocíticas, também são encontradas nos microrganismos, como a Rab7 que foi observada na via endocítica do metazoário *Paramecium* (SURMACZ et al., 2003). A via endocítica em leveduras (PORCARO et al., 2003) e fungos filamentosos como *Aspergillus nidulans* (PENALVA, 2005; ABENZA et al., 2008) e *Ustilago maydis* (FUCHS; STEINBERG, 2005) também foi estudada.

*P. brasiliensis*, quando infecta pulmões de camundongo, ocasiona uma reação inflamatória, e este infiltrado é composto principalmente por neutrófilos, macrófagos, poucos eosinófilos e linfócitos (KEER et al., 1988). A interação de macrófagos alveolares com *P. brasiliensis* resulta em níveis de citocinas suficientes para regular moléculas de adesão celular como ICAM-1 (molécula de adesão intercelular), VCAM-1 (molécula de adesão celular vascular), que

interagem com LFA-1 (antígeno 1 associado a função de linfócitos) e Mac-1 (*antigen 1 macrophages*) que participam da patogênese da doença (GONZALEZ et al., 2005b). Em 2002, Popi et al., verificaram que *P. brasiliensis* modula a fagocitose através da interação de suas proteínas de superfície com receptores homólogos na superfície de macrófagos. Assim, como a gp43 é o principal antígeno secretado por este fungo, esta participa do engolfamento do fungo por macrófagos via receptor de manose. Quando a mesma foi colocada em contato com macrófagos, ocorreu diminuição da fagocitose de acordo com o aumento da concentração de gp43. Como os macrófagos são os pivôs da infecção fúngica, é importante considerar que a gp43 estaria envolvida no mecanismo de evasão do fungo para facilitar a sua implantação nos tecidos do hospedeiro na infecção primária. Já em 2006, Jimenez et al. verificaram que a opsonização de *P. brasiliensis* por complemento, aumentava a porcentagem de fagocitose pelas linhagens de macrófagos resistentes e susceptíveis à infecção. Quando os macrófagos foram tratados com anti-receptor 3 complemento (CR3), a fagocitose diminuiu. A opsonização aumentou a porcentagem de fagocitose de *P. brasiliensis* por macrófagos, mas o mesmo não acontece com *Cryptococcus*, como observado por Giles et al. (2007).

Wasylnka e Moore (2003) estudaram a fagocitose de conídios de *Aspergillus fumigatus*, utilizando linhagem de células J774 (macrófagos) e A549 (células epiteliais não fagocíticas). Estes autores marcaram endossomo precoce com anticorpo anti-receptor de transferrina (CD71) e lisossomo com anticorpos anti-LAMP-1. Essa avaliação foi realizada por 25, 45 e 120 minutos. Após 25 minutos, observaram a co-localização de conídios em fagossomos CD71 positivos e com 120 minutos após infecção, foram observados conídios em fagossomos LAMP-1 positivos. Concluindo assim que, os conídios de *A. fumigatus* são internalizados pelos dois tipos celulares e que, os fagossomos contendo os conídios fundem-se rapidamente com endossomo tardio/lisossomo e que a passagem através da rede endossomal de células J774 foi mais rápida e mais de 99% dos conídios foram mortos em 12 horas após a infecção. No entanto, em contraste as células J774, um significativo número de conídios sobreviveu e germinou em fagossomos ácidos das células A549. A fagocitose de conídios de *A. fumigatus* requer a polimerização de actina, a atividade de fosfatidilinositol 3-quinase e tirosina quinase (IBRAHIM-GRANET et al., 2003; LUTHER et al., 2008).



Na infecção de células HeLa pelos vírus do oeste do Nilo e vírus da dengue, a entrada do vírus apresentou-se reduzida, quando o gene para Rab5 foi silenciado com RNA de interferência, demonstrando que somente 20% das células foram permissivas à infecção, e o mesmo não aconteceu com o silenciamento de Rab7. Assim concluíram que, os vírus do oeste do Nilo e o da dengue entram nas células HeLa através de endocitose mediada por clatrina e após a endocitose, ambos os vírus necessitam serem transportados para endossomo precoce, mas não tardio, em pH ácido (KRISHNAN et al., 2007).

Os mecanismos de escape de microrganismos patogênicos na célula hospedeira compreendem uma série de eventos de sinalização, possibilitando a propagação do microrganismo. O estudo da biogênese do fagolisossomo é fundamental para a maior compreensão de como os microrganismos invadem as células do hospedeiro, são fagocitados ou forçam sua própria fagocitose como mecanismo de escape. Estudos prévios demonstraram que alguns patógenos dependem da via de sinalização de fosfolipídios de membrana, através do fosfatidilinositol 3-quinase, para a regulação da via fagolisossomal. Quando fibroblastos de camundongo foram tratados com wortmanina e infectados com *Trypanosoma cruzi*, o número de parasitas apresentava-se reduzido quando comparado com células não tratadas com este inibidor, e após a infecção, formas tripomastigotas não foram detectadas no compartimento lisossomal, avaliado através da expressão de LAMP-1 (ANDRADE; ANDREWS; 2004). Assim, o receptor específico que o patógeno utiliza para invadir células epiteliais ou ser fagocitado, pode afetar significativamente na localização intracelular da vesícula que envolve o patógeno (FINLAY; FALKOW, 1997).

A via endocítica também depende de proteínas que garantem a seletividade do transporte e o ancoramento de vesículas contendo a carga endocitada e isto acontece de maneira específica. As proteínas da família Rab são membros da família de GTPases que fornecem a força necessária para que a vesícula endocítica, ancorada próxima da membrana alvo, possa captar energia da hidrólise de GTP necessária à fusão das membranas e liberação da carga (ALBERTS et al, 2004). *Legionella pneumophila* impede o recrutamento de Rab5 e sua ativação na membrana fagossomal, sendo que esta ativação ocorre através gene dot/lcm (sistema de secreção tipo IV), que ativa caspase-3, que cliva rabaptina-5, uma molécula efetora de Rab5, resultando na dissociação de Rab5

do endossomo e conseqüentemente não ocorre à formação do endossomo tardio e a *L. pneumophila* consegue se replicar no endossomo precoce e evadir-se da degradação lisossomal (SANTIC; KWAIK, 2006). Batista et al. (2006) caracterizaram a expressão de Rab5a, uma isoforma de Rab5, em cardiomiócitos infectados e não infectados com *T. cruzi*. A expressão e localização de Rab5a foram realizadas através de diferentes metodologias, como microscopia confocal a laser, *western blotting* e citometria de fluxo. As análises, qualitativa e quantitativa, mostraram que a expressão de Rab5a não foi alterada em cardiomiócitos depois da invasão por *T. cruzi*. No entanto, a análise da expressão de EEA1 (antígeno de endossomo precoce 1) mostrou uma redução de 86% para aproximadamente 20% em células infectadas, podendo contribuir para alteração no brotamento e transporte da vesícula e eventos de fusão de endossomo precoce.

*P. brasiliensis* pode aderir e invadir células epiteliais, aparecendo em uma forma circunscrita dentro de um vacúolo, sugerindo processo de fagocitose. No entanto, este evento ainda não foi amplamente estudado. A compreensão do mecanismo de escape fagolisossomal de um microrganismo é de extrema relevância para que se possa futuramente, na tentativa de circunscrever a infecção, encontrar novos alvos para drogas.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Verificar a expressão de proteínas de junções e ancoramento, bem como Identificar a rota endossomo/lisossomo que *P. brasiliensis* realizada após a adesão e invasão de células epiteliais A549 e macrófagos AMJ2-C11 e verificar as alterações na via endocítica que promovem sua saída.

#### **3.2 Metas Específicas**

3.2.1 Determinar a co-localização de *P. brasiliensis* dentro de fagossomos formados em células epiteliais A549 e macrófagos AMJ2-C11, determinando as proteínas endossomais/lisossomais envolvidas;

3.2.2 Verificar a expressão de proteínas de junções e ancoramento no fungo e nas células.

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 Microrganismo**

Foi empregado o isolado 18 de *P. brasiliensis* (Pb) na fase leveduriforme, gentilmente cedida pela Profa. Dra. Vera Calich. Este foi obtido de caso de paracoccidioidomicose no Brasil. Durante a realização deste trabalho, o isolado havia sido recentemente isolado de animal e foi mantido em meio de Fava Netto em estufa a 35°C e repicado a cada 3-4 dias.

### **4.2 Preparação de anticorpos anti - *P. brasiliensis***

#### **4.2.1 Extrato *cell-free***

Este extrato foi obtido com o isolado 18, na fase leveduriforme. Cerca de 300mg de crescimento com 3-4 dias em meio Fava Netto foram adicionados em 1 mL de tampão salina-fosfato (PBS), pH 7,4 0,01M estéril. Esta mistura foi agitada em *vortex* por 30 segundos e centrifugada a 400 x *g* por 1 minuto. O sobrenadante (antígeno *cell-free*) foi retirado, aliquoteado e armazenado a -20°C. A concentração proteica foi quantificada pelo método de Lowry et al. (1951) e em seguida a amostra foi avaliada por SDS-PAGE (LAEMMLI, 1970; STUDIER, 1973).

#### **4.2.2 Produção de anticorpos policlonais anti-*cell free***

##### **4.2.2.1 Soro anti-*cell-free* de *P. brasiliensis***

Soro anti-*cell-free* de *P. brasiliensis* foi produzido a partir do antígeno *cell-free* do isolado 18. Quantidades de 0,2; 0,5; 0,7 e 1,0 mL do antígeno (500µg/mL) foram inoculados intradermicamente em coelho, intercaladas as inoculações a cada quatro dias, sendo que nas duas primeiras a suspensão foi emulsificada com adjuvante incompleto de Freund. Decorridos 15 dias da última inoculação, uma sangria de prova foi realizada e a avaliação do título de anticorpos foi feita através da técnica de imunoblot. Em seguida, foram feitas quatro doses de reforço

de 1,0 mL cada, em um intervalo de 15 dias de cada aplicação. Nova sangria de prova foi realizada e após 15 dias da última inoculação a sangria total. O anti-soro obtido foi precipitado com sulfato de amônio, dializado e aliquoteado e estocado a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

### **4.3 Cultura Celular**

#### **4.3.1 Cultura de células epiteliais**

Neste estudo, foi utilizada linhagem de células epiteliais respiratórias - pneumócitos tipo II (A549). Estas foram cultivadas em garrafas plásticas contendo meio Ham-F12 suplementados com soro fetal bovino (SFB) 10% e antibióticos, e mantidos à temperatura de  $36,5^{\circ}\text{C}$ .

Decorridos 3 a 4 dias, as garrafas de células foram submetidas a tripsinização. Para isso, a monocamada formada foi lavada com PBS 0,05 M, pH 7.2 estéril e, após lavagem, este foi desprezado para então acrescentar 1 mL de ATV-solução de tripsina 0,2% e EDTA 0,02% (Adolfo Lutz). Seguidos 1-2 minutos, as células foram homogeneizadas com volumes variados do meio Ham-F12 acrescido de SFB. Nesta etapa, a tripsina (ATV) foi neutralizada pelo SFB presente no meio de cultura. O volume total da suspensão celular obtido foi transferido para outras garrafas, de modo a se obter uma concentração celular de  $10^6$  células/ mL.

#### **4.3.2 Cultura de macrófagos**

Foi utilizada linhagem de macrófagos alveolares de camundongo (AMJ2-C11) (Banco de Células do Rio de Janeiro). Estes foram cultivados em garrafas plásticas, em meio DMEM (Sigma) suplementados com soro fetal bovino (SFB) 10% e antibióticos, e mantidos à temperatura de  $36,5^{\circ}\text{C}$ .

Decorridos 3 a 4 dias, as garrafas de células foram submetidas a tripsinização. Para isso, a monocamada formada foi lavada com PBS 0,05 M, pH 7.2 estéril e, após lavagem, este foi desprezado para então acrescentar 1mL de ATV-solução de tripsina 0,2% e EDTA 0,02% (Adolfo Lutz). Seguidos 1-2 minutos, as células foram homogeneizadas com volumes variados do meio DMEM

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

#### **4.4. Infecção de células epiteliais e macrófagos por *P. brasiliensis***

Os ensaios de infecção foram realizados em placas de 24 orifícios contendo no interior uma lamínula redonda 13 mm. Para os ensaios foi utilizada uma suspensão celular padronizada de  $3 \times 10^4$  células/mL. Assim, após a tripsinização e homogeneização da suspensão celular, 0,2 mL desta foi retirada da garrafa, e diluída em 1,8 mL de meio de cultivo (Ham-F12) e então foi realizada a contagem das células em hemocítmetro, para que, através de diluições adequadas, fosse ajustada a concentração desejada. Ao término desta etapa, 0,5 mL dessa suspensão de células foi dispensada em cada orifício da placa e esta incubada a  $36,5^\circ\text{C}$  por 48h, para que a monocamada celular fosse formada sobre a lamínula, e a partir daí, pudessem ser utilizadas para a avaliação da via fagolisossomal. As lamínulas com as células epiteliais e macrófagos foram infectadas e incubadas a  $36,5^\circ\text{C}$  por 5h, para avaliar a capacidade de adesão de *P. brasiliensis*. As lamínulas foram coradas por Giemsa e observadas em microscópio óptico para avaliação da quantidade de fungos e determinação da capacidade de infecção do isolado à monocamada de células epiteliais. Após a infecção das células epiteliais e macrófagos, as lamínulas foram coradas pela coloração de Gram para verificar a presença de bactérias.

##### **4.4.1 Preparo e padronização do inóculo**

*P. brasiliensis* foi cultivado em meio Fava Netto durante três dias, a  $35^\circ\text{C}$ . Foi adicionado a uma quantidade suficiente de PBS estéril, quantidade de fungo para obtenção de uma suspensão turva e homogênea, correspondente a  $1 \times 10^5$  células/mL, de acordo com a escala de MacFarland e ajustada também através de leitura em espectrofotômetro ( $D.O_{.550\text{nm}} = 0,5$ ).

Após a formação do tapete celular sobre as lamínulas contidas na placa de 24 orifícios, por aproximadamente de 48h, o sobrenadante foi desprezado e as

células lavadas por 3 vezes com 1mL cada de PBS 0,05 M, pH 7.2 estéril. Em seguida, cada poço foi inoculado com 500µL da suspensão padronizada de *P. brasiliensis* em PBS e então acrescentado 500µL de meio de cultivo e em outros poços foram acrescentados apenas de 1,0 mL de meio de cultivo. A seguir, as células infectadas e não-infectadas foram incubadas em estufa a 36,5°C, em diferentes períodos de tempo.

#### 4.4.2 Períodos de infecção

O período de infecção com as células epiteliais A549 foi empregado de acordo com Monteiro da Silva (2004). A infecção das células epiteliais por *P. brasiliensis* foi avaliada em diferentes intervalos de tempo, como 3, 5, 8 e 24h e os macrófagos foram avaliados nos intervalos de 3, 5, 10 e 24h.

#### 4.4.3 Reação de Imunofluorescência

Foi realizada a imunofluorescência com as lamínulas preparadas com monocamada de células epiteliais e macrófagos infectados com *P. brasiliensis* por um período de 3, 5, 8, 24 e 3, 5, 10 e 24h, respectivamente. O uso de dois fluoróforos possibilitou a observação do fungo intra e extracelular e das proteínas celular, como descrito por Heesemann e Laufs (1985).

A reação dupla foi realizada com anticorpo primário anti-*cell-free* (Pb 18) para a marcação do fungo e anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado com Alexa Fluor® 594 (Molecular Probe) e para a observação das proteínas de junções, ancoramento e marcadores da via fagolisossomal celular foi utilizado anticorpo secundário anti-IgG conjugado com Alexa Fluor® 488 (Molecular Probe). Para as proteínas de junção e ancoramento celular, foi realizada apenas imunofluorescência simples com o anticorpo primário e seu respectivo anticorpo secundário.

As lamínulas contendo a monocamada de células infectadas com *P. brasiliensis* foram permeabilizadas com Triton X-100 0,5% em PBS e incubadas a temperatura ambiente por 30 min. Após lavagens em PBS-Tween-20 0,25% (PBS-T) gelado, foram incubadas com solução de bloqueio (BSA 2,5% (Sigma) + leite Molico desnatado® 1% + Soro fetal bovino 8%) (FERNANDES DA SILVA,

1998) por 30 minutos à temperatura ambiente. Após o período de incubação, a solução de bloqueio foi desprezada e então foi adicionado o anticorpo primário anti-*cell-free* do isolado de Pb18 (diluído 1:50 em PBS) por uma hora a 37°C. Após novas lavagens com PBS-T gelado, as lamínulas foram incubadas com anti-IgG de coelho conjugado com Alexa Fluor® 594 (diluído 1:300 em PBS) por uma hora a 37°C. Após novas lavagens com PBS-T foi realizada a incubação com anticorpo primário utilizado, como descrito na tabela 1, por 1h a 37°C e o anticorpo secundário anti-IgG, por 30 minutos a 37°C. Após novas lavagens com PBS-T gelado, as lamínulas foram montadas com anti-*fading* (p-phenylenediamine (Sigma)/ glicerol/ PBS 0.01M pH 8.6) e as imagens foram analisadas por microscopia confocal a laser (LSM 510 – META, Zeiss). Na tabela 1 estão descritos os anticorpos e seus respectivos títulos e origem empregados neste trabalho.

#### **4.5 Imunomarcação das proteínas celulares**

##### **4.5.1 Proteínas de junções celulares**

Foram utilizados anticorpos para marcar proteínas de junções oclusivas (anti-claudina-1, anti-claudina-4 e anti-occludina) e anticorpo secundário anti-IgG de cabra Alexa Fluor® 488. Para imunomarcação de junção aderente foi utilizado anticorpo anti-E-caderina, com anticorpo secundário conjugado com Alexa Fluor® 594 e para marcação das junções comunicantes foi utilizado anticorpo anti-conexina 43 e anticorpo secundário conjugado com Alexa Fluor® 488.

##### **4.5.2 Proteínas de ancoramento intracelular**

Foram utilizados anticorpos primários anti-talina e anti-vinculina e anticorpo secundário conjugado com Alexa Fluor® 594.

##### **4.5.3 Proteínas da via endocítica**

Foram utilizados anticorpos para marcar a via endocítica. Para endossomo precoce foi utilizado soro anti-clatrina, para endossomo tardio foi utilizado soro



anti-Rab7 e para lisossomo, soro anti-LAMP-1. Os anticorpos secundários utilizados foram anti-IgG conjugado Alexa Fluor® 488 e anti-IgG conjugado com Alexa Fluor® 594.

Tabela 1: Anticorpos utilizados nas reações de imunofluorescência.

<b>Anticorpos</b>	<b>Título dos anticorpos</b>	<b>Origem dos anticorpos</b>	<b>Marca</b>
Claudina-1	1/100	Monoclonal cabra	Santa Cruz
Claudina-4	1/100	Monoclonal cabra	Santa Cruz
Ocludina	1/100	Monoclonal cabra	Santa Cruz
E-Caderina	1/50	Policlonal coelho	Santa Cruz
Conexina 43	1/50	Monoclonal camundongo	Santa Cruz
Talina	1/50	Policlonal coelho	Santa Cruz
Vinculina	1/50	Policlonal coelho	Santa Cruz
Rab7	1/100	Monoclonal camundongo	Sigma
LAMP-1	1/100	Monoclonal camundongo	BD
Clatrina	1/50	Policlonal cabra	Santa Cruz
Alexa Fluor® 488	1/400	Camundongo e Cabra	Molecular Probe
Alexa Fluor® 594	1/300	Coelho	Molecular Probe

#### 4.6 Imunoblot

As células epiteliais e macrófagos foram cultivados em garrafas de cultura contendo meio Ham-F12 e DMEM, respectivamente e acrescido de soro fetal bovino 10% e antibióticos. Após a confluência do tapete celular, o sobrenadante foi removido e as células lavadas com 1mL de PBS 0,05M pH 7,2 estéril. Em seguida, a garrafa foi inoculada com suspensão padronizada de *P. brasiliensis* em PBS e meio de cultivo Ham-F12 ou DMEM. Foram testados os períodos de infecção de 3, 5, 8 e 24 horas para as células epiteliais A549 e 3, 5, 10 e 24h para

macrófagos. Para cada um dos testes, foram também cultivadas garrafas com células não-infectadas e em outras foram colocadas somente o fungo e o meio de cultura das respectivas células para controle do experimento.

Após os períodos de infecção, as células foram lavadas com PBS 0,05 M pH 7,2 para eliminação das células fúngicas não aderentes às culturas celulares, o mesmo foi realizado para as células não-infectadas. Após o período de infecção, as células infectadas e não-infectadas e o fungo foram removidos da garrafa com tampão de lise (100 mM Tris-HCl, pH 7,5, 0,1 M NaCl, 2 mM EDTA, 1% contendo 1 mM (PMSF) fenilmetilsufonil Fluoreto). O lisado foi centrifugado por 10min/ 17500 x *g* 4°C. Após a centrifugação, o *pellet* foi separado do sobrenadante e com este, estimada a quantidade de proteínas pelo método de Lowry et al. (1951). A eletroforese foi realizada com 174µg/ mL de proteínas para as células A549 e 208 µg/ mL para os macrófagos. O sobrenadante das células, juntamente com 80µL do controle positivo, lisado de cérebro de rato (BD), foram submetidos ao SDS-PAGE (LAEMMLI, 1970; STUDIER, 1973) e transferido para membrana de nitrocelulose para a realização da técnica de imunoblot, conforme descrito por TOWBIN et al. (1979). 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.

Assim, as membranas foram bloqueadas com leite desnatado 5% em PBS, por 4 horas, lavadas três vezes com PBS-T e incubadas por 1h a temperatura ambiente com o anticorpo primário, diluído em leite Molico® desnatado 1% em PBS. Após a incubação foram realizadas novas lavagens com PBS-T e a membrana incubada à temperatura ambiente com anticorpo secundário conjugado com peroxidase (Sigma) diluído 1/50 em leite 1% em PBS. Após a incubação foram realizadas novas lavagens e a membrana preparada para revelação com “Enhance chemiluminescence” (ECL™) (TrisHCl 1M pH 8,5/ luminol/ ácido cumárico) e então foi colocada em contato com o filme de raio-X (Tabela 2).

Tabela 2: Anticorpos utilizados nas reações de imunoblot.

<b>Anticorpos</b>	<b>Título dos anticorpos primário</b>	<b>Marca</b>	<b>Origem</b>	<b>Massa Molecular</b>
EEA1	1/10	BD	camundongo	180 kDa
Rab5	1/25	Santa Cruz	Camundongo	25 kDa
Rab7	1/20	Sigma	Camundongo	25 kDa
LAMP-1	1/10	BD	Camundongo	120 kDa

#### 4.7 Imunomarcação de *P. brasiliensis*

Foi realizada uma suspensão de *P. brasiliensis* na escala 0,5 de MacFarland, e esta colocada em contato com meio de cultura DMEM (v/v) e incubadas por 3h em estufa à 37°C. Após a incubação, o fungo foi centrifugado a 12000 x *g*/ 4°C/ 5min e então adicionado 200µL de paraformaldeído 4% por 1h à temperatura ambiente. Após esse período, a suspensão foi lavada 3x com PBS, centrifugando a cada lavagem. Após as lavagens foi realizada a imunomarcação com anti-clatrina, anti-Rab7 e anti-LAMP-1, e a reação foi realizada como descrito anteriormente, sendo lavadas 3x com PBS a cada etapa da reação.

## 5. Resultados

As proteínas de junções celulares e da via endocítica foram analisadas pela técnica de imunofluorescência indireta com um ou dois marcadores e as da via endocítica foram analisadas também por imunoblot.

Para as reações de imunofluorescência foram utilizados os conjugados Alexa Fluor® 488 de cabra e camundongo e Alexa Fluor® 594, e para estes foram realizados os controles com a omissão dos anticorpos primários anti-clatrina, anti-LAMP-1 e anti-*cell free*, respectivamente. Assim, os controles não apresentaram auto-fluorescência na ausência do anticorpo primário (Figura 6).

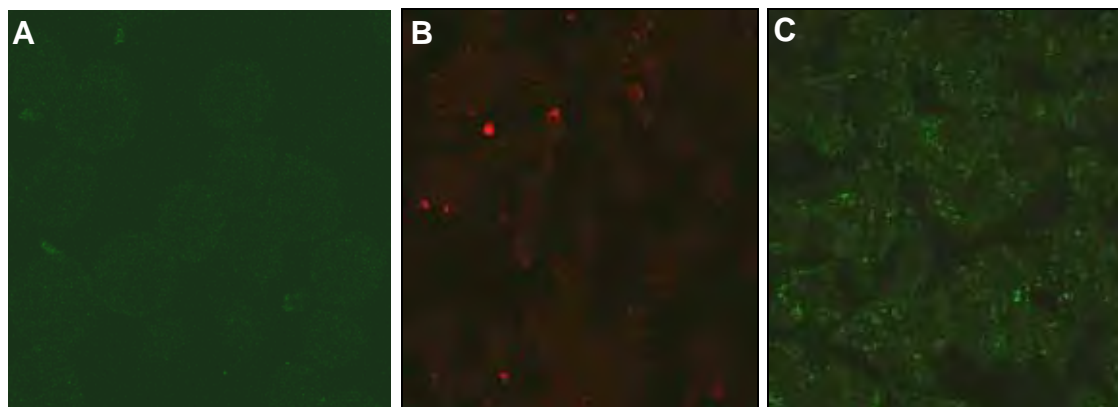


Figura 6: Células epiteliais A549 - Controle dos anticorpos secundários Alexa Fluor®. A – Controle anticorpo secundário Alexa Fluor® 488 de cabra. B – Controle anticorpo secundário Alexa Fluor® 488 de camundongo. C - Controle anticorpo secundário Alexa Fluor® 594. Aumento 63x/1.4.

### 5.1 Imunomarcção das proteínas de junções nas células A549

A imunomarcção das proteínas de junções celulares foi realizada nas células epiteliais A549 infectadas e não infectadas com *P. brasiliensis*. As proteínas de junções foram analisadas por imunofluorescência para junções oclusivas, junções aderentes, junções comunicantes e para proteínas de ancoramento intracelular.

### 5.1.1 Junções Oclusivas

As junções oclusivas foram imunomarcadas com anticorpos anti-claudina-1, anti-claudina-4 e anti-occludina nas células epiteliais A549 infectadas e não infectadas com *P. brasiliensis* por um período de 5h. Apenas o fungo em contato com as células epiteliais A549 demonstrou expressão de claudina-1, como demonstrado na figura 7. As demais foram não reagentes nas condições empregadas.

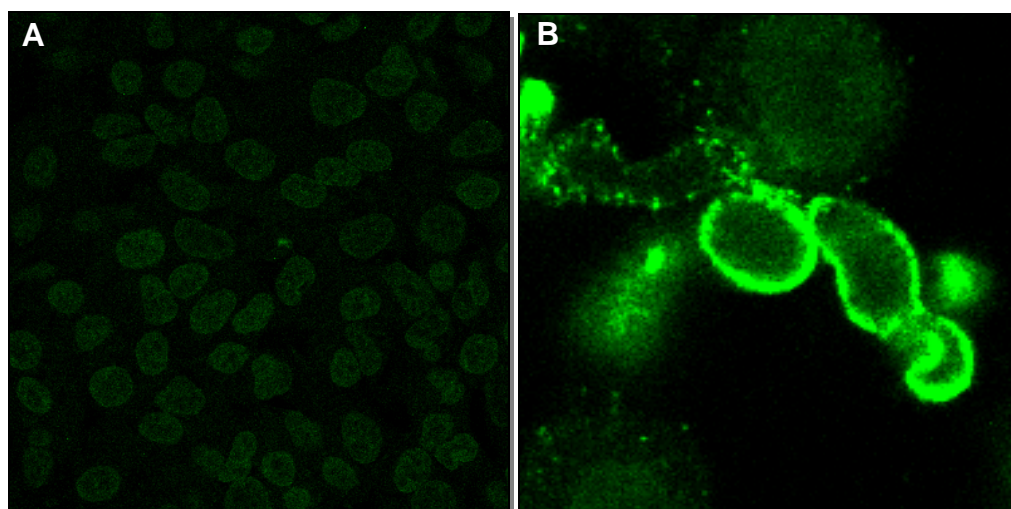


Figura 7: Células A549 marcadas com soro anti-claudina e conjugado marcado com Alexa Fluor® 488. A – Células epiteliais A549 não-infectadas. B – Células epiteliais A549 infectadas por 5h com *P. brasiliensis*. Aumento 63x/1.4.

### 5.1.2 Junções Aderentes

As células A549 infectadas e não-infectadas com *P. brasiliensis* por um período de 5h foram imunomarcadas com anticorpo primário anti-E-caderina (Figura 8). A expressão desta proteína foi de forma difusa pelo citoplasma das células A549 infectadas e não-infectadas. Além disso, também foi constatada a expressão de E-caderina, aparentemente, na parede do fungo e na septação entre as duas células fúngicas, como demonstra a seta na figura 8C.

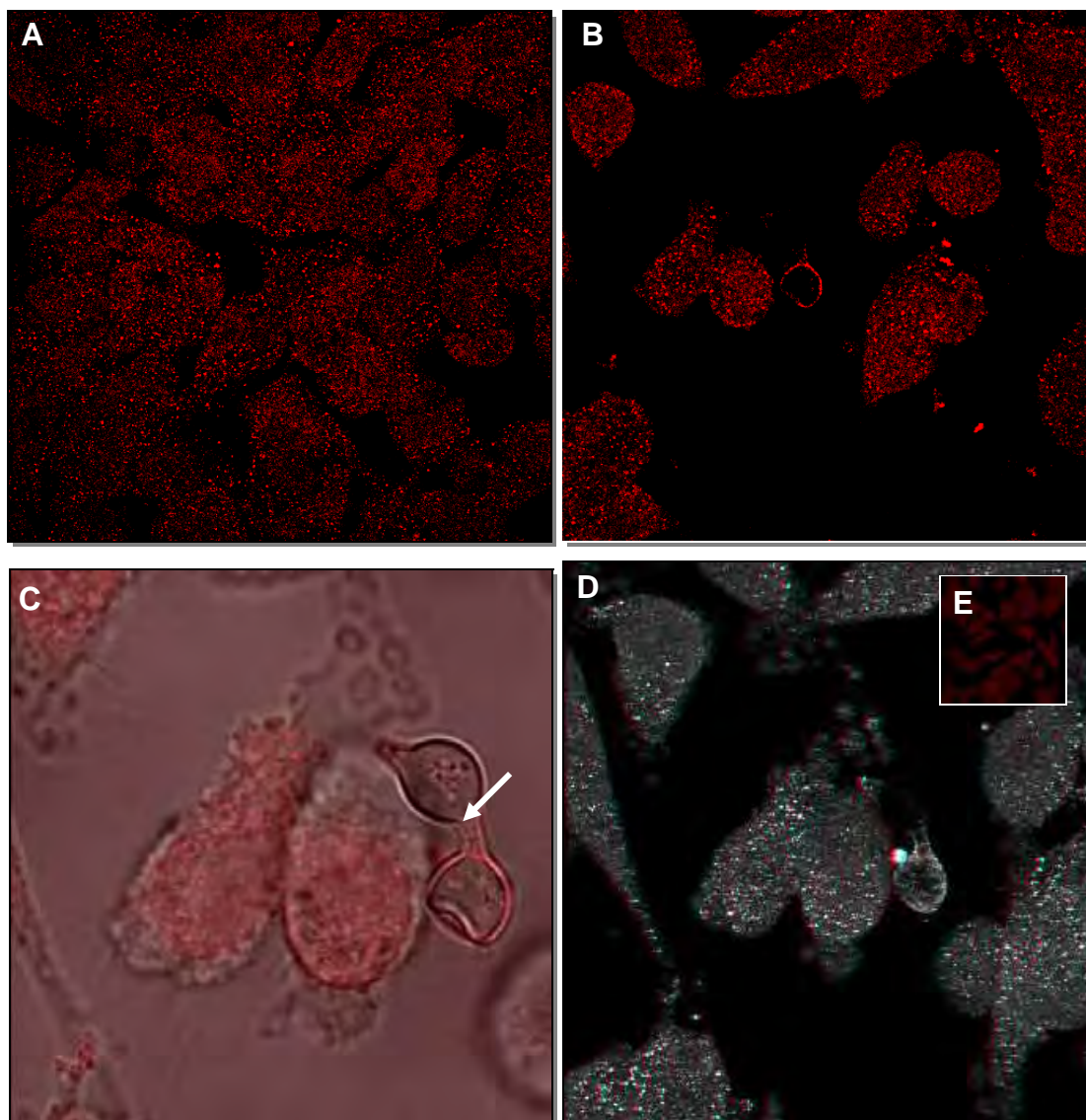


Figura 8: Células epiteliais A549 marcadas com soro anti-caderina e anticorpo secundário Alexa Fluor® 594. Células A549 infectadas (CI) e não-infectadas (CNI) por 5h com *P. brasiliensis*. A – CNI. B – CI com *P. brasiliensis*. C – CI com *P. brasiliensis* (Normasky). D – CI com *P. brasiliensis* (Imagem 3D). E – CNI (controle negativo – omissão do anticorpo primário). Aumento 63x/1.4.

### 5.1.3 Junções Comunicantes

Para as junções comunicantes, as células epiteliais A549 infectadas com *P. brasiliensis* por um período de 5h foram imunomarcadas com anticorpo primário anti-conexina 43, mas não foi evidenciada expressão de conexina 43 nas células epiteliais A549 e no fungo.

#### 5.1.4 Proteína de ancoramento intracelular

As proteínas de ancoramento intracelular foram imunomarcadas com anticorpo primário anti-talina e anti-vinculina nas células epiteliais A549 infectadas e não infectadas com *P. brasiliensis* por um período de 5h. As células A549 quando marcadas com anti-vinculina demonstraram expressão tanto nas células infectadas como nas não-infectadas, sendo distribuídas de forma difusa pelo citoplasma, mas não evidenciada no fungo (Figura 9). As células epiteliais A549 quando marcadas com anti-talina também apresentaram o mesmo padrão de expressão que as marcadas com vinculina, de maneira difusa pelo citoplasma. No entanto, foi observada a expressão de talina no fungo, como demonstrado na figura 10B.

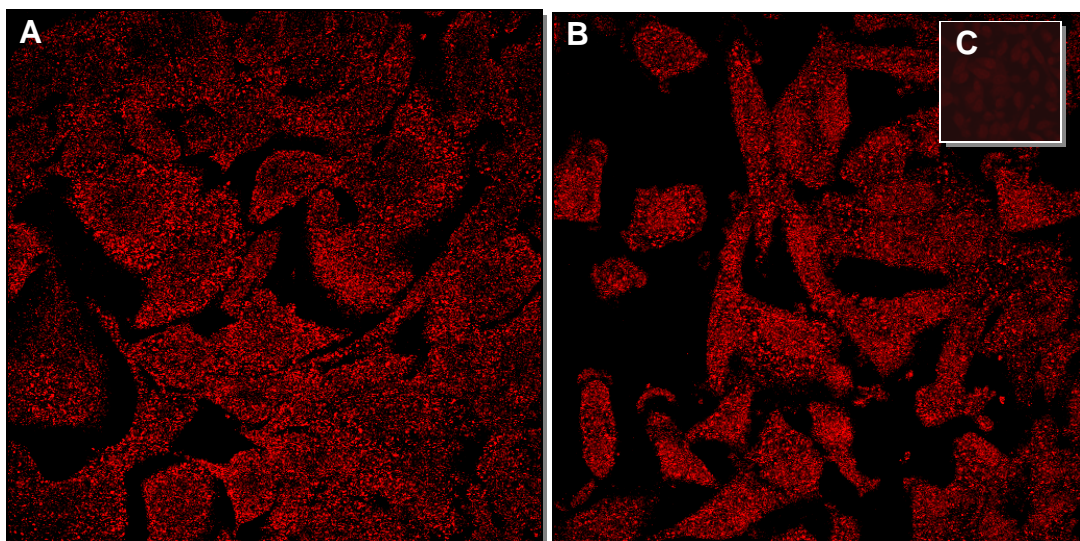


Figura 9: Células epiteliais A549 marcadas com soro anti-vinculina e conjugado Alexa Fluor® 594. Células epiteliais A549 infectadas (CI) e não-infectadas (CNI) com *P. brasiliensis* por 5h. A – CNI. B – CI. C - CNI (controle negativo – omissão do anticorpo primário). Aumento 63x/1.4.



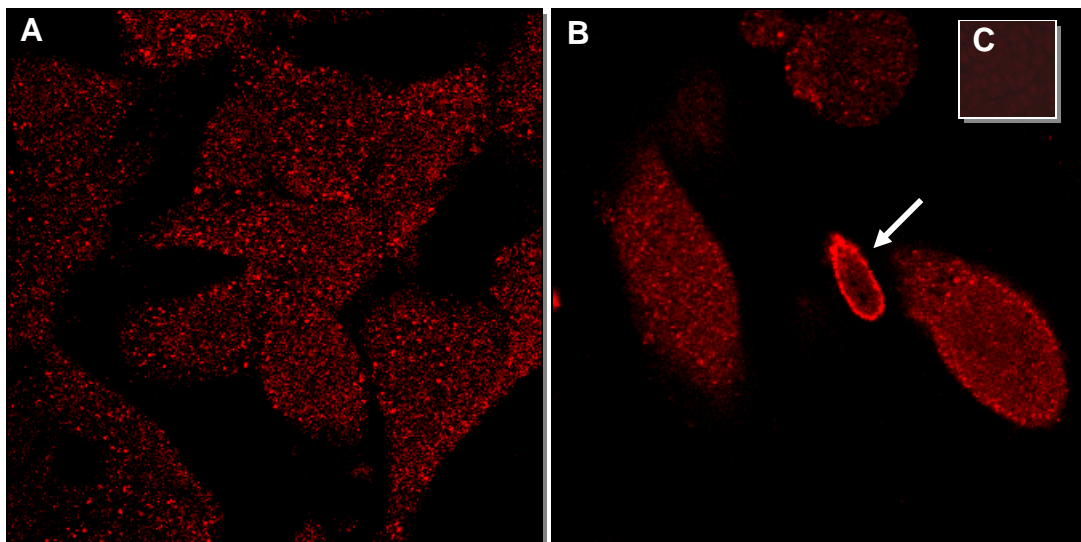


Figura 10: Células epiteliais A549 marcadas com soro anti-talina e conjugado Alexa Fluor® 594. Células epiteliais A549 infectadas (CI) e não-infectadas por 5h com *P. brasiliensis*. A – CNI. B – CI. C - CNI (controle negativo – omissão do anticorpo primário). Aumento 63x/1.4.

## 5.2 Imunomarcção das proteínas endossomais nas células epiteliais A549 infectadas e não-infectadas com *P. brasiliensis*

Foi realizada imunofluorescência dupla e imunoblot das células epiteliais A549 infectadas e não-infectadas com *P. brasiliensis* nos períodos de infecção de 3, 5, 8 e 24h, com o objetivo de co-localizar o fungo junto à via endocítica e também analisar a expressão das proteínas endossomais. Na imunofluorescência, as proteínas endossomais foram marcadas com anticorpo primário (anti-Clatrina, anti-Rab7 e anti-LAMP-1) e anticorpo secundário anti-IgG de cabra e camundongo conjugado com Alexa Fluor® 488 e o fungo *P. brasiliensis* foi marcado com anticorpo anti-*cell free* e o anticorpo secundário anti-IgG coelho conjugado com Alexa Fluor® 594. Para controle da reação foi realizada imunofluorescência das células epiteliais A549 não-infectadas, e como controle negativo, foi omitido o anticorpo primário para as proteínas endossomais.

Para a técnica de imunoblot foi utilizado o lisado das células epiteliais A549 infectadas e não-infectadas, bem como o lisado da suspensão fúngica em meio Ham-12, para demonstrar a diferença na expressão de Rab5, EEA1, Rab7 e LAMP-1 entre as células infectadas e não-infectadas, e também em relação à expressão dessas proteínas no fungo.



## 5.2.1 Endossomo precoce

### 5.2.1.1 Clatrina

Células epiteliais A549 infectadas e não infectadas por 24h com *P. brasiliensis* foram imunomarcadas com anti-clatrina e não houve diferença na expressão de clatrina, sendo esta distribuída de forma difusa pelo citoplasma da célula epitelial e também no fungo. Neste a expressão foi, aparentemente, próximo à parede do fungo como demonstra a figura 11B.

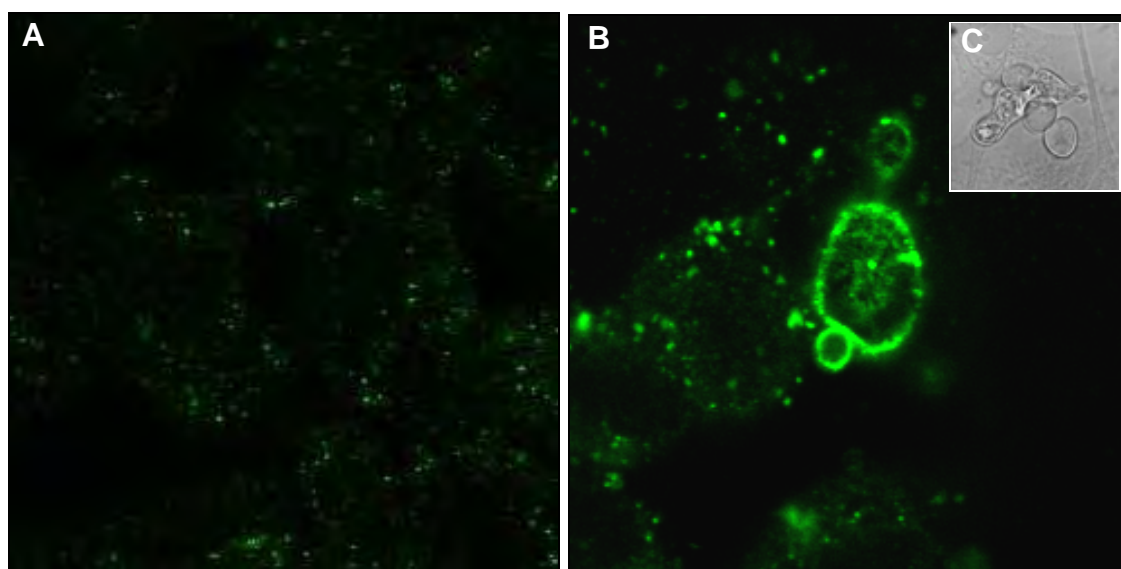


Figura11: Células epiteliais A549 marcadas com soro anti-clatrina e conjugado Alexa Fluor® 488. Células epiteliais A549 infectadas (CI) e não-infectadas (CNI) com *P. brasiliensis* por 24h. A – CNI. B – CI com *P. brasiliensis*. C - CI com *P. brasiliensis* (Normasky) (Controle – omissão anticorpo primário). Aumento 63x/1.4.

### 5.2.1.2 Rab5

A expressão de Rab5 nas células epiteliais A549 e no fungo foi realizada apenas pela técnica de imunoblot, nos tempos de infecção, de 5, 8 e 24h. A análise do imunoblot não revelou diferenças na expressão de Rab5 entre as células infectadas e não-infectadas e não foi possível observar a expressão de Rab5 pelo fungo através deste método (Figura 12). Aparentemente, há diferença

de expressão em função do tempo.

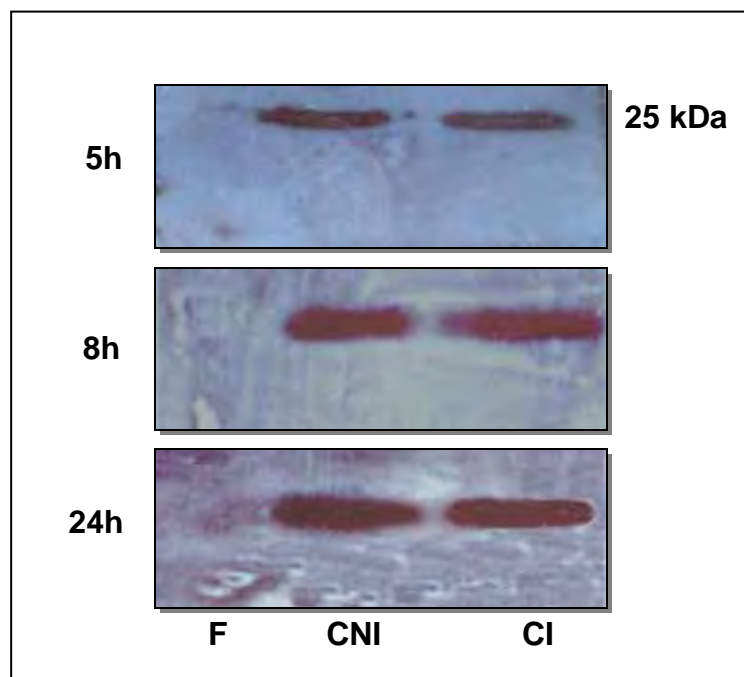


Figura 12: Reação de Imunoblot revelado com anticorpo anti- Rab5. F – Fungo. CNI – Célula epitelial A549 não-infectada. CI – Célula epitelial A549 infectada com o isolado 18 de *P. brasiliensis*.

#### 5.2.1.2. EEA1

A reação de imunoblot foi realizada para EEA1, tanto para o fungo, quanto para as células A549 infectadas e não-infectadas com *P. brasiliensis* por um período de 5, 8 e 24h. Quanto às células epiteliais, não houve alteração no perfil de expressão de EEA1, já no fungo não foi possível observar a expressão de EEA1 pela técnica de imunoblot como demonstrado na figura 13.

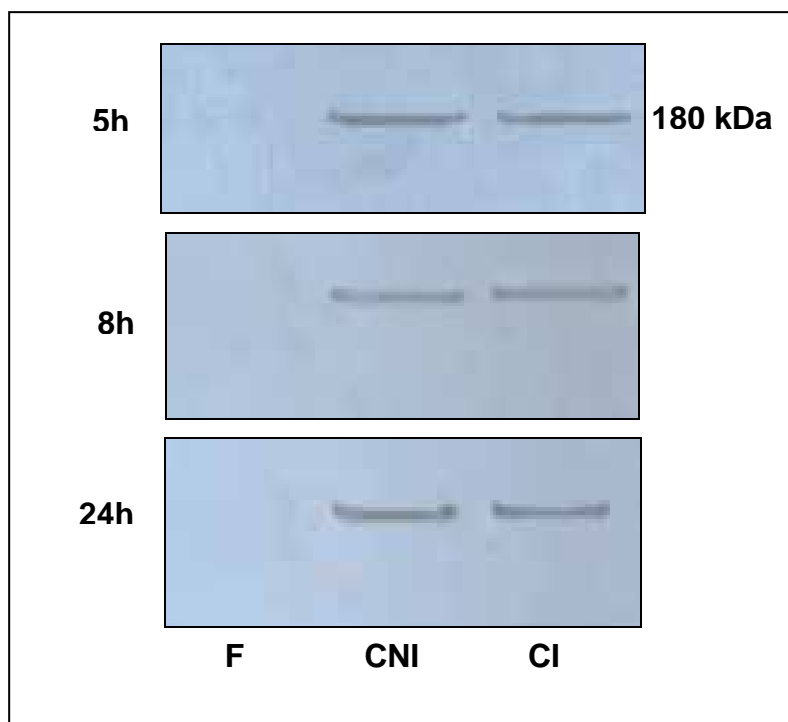


Figura 13: Reação de Imunoblot revelado com anticorpo anti-EEA1. F – Fungo. CNI – Célula epitelial A549 não-infectada. CI – Célula epitelial A549 infectada com o isolado 18 de *P. brasiliensis*.

### 5.2.2 Endossomo tardio

A análise da via endocítica foi realizada com co-localização de Rab7 e o fungo *P. brasiliensis* no endossomo tardio das células epiteliais A549. As células epiteliais foram infectadas com *P. brasiliensis* em diferentes períodos de infecção, 3, 5, 8 e 24h e nestes não foi observada alteração na expressão de Rab7 entre as células infectadas e não-infectadas (Figuras 14-17A). Assim como, não foi possível co-localizar o fungo no interior do endossomo tardio. As células infectadas e não-infectadas apresentaram o mesmo padrão de expressão de Rab7, com fluorescência difusa pelo citoplasma. Também foi constatada a expressão de Rab7 na célula fúngica, como demonstrado nas figuras 14D e 16D.

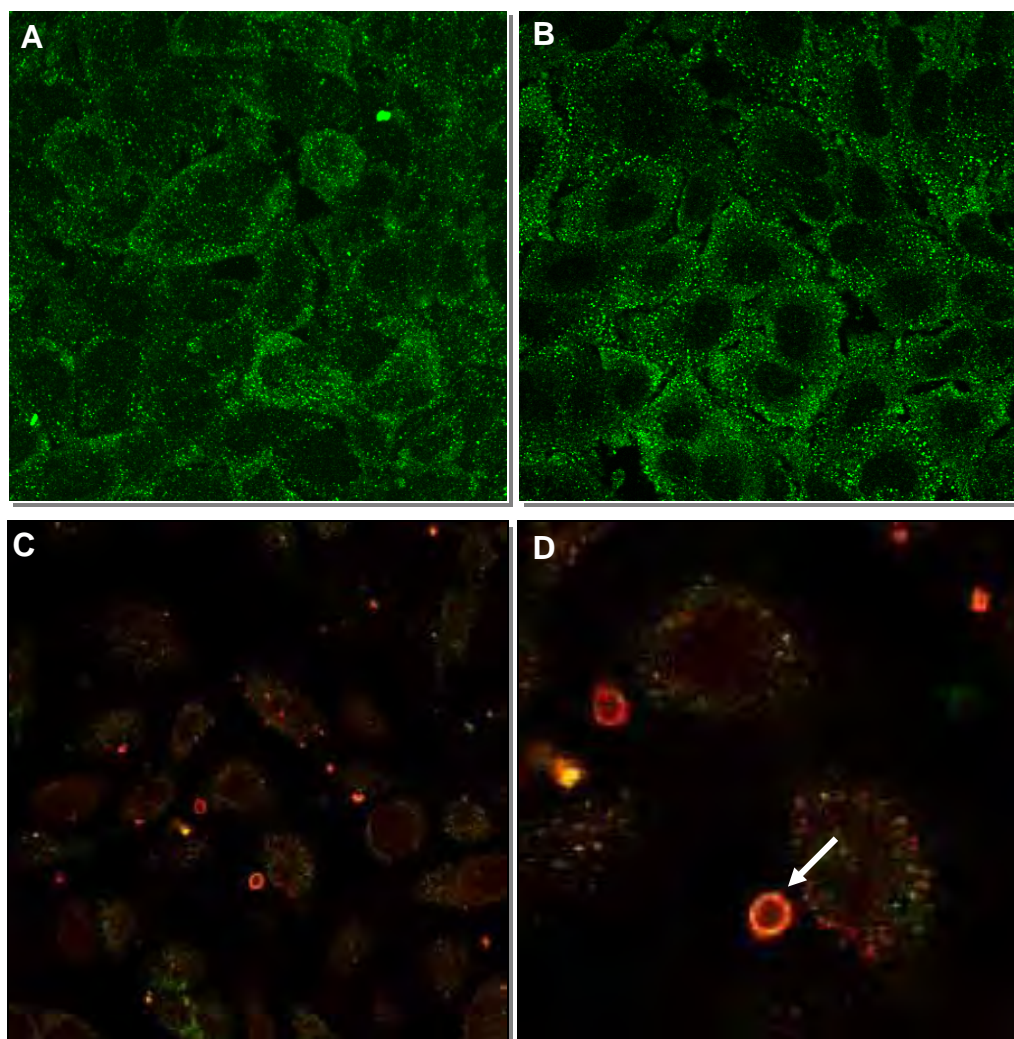


Figura 14: Células epiteliais A549 infectadas (CI) e não-infectadas (CNI) por 3h com *P. brasiliensis* imunomarcadas com soro anti-Rab7. A – CNI. B - CI com *P. brasiliensis*. C - CI com *P. brasiliensis* (Imunofluorescência dupla). D - CI com *P. brasiliensis* (Imunofluorescência dupla - Zoom). Aumento 63x/1.4.

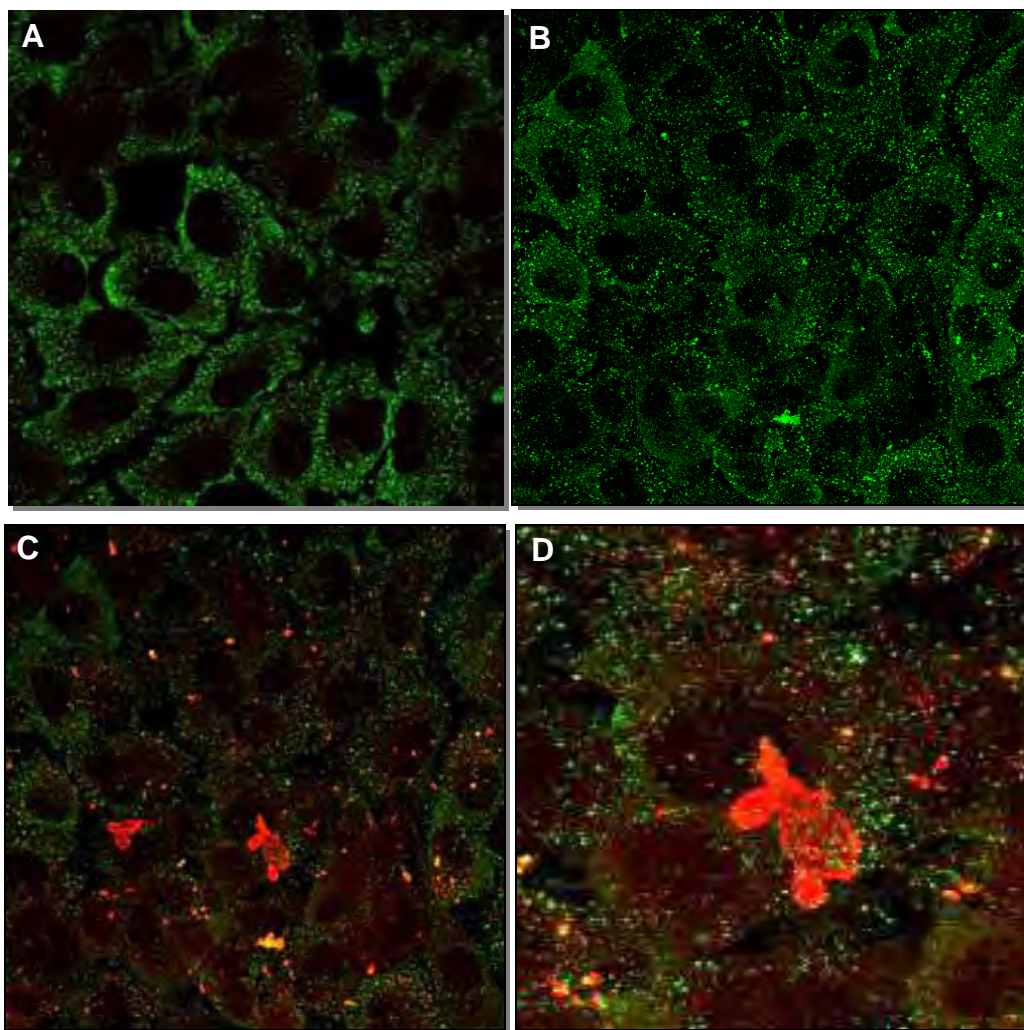


Figura 15: Células epiteliais A549 infectadas (CI) e não-infectadas (CNI) por 5h com *P. brasiliensis* imunomarcadas com anti-Rab7. A – CNI. B - CI com *P. brasiliensis*. C - CI com *P. brasiliensis* (Imunofluorescência dupla). D – CI com *P. brasiliensis* (Projeção e Zoom). Aumento 63x/1.4.



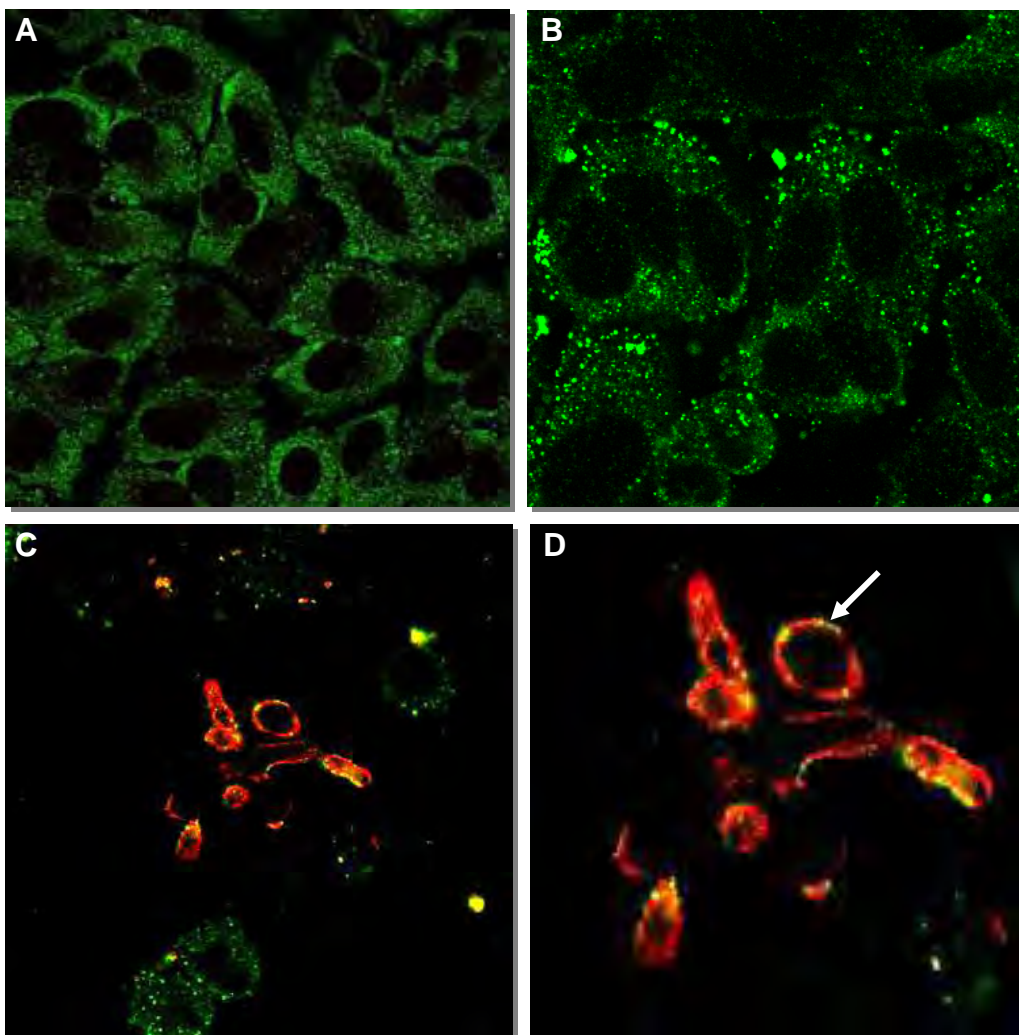


Figura 16: Células epiteliais A549 infectadas (CI) e não-infectadas (CNI) com *P. brasiliensis* por 8h marcadas com anti-Rab7. A - CNI. B - CI com *P. brasiliensis*. C - CI com *P. brasiliensis* (Imunofluorescência dupla). D - CI com *P. brasiliensis* (Projeção e Zoom). Aumento 63x/1.4.

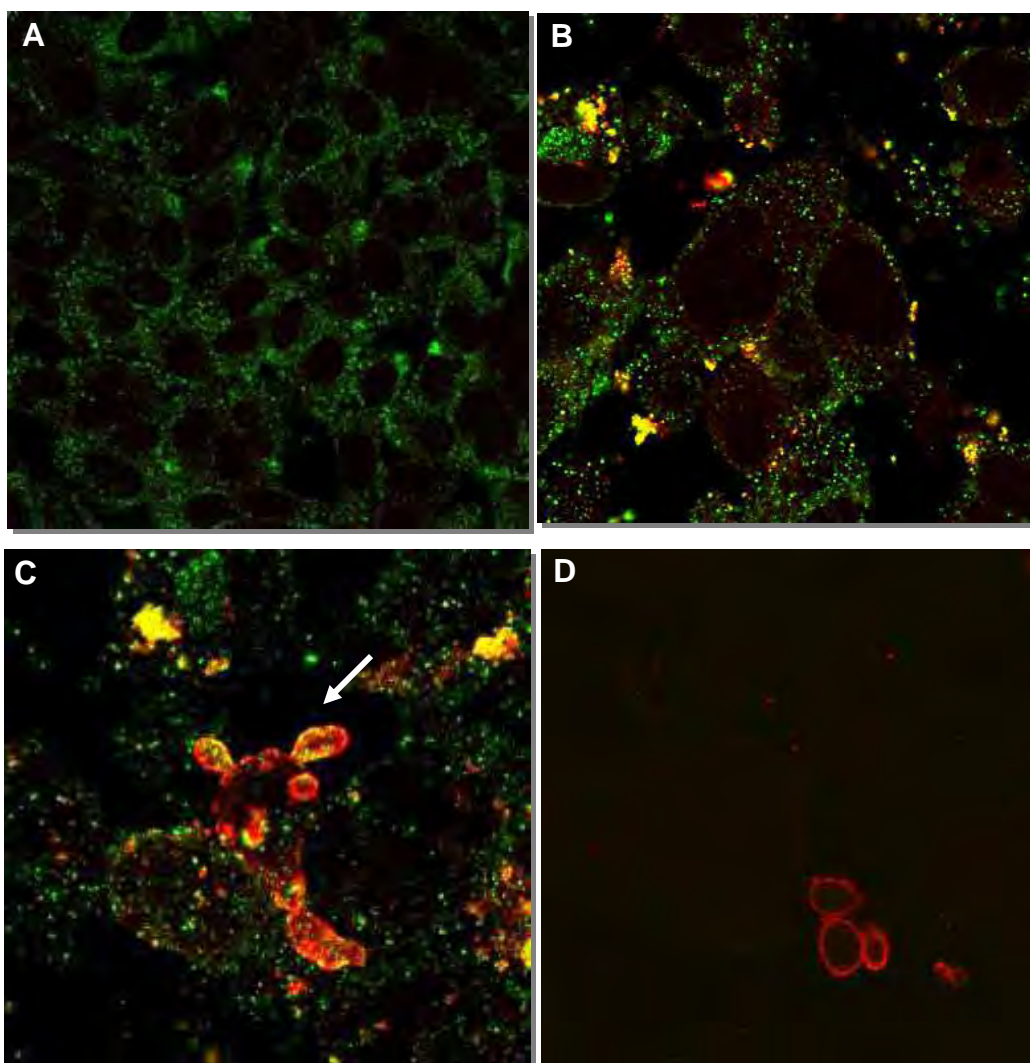


Figura 17: Células epiteliais A549 infectadas (CI) e não-infectadas (CNI) com *P. brasiliensis* por 24h marcadas com anti-Rab7. A - CNI. B – CI com *P. brasiliensis* (Imunofluorescência dupla). C – CI com *P. brasiliensis* (Imunofluorescência dupla com Projeção). D – Controle Alexa Fluor® 488. Aumento 63x/1.4.

O marcador de endossomo tardio, Rab7, também foi analisado pela técnica de imunoblot, nos períodos de infecção de três e 24h, onde, aparentemente, também não demonstraram alteração na expressão. A expressão de Rab7 no fungo, observada nas imagens de imunofluorescência, não foi evidenciada pela técnica de imunoblot (Figura 18).

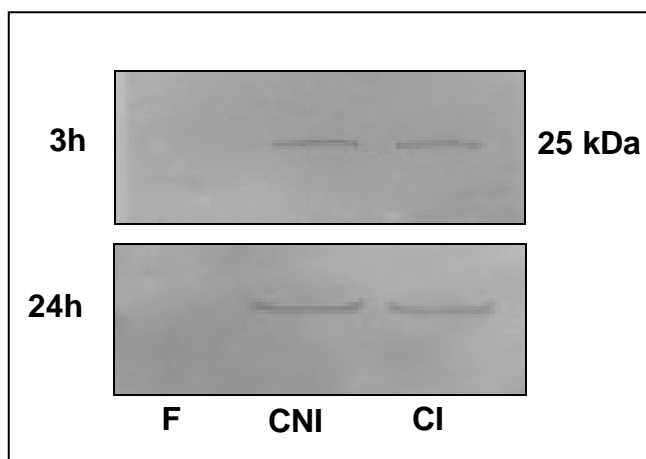


Figura 18: Reação de Imunoblot revelado com anticorpo anti-Rab7. F – Fungo. CNI – Célula epitelial A549 não-infectada. CI – Célula epitelial A549 infectada com o isolado 18 de *P. brasiliensis*.

### 5.2.3 Lisossomo

A imunomarcagem de lisossomo foi realizada com soro anti-LAMP-1, nas células A549 infectadas e não-infectadas com *P. brasiliensis* nos períodos de 3, 5 e 24h (Figuras 19 e 20). A expressão de LAMP-1 não sofreu alteração e sua distribuição ocorreu de forma difusa pelo citoplasma da célula epitelial, sendo que em algumas situações a expressão de LAMP-1, aparentemente, foi localizada mais intensamente na extremidade oposta de onde o fungo estava aderido, como demonstrado na figura 19F. A expressão de LAMP-1 no fungo ocorreu de forma discreta, como demonstrado na figura 19C. A co-localização do fungo e lisossomo não foi possível devido à ausência de observação de invasão fúngica nas células epiteliais A549. A imagem D (*Normasky*), da figura 20, representa o controle do anticorpo secundário Alexa Fluor® 488, quando omitido o anticorpo primário anti-LAMP-1.



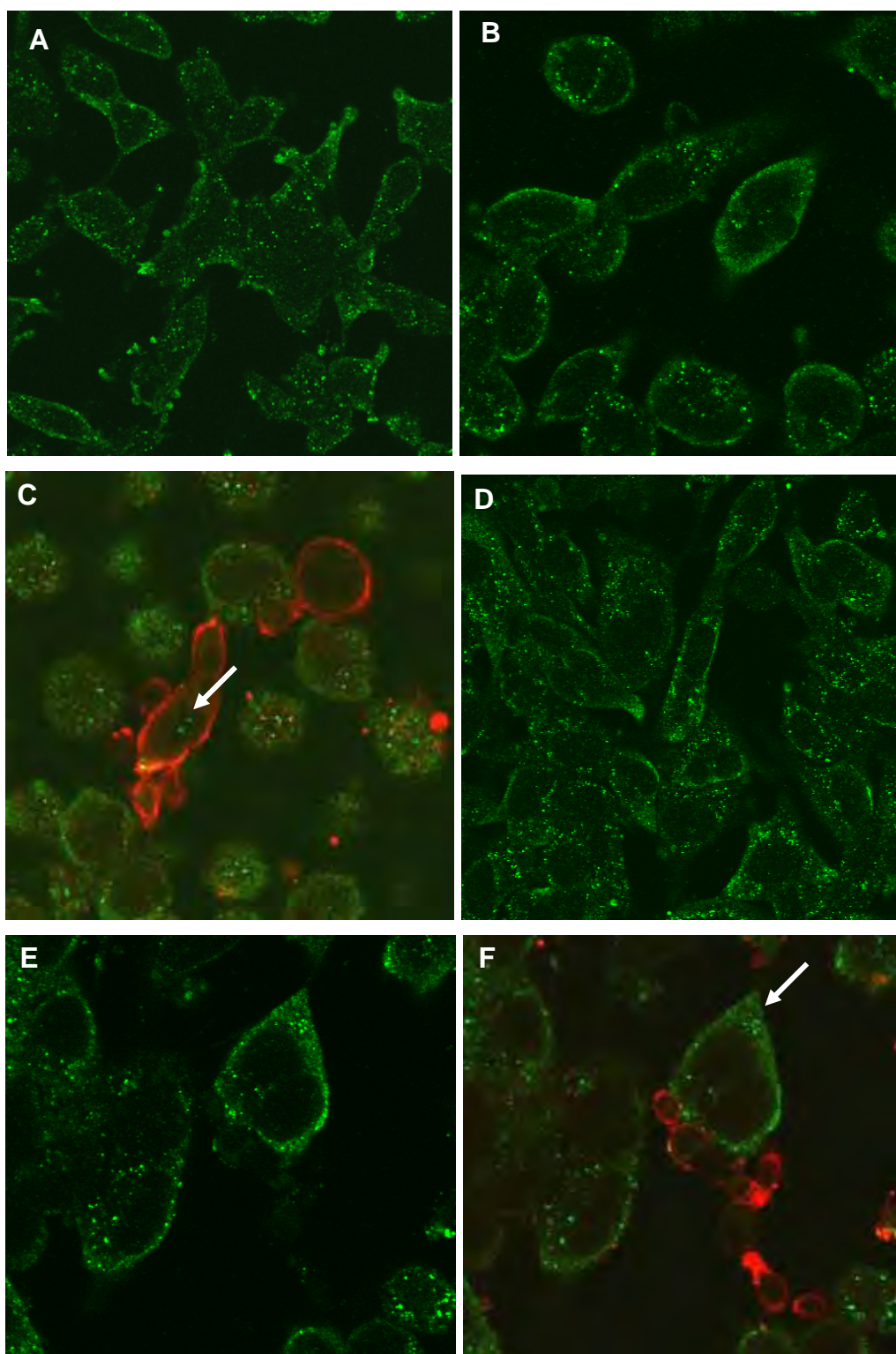


Figura 19: Células epiteliais A549 infectadas e não-infectadas com *P. brasiliensis* por 3h (A – C) e 5h marcadas com anti-LAMP-1(D – F). A – CNI. B - CI com *P. brasiliensis*. C - CI com *P. brasiliensis* (Imunofluorescência dupla). D - CNI. E - CI com *P. brasiliensis*. F - CI com *P. brasiliensis* (Imunofluorescência dupla). Aumento 63x/1.4.

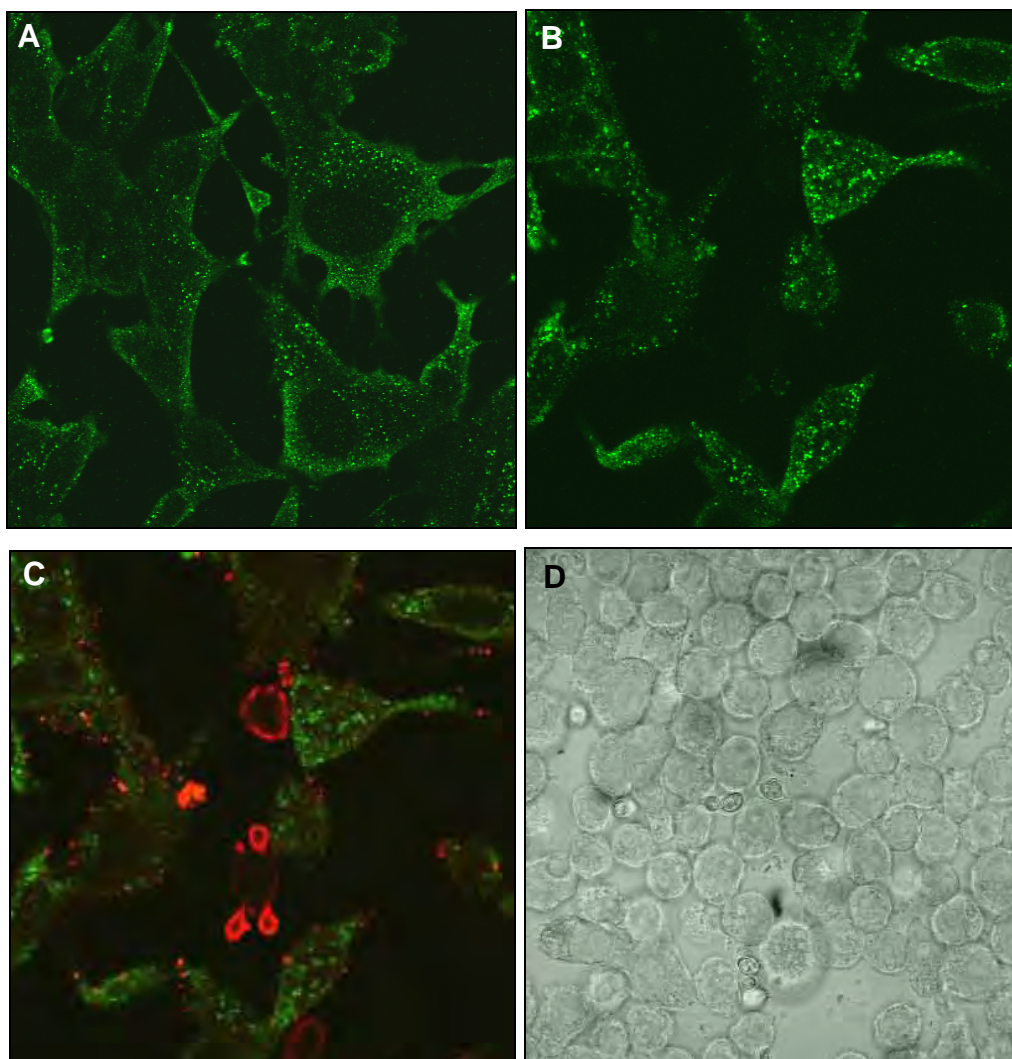


Figura 20: Células A549 Células epiteliais A549 infectadas (CI) e não-infectadas (CNI) com *P. brasiliensis* por 24h imunomarcadas com anti-LAMP-1. A – CNI. B - CI com *P. brasiliensis*. C - CI com *P. brasiliensis* (Imunofluorescência dupla). D – Controle Alexa Fluor® 488 (Normasky).

Foi realizado imunoblot para LAMP-1 com células A549 infectadas e não-infectadas com *P. brasiliensis* por 3, 5 e 24h. Não foi observada, aparente, alteração na expressão de LAMP-1 entre as células infectadas e não-infectadas e não foi observada expressão de LAMP-1 no fungo pela técnica de imunoblot (Figura 21).

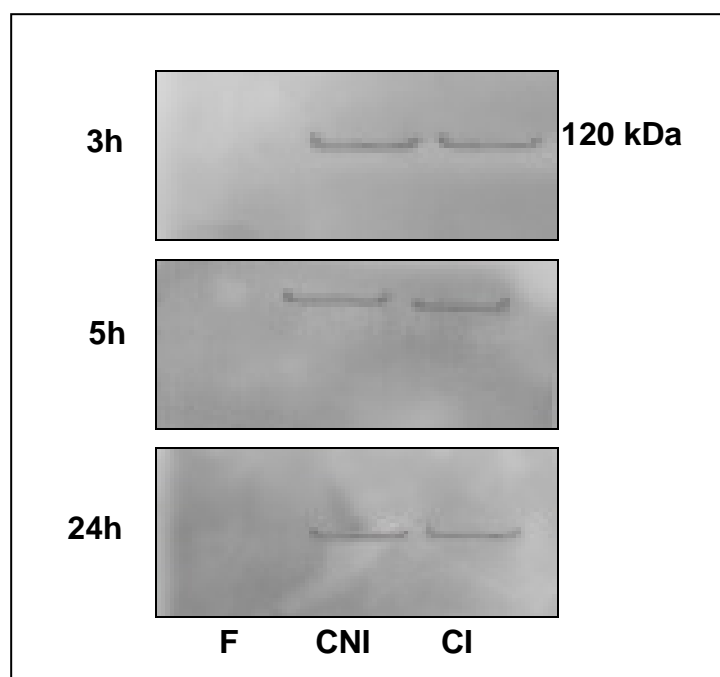


Figura 21: Reação de Imunoblot revelado com anticorpo anti-LAMP-1. F – Fungo. CNI – Célula epitelial A549 não-infectada. CI – Célula epitelial A549 infectada com o isolado 18 de *P. brasiliensis*.

### 5.3. Imunomarcção das proteínas endossomais nos macrófagos AMJ2-C11 infectados e não-infectados com *P. brasiliensis*

Foi realizada infecção dos macrófagos AMJ2-C11 com *P. brasiliensis* nos períodos de 3, 5, 10 e 24h para realização de imunofluorescência dupla e imunoblot. Após esses períodos de infecção foram realizadas as imunomarcções do fungo e das proteínas endossomais, clatrina, Rab7 e LAMP-1 e imunoblot para as proteínas EEA1, Rab7 e LAMP-1.

#### 5.3.1 Endossomo precoce

##### 5.3.1.1 Clatrina

Foi realizada a imunomarcção de clatrina nos macrófagos com soro anti-clatrina e anticorpo secundário anti-IgG de cabra conjugado com Alexa Fluor®

488. Foi evidenciada uma marcação difusa no citoplasma dos macrófagos infectados e estes apresentaram uma aparente diminuição da expressão desta proteína. Já o fungo *P. brasiliensis* apresentou expressão de clatrina próximo à sua parede, estando este aderido ou no interior dos macrófagos, como demonstrado na figura 22D. Não foi observada a co-localização do fungo no interior de vesículas revestidas por clatrina, apenas a expressão de clatrina no próprio fungo.

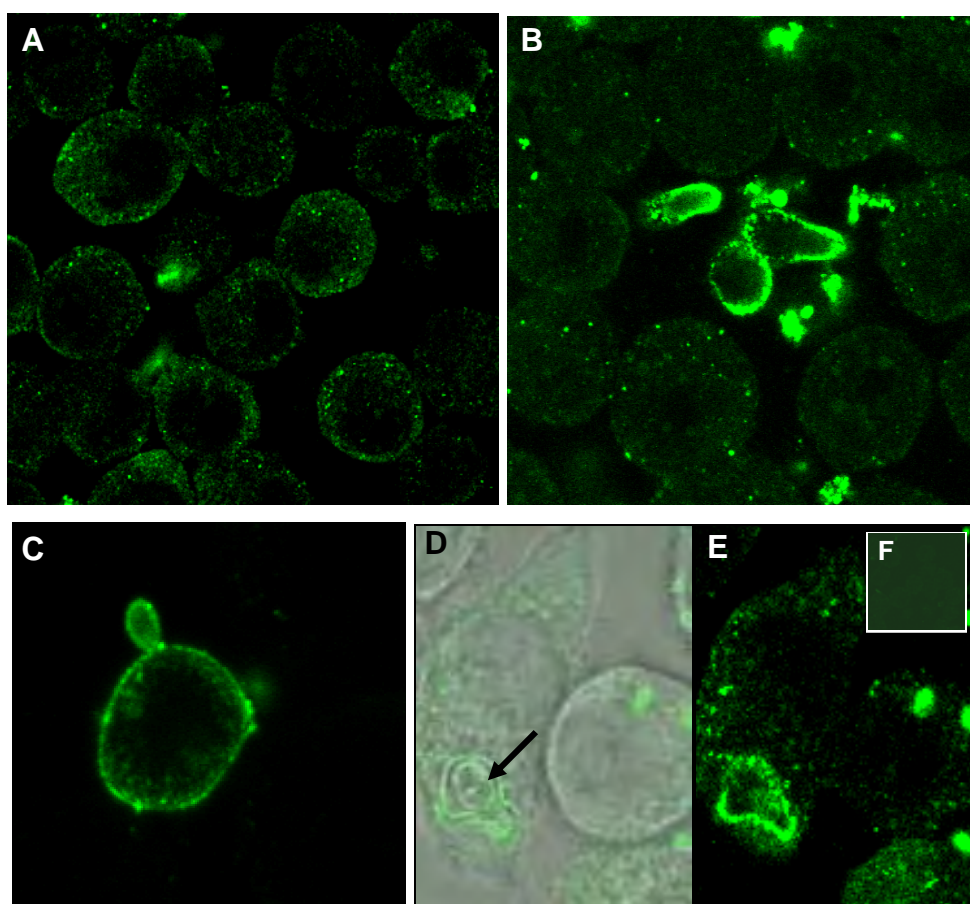


Figura 22: Macrófagos infectados e não-infectados por 5h com *P. brasiliensis* imunomarcados com anti-clatrina. A – Macrófagos não-infectados. B – Macrófagos infectados. C - Macrófagos infectados (Projeção Z). D - Macrófagos infectados (Normarsky). E - Macrófagos infectados. F – Controle do Alexa Fluor® 488. Aumento 63x/1.4.

### 5.3.1.2 EEA1

Foi realizado imunoblot para EEA1 com macrófagos infectados e não-

infectados com *P. brasiliensis* nos períodos de 3, 5, 10 e 24h e também com o fungo em contato com o meio de cultura dos macrófagos (DMEM), nos mesmos períodos de tempo. Foi observado que houve uma diminuição na expressão de EEA1 nos macrófagos infectados com *P. brasiliensis* em relação aos macrófagos não-infectados. Já o fungo não demonstrou expressão de EEA1 pela técnica de imunoblot, como demonstrado na figura 23.

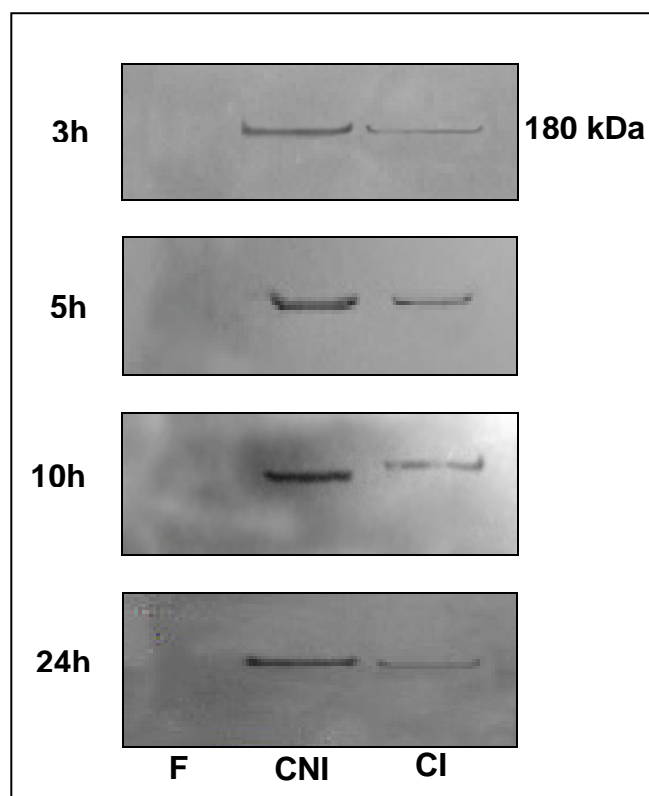


Figura 23: Reação de Imunoblot revelada com anticorpo anti-EEA1. F – Fungo. CNI – Célula não-infectada. CI – Célula infectada com o isolado 18 de *P. brasiliensis*.

### 5.3.2 Endossomo Tardio

O endossomo tardio foi co-localizado com anti-Rab7, em que os macrófagos infectados e não-infectados marcados com anti-Rab7 apresentaram um padrão de expressão diferenciado pela técnica de imunofluorescência, como demonstrado nas figuras 24-25. Os macrófagos infectados e os não-infectados apresentaram um padrão de expressão de Rab7 localizada na periferia das células, sendo que aparentemente, nos macrófagos infectados com *P.*



*brasiliensis*, ocorreu uma expressão maior de Rab7 na periferia da célula. Também foi demonstrada a expressão de Rab7 no fungo, quando este está aderido aos macrófagos (Figura 24B), já no interior dos mesmos não foi possível observar a expressão de Rab7 (Figura 25C). Além disso, foi evidenciado que a expressão de Rab7 foi mais intensa nos brotos do que na célula mãe. Também foi constatado que alguns fungos internalizados apresentavam parede e outros não, como demonstrado nas figuras 25C e 25E, respectivamente. Quando estes macrófagos foram analisados pela técnica de imunoblot não demonstraram alteração na expressão de Rab7 entre as células infectadas e não-infectadas. Quanto à expressão de Rab7 pelo *P. brasiliensis* não foi possível detectar pela técnica de imunoblot nos períodos de 5, 10 e 24h como demonstrado na figura 26.

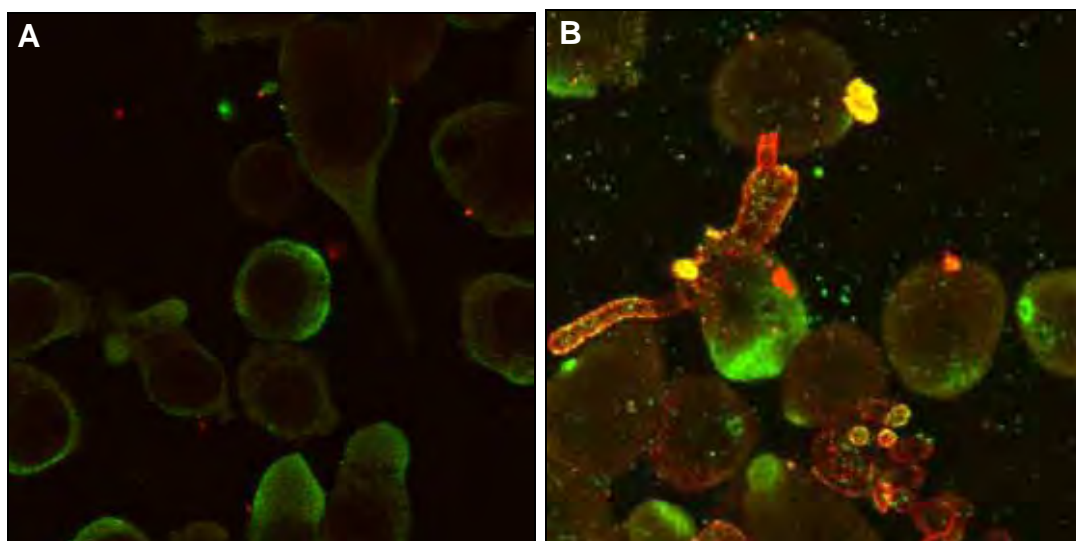


Figura 24: Macrófagos AMJ2-C11 infectados (CI) e não-infectados (CNI) com *P. brasiliensis* por 5h imunomarcados com soro anti-Rab7. A - CNI. B - CI com *P. brasiliensis* (Proiecção). Aumento 63x/1.4.

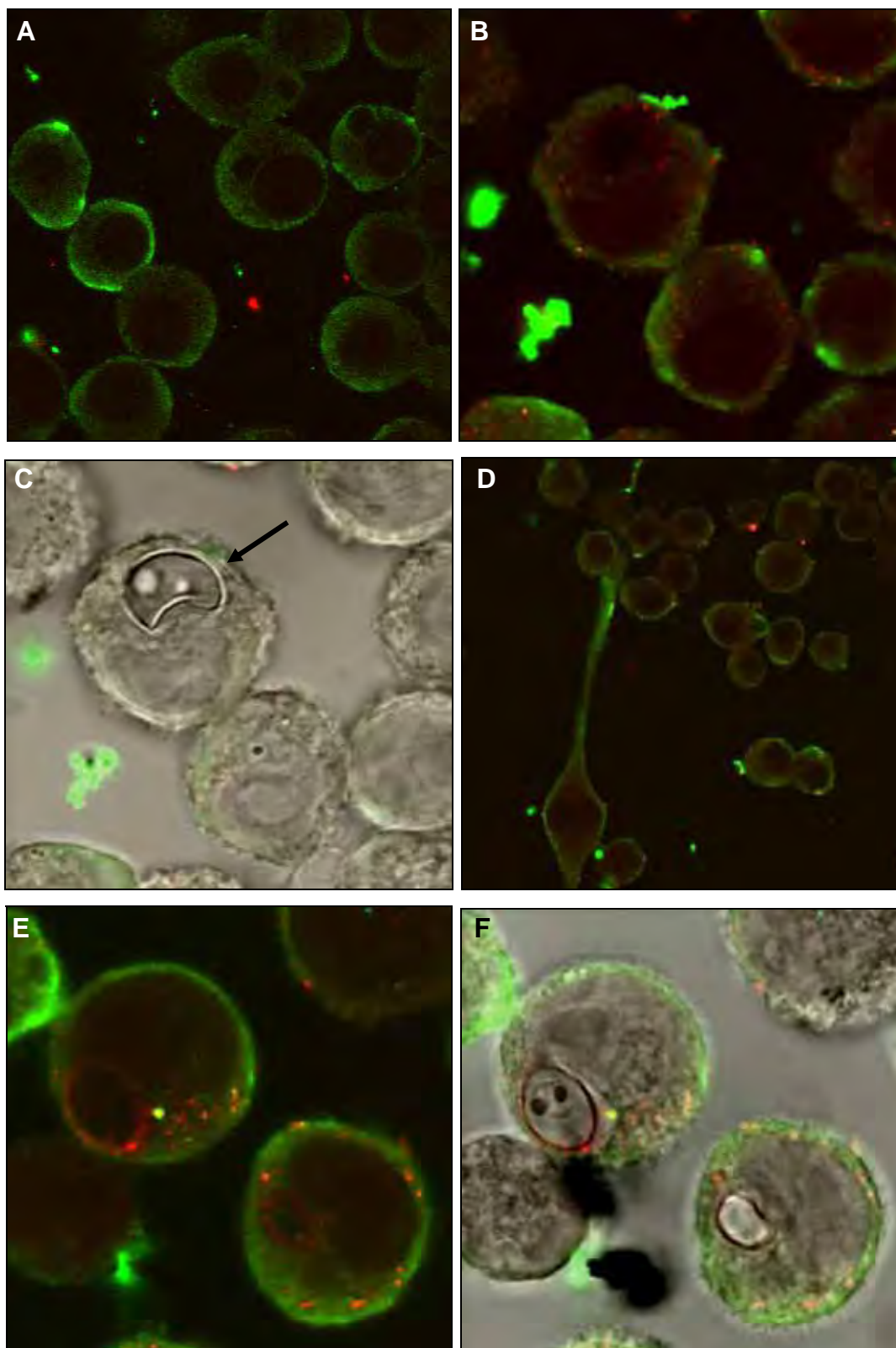


Figura 25: Macrófagos AMJ2-C11 infectados (CI) e não-infectados (CNI) com *P. brasiliensis* por 10h (A – C) e 24h (D – F) marcados com anti-Rab7. A – CNI. B - CI com *P. brasiliensis*. C - CI com *P. brasiliensis* (Normasky). D - CNI. E - CI com *P. brasiliensis*. F - CI com *P. brasiliensis* (Normasky). Aumento 63x/1.4.

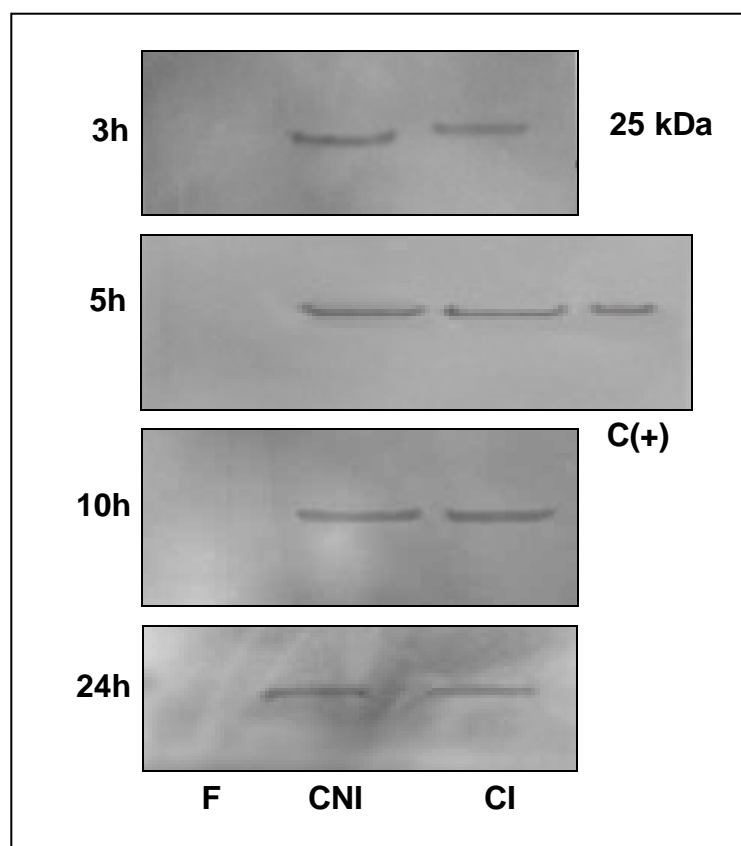


Figura 26: Reação de Imunoblot revelado com anticorpo anti-Rab7. F – Fungo. CNI – Célula não-infectada. CI – Célula infectada com o isolado Pb18 de *P. brasiliensis*. C+ - Controle positivo com proteína Rab7.

### 5.3.3 Lisossomo

Os macrófagos infectados e não-infectados com *P. brasiliensis* foram imunomarcados com anti-LAMP-1 nos períodos de 3, 10 e 24h. Os resultados apresentados nas figuras 27 e 28 não demonstraram expressão diferenciada entre os macrófagos infectados e não-infectados, sendo que esta expressão apresentou-se de forma difusa pelo citoplasma e em algumas células foi observada uma fluorescência mais intensa na periferia de algumas células aparentemente apoptóticas. Na figura 27D o fungo encontra-se no interior do macrófago, provavelmente decorrente de um processo de invasão fúngica. Na figura 28 também é observada invasão aparente de *P. brasiliensis* nos macrófagos, sendo essa interiorização confirmada pela projeção ortogonal, imagem C, e melhor visualizada pelo *normasky* na imagem D, que também demonstra uma aparente delimitação citoplasmática com estrutura semelhante a



vacúolo (Imagem D das figuras 27 e 28).

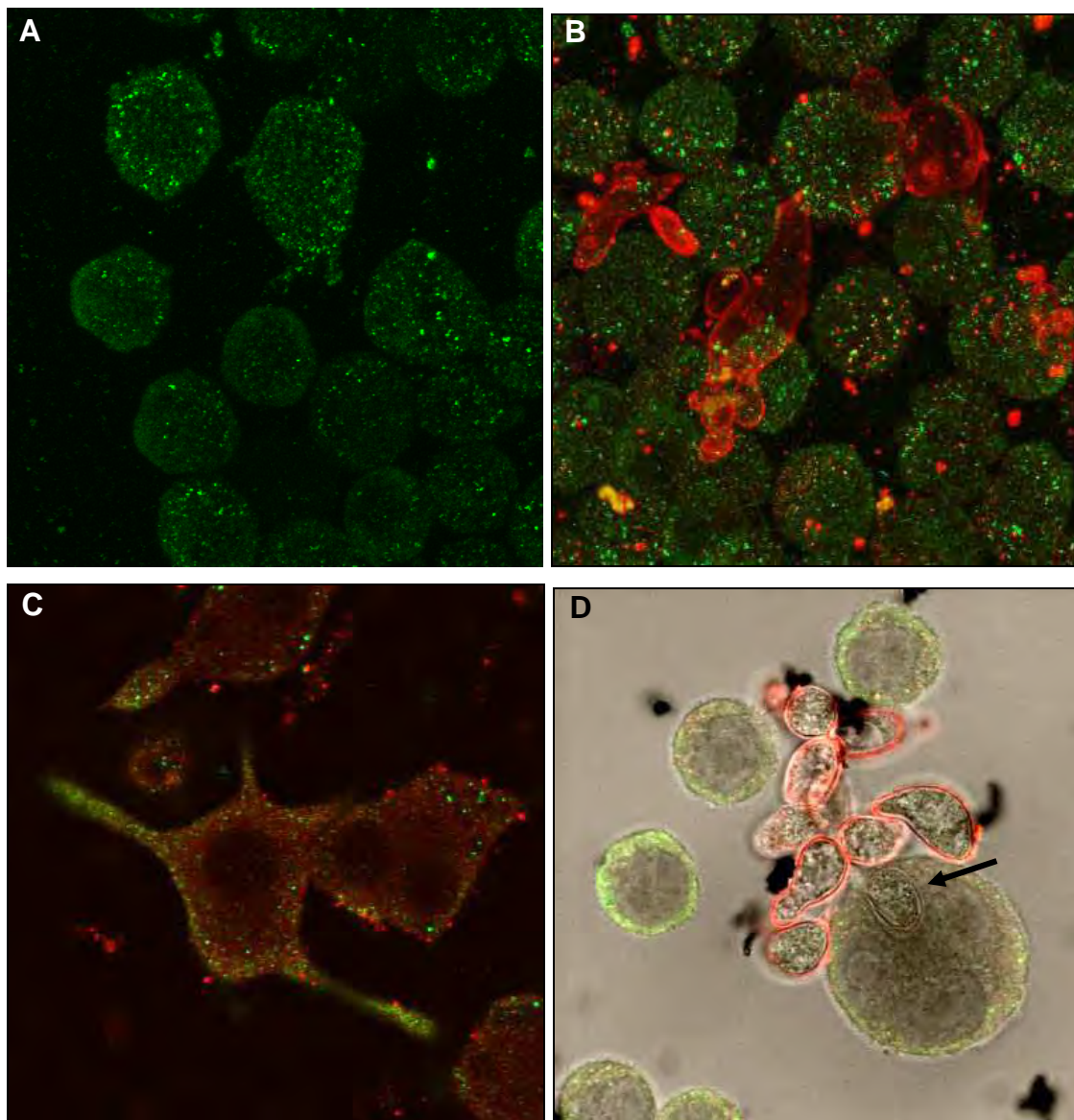


Figura 27: Macrófagos AMJ2-C11 infectados (CI) e não-infectados (CNI) com *P. brasiliensis* por 3h (A e B) 10h (C e D) marcados com anti-LAMP-1. A – CNI. B - CI com *P. brasiliensis*. C - CNI. D - CI com *P. brasiliensis* (Normasky). Aumento 63x/1.4.

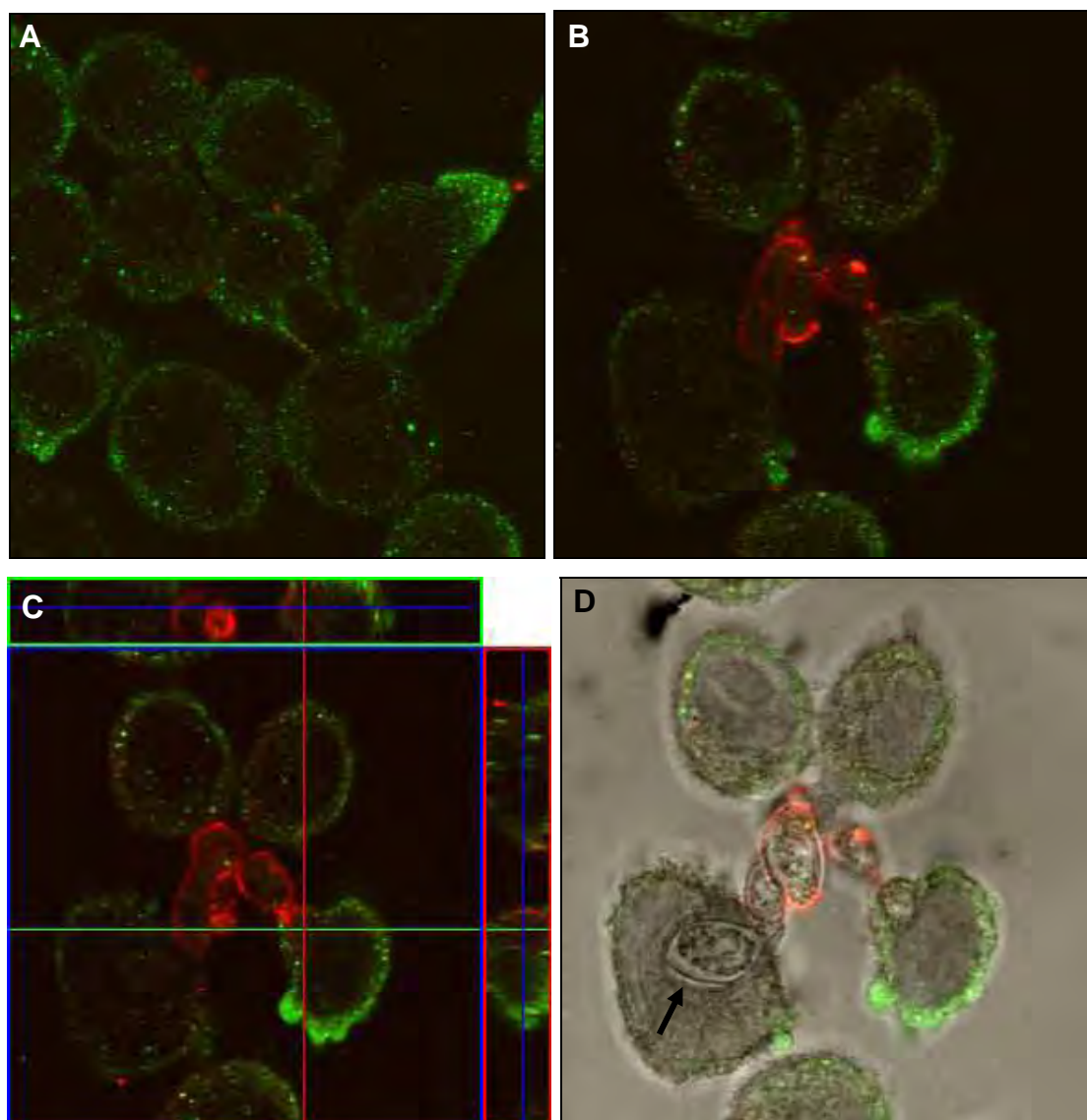


Figura 28: Macrófagos AMJ2-C11 infectados e não-infectados com *P. brasiliensis* por 24h marcados com anti-LAMP-1. A – CNI. B - CI com *P. brasiliensis*. C – CI com *P. brasiliensis* (Projeção ortogonal). D - CI com *P. brasiliensis* (Normasky). Aumento 63x/1.4.

Além da imunofluorescência, também foi realizado imunoblot com os macrófagos infectados e não-infectados com *P. brasiliensis* nos períodos de 3, 10 e 24h. Em nenhum dos períodos foi observada alteração da expressão de LAMP-1 (Figura 29).

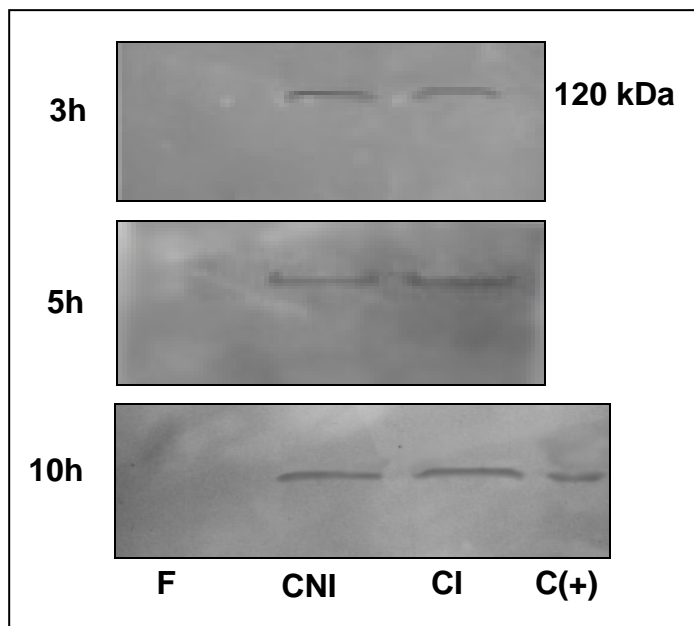


Figura 29: Reação de Imunoblot revelado com anticorpo anti-LAMP-1. F – Fungo. CNI – Célula não-infectada. CI – Célula infectada com o isolado Pb18 de *P. brasiliensis*. C(+) - Controle positivo com proteína LAMP-1.

#### 5.4 Expressão de proteínas em *P. brasiliensis*

Foi observado que o fungo *P. brasiliensis* expressa algumas proteínas em sua célula, como claudina-1, caderina, talina, clatrina, Rab7 e LAMP-1. Assim, foi do que a expressão de clatrina, Rab7 e LAMP-1 ocorre tanto na interação como na ausência de interação com as células do hospedeiro, como demonstrado nas figuras 30 e 31. A imagem A da figura 30 confirma a expressão de clatrina no fungo na ausência de interação e a B representa a imagem 3D da A. A figura 31 apresenta a expressão de Rab7 e LAMP-1 no fungo *P. brasiliensis* na ausência de interação com os macrófagos.

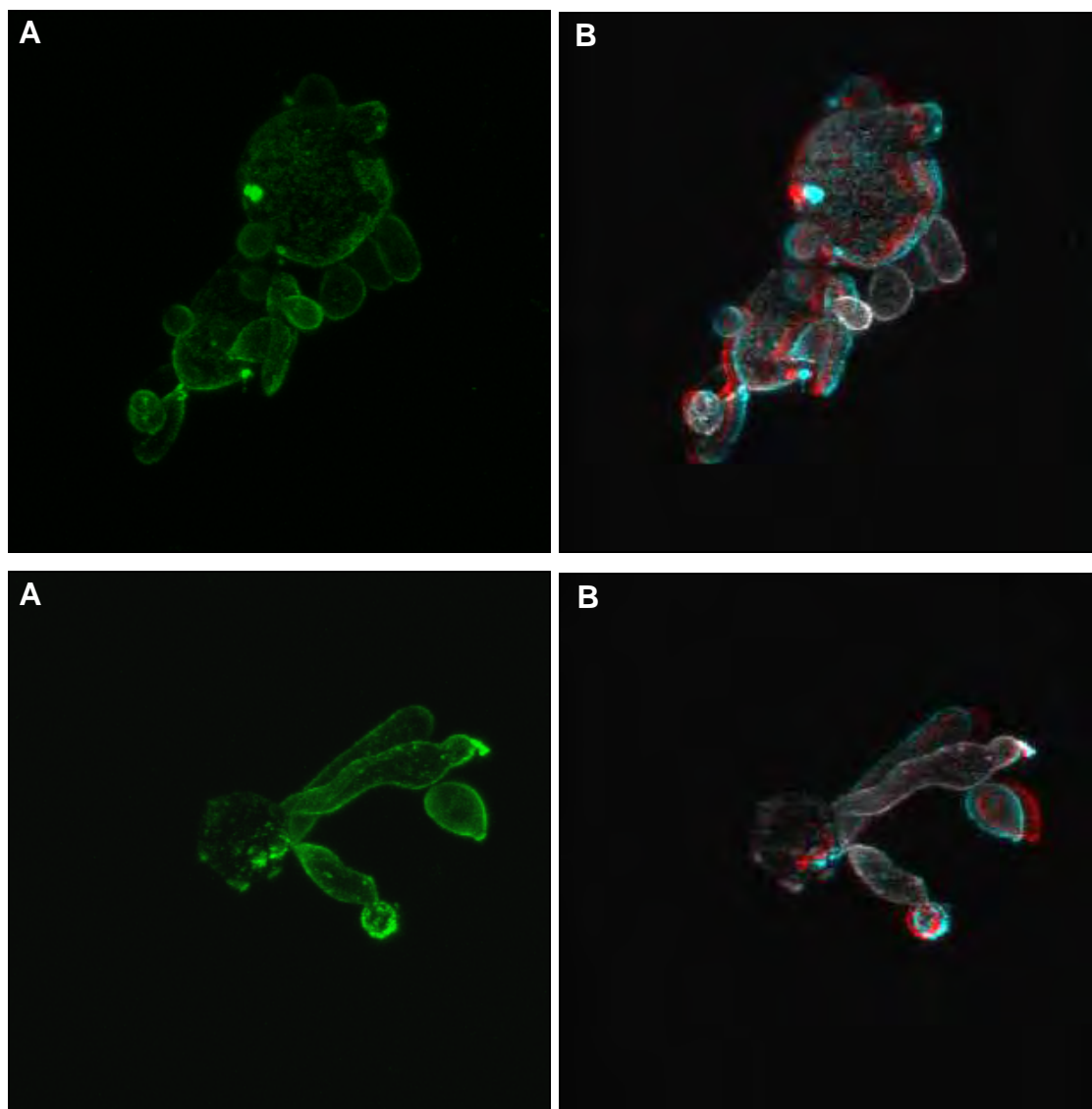


Figura 30: Imunomarcção de *P. brasiliensis* com soro anti-clatrina. A - *P. brasiliensis* imunomarcado com soro anti-clatrina. B - *P. brasiliensis* imunomarcado com anti-clatrina (Imagem 3D).

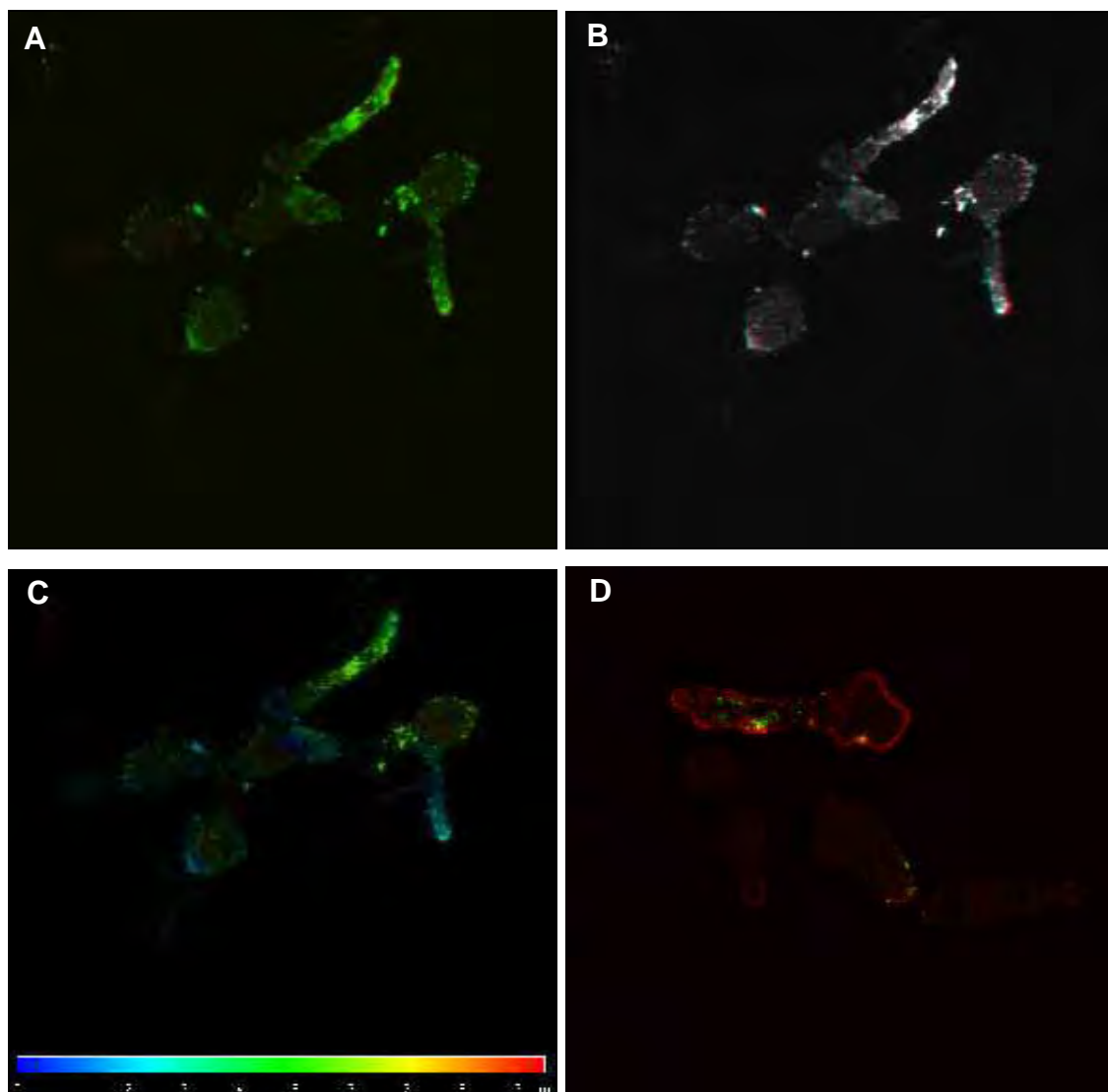


Figura 31: Imunomarcção de *P. brasiliensis* com soro anti-Rab7 e anti-LAMP-1. A - *P. brasiliensis* imunomarcado com Anti-Rab7. B - *P. brasiliensis* imunomarcado com Anti-Rab7 (Imagem 3D). C - *P. brasiliensis* imunomarcado com Anti-Rab7 (Escala em profundidade). D - *P. brasiliensis* imunomarcado com Anti-LAMP-1.

Na tabela 3 estão apresentados os dados resumidos da reatividade de anticorpos relacionados às moléculas de adesão e da via endocítica com os diferentes tipos celulares.

Tabela 3: Resultados das reações de imunofluorescência e imunoblot com diferentes anticorpos relacionados às moléculas de adesão e da via endocítica com os diferentes tipos celulares

<b>IMUNOFLUORESCÊNCIA</b>			
<b>Anticorpos</b>	<b>Pneumócitos tipo I A549</b>	<b>Macrófagos alveolares de camundongo AMJ2-C11</b>	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
<b>Claudina - 1</b>	-	NR	+
<b>Claudinas - 4</b>	-	NR	-
<b>Ocludina</b>	-	NR	-
<b>E-caderina</b>	+	NR	+
<b>Conexina 43</b>	-	NR	-
<b>Clatrina</b>	+	+(↓)	+
<b>Talina</b>	+	NR	+
<b>Vinculina</b>	+	NR	-
<b>Rab7</b>	+	+ “raft”	+
<b>LAMP-1</b>	+	+	+
<b>IMUNOBLLOT</b>			
<b>EEA1</b>	+	+(↓)	-
<b>Rab5</b>	+		-
<b>Rab7</b>	+	+	-
<b>LAMP-1</b>	+	+	-

NR: não realizado

## 6. DISCUSSÃO

*P. brasiliensis* apresenta capacidade de aderir e invadir células epiteliais, contudo pouco se sabe sobre o mecanismo envolvido neste processo. É conhecido que o fungo adere às células epiteliais através de proteínas de sua parede, que foram caracterizadas como adesinas, como gp43 (VICENTINI et al., 1994), proteínas de 19 e 32kDa (GONZALEZ et al., 2005a), proteína de 30 kDa (ANDREOTTI et al., 2005), GAPDH (BARBOSA et al., 2006) e TPI (PEREIRA et al., 2007), que ligam receptores na matriz da célula hospedeira. Após o processo de adesão se inicia a invasão fúngica, que levará o fungo para o interior da célula hospedeira, promovendo alterações no citoesqueleto, como observado por Monteiro da Silva et al. (2004) com as células epiteliais A549. A entrada do fungo em células epiteliais *in vivo* e *in vitro* foi observada em estudos desenvolvidos por De Brito et al. (1973) e através de microscopia eletrônica, em que o fungo, aparentemente, estava no interior de um vacúolo (MONTEIRO DA SILVA et al., 2001). Assim, com a finalidade de ampliar o conhecimento sobre adesão e invasão deste fungo, pretendeu-se avaliar outras moléculas relacionadas com adesão e também com a via endocítica em células epiteliais infectadas com *P. brasiliensis* bem como, em macrófagos.

Em nosso estudo foi verificado que as células epiteliais A549 não expressaram algumas proteínas de junções oclusivas, como claudina-1, claudina-4 e ocludina, mas o fungo *P. brasiliensis* apresentou aparentemente expressão de claudina-1. O estudo da adesão possibilita avaliar as diferentes moléculas relacionadas à interação parasito-hospedeiro. Em 2008, Meertens et al. demonstraram que claudina-1, claudina-6 e claudina-9 são expressas nas células CD81<sup>+</sup> (células endoteliais) e estas apresentam a função de moléculas co-receptoras para entrada do vírus nas células (ZHENG et al., 2007). Além de apresentar a função de receptor para a entrada de microrganismos, as junções oclusivas podem ser consideradas como “obstáculos” para que os microrganismos possam ter acesso às células. Podem-se ter também microrganismos que podem atuar diretamente estas proteínas, como a enzima, serino-peptidase, produzida por *Aspergillus fumigatus*, que atua no processo alérgico alterando a função das claudinas e levando a uma reação inflamatória (ROBINSON et al., 2001). Por outro lado, foi observado que alguns tipos de

claudinas são específicos para cada tipo de tecido. Assim, nossos resultados podem ser explicados pela ausência de expressão desta nestas células e também por termos estudado células em monocamadas e não polarizadas. Células A549 em monocamada, não possuem as características funcionais e estruturais dos tecidos das quais elas foram derivadas (CARTERSON et al., 2005). O entendimento dos mecanismos envolvidos na invasão de microrganismos é de crucial importância e pode ser fundamental no desenvolvimento de estudos de sua patogênese. Aparentemente, as células A549 em monocamada não expressam as junções oclusivas, podendo assim, justificar o padrão de adesão e invasão verificado anteriormente (MENDES-GIANNINI et al., 2008). Em contraste, observamos a expressão de claudina-1 na parede de *P. brasiliensis*, apesar da seqüência desta proteína não ter sido identificada no genoma do fungo e este ter sido 80% seqüenciado. Já o nematódeo *Caenorhabditis elegans* apresenta proteína de junção celular VAB-9, que é uma proteína integral de membrana com elevada similaridade para BCMP1 (proteína 1 de membrana de células cerebrais, sendo um membro das proteínas de junção celular da família das claudinas/ PMP22/ EMP) e mutantes para esta mostraram que estaria relacionada a desorganização de F-actina e junções celulares (SIMSKE et al., 2003).

Quanto à expressão de E-caderina nas células epiteliais A549, a mesma foi observada de forma difusa pelo citoplasma e principalmente no fungo. De acordo com o que a literatura relata, alguns microrganismos expressam proteínas com homologia às caderinas. Em 2007, Phan et al. analisaram uma invasina de *C. albicans*, conhecida como Als3, que interage com as caderinas das células endoteliais e epiteliais da mucosa oral, e sugerem que a Als3 seja uma caderina e assim propuseram que provavelmente poderia ocorrer interação caderina-caderina. A expressão de caderinas já foi evidenciada em *Drosophila* e agora mais recentemente nos estágios de oogenese (HILL et al., 2001; ZARTMAN et al., 2008). Além de a caderina ser expressa em microrganismos, a mesma também pode ser utilizada como receptor para adesinas ou mesmo ser a via de acesso para o microrganismo entrar na célula. Um exemplo é a *C. albicans*, que quando na forma de pseudo-hifas, utiliza N-caderina como receptor para invadir células endoteliais *in vitro* (PHAN et al., 2005). *Listeria monocytogenes* através da adesina, internalina A, liga ao receptor E-caderina para ser endocitada por células epiteliais não-fagocíticas (BOYLE; FINLAY, 2003). Villar et al. (2007) aventaram



que *C. albicans* invade a mucosa tecidual através da degradação de E-caderina. Assim, as caderinas presentes nas células epiteliais, não apresentam apenas a função de adesão entre células epiteliais, mas também com os microrganismos, ou então sendo expressa em microrganismos, e podendo até ser degradada por estes. Em nosso trabalho evidenciamos que não houve alteração na expressão de E-caderina nas células epiteliais A549 infectadas e não infectadas, mas constatamos a expressão de E-caderina na parede de *P. brasiliensis* e aparentemente na septação entre duas células, sendo compatível com os dados observados por Xiang-Dong et al. (2007), onde as proteínas Axl2p, que apresentam regiões homólogas as caderinas, nas porções extracelulares, apresentam papel no brotamento axial de leveduras.

As junções comunicantes são junções que formam canais transmembrânicos compostos por conexina. As conexinas são proteínas não-glicosiladas que exibem uma variedade de isoformas, sendo que cada tecido pode apresentar uma isoforma característica ou mesmo cada tipo de organismo (MALASSINÉ; CRONIER, 2005). Assim, a ausência de expressão de conexina 43 nas células epiteliais A549 é devido à ausência desta isoforma neste tipo celular. A conexina 43 se expressa nas junções comunicantes das células estromais de cavalo, porco e ovelha (MALASSINÉ; CRONIER, 2005).

A expressão de talina e vinculina nas células epiteliais A549 foi avaliada no período de infecção de 5h. Como a talina e vinculina são proteínas de ancoramento entre as integrinas e os filamentos de actina, a invasão de *P. brasiliensis* as células epiteliais iria promover uma reestruturação dessas proteínas, componentes do citoesqueleto. O simples fato de o fungo aderir às células epiteliais A549 poderia desencadear eventos de sinalização recrutando essas proteínas, no momento adequado. Além da expressão de talina e vinculina pelo citoplasma da célula epitelial, também se verificou a expressão de talina na parede do fungo, dado este, compatível com a presença de sequência nucleotídica homóloga a sequência de talina de *Aspergillus fumigatus* (XP\_754991.1). No nematódeo *Caenorhabditis elegans* verificou-se que este expressa uma proteína homóloga a talina de camundongo, que está associada com a adesão focal semelhantes às estruturas *in vivo* (MOULDER et al., 1996).

Assim, as moléculas de adesão no fungo não foram vistas de forma polar ou seletivamente localizadas nos pontos próximos de contato entre as células,

sendo distribuídas, mais comumente, na “parede” do fungo e no citoplasma das células epiteliais A549. Pela primeira vez foi demonstrada a presença destas moléculas em *P. brasiliensis*. A maioria dos trabalhos de adesão baseia-se em estudos de inibição, sem evidência morfológica. Portanto, essas proteínas serão posteriormente confirmadas por técnicas moleculares.

Além de avaliar a expressão de proteínas de junções celulares, também foi analisada a expressão de proteínas relacionadas com a via endocítica das células A549 e macrófagos AMC2-J11 infectados e não-infectados com *P. brasiliensis*. Em relação à clatrina, esta foi expressa tanto nas células A549 como nos macrófagos. Além da adesão, analisamos a interiorização do fungo nas células epiteliais A549 e macrófagos, sendo que na primeira não foi possível observar o fungo internalizado. Já nos macrófagos evidenciamos o fungo interiorizado, mas não co-localizado em vesícula revestida por clatrina. Foi observada nas células A549 e macrófagos que a expressão de clatrina ocorreu principalmente na área periférica das células como esperado, e não se percebeu alteração das mesmas nas células infectadas. Constatamos apenas a presença de vesículas, aparentemente, já revestidas por clatrina. Alguns estudos de reconstituição *in vitro* do modelo *triskelion* da clatrina, sugerem que a estrutura da clatrina recobre vesículas com no máximo 120nm, ou seja, partículas maiores que 120nm não entraria nas células por endocitose mediada por clatrina (VEIGA; COSSART, 2006). Assim, o tamanho da vesícula é um fator importante, considerando que o tamanho do fungo varia de 3 a 35 $\mu$ m (RESTREPO-MORENO, 2003), e que sua entrada promove um rearranjo de actina, podemos inferir que o fungo *P. brasiliensis* não poderia ser interiorizado por endocitose via clatrina. Embora a interiorização do fungo não seja via clatrina, foi observado que o mesmo expressa clatrina próximo a sua parede, tanto nos fungos aderidos, como nos fungos interiorizados. Em leveduras, a proteína homóloga a clatrina é denominada yAP180 (WENDLAND, 1998). Na levedura *Saccharomyces cerevisiae*, as vesículas revestidas por clatrina são necessárias para o brotamento das vesículas do Complexo Golgi tardio para o corpo multivesicular (KUCHARCZYK; RYTKA, 2001). Assim, com todos os estudos referentes à via endocítica de células eucarióticas de mamíferos e de microrganismos, constatamos que *P. brasiliensis* apresenta via endocítica mediada por clatrina, sendo confirmado o gene de clatrina no genoma do próprio Pb18 (Clatrina *P. brasiliensis* AAL35337.1.). Idrissi

et al. (2008) descreveram algumas similaridades e diferenças entre endocitose de leveduras e de células de mamíferos, confirmando a presença de endocitose mediada por clatrina em leveduras. Assim, contextualizamos a presença de via endocítica em *P. brasiliensis*, já que se trata de uma célula eucariótica, e consequentemente apresenta uma via endocítica, e que esta, por sua vez, possa estar relacionada com a secreção de proteases do fungo, como também relacionada à aquisição de nutrientes.

Ao analisar a via endocítica das células epiteliais A549 frente à infecção com *P. brasiliensis* não foi observada alteração na expressão de proteínas como EEA1 e Rab5 pela técnica de imunoblot e Rab7 e LAMP-1 pela técnica de imunofluorescência e imunoblot em diferentes períodos de infecção. A ausência de alteração na expressão dessas proteínas no caso das células A549 pode ser parcialmente explicada pela ausência de fungo internalizado nas microscopias realizadas. De acordo com Andreotti et al. (2005), com 3h de infecção já seria possível observar invasão de células Vero por *P. brasiliensis*. Monteiro da Silva et al. (2001), verificaram alteração na membrana de células Vero, como se elas emitissem pseudópodes, provavelmente interferindo na actina celular. Posteriormente foi verificado que tanto nas células Vero como A549, ocorria alterações do citoesqueleto, levando a dissipação dos filamentos de actina próximo à área de contato do fungo (MENDES-GIANNINI et al., 2004). Assim, estudos posteriores poderão explicar as diferenças observadas neste estudo.

Além da clatrina, a via endocítica também foi avaliada através dos endossomos precoce e tardio e lisossomo nas células epiteliais A549 e macrófagos AMC2-J11, através de imunofluorescência e imunoblot. O marcador LAMP-1, aparentemente foi expresso de maneira diferente, quando se comparou células infectadas e não-infectadas. Nas primeiras há uma agregação na extremidade oposta a adesão do fungo. Foi observado um recrutamento de LAMP-1, mas não foi possível observar o fungo interiorizado. Para células epiteliais A549 realizamos a técnica de imunoblot para EEA1, Rab5, Rab7 e LAMP-1, onde também não foi possível identificar alteração na expressão dessas proteínas. Já os macrófagos quando avaliados pela técnica de imunofluorescência para Rab7 e LAMP-1, demonstraram fungos internalizados, mas não co-localizados. Embora a expressão de Rab7 tenha sido de forma mais localizada na extremidade oposta da adesão fúngica. Além disso, o fungo *P.*

*brasiliensis* demonstrou expressar essa proteína em sua estrutura. A expressão de LAMP-1 se mostrou distribuída de forma homogênea, e em algumas situações na periferia da célula. Quanto à técnica de imunoblot para EEA1, Rab7 e LAMP-1 foi observada a diminuição da expressão de EEA1 nas células infectadas. Quanto a Rab7 e LAMP-1 não foi observada alteração na expressão dessas proteínas.

Em relação ao marcador de endossomo precoce EEA1, houve diminuição de sua expressão nas células infectadas quando comparadas com as células não-infectadas pela técnica de imunoblot. Nossos dados são compatíveis com os resultados obtidos por Batista et al. (2006), que avaliaram a via endocítica de *Trypanosoma cruzi* em cardiomiócitos. Assim, a redução na expressão de EEA1 nos macrófagos infectados com *P. brasiliensis*, ocasiona prejuízo para a via endocítica, ou seja, pode prejudicar o tráfego, brotamento, transporte e fusão de vesículas. Portanto, este poderia ser um mecanismo do fungo para alterar a função dos macrófagos e conseqüentemente a sua efetividade durante o desenvolvimento da doença.

Por outro lado, os macrófagos, quando analisados em relação ao endossomo tardio, por imunofluorescência, demonstraram expressão de Rab7 em forma de *raft*, que se manteve localizado na periferia dos macrófagos tanto nas células infectadas quanto nas não-infectadas, com aparente expressão mais intensa nas células infectadas. Assim, a expressão em forma de *raft* para Rab7 foi observada apenas nos macrófagos. Alguns microrganismos utilizam o *raft* de lipídeos para invadir as células, como é o caso da *Francisella tularensis* (TAMILSELVAM; DAEFLER, 2008) e também da *Porphyromonas gingivalis* (WANG; HAJISHENGALLIS, 2008). Recentemente também, Maza et al. (2008) demonstraram que *P. brasiliensis* promove *raft* nas células epiteliais A549, sendo importante para adesão fúngica e estabelecimento da infecção. Além da expressão de Rab7 nas células epiteliais A549 e macrófagos, constatamos a expressão de Rab7 no fungo, aparentemente próximo à parede e com maior expressão nos brotos, sendo este dado confirmado pela presença do gene para Rab7 no genoma do Pb18 quando analisado com a seqüência de Rab7 da *Neurospora crassa* (AL513467.1). A presença de Rab7 também foi descrita em *Paramecium* SP (SURMACZ et al., 2003), e em *Lentinula edodes* (Shiitake) (LEE et al., 2007). A expressão deste análogo demonstra a presença de componentes

da via endocítica em microrganismo e que esta pode ser conservada no processo evolutivo.

Assim, a análise da internalização endocítica utilizando microscopia de fluorescência fornece ferramentas de extrema importância, mas seria necessário unir a microscopia de fluorescência com a microscopia eletrônica para melhor caracterizar os achados morfológicos, bem como abordagens moleculares e de proteoma para avaliar quali e quantitativamente a expressão destas proteínas.

## 7. CONCLUSÕES

- A endocitose de *P. brasiliensis* por células epiteliais A549 e macrófagos alveolares não ocorre via clatrina;
- A redução na expressão de EEA1 nos macrófagos infectados com *P. brasiliensis* pode ocasionar prejuízo para a via endocítica, ou seja, pode prejudicar o tráfego, brotamento, transporte e fusão de vesículas. Portanto, este poderia ser um mecanismo do fungo para alterar a função dos macrófagos e conseqüentemente a sua efetividade durante o desenvolvimento da doença.

## 8. Referências Bibliográficas

ABENZA, J. F.; PANTAZOPOULOU, A.; RODRÍGUEZ, J. M.; GALINDO, A.; PEÑALVA, M. A. Long-distance movement of *Aspergillus nidulans* early endosomes on microtubule tracks. **Traffic.**, 2008. [Epub ahead of print]

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Molecular Biology of the Cell.** 4<sup>th</sup>. ed. Porto Alegre: Artmed. 2004, p. 1065–1089.

ALVAREZ, M.; CASADEVALL, A. Cell-to-Cell spread and massive vacuole formation after *Cryptococcus neoformans* infection of murine macrophages. **BMC Immunol.**, v.8, n. 16, p. 1-7, 2007.

AMER, A. O.; SWANSON, M. S. A phagosome of one's own: a microbial guide to life in the macrophage. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 5, n. 1, p. 56–61, 2002.

ANDRADE, L. O.; ANDREWS, N. W. Lysosomal fusion is essential for the retention of *Trypanosoma cruzi* inside host cells. **J. Exp. Med.**, v. 200, n. 9, p. 1135-1143, 2004.

ANDREOTTI, P. F.; MONTEIRO DA SILVA, J. L.; BAILÃO, A. M.; SOARES, C. M. A.; BENARD, G.; SOARES, C. P.; MENDES-GIANNINI, M. J. S. Isolation and partial characterization of a 30 kDa adhesin from *Paracoccidioides brasiliensis*. **Microbes 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, n. 11, 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*) an ecological study. **Med. Mycol.**, v. 41, n. 3, p. 217-223, 2003.

BARBIERI, M. A.; RAMKUMAR, T. P.; FERNADEZ-POL, S.; CHEN, P. I.; STAHL, P. D. Receptor tyrosine kinase signaling and trafficking-paradigms revisited. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.**, v. 286, p. 1-20, 2004.

BARBOSA, M. S.; BÃIO, 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, n. 1, p. 382 – 389, 2006.

BATISTA, D. G. J.; SILVA, C. F.; MOTA, R. A.; COSTA, L. C.; MEIRELLES, M. N. L.; MEUSER-BATISTA, M.; SOEIRO, M. N. C. *Trypanosoma cruzi* modulates the expression of Rabs and alters the endocytosis in mouse cardiomyocytes in vitro. **J. Histochem. Cytochemistry**, v. 54, n. 6, p. 605 - 614, 2006.

BELANGER, P. H.; JOHNSTON, D. A.; FRATTI, R. A.; ZHANG, M.; FILLER, S. G. Endocytosis of *Candida albicans* by vascular endothelial cells is associated with tyrosine phosphorylation of specific host cell proteins. **Cell. Microbiol.**, v. 4, n. 12, p. 805-812, 2002.

BENARD, G.; MENDES-GIANNINI, M. J. S.; JUVENALE, M.; MIRANDA, E. T.; DUARTE, A. J. Immunossupression in paracoccidioidomycosis: T cell hyporesponsiveness to two *Paracoccidioides brasiliensis* glycoproteins that elicit strong humoral responses. **J. Infect. Dis.**, v. 175, n. 5, p. 1263 - 1267, 1997.

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, n. 4, p. 387-391, 2002.

BROAD INSTITUT: Broad Institut Blast Similarity Search. Cambridge: Center for Genomics. 2008. Blast sequência de Rab7 da *Neurospora crassa* com *Paracoccidioides brasiliensis*. Disponível em: [http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/paracoccidioides\\_brasiliensis/BlastOutput.html?sp=kUserAction%2F501697](http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/paracoccidioides_brasiliensis/BlastOutput.html?sp=kUserAction%2F501697). Acesso em: 18 nov 2008.



BROAD INSTITUT: Broad Institut Blast Similarity Search. Cambridge: Center for Genomics. 2008. Blast sequência de Talin do *Aspergillus fumigatus* com *Paracoccidioides brasiliensis*. Disponível em: [http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/paracoccidioides\\_brasiliensis/GeneDetails.html?sp=S7000001960878763](http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/paracoccidioides_brasiliensis/GeneDetails.html?sp=S7000001960878763). Acesso em: 18 nov 2008.

BOYLE, E. C.; FINLAY, B. B. Bacterial pathogenesis: exploiting cellular adherence. **Curr. Opin. Cell. Biol.**, v. 15, n. 5, p. 633-639, 2003.

BRUMMER, E.; HANSON, L. H.; RESTREPO, A.; STEVENS, D. A. Intracellular multiplication of *Paracoccidioides brasiliensis* in macrophages. **Infect. Immun.**, v. 57, n. 8, p. 2289-2294, 1989.

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, n. 1, p.13-18, 1990.

BRUMMER, E.; CASTANEDA, E.; RESTREPO, A. Paracoccidioidomycosis: an update. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 6, n. 2, p. 89-117, 1993.

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, n. 3, p. 742-747, 1998.

CARRERO, L. L.; NINÑO-VEGA, G.; TEIXEIRA, M. M.; CARVALHO, M. J. A.; SOARES, C.M.A.; PEREIRA, M.; JESUÍNO, R. S. A., MCEWEN, J. G.; MENDOZA, L.; JOHN TAYLOR, J. W.; FELIPE, M. S.; SAN-BLAS, G. New *Paracoccidioides brasiliensis* isolate reveals unexpected genomic variability in this human pathogen. **Fungal Genet. Biol.**, v. 45, p. 605–612, 2008.

CARTERSON, A. J.; HÖNER ZU BENTRUP, K.; OTT, C. M.; CLARKE, M. S.; PIERSON, D. L.; VANDERBURG, C. R.; BUCHANAN, K. L.; NICKERSON, C. A.;

SCHURR, M. J. A549 Lung Epithelial Cells Grown as Three-Dimensional Aggregates: Alternative Tissue Culture Model for *Pseudomonas aeruginosa* Pathogenesis. **Infect. Immun.**, v. 73, n. 2, p. 1129-1140, 2005.

CASADEVALL, A.; PIROFSKI, L. A. Host-pathogen interactions: redefining the basic concepts of virulence and pathogenicity. **Infect. Immun.**, v. 67, n. 8, p. 3703-3713, 1999.

CHU, J. J. H.; NG, M. L. Infectious Entry of West Nile Virus Occurs through a Clathrin-Mediated Endocytic Pathway. **J. Virol.**, v. 78, n. 19, p. 10543-10555, 2004.

COUTINHO, Z. F.; SILVA, D.; LAZERA, M.; PETRI, V.; OLIVEIRA, R. M.; SABROZA, P.C.; WANKE, B. Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980-1995). **Cad. Saúde Pública**, v. 18, n. 5, p. 1441-1454, 2002.

De BRITO, T.; FURTADO, J. S.; CASTRO, R. M.; MANINI, M. Intraepithelial parasitism as an infection mechanism in human paracoccidioidomycosis. **Virch. Arch. Abt. A. Pat. Anat.**, v. 36, n. 2, p. 129, 1973.

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.

DONALDSON, J.; PORAT-SHLIOM, N.; COHEN, L. A. Clathrin-independent endocytosis: A unique platform for cell signaling and PM remodeling. **Cell. Signal.**, 2008. [Epub ahead of print]

FERNANDES DA SILVA, M. **Paracoccidioidomicose experimental: ativação de macrófagos CD11b<sup>+</sup> e CD23<sup>+</sup> na reação inflamatória ao *Paracoccidioides brasiliensis***. Tese. (Doutorado) Universidade de São Paulo – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 1998.

FINLAY, B. B.; FALKOW, S. Common themes in microbial pathogenicity revisited.

**Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 61, n. 2, p. 136 - 169, 1997.

FRANCO, M. F. Host parasite relationship in paracoccidioidomycosis. **J. Med. Trop.**, v. 20, p. 32, 1987.

FRANCO, M. F. Pathobiology. In: FRANCO, M.; LACAZ, C. S.; RESTREPO-MORENO, A.; DEL-NEGRO, G. (Ed.) **Paracoccidioidomycosis**. Boca Raton: CRC Press, 1994, p. 142-146.

FRANCO, M.; MENDES, R.P.; MOSCARDI-BIACCHI, M.; REZKALLAH-IWASSO, M.; MONTENEGRO, M.R. Paracoccidioidomycosis. **Baillière's Clin. Trop. Med. Commun. Dis.**, v. 4, p.185–220, 1989.

FUCHS, U.; G. STEINBERG. Endocytosis in the plant-pathogenic fungus *Ustilago maydis*. **Protoplasma**, v. 226, n. 1 – 2, p. 75 – 80, 2005.

FURUSE, M.; TSUKITA, S. Claudins in occluding junctions of humans and flies. **Trends Cell Biol.**, v. 16, n. 4, p. 181-187, 2006.

GARCIA, N. M.; DEL NEGRO, G. M. B.; HEINS-VACARI, E. M.; MELO, N. T.; ASSIS, C. M.; LACAZ, C. S. *Paracoccidioides brasiliensis*, nova amostra isolada de fezes de um pingüim (*Pygocelis adeliae*). **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 35, p. 227 - 235, 1993.

GILES, S. S.; ZAAS, A. K.; REIDY, M. F.; PERFECT, J. R.; WRIGTH, J. R. *Cryptococcus neoformans* is resistant to surfactant protein A mediated host defense mechanisms. **Rev. Plos one**, v. 2, n. 12, p. e1370, 2007.

GIRAO, H., GELI, M. I.; IDRISSE, F. Z. Actin in the endocytic pathway: from yeast to mammals. **FEBS Lett.**, v. 582, n. 14, p. 2112–2119, 2008.

GONZALEZ, A.; GOMEZ, B. L.; RESTREPO, A.; HAMILTON, A. J.; CANO, L. E. Recognition of extracellular matrix proteins by *Paracoccidioides brasiliensis* yeast cells. **Med. Mycol.**, v. 43, n. 7, p. 637-645, 2005. (a)

GONZALEZ, A.; LENZI, H.L.; MOTTA, E. M.; CAPUTO, L.; SAHAZA, J. H.; COCK, A. M.; RUIZ, A. C.; RESTREPO, A.; CANO, L. E. Expression of adhesion molecules in lungs of mice infected with *Paracoccidioides brasiliensis* conidia. **Microbes Infect.**, v. 7, n. 4, p. 666-673, 2005. (b)

GONZÁLEZ, A.; CARO, E.; MUÑOZ, C.; RESTREPO, A., HAMILTON, A. J.; CANO, L. E. *Paracoccidioides brasiliensis* conidia recognize fibronectin and fibrinogen which subsequently participate in adherence to human type II alveolar cells: involvement of a specific adhesin. **Microb. Pathog.**, v. 44, n. 5, p. 389-401, 2008.

GROSE, E.; TAMSITT, J. *Paracoccidioides brasiliensis* recovered from the intestinal tract of three bats (*Artibeus lituratus*) Colombia. **Sabouraudia**, v. 4, n. 2, p. 124- 25, 1965.

GRUENBERG, J. Lipids in endocytic membrane transport and sorting. **Curr. Opin. Cell. Biol.**, v. 15, p. 382-388, 2003.

HANNA, S. A.; MONTEIRO da SILVA, J. L.; MENDES-GIANNINI, M. J. S.; Adherence and intracellular parasitism of *Paracoccidioides brasiliensis* in Vero cells. **Microbes Infect.**, v. 2, p. 877 - 884, 2000.

HARTSOCK , A.; NELSON, W. J. Adherens and tight junctions: Structure, function and connections to the actin cytoskeleton. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1778, p. 660–669, 2008.

HAUCK, C. R.; MEYER, T. F. The lysosomal/ phagosomal membrane protein h-LAMP-1 is a target of the IgA1 protease of *Neisseria gonorrhoeae*. **FEBS Lett.**, v. 405, p. 86 – 90, 1997.

HEESEMAN, J.; LAUFS, R. Double ImmunoFluorescence Microscopic Technique for Accurate Differentiation of Extracellularly and Intracellularly Located Bacteria in Cell Culture. **J. Clin. Microbiol.**, v. 22, p. 168-175, 1985.

HILL, E.; BROADBENT, I. D.; CHOTHIA, C; PETTITT, J. Cadherins superfamily proteins in *Caenorhabditis elegans* and *Drosophila melanogaster*. **J. Mol. Biol.**, v. 305, 1011–1024, 2001.

HYBISKE, K.; STEPHENS, R. S. Mechanisms of *Chlamydia trachomatis* Entry into Nonphagocytic Cells. **Infect. Immun.**, v. 75, p. 3925 – 3934, 2007.

IBRAHIM-GRANET, O.; PHILIPPE, B.; BOLETI, H.; BOISVIEUX-ULRICH, E. ; GRENET, D. ; STERN, M. ; LATGÉ, J. P. Phagocytosis and intracellular fate of *Aspergillus fumigatus* conidia in alveolar macrophages. **Infect. Immun.**, v. 71, n. 2, p. 891–903, 2003.

IDRISSI, F. Z.; GRÖTSCH, H.; FERNÁNDEZ-GOLBANO, I. M.; PRESCIATTO-BASCHONG, C.; RIEZMAN, H.; GELI, M. I. Distinct acto/myosin-I structures associate with endocytic profiles at the plasma membrane. **J. Cell Biol.**, v. 180, n. 6, p. 1219-1232, 2008.

JIMENEZ, M. D. O.; RESTREPO, A.; RADZIOCH, D.; CANO, L. E.; GARCIA, L. F. Importance of complement 3 and mannose receptors in phagocytosis of *Paracoccidioides brasiliensis* conidia by Nramp1 congenic macrophages lines. **FEMS Lett.**, v. 47, n. 1, p. 56-66, 2006.

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

KERR, I. B.; ARARIPE, J. R.; OLIVEIRA, P. C.; LENZI, H. L. Paracoccidioidomycosis: a sequential histopathologic study of lesions in experimentally-infected rats. **Rev. Inst. Med. Trop.**, v. 30, n. 5, p. 336 – 350, 1988.

KRISHNAN, M. N.; SUKUMARAN, B.; PAL, U.; AGAISSE, H.; MURRAY, J. L.; HODGE, T. W.; FIKRIG, E. Rab5 Is Required for the Cellular Entry of Dengue and West Nile Viruses. **J. Virol.**, v. 81, n. 9, p. 4881 -4885, 2007.

KUCHARCZYK, R.; RYTKA, J. *Saccharomyces cerevisiae* – a model organism for the studies on vacuolar transport. **Acta Biochim. Pol.**, v. 48, p.1025–1042, 2001.

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. 639-641.

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

LEE, M. T.; SZETO, C. Y. Y.; NG, T. P.; KWAN, H. S. Endocytosis in the Shiitake Mushroom *Lentinula edodes* and Involvement of GTPase LeRAB7. **Eukaryot. Cell.**, v. 6, p. 2406–2418, 2007.

LECLERC, M.C.; PHILIPPEM, H.; GUÉHO, E. Phylogeny of dermatophytes and dimorphic fungi based on large subunit ribosomal RNA sequence comparisons. **J. Med. Vet. Mycol.**, 32, p. 331 – 341, 1994.

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.

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

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.

LUTHER, K.; ROHDE, M.; STURM, K.; KOTZ, A.; HEESEMANN, J.; EBEL, F. Characterisation of the phagocytic uptake of *Aspergillus fumigatus* conidia by macrophages. **Microbes Infect.**, v. 10, n. 2, p. 175–184, 2008.

MARQUES, S. A. Paracoccidioidomycose: atualização epidemiológica, clínica e terapêutica. **An. Bras. Dermatol.**, v. 78, p. 135-150, 2003.

MALASSINÉ, A.; CRONIER, L. Involvement of gap junctions in placental functions and development. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1719, n. 1-2, p. 117-124, 2005.

MARSH, M.; SCHMID, S.; KERN, H.; HARMS, E.; MALE, P.; MELLMAN, I.; HELENIUS, A. Rapid analytical and preparative isolation of functional endosomes by free flow electrophoresis. **J. Cell. Biol.**, v. 104, p. 875-886, 1987.

MATUTE, D. R.; McEWEN, J. G.; PUCCIA, R.; MONTES, B. A.; SAN-BLÁS, G.; BAGAGLI, E.; RAUSCHER, J. T.; RESTREPO, A.; MORAIS, F.; NINÑO-VEGA, G.; TAYLOR, J. W. Cryptic speciation and recombination in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* as revealed by gene genealogies. **Mol. Biol. Evol.**, v. 23, n. 1, p. 65-73, 2006.

MAYOR, S.; PAGANO, R. E. Pathways of clathrin-independent endocytosis. **Mol. Cell. Biol.**, v. 8, p. 603–612, 2007.

MAZA, P. K.; STRAUS, A. H.; TOLEDO, M. S.; TAKAHASHI, H. K.; SUZUKI, E. Interaction of epithelial cell membrane rafts with *Paracoccidioides brasiliensis* leads to fungal adhesion and Src-family kinase activation. **Microbes Infect.**, v. 10, p. 540–547, 2008

McEWEN, 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.

McEWEN, 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.

MEERTENS, L.; BERTAUX, C.; CUKIERMAN, L.; CORMIER, E.; LAVILLETTE, D. The Tight Junction Proteins Claudin-1, -6, and -9 Are Entry Cofactors for Hepatitis C Virus. **J. Virol.**, v. 82, n. 23, p. 3555–3560, 2008.

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. 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, G.; TRONCHIN, G.; VICENZI, 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.

MENDES-GIANNINI, M. J. S.; HANNA, S. A.; MONTEIRO DA SILVA, J. L.; ANDREOTTI, P. F.; BENARD, G.; LENZI, H. L.; SOARES, C. P. Invasion of epithelial mammalian cells by *Paracoccidioides brasiliensis* leads to cytoskeletal rearrangement and apoptosis of the host cell. **Microbes Infect.**, v. 6, p. 882-891, 2004.

MENDES-GIANNINI, M. J. S.; ANDREOTTI, P. F.; 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, n. 6, p. 1550-1559, 2006.

MENDES-GIANNINI, M. J. S.; MONTEIRO DA SILVA, J. L.; SILVA, J.F.; DONOFRIO, F. C.; MIRANDA, E. T.; ANDREOTTI, P. F.; SOARES, C. P. Interactions of *Paracoccidioides brasiliensis* with host cells: recent advances. **Mycopathologia**, v. 165, n. 4-5, p. 237-248, 2008.



MENDES, R. P. The gamut of clinical manifestations. In: FRANCO, M.; LACAZ, C. S.; RESTREPO-MORENO, A.; DEL-NEGRO, G. (Ed.) **Paracoccidioidomycosis**. Boca Raton: CRC Press, 1994.

MIACZYNSKA, M.; ZERIAL, M. Mosaic organization of the endocytic pathway. **Exp. Cell. Res.**, v. 272, p. 8-14, 2002.

MONTEIRO Da SILVA, J.L.; MENDES-GIANNINI, M. J. S.; SANDOVAL, M . P.; LENZI, H. L. Adesão e invasão de *Paracoccidioides brasiliensis* em cultura de células Vero. **Rev. Cienc. Farm.**, v. 22, p. 103-129, 2001.

MONTEIRO DA SILVA, J. L. **Adesão e invasão de *Paracoccidioides brasiliensis* em cultura de células: envolvimento do citoesqueleto, evento de sinalização e ocorrência de apoptose**. Tese. (Doutorado) Universidade Estadual Paulista – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, 2004.

MONTEIRO DA SILVA, J. L.; ANDREOTTI, P. F.; BENARD, G.; SOARES, C. P.; MIRANDA, E. T.; MENDES-GIANNINI, M. J. S. Epithelial cells treated with genistein inhibit adhesion and endocytosis of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 92, p. 129-135, 2007.

MONTENEGRO, M. R.; FRANCO, M. Pathology. In: Franco, M.; Lacaz, C. S.; Restrepo-Moreno, A.; Del Negro, G. (Ed.) **Paracoccidioidomycosis**. Boca Raton: CRC Press. 1994. 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.

MOULDER, G. L.; HUANG, M. M.; WATERSTON, R. H.; BARSTEAD, R. J. Talin requires  $\beta$ -Integrin, but not vinculin, for its assembly into focal adhesion-like structures in the nematode *Caenorhabditis elegans*. **Mol. Biol. Cell.**, v. 7, p. 1181–1193, 1996.

NAIFF, R. D.; BARRET, T. V. Novos registros de *Paracoccidioides brasiliensis* em tatus (*Dasyurus novemcinctus*). In: ANAIS DO CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA, 1989, Rio de Janeiro. Novos registros de *Paracoccidioides brasiliensis* em tatus (*Dasyurus novemcinctus*). **Anais...** São Paulo, 1989, Abstract 197.

NEGRONI, R. Paracoccidioidomycosis (South American blastomycosis, Lutz's Mycosis). **Int. J. Dermatol.**, v. 32, p. 847-885, 1993.

NIESSEN, C. M.; GOTTARDI, C. J. Molecular components of the adherens junction. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1778, n. 3, p. 562 – 571, 2008.

NIKULIN, J.; PANZNER, U.; FROSCH, M.; SCHUBERT-UNKMEIR, A. Intracellular survival and replication of *Neisseria meningitidis* in human brain microvascular endothelial cells. **Int. J. Med. Microbiol.**, v. 296, n. 8, p. 553-558, 2006.

NINÕ-VEGA, G.; PEREZ-SILVA, C.; SAN-BLAS, G. The actin gene in *Paracoccidioides brasiliensis*: organization, expression and phylogenetic analyses. **Mycol. Res.**, v. 111, p. 363–369, 2007.

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

PEÑALVA, M. A. Tracing the endocytic pathway of *Aspergillus nidulans* with FM4-64. **Fungal Genet. Biol.**, v. 42, p. 963 – 975, 2005.

PEREIRA, L. A.; BAIO, S. N.; BARBOSA, M. S.; DA SILVA, J. L.; FELIPE, M. S.; DE SANTANA, J. M.; MENDES-GIANNINI, M. J.; DE ALMEIDA SOARES, C. M. Analysis of the *Paracoccidioides brasiliensis* triosephosphate isomerase suggests the potential for adhesin function. **FEMS Yeast Res.**, v. 7, n. 8, p. 1381 – 1388, 2007.

PHAN, Q. T.; FRATTI, R. A.; PRASADARAO, N. V.; EDWARDS JR., J. E. FILLER, S. G. N-cadherin Mediates Endocytosis of *Candida albicans* by Endothelial Cells. **J. Biol. Chem.**, v. 280, n.11, p. 10455-10461, 2005.

PHAN, Q.T.; MYERS, C.L.; FU, Y.; SHEPPARD, D.C.; YEAMAN, M.R., et al. Als3 is a *Candida albicans* invasin that binds to cadherins and induces endocytosis by host cells. **PLoS Biol.**, v. 5, n. 3, p. 543–557, 2007.

POPI, A. F.; LOPES, J. D.; MARIANO, M. GP43 from *Paracoccidioides brasiliensis* inhibits macrophage functions. An evasion mechanism of the fungus. **Cell. Immunol.**, v. 218, p. 87-94, 2002.

PORCARO, I.; VIDAL, M.; JOUVERT, S.; STAHL, P. D.; GIAIMIS, J. Mannose receptor contribution to *Candida albicans* phagocytosis by murine E-clone J774 macrophages. **J Leukoc Biol.**, v. 74, n. 2, p. 206–215, 2003.

PROTEIN. Sequence Database. Versão AAL35337.1. Clathrin *Paracoccidioides brasiliensis*. Bethesda, (MD): National Center for Biotech Information. 2008. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?val=17066643&from=1&to=675&view=gbwithparts>. Acesso em: 18 nov 2008.

PROTEIN. Sequence Database. Versão XP\_754991.1. Talin *Aspergillus fumigatus*. Bethesda, (MD): National Center for Biotech Information. 2008. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?val=71000618&from=1&to=3132&view=gbwithparts>. Acesso em: 18 nov 2008.

PROTEIN. Sequence Database. Versão AL513467.1. Rab7 *Neurospora crassa*. Bethesda, (MD): National Center for Biotech Information. 2008. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?val=12718264&itemID=28&view=gbwithparts>. Acesso em: 18 nov 2008.

RESTREPO, A. M. The ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*: a puzzle still unsolved. **Sabouraudia**, v. 23, p. 323-334, 1985.

RESTREPO, A. M.; SALAZAR, M. E.; CANO, M. E.; ESTOVER, E. P.; FELDMAN, D.; STEVENS, D. A. Estrogens inhibit mycelium to yeast transformation in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*: implications for resistance of female paracoccidioidomycosis. **Infect. Immun.**, v. 46, p. 346-353, 1984.

RESTREPO-MORENO, A. Paracoccidioidomycosis. *In*: DISMUKES, W. E.; PAPPAS, P.G.; SOBEL, J. D. (Ed.) **Clinical Mycology**. Oxford, 2003, p. 328–345.

RICCI, G.; SILVA, I. D. C. G.; MOTA, F. T.; WAKAMATSU, A.; FRANCO, M. F. Canine paracoccidioidomycosis. **Med. Mycol.**, v. 42, p.379 - 383, 2002.

ROBINSON, C.; BAKER, S. F.; GARROD, D. R. Peptidase allergens, occludin and claudins. Do their interactions facilitate the development of hypersensitivity reactions at mucosal surfaces? **Clin. Exp. Allergy**, v. 31, p. 186-192, 2001.

RODMAN, J. S.; WANDINGER-NESS, A. Rab GTPases coordinate endocytosis. **J. Cell. Sci.**, v. 113, p. 183 - 192, 2000.

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

SAN-BLAS, G.; NINÓ-VEGA, G.; ITURRIAGA, T. *Paracoccidioides brasiliensis* and paracoccidioidomycosis: molecular approaches to morphogenesis, diagnosis, epidemiology, taxonomy and genetics. **Med. Mycol.**, v. 40, p. 225–242, 2002.

SAN-BLAS, G.; PRIETO, A.; BERNABÉ, M.; AHRAZEM, O.; MORENO, B.; LEAL, J.A. a-gal 1? 6-a-mannopyranoside side chains in *Paracoccidioides brasiliensis*

cell wall are shared by members of the onygenales, but not by galactomannans of other fungal genera. **Med. Mycol.**, v. 43, p. 153–159, 2005.

SANTIC, M.; KWAIK, Y. A. *Legionella pneumophila* can hijack the self-destruct system of macrophages. **Microbes Infect.**, v. 1, p. 185-191, 2006.

SANTO, A. H. Paracoccidioidomycosis-related mortality trend, state of São Paulo, Brazil: a study using multiple causes of death  
Tendência da mortalidade relacionada à paracoccidioidomicose, Estado de São Paulo, Brasil, 1985 a 2005: estudo usando causas múltiplas de morte. **Rev. Pan. Salud Publica**, v. 23, n. 5, p. 313–324, 2008.

SAWADA, N.; MURATA, M.; KIKUCHI, K.; OSANAI, M.; TOBIOKA, H.; KOJIMA, T.; CHIBA, H. Tight junctions and human diseases. **Med Electron Microsc.**, v.36, p. 147–156, 2003.

SIMSKE, J. S.; KÖPPEN, M.; SIMS, P.; HODGKIN, J.; YONKOF, A.; HARDIN, J. The cell junction protein VAB-9 regulates adhesion and epidermal morphology in *C. elegans*. **Nature Cell Biol.**, v. 5, n. 7, p. 619-626, 2003.

STUDIER, F. W. Analysis of bacteriophage T7 early RNAs and proteins on slab gels. **J. Mol. Biol.**, v. 79, p. 237-248, 1973.

SURMACZ, L.; WIEJAK, J.; WYROBA, E. Evolutionary conservancy of the endocytic and trafficking machinery in the unicellular eukaryote *Paramecium*. **Biol. Cell**, v. 95, p. 69–74, 2003.

TAMILSELVAM, B.; DAEFLER, S. *Francisella* Targets Cholesterol-Rich Host Cell Membrane Domains for Entry into Macrophages<sup>1</sup>. **J. Immun.**, v. 180, p. 8262-8271, 2008.

TOWBIN, H.; STACHELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets. Procedure and some applications. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 76, p. 4350-4352, 1979.

TRAVASSOS, L. R.; RODRIGUES, E. G.; IWAI, L. K.; TABORDA, C. P. Attempts at a peptide vaccine against paracoccidioidomycosis, adjuvant to chemotherapy. **Mycopathologia**, v.165, n. 4 – 5, p.341-352, 2008.

TUDER, R. M.; EL IBRAHIM, R.; GODOY, C. E.; DE BRITO, T. Pathology of the human pulmonary paracoccidioidomycosis. **Mycopathologia**, v. 92, p. 179 - 188, 1985.

VEIGA, E.; COSSART, P. The role of clathrin-dependent endocytosis in bacterial internalization. **Trends Cell Biol.**, v.16, n.10, p. 499 - 504, 2006.

VICENTINI, A. P.; GESZTESI, J. L.; FRANCO, M. F.; DE SOUZA, W.; DE MORAES, J. Z.; TRAVASSOS, L. R.; LOPES, J. D. Binding of *Paracoccidioides brasiliensis* to laminin through surface glycoprotein gp43 leads to enhancement of fungal pathogenesis. **Infect. Immun.**, v. 62, n. 4, p. 1465 – 1469, 1994.

VILLAR, C. C.; KASHLEVA, H.; NOBILE, C. J.; MITCHELL, A. P.; DONGARI-BAGTZOGLOU, A. Mucosal Tissue Invasion by *Candida albicans* Is Associated with E-Cadherin Degradation, Mediated by Transcription Factor Rim101p and Protease Sap5p. **Infect. Immun.**, v. 75, n. 5, p. 2126-2135, 2007.

XIANG-DONG, G.; SPERBER, L. M.; KANE, S. A. Sequential and Distinct Roles of the Cadherin Domain-containing Protein Axl2p in Cell Polarization in Yeast Cell Cycle. **Mol. Biol. Cell**, v. 18, p. 2542–2560, 2007.

WANG, M.; HAJISHENGALLIS, G. Lipid raft-dependent uptake, signalling and intracellular fate of *Porphyromonas gingivalis* in mouse macrophages. **Cell Microbiol.**, v. 10, n. 10, p. 2029-2042, 2008.

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

WASYLNKA, J. A.; MOORE, M. M. *Aspergillus fumigatus* conidia survive and

germinate in acidic organelles of A549 epithelial cells. **J. Cell Sci.**, v. 116, n. 8, p. 1579-1587, 2003.

WENDLAND, B. Panlp, yeast epsl 5, functions as a o multivalent adaptor that coordinates protein-protein interactions essential for endocytosis. **J. Cell Biol.**, 141, p. 71-84, 1998.

ZARTMAN, J.J.; KANODIA, J.S.; YAKOBY, N.; SCHAFER, X.; WATSON, C.; SCHLICHTING, K.; DAHMANN, C.; SHVARTSMAN, S.Y. Expression patterns of cadherin genes in *Drosophila* oogenesis. **Gene Expr. Patterns**, 2008.

ZERIAL, M.; McBRIDE, H. Rab proteins as membrane organizers. **Nat. Rev. Molec. Cell. Biol.**, v. 2, p. 107-119, 2001.

ZHENG, A.; YUAN, F.; LI, Y.; ZHU, F.; HOU, P.; LI, J.; SONG, X.; DING, M.; DENG, H. Claudin-6 and Claudin-9 Function as Additional Coreceptors for Hepatitis C Virus. **J. Virol.**, v. 81, p. 12465–12471, 2007.