

Samira Abdallah Hanna

***Interação com constituintes da matriz
extracelular e o envolvimento do citoesqueleto
na adesão e invasão de *Paracoccidioides
brasiliensis* às células epiteliais***

Orientadora

Profa. Dra. Maria José Soares Mendes Giannini

Tese apresentada à
Faculdade de Medicina da
Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho” para
obtenção do grau de Doutor do
Curso de Doenças Tropicais
Modalidade Biologia Tropical.

Botucatu
2001

Sumário	Página
Lista de figuras	1
1. Introdução	11
2. Revisão da literatura	15
2.1. Patogenicidade e Virulência	15
2.2. Adesão de microrganismos aos tecidos do hospedeiro	20
2.2.1. Matriz Extracelular – MEC	21
2.2.2. Citoesqueleto	26
2.3. <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	28
2.4. Interação patógeno-célula hospedeira	41
3. Objetivos	52
4. Material e Métodos	53
4.1. Microrganismos	53
4.2. Preparo dos antígenos de <i>P.brasiliensis</i>	53
4.2.1. Antígeno “cell-free”	53
4.2.2. Filtrado de Cultura	54
4.2.2.1. Fracionamento e purificação do antígeno de 43 kDa	54
4.3. Preparo dos anticorpos policlonais específicos	55
4.3.1. Anti- “cell-free” de <i>P.brasiliensis</i>	55
4.3.2. Anti- fração de 43 kDa	55
4.4.3. Precipitação das imunoglobulinas totais	56
4.4. Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)	57
4.4.1. Imunoblot – titulação dos anticorpos policlonais	58
4.5. Cultura de células	59
4.5.1. Cultivo contínuo e tripsinização	59
4.5.2. Detecção de contaminantes nas linhagens celulares	60

4.5.2.1.	Bactérias e fungos	60
4.5.2.1.	Micoplasmas	60
4.5.3.	Estocagem de células à baixa temperatura	61
4.5.3.1.	Técnica de congelamento das linhagens	61
4.5.3.2.	Descongelamento das linhagens	62
4.6.	Ensaio de infecção de <i>P.brasiliensis</i> às culturas epiteliais ..	62
4.6.1.	Cultivo de células em lamínulas	62
4.6.1.1.	Preparo e padronização do inóculo de <i>P.brasiliensis</i>	63
4.6.1.2.	Realização do teste	63
4.6.1.3.	Períodos de infecção	63
4.6.2.	Cinética de interação <i>P.brasiliensis</i> às culturas epiteliais	64
4.6.3.	Adesão de <i>P.brasiliensis</i> às células por microscopia eletrônica de varredura	64
4.7.	Interação de <i>P.brasiliensis</i> com as células epiteliais e componentes da matriz extracelular (MEC)	65
4.7.1.	Reação de imunoperoxidase <i>in situ</i>	65
4.7.2.	Reação de imunofluorescência indireta	66
4.8.	Envolvimento do citoesqueleto na invasão de <i>P.brasiliensis</i> às células epiteliais	67
4.8.1.	Microfilamentos de actina	67
4.8.1.1.	Dinâmica dos microfilamentos de actina de células Vero durante o cultivo	67
4.8.1.2.	Marcação com faloidina para visualização dos filamentos de actina	68
4.8.1.3.	Efeito da citocalasina D sobre células Vero infectadas com <i>P.brasiliensis</i>	68
4.8.1.4.	Microfilamentos de actina na invasão de <i>P.brasiliensis</i> às células Vero e A ₅₄₉	69
4.8.2.	Microtúbulos	70
4.8.2.1.	Efeito da colchicina sobre células infectadas com <i>P.brasiliensis</i>	70
4.8.2.2.	Microtúbulos na invasão de <i>P.brasiliensis</i> às	

<i>P.brasiliensis</i> às células Vero e A ₅₄₉	105
5.6.1.3.1. Interação de <i>P.brasiliensis</i> com células tratadas com citocalasina D	105
5.6.1.3.2. Interação de <i>P.brasiliensis</i> com células sem tratamento prévio	106
5.6.2. Microtúbulos na invasão de <i>P.brasiliensis</i> às células epiteliais Vero e A ₅₄₉	112
5.6.2.1. Interação de <i>P.brasiliensis</i> com células tratadas com colchicina	112
5.6.2.2. Interação de <i>P.brasiliensis</i> com células sem tratamento prévio	115
5.6.3. Ensaio de plaqueamento	120
5.6.4. Filamentos intermediários: Citoqueratina	121
5.7. Comprometimento do citoesqueleto por componentes de <i>P.brasiliensis</i>	127
5.7.1. Microfilamentos de actina	127
5.7.2. Filamentos de citoqueratina	128
5.8. Avaliação do sobrenadante das culturas celulares infectadas com <i>P.brasiliensis</i>	129
5.9. Componentes de <i>P.brasiliensis</i> que interagem com constituintes do citoesqueleto	130
5.10. Ocorrência de apoptose em células infectadas com <i>P.brasiliensis</i>	132
6. Discussão	143
7. Conclusões	170
8. Referências bibliográficas	172
9. Resumo	202
10. Summary	204

Lista de Figuras

Página

Figura 1 – Padrão de reconhecimento de <i>P.brasiliensis</i> , amostra 18 frente ao soro anti-“cell-free” a 1:100, revelado por imunofluorescência indireta e analisado por microscopia óptica e confocal a laser.....	79
Figura 2 – Padrão de reconhecimento de <i>P.brasiliensis</i> , amostra 18, frente ao soro anti- gp 43 a 1:50, revelado por imunofluorescência indireta e analisado por microscopia óptica e confocal a laser.....	80
Figura 3 – Cinética da adesão e invasão de <i>P.brasiliensis</i> em função do período de incubação com células das linhagens Vero e A ₅₄₉	81
Figura 4 – <i>P.brasiliensis</i> , amostra 18, analisado por microscopia confocal a laser	82-83
Figura 5 – Adesão de <i>P.brasiliensis</i> às células Vero após duas horas de infecção e leveduras parcialmente interiorizadas após três horas de contato, por microscopia confocal a laser ..	84
Figura 6 – Invasão de <i>P.brasiliensis</i> às células Vero após três horas de infecção, por microscopia confocal a laser	85
Figura 7 – <i>Invasão de P.brasiliensis às células Vero após cinco horas de infecção, por microscopia confocal a laser</i>	86
Figura 8 – <i>P.brasiliensis</i> no citoplasma da célula Vero, após cinco horas de infecção, por microscopia confocal a laser	87
Figura 9 – Interação entre <i>P.brasiliensis</i> e células Vero após	

uma hora de contato, demonstrando a adesão através de estrutura semelhante a um tubo, por microscopia eletrônica de varredura	89
Figura 10 – Interação entre <i>P.brasiliensis</i> e células Vero após três horas de contato, demonstrando a levedura parcialmente internalizada, por microscopia eletrônica de varredura	89
Figura 11 – Interação entre <i>P.brasiliensis</i> e células Vero após cinco horas de contato, demonstrando leveduras em estágios diferentes de desenvolvimento e o comprometimento da forma celular, por microscopia eletrônica de varredura	90
Figura 12 – Padrão de reconhecimento da amostra 18 de <i>P.brasiliensis</i> e células Vero após três horas de contato frente aos anticorpos anti- “cell-free” e anti- gp 43, por imunoperoxidase <i>in situ</i>	91
Figura 13 – Padrão de reconhecimento da amostra 18 de <i>P.brasiliensis</i> e células Vero após três horas de contato frente ao soro anti-fibronectina, por imunoperoxidase <i>in situ</i>	92
Figura 14 – Padrão de reconhecimento da amostra 18 de <i>P.brasiliensis</i> e células Vero após três horas de contato frente ao soro anti-colágeno tipo I, por imunoperoxidase <i>in situ</i>	93
Figura 15 – Padrão de reconhecimento da amostra 18 de <i>P.brasiliensis</i> frente ao soro anti-laminina, revelado por imunofluorescência indireta e analisado por microscopia confocal a laser	94
Figura 16 – Padrão de reconhecimento de <i>P.brasiliensis</i> e	

células Vero, após duas horas de contato, frente ao soro anti-laminina, revelado por imunofluorescência em microscopia óptica	95
Figura 17 – Padrão de reconhecimento de <i>P.brasiliensis</i> e células A ₅₄₉ , após duas horas de contato, frente ao soro anti-laminina, revelado por imunofluorescência em microscopia óptica	96
Figura 18 – Padrão de reconhecimento da amostra 18 de <i>P.brasiliensis</i> frente ao soro anti-fibronectina, revelado por imunofluorescência indireta e analisado por microscopia confocal a laser	97
Figura 19 – Padrão de reconhecimento de <i>P.brasiliensis</i> e células Vero, após duas horas de contato, frente ao soro anti-fibronectina, revelado por imunofluorescência em microscopia óptica	98
Figura 20 – Padrão de reconhecimento de <i>P.brasiliensis</i> e células Vero, após três horas de contato, frente ao soro anti-fibronectina, revelado por imunofluorescência em microscopia óptica	99
Figura 21 – Padrão de reconhecimento de <i>P.brasiliensis</i> e células A ₅₄₉ , após duas horas de contato, frente ao soro anti-fibronectina, revelado por imunofluorescência em microscopia óptica	100
Figura 22 – Cinética do desenvolvimento dos microfilamentos de actina de células Vero cultivadas em diferentes períodos de tempo, marcadas com faloidina-FITC e analisadas por microscopia óptica	102-103

Figura 23 – Células A ₅₄₉ e <i>P.brasiliensis</i> , após uma e três horas de incubação, frente ao soro anti-actina, reveladas por imunofluorescência indireta em microscopia óptica	104
Figura 24 – Células A ₅₄₉ e <i>P.brasiliensis</i> , após duas horas de incubação, frente ao soro anti-actina, reveladas por imunofluorescência indireta em microscopia óptica	105
Figura 25 – Células Vero infectadas com <i>P.brasiliensis</i> , por cinco horas, após tratamento com citocalasina D na concentração de 10µg/mL, reveladas por imunofluorescência indireta dupla marcando-se o fungo com anti-“cell-free” e a célula com faloidina, por microscopia óptica	106
Figura 26 – Parasitismo intracelular de <i>P.brasiliensis</i> em células Vero, após cinco horas de contato, analisado por imunofluorescência indireta dupla, marcando-se o fungo com anti-“cell-free” e os filamentos de actina das células com faloidina, por microscopia óptica	107
Figura 27 – Parasitismo intracelular de <i>P.brasiliensis</i> em células Vero, após cinco horas de contato, analisado por imunofluorescência indireta dupla, marcando-se o fungo com anti-“cell-free” e os filamentos de actina das células com faloidina, por microscopia óptica	108
Figura 28 – Parasitismo intracelular de <i>P.brasiliensis</i> em células A ₅₄₉ , após três horas de contato, analisado por imunofluorescência indireta dupla, marcando-se o fungo com anti-“cell-free” e os filamentos de actina das células com faloidina, por microscopia óptica	109

Figura 29 – Parasitismo intracelular de <i>P.brasiliensis</i> em células Vero, após cinco horas de contato, analisado por imunofluorescência indireta dupla, marcando-se o fungo com anti-“cell-free” e os filamentos de actina das células com faloidina, por microscopia confocal a laser	110
Figura 30 – Parasitismo intracelular de <i>P.brasiliensis</i> em células Vero, após cinco horas de contato, analisado por imunofluorescência indireta dupla, marcando-se o fungo com anti-“cell-free” e os filamentos de actina das células com faloidina, por microscopia confocal a laser	111
Figura 31 – Padrão de microtúbulos das células Vero marcadas com anticorpo anti- β tubulina, revelado por imunofluorescência indireta em microscopia óptica	113
Figura 32 – Imunofluorescência indireta dupla em células A ₅₄₉ após cinco horas de contato com <i>P.brasiliensis</i> , marcando-se o fungo com anti-“cell-free” e as células com anti- β tubulina, demonstrando por microscopia óptica: controle de células, célula tratada com colchicina a 5 μ g/mL e células infectadas por <i>P.brasiliensis</i> não tratadas	114
Figura 33 – Imunofluorescência indireta dupla em células Vero após cinco horas de contato com <i>P.brasiliensis</i> , marcando-se o fungo com anti-“cell-free” e as células com anti- β tubulina, demonstrando por microscopia óptica as células infectadas por <i>P.brasiliensis</i> e o envolvimento dos microtúbulos	115
Figura 34 – Imunofluorescência indireta dupla em células Vero após cinco horas de contato com <i>P.brasiliensis</i> , marcando-se o fungo com anti-“cell-free” e as células com	

anti- β tubulina, demonstrando por microscopia óptica as células infectadas por <i>P.brasiliensis</i> e o envolvimento dos microtúbulos	116
Figura 35 – Imunofluorescência indireta dupla em células Vero após cinco horas de contato com <i>P.brasiliensis</i> , marcando-se o fungo com anti-“cell-free” e as células com anti- β tubulina, demonstrando por microscopia confocal a laser as células infectadas por <i>P.brasiliensis</i> e o envolvimento dos microtúbulos	117
Figura 36 – Imunofluorescência indireta dupla em células A ₅₄₉ após três horas de contato com <i>P.brasiliensis</i> , marcando-se o fungo com anti-“cell-free” e as células com anti- β tubulina, demonstrando por microscopia confocal a laser as células infectadas por <i>P.brasiliensis</i> e o envolvimento dos microtúbulos	118
Figura 37 – Imunofluorescência indireta dupla em células A ₅₄₉ após três horas de contato com <i>P.brasiliensis</i> , marcando-se o fungo com anti-“cell-free” e as células com anti- β tubulina, demonstrando por microscopia confocal a laser as células infectadas por <i>P.brasiliensis</i> e o envolvimento dos microtúbulos	119
Figura 38 – Ensaio de plaqueamento de <i>P.brasiliensis</i> em função do período de contato e do tratamento das células Vero com colchicina a 5 μ g/mL e citocalasina D a 10 μ g/mL	120
Figura 39 – Imunofluorescência indireta em células A ₅₄₉ , empregando-se o soro anti-pan citoqueratina, demonstrando o padrão dos filamentos intermediários de citoqueratina por microscopia confocal a laser	121

Figura 40 – Imunofluorescência indireta em células Vero e A ₅₄₉ , empregando-se o soro anti-pan citoqueratina, demonstrando o padrão dos filamentos intermediários de citoqueratina por microscopia óptica	122
Figura 41 – Padrão de reconhecimento de <i>P.brasiliensis</i> frente ao soro anti-citoqueratina a 1:20, revelado por imunofluorescência indireta em microscopia confocal a laser .	123
Figura 42 – Imunofluorescência indireta dupla em células Vero e A ₅₄₉ após uma hora de contato com <i>P.brasiliensis</i> , marcando-se o fungo com anti-“cell-free” e as células com anti-pan citoqueratina, por microscopia óptica	124
Figura 43 – Imunofluorescência indireta dupla em células Vero após duas, três e cinco horas de contato com <i>P.brasiliensis</i> , marcando-se o fungo com anti-“cell-free” e as células com anti-pan citoqueratina, por microscopia óptica	125
Figura 44 – Imunofluorescência indireta dupla em células A ₅₄₉ após três horas de contato com <i>P.brasiliensis</i> , marcando-se o fungo com anti-“cell-free” e as células com anti-pan citoqueratina, por microscopia confocal a laser	126
Figura 45 – Imunofluorescência indireta em células Vero sem tratamento prévio e tratadas com gp 43 na concentração de 12,5µg/mL, empregando-se a faloidina-FITC para marcação da actina e analisada por microscopia óptica	128
Figura 46 – Imunofluorescência indireta em células Vero sem tratamento prévio e tratadas com gp 43 na concentração de 22,5µg/mL, empregando-se o soro anti-citoqueratina para	

marcação dos filamentos intermediários de citoqueratina e analisada por microscopia óptica	129
Figura 47 - Imunoblot de sobrenadante de cultura de células A ₅₄₉ frente aos soros anti-actina a 1:100 e anti-citoqueratina a 1:10.....	130
Figura 48 - Imunoblot de antígenos “cell-free” de <i>P.brasiliensis</i> frente aos soros anti-actina a 1:100, anti-citoqueratina a 1:10 e anti-gp 43 a 1:50	131
Figura 49 - Células Vero não infectadas, marcadas pela técnica do “TUNEL”, demonstrando células com fragmentação de DNA, características de apoptose e células normais	133
Figura 50 - Células expostas por uma hora a <i>P.brasiliensis</i> , marcadas pela técnica do “TUNEL” assim como com soro anti-“cell-free” de <i>P.brasiliensis</i> , demonstrando a fragmentação de DNA e mudanças morfológicas evidentes nas células, características de apoptose	134
Figura 51 - Células expostas por duas horas a <i>P.brasiliensis</i> , marcadas pela técnica do “TUNEL” assim como com soro anti-“cell-free”, demonstrando <i>P.brasiliensis</i> e a fragmentação de DNA e mudanças morfológicas drásticas nas células, características de apoptose.....	135
Figura 52 - Células expostas por três horas a <i>P.brasiliensis</i> , marcadas pela técnica do “TUNEL” assim como com soro anti-“cell-free”, demonstrando <i>P.brasiliensis</i> e a fragmentação de DNA e mudanças morfológicas drásticas nas células, características de apoptose	136
Figura 53 - Células expostas por cinco horas a <i>P.brasiliensis</i> ,	

marcadas pela técnica do “TUNEL” assim como com soro anti-“cell-free”, demonstrando células apoptóticas sem a presença de *P.brasiliensis* 137

Figura 54 – Imunofluorescência indireta de tapete celular após três horas de contato com *P.brasiliensis*, com marcação da actina celular com faloidina-FITC, demonstrando células apoptóticas por microscopia óptica 138

Figura 55 – Imunofluorescência indireta de tapete celular após três horas de contato com *P.brasiliensis*, com marcação da actina celular com faloidina-FITC e do fungo com soro anti-“cell-free”, demonstrando célula apoptótica com *P.brasiliensis* no seu interior por microscopia óptica 139

Figura 56 – Microscopia eletrônica de varredura demonstrando células apoptóticas no tapete de células Vero infectado por *P.brasiliensis* por três horas 140

Figura 57 A – Interação entre *P.brasiliensis* e células Vero, após três horas de contato, demonstrando adesão, multiplicação e células apoptóticas por microscopia confocal a laser pelo código de cores 141

Figura 57 B – Interação entre *P.brasiliensis* e células Vero, após três horas de contato, demonstrando adesão, multiplicação e células apoptóticas por microscopia confocal a laser pela imagem em 3D 142

1. Introdução

A compreensão da cinética da interação parasita-hospedeiro, sob a perspectiva da doença, é de grande importância para o conhecimento dos mecanismos de patogenicidade e neste prisma, a aderência de microrganismos a diferentes tecidos caracteriza-se como uma das etapas da infecção e um pré-requisito para a colonização.

As bases moleculares do processo de adesão, aparentemente variam de acordo com a natureza do patógeno. Essa interação específica é mediada por moléculas referidas como adesinas, que se combinam com estruturas complementares das células hospedeiras referidas como receptores.

O complexo de adesão célula-célula desempenha um papel importante na organização e função das células nos tecidos [1]. A habilidade destas em interagir umas com as outras de maneira ordenada depende de múltiplas interações adesivas entre as células adjacentes e seu ambiente extracelular. Estas interações são mediadas por uma família de proteínas de superfície celular, conhecidas como moléculas de adesão celular [2]. As moléculas de adesão são extremamente versáteis e podem funcionar como receptores de superfície celular, os quais não apenas mantêm as células unidas, mas disparam sinais físicos e bioquímicos que regulam uma variedade de funções, tais como proliferação celular, expressão gênica, diferenciação, apoptose e migração. Também, como muitas outras moléculas de superfície celular, elas são utilizadas como porta de entrada para alguns patógenos [2].

A capacidade de aderência às moléculas específicas da superfície celular, confere ao patógeno a habilidade para selecionar com qual componente do hospedeiro irá interagir [3, 4].

A interação com receptores celulares, que estão normalmente envolvidos no contato célula-célula ou célula-matriz (especialmente as integrinas), podem ser usados pelo patógeno para invadir e coexistir como parasita intracelular. Assim, os microrganismos patogênicos podem subverter as moléculas de adesão do hospedeiro visando sua entrada, promovendo a própria sobrevivência e disseminação.

Os componentes da matriz extracelular estão intimamente associados com as superfícies da célula hospedeira nos tecidos. Há dois tipos principais de matriz: o interstício e a membrana basal. A laminina é encontrada principalmente na membrana basal subendotelial, enquanto a fibronectina e vários tipos de colágeno estão presentes no interstício, particularmente como parte das fibras reticulares [5]. Estas fibras estão envolvidas no processo de adesão em fungos, parasitas e bactérias como moléculas-alvo [6-8].

A paracoccidiodomicose, cujo agente etiológico é o fungo dimórfico *Paracoccidioides brasiliensis*, é uma doença que manifesta um amplo espectro de apresentações clínicas, variando desde formas cutâneas a sistêmicas. O fungo pode atingir vários tecidos, com ênfase ao pulmão. Os mecanismos de disseminação, bem como as etapas para a translocação dos compartimentos intravasculares para o parênquima de diferentes órgãos não são bem conhecidos. Acredita-se que *P.brasiliensis*, à semelhança de outros fungos causadores de micoses sistêmicas, deva utilizar diferentes mecanismos de patogenicidade para se estabelecer no hospedeiro e causar doença [9].

Em relação à virulência, os dados obtidos indicam que a composição da parede do fungo é um fator provável [10]. Por outro lado, alguns trabalhos tem abordado o estudo da glicoproteína de 43 kDa [11], encontrada no soro e na urina de pacientes [12, 13] apresentando atividade proteolítica [14, 15] e papel nos mecanismos

de adesão de *P. brasiliensis* [16, 17]. Mais recentemente, uma serinotiol proteinase capaz de clivar componentes da membrana basal da matriz extracelular, incluindo a laminina, fibronectina, colágeno tipo IV e proteoglicanas [18] foi identificada por Carmona *et al.*, (1995) [19].

Os fatores de virulência podem se distribuir em duas categorias: aqueles que promovem a colonização e invasão e os que causam danos ao hospedeiro, como as toxinas e proteinases [20].

A adesão é estudada através de técnicas de cultura de células de mamíferos, especialmente em bacteriologia e mais recentemente empregadas em micologia. A partir destes estudos, ocorreram importantes inferências para a patogênese, traçadas pela cinética da interação parasita-célula *in vitro*.

Nos últimos anos, esta abordagem foi estendida para vários fungos patogênicos como *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, *Histoplasma capsulatum* e *Sporothrix schenckii*. Na disseminação de *C.albicans*, estão envolvidos componentes da matriz extracelular como laminina, [21-24] fibrinogênio [25, 26], fibronectina [27-29], colágeno tipo IV [30, 31] e mais recentemente entactina [24].

A interação entre conídios de *A.fumigatus* e laminina foi também observada, além de sua degradação por proteases do fungo [32, 33]. Uma adesina de 50 kDa, presente em extrato da parede celular de *H.capsulatum* foi identificada como ligante para a laminina [34] e foi mostrada a adesão de *S.schenckii* a diferentes proteínas da matriz extracelular como colágeno tipo II, laminina e fibronectina [35].

No estudo da virulência de *P. brasiliensis*, Mendes-Giannini *et al.*, (1994) [36] utilizando culturas de células da linhagem Vero (rim de macaco verde de África), demonstraram que este agente apresenta mecanismos de adesão e de invasão.

P.brasiliensis (amostra 113), sem qualquer tratamento prévio foi capaz de aderir, seguido aparentemente de invasão de células

epiteliais de linhagem contínua [37], com aparente migração para o núcleo [36]. Os fungos foram observados no interior das células numa forma circunscrita dentro de um vacúolo, sugerindo processo de fagocitose [38, 39].

A invasão de *P.brasiliensis* às células Vero pode ocorrer pela ativação de um processo fagocitário da própria célula hospedeira, à semelhança do ocorrido com a invasão de células pelas enterobactérias [40, 41]. O real mecanismo desta coexistência intracelular, não está bem esclarecido, tendo sido sugerido a ocorrência de fagocitose forçada, na qual componentes fúngicos poderiam estimular o rearranjo do citoesqueleto da célula hospedeira, que passa a se comportar como "um fagócito não profissional".

A cinética da infecção de patógenos em células foi extensivamente investigada para bactérias e, atualmente, poucas informações são disponíveis no que se refere aos prováveis mecanismos de interação de *P.brasiliensis* às células e com constituintes da matriz extracelular, assim como o envolvimento do citoesqueleto durante a internalização celular. Não há referências se tal interação, exerce algum papel na disseminação, característica marcante na paracoccidiodomicose.

1. Revisão da Literatura

2.1. Patogenicidade e Virulência

No sentido de se estudar a patogênese e também compreender a evolução dos processos infecciosos, um intenso trabalho foi realizado nos últimos anos com diferentes microrganismos. O patógeno foi definido como um microrganismo que causava doença em um hospedeiro, porém, atualmente este conceito tornou-se inadequado, uma vez que alguns não causam doença evidente em todos os hospedeiros. Assim, a importância da susceptibilidade de um hospedeiro para a virulência de um microrganismo foi inserida nos conceitos modernos de patogênese microbiana. Neste contexto, a habilidade de um patógeno causar doença, não é uma característica invariável, mas sim modificada em função da resposta imune do hospedeiro, ou seja, da interação microrganismo-hospedeiro.

Smith (1913) [42] reconheceu a importância do hospedeiro na patogenicidade, mas continuou enfatizando as características microbianas como responsáveis pela virulência. Nesta concepção, microrganismos patogênicos seriam dotados de funções “ofensivas” e “defensivas” que os separariam dos não patogênicos e determinariam a interação patógeno-hospedeiro. O bacilo diftérico foi classificado como um patógeno com funções ofensivas que causava a lesão da mucosa com suas toxinas, enquanto que o bacilo da tuberculose era dotado principalmente de funções defensivas, que permitiam a persistência no tecido.

Em seu tratado de doenças infecciosas, Zinsser (1914) [43] definiu que os microrganismos estariam agrupados em três classes: saprófitas por excelência que não se estabeleceriam em tecido vivo; parasitas que poderiam se estabelecer facilmente em hospedeiros normais; e os potencialmente parasitas, com algumas características

invasivas que causariam infecção em certas circunstâncias. Embora o termo patogênico fosse empregado para microrganismos capazes de causar doença, foi sugerido que, para a virulência, havia dois atributos: um passivo, constituído pelas características microbianas (como exemplo a cápsula) e um agressivo (as toxinas, etc). Doença infecciosa foi também relacionada ao parasitismo, em que nenhuma adaptação mútua acontece; a invasão do hospedeiro pelo microrganismo seria marcada por manifestações locais e sistêmicas, constituindo a doença, e a virulência como o potencial invasivo. Variáveis independentes foram relacionadas à virulência, como agressividade microbiana, invasividade, infectividade e toxigenicidade [43-45].

A virulência microbiana foi considerada propriedade complexa, onde o agente infeccioso poderia penetrar as barreiras protetoras do hospedeiro e sobreviver aos muitos mecanismos de defesa, desde que pudesse adaptar-se ao ambiente, multiplicar-se e, finalmente produzir a doença, ou seja, produzir substâncias ou condições que causassem perturbações fisiológicas e patológicas [46].

Os conceitos de patogenicidade e virulência foram primeiro centrados nas propriedades intrínsecas do patógeno, embora já ressaltado que a patogenicidade não era atributo exclusivo do agente microbiano. As agressinas e virulinas foram propostas como produtos microbianos que favoreciam o estabelecimento do patógeno [46].

Porém, a idéia que virulência era somente uma propriedade microbiana, foi sendo abandonada, e a maioria das definições voltou-se ao contexto da relação de patógeno-hospedeiro [45].

Em estudos recentes sobre patogênese microbiana, as características da superfície microbiana foram salientadas como determinante crítico da virulência. Neste sentido, principalmente a constituição química da superfície microbiana distinguiria entre

patogênicos e não patogênicos. Neste prisma, a adesão microbiana às superfícies celulares, foi considerada condição primordial para a colonização e primeiro passo na patogênese [47].

Foram identificados atributos de virulência que poderiam ser variáveis inerentes ao patógeno, como a capacidade de invadir, de causar toxicidade e hipersensibilidade. Organismos produtores de toxinas, como *Clostridium tetani* teriam capacidade elevada de causar toxicidade, *Staphylococcus aureus*, alta invasividade e *Mycobacterium tuberculosis* alto poder invasivo e de hipersensibilidade. A associação entre virulência e hipersensibilidade, causada por alguns patógenos, reunia as características do microrganismo com a resposta do hospedeiro [48].

As diferenças moleculares entre organismos patogênicos e não patogênicos, são atualmente bastante estudadas e muitos genes de virulência estão em segmentos de DNA discretos, denominados “ilhas de patogenicidade”. Considerando as variáveis relacionadas aos patógenos, Falkow (1988) [49] propôs, uma adaptação aos postulados de Koch, na verdade um jogo de ferramentas conceituais para dissecação da patogênese bacteriana, baseado na identificação dos genes responsáveis pela doença. Assim, uma variação genética em um fator de adesão tecido-específica de certo microrganismo, poderia resultar na transição de comensal para patógeno, sugerindo o microrganismo com papel central na patogênese.

Brubaker (1985) [50] distinguiu sapróbios de patógenos, baseado na substituição de funções necessárias para existência saprobiótica e o ganho de fatores de virulência requeridos para evadir às defesas do hospedeiro.

A epidemia pelo vírus da imunodeficiência humana tem resultado em um aumento marcante de infecções por organismos que raramente causavam doença em hospedeiros saudáveis. Neste contexto, oportunista como *C.albicans*, são causa freqüente de

morbidade e mortalidade em indivíduos com um espectro grande de alterações da resposta imune e da microbiota. Desta forma, as infecções por organismos considerados sapróbios não puderam ser conciliadas no espectro de visão da patogênese centrada somente no patógeno.

Posteriormente, os novos estudos evidenciaram a variabilidade antigênica, como uma outra característica do patógeno, que possibilitaria o escape às defesas do hospedeiro [51].

Assim, as diversas proposições para definir patógeno, patogenicidade e virulência denotam a dificuldade e a complexidade envolvidas na formulação de conceitos apropriados, uma vez que os existentes tornaram-se insatisfatórios, pois freqüentemente, indicadores múltiplos são necessários para responder pelo estado do hospedeiro, como também o do patógeno. Uma proliferação de adjetivos para descrevê-lo surgiu, incluindo primário, oportunista, comensal, emergente e nosocomial. Assim, a capacidade inata de alguns microrganismos em causar doença nos hospedeiros normais e a habilidade de comensais e oportunistas em causar infecções em hospedeiros com imunidade alterada, não pode ser deduzida pelas definições de patogenicidade baseadas no patógeno.

O potencial de causar doença não pode ser definido apenas pelas características do microrganismo ou do hospedeiro independentemente. A definição de um fator de virulência é também problemática, pois definições padrão não são baseadas em organismos de baixa-virulência, como por exemplo, pelos comensais e oportunistas [52].

A interação patógeno-hospedeiro pode ou não redundar em alterações nocivas ao hospedeiro. As lesões envolvem os tecidos, os órgãos e pode ocorrer a indução de necrose celular, apoptose e transformação maligna, assim como inflamação granulomatosa, fibrose e tumor. O reconhecimento de que as agressões celulares são

uma característica preliminar na doença infecciosa foi logo evidenciado. Sparling (1983) [53] sugeriu que estas são exigência para a ocorrência de uma infecção clinicamente significativa, enquanto Lipsitch e Moxon (1997) [44] citaram danos teciduais por citotoxicidade como um componente de virulência microbiana. As alterações podem ser mediadas pelos patógenos ou pelo hospedeiro e as doenças infecciosas, em sua natureza e extensão, dependem do estado imune deste. As alterações em hospedeiros com resposta imune baixa ou ausente são principalmente mediadas pelos patógenos, enquanto naqueles com resposta eficiente, são mediadas principalmente pelo hospedeiro. Contudo, em muitas interações entre patógenos e hospedeiros normais, há uma inter-relação contínua entre fatores mediados pelo patógeno e pelo hospedeiro que resultam em doença, quando a natureza das agressões prejudica a função normal do organismo humano [54].

Consequentemente, a doença pode ser resultado das agressões mediadas pelo patógeno (patógenos que induzem necrose), pelo hospedeiro (respostas imunes alteradas, como febre reumática ou fibrose intestinal), ou ambos. A patogênese microbiana definida em termos de danos ao hospedeiro permite a inclusão de muitas variáveis que afetam a relação patógeno-hospedeiro. Nesta visão, virulência é uma propriedade do patógeno, mas modulada pela susceptibilidade ou resistência do hospedeiro [52].

Os mecanismos e fatores de virulência dos microrganismos são objeto de estudo de muitos pesquisadores e no caso de infecções sistêmicas fúngicas, o conhecimento da interação fungo-célula hospedeira, poderá servir para a melhor compreensão dos mecanismos de patogenicidade e futuramente no desenvolvimento de novas estratégias para circunscrever a infecção fúngica.

2.2. Adesão de microrganismos aos tecidos do hospedeiro

A aderência de microrganismos aos diferentes tecidos, foi caracterizada como um pré-requisito para o seu estabelecimento e conseqüente disseminação. O microrganismo deve encontrar o tecido alvo e, para a própria sobrevivência necessita de mecanismos de evasão, subversão ou circunvenção das defesas iniciais do hospedeiro. A partir daí, pode ocorrer sua multiplicação ou persistência, culminando em agressões a este organismo. No decorrer destas etapas, o microrganismo desenvolve estratégias de acordo com as respostas do hospedeiro, ou seja, se este é suscetível ou resistente. Assim, microrganismos antes não patogênicos, adquirem condições de patogenicidade, outros originalmente extracelulares, desenvolvem mecanismos que possibilitam a sua interiorização celular.

As adesinas bacterianas e os mecanismos moleculares foram primeiramente descritos, na adesão de *Escherichia coli* às células epiteliais [55-58]. Posteriormente, Kimura e Pearsall (1978) [59] descreveram a adesão de *C.albicans* em células epiteliais e a partir daí, diversos trabalhos foram realizados para o entendimento desta interação.

Atualmente, é reconhecido que o mecanismo de adesão de microrganismos às células hospedeiras é governado por estruturas da superfície de ambas células. As bases moleculares do processo de adesão variam de acordo com a natureza do patógeno. Essa interação específica é mediada por moléculas referidas como adesinas, que se combinam com estruturas complementares das células hospedeiras referidas como receptores [60, 6, 61].

O microrganismo tem como opção vários componentes do hospedeiro, com os quais pode interagir: substâncias secretadas

pela célula, estruturas superficiais da célula hospedeira, constituintes da matriz extracelular (MEC) e o citoesqueleto [3, 4].

Os microrganismos podem evadir-se do sistema imune do hospedeiro, através do envolvimento com substâncias secretadas pelas células. Com relação aos componentes da MEC, até recentemente pensava-se que sua principal função seria a de estabilizar a estrutura física dos tecidos, sendo relativamente inerte. Porém, já é consensual que a MEC desempenha papel muito mais ativo e complexo na regulação do comportamento das células com as quais faz contato. A MEC além de apresentar função estrutural, uma vez que isola compartimentos teciduais e influencia sua arquitetura, afeta também a fisiologia celular do organismo. Adesão, migração, proliferação, diferenciação celular são alguns exemplos dos processos biológicos influenciados pela composição estrutural da MEC [62].

A interação com receptores celulares, que estão normalmente envolvidos no contato célula-célula ou célula-matriz (integrinas e citoesqueleto), podem ser usados pelo patógeno para invadir e coexistir como parasita intracelular [63].

Os modelos de estudo como os sistemas de cultura de células *in vitro* permitem a caracterização de propriedades intrínsecas aos microrganismos como as adesinas, invasinas e toxinas, assim como a caracterização dos receptores das células envolvidos na interação microrganismo-célula, através de inúmeras metodologias.

2.2.1. Matriz Extracelular - MEC

As células de um tecido estão em contato com uma rede complexa de macromoléculas extracelulares denominada matriz extracelular (MEC). No tecido conjuntivo, a MEC é abundante, rica em polímeros fibrosos como o colágeno e as células são escassas e ligados à matriz. No tecido epitelial, as células estão unidas em

camadas e a matriz é escassa, consistindo de uma camada fina, adjacente às células denominada lâmina basal. A MEC é composta por várias proteínas e polissacarídeos. Ambos são secretados no local e montados em uma rede organizada, associada à superfície celular que os produz [64].

As duas classes principais de macromoléculas extracelulares que formam a matriz são as cadeias de polissacarídeos do grupo denominado glicosaminoglicanas (GAGs) e a das proteínas fibrosas de dois tipos funcionais: estruturais (colágeno e elastina) e adesivos (fibronectina e laminina) [65].

As GAGs são um grupo heterogêneo de cadeias polissacarídicas com carga negativa e ligadas por ligações covalentes às proteínas, formando moléculas de proteoglicana. Estas ocupam um grande volume, formam géis hidratados no espaço extracelular e são também encontradas na superfície de células, onde funcionam como co-receptores, auxiliando na ligação com a matriz e na resposta a fatores de crescimento [66].

Os colágenos são uma família de proteínas fibrosas, secretadas principalmente por células do tecido conjuntivo. A principal característica de uma molécula típica é a estrutura longa, rígida e em fita tripla helicoidal, na qual três cadeias polipeptídicas são enroladas entre si, formando um tipo de corda supertorcida. Nos tecidos conjuntivos, os principais colágenos são os dos tipos I, II, III, V e IX. Os colágenos do tipo I, principais da pele e ossos, são os fibrilares, que após serem secretados para o espaço extracelular, agrupam-se em polímeros ordenados chamados fibrilas de colágeno. Os colágenos tipo IV e VII são os formadores de redes, onde o de tipo IV agrupa-se em uma camada, formando a parte principal da lâmina basal, enquanto o de tipo VII forma as fibrilas ancoradoras, que auxiliam a conexão da lâmina basal do epitélio ao tecido conjuntivo subjacente [67, 68].

A elastina é o principal componente das fibras elásticas e esta proteína é composta principalmente por dois tipos de pequenos segmentos que se alternam pela cadeia polipeptídicas, responsáveis pelas propriedades elásticas da molécula. Esta proteína é secretada para o espaço extracelular e agrupa-se em fibras, próximas à membrana plasmática, geralmente em invaginações da superfície celular e são altamente entrecruzadas entre si, gerando uma extensa rede de fibras e camadas [65].

A MEC contém várias proteínas adesivas, que contém domínios múltiplos, cada um com sítios específicos para outras macromoléculas da matriz e para receptores na superfície celular. A principal destas proteínas é a fibronectina, um dímero composto de duas subunidades unidas por um par de pontes de dissulfeto próximos às suas extremidades C-terminais. Cada subunidade é dobrada em uma série de domínios com funções diferentes, que se ligam ao colágeno, a heparina e a receptores específicos na superfície de vários tipos celulares. Além de ser importante para a adesão das células à matriz, também conduz a migração celular [69].

A laminina foi purificada e caracterizada por Timpl *et al.*, (1979) [70], a partir do tumor murino Engelbreth-Holm-Swarm (EHS). É uma glicoproteína com peso molecular alto (850 kDa), formada por três cadeias longas de polipeptídios organizadas na forma de uma cruz assimétrica com vários domínios funcionais, que se ligam às moléculas de colágeno tipo IV, ao sulfato de heparana, a entactina e a outros receptores protéicos na superfície celular [71]. Ela possui atividade estrutural, filtrante, determina a polaridade das células, influencia no metabolismo celular, organiza as proteínas nas membranas plasmáticas adjacentes, induz a diferenciação celular e orienta a migração celular. Apesar da composição precisa ser bastante variável entre tecidos, a maioria das lâminas basal

contém colágeno tipo IV, a proteoglicana de sulfato de heparana e as glicoproteínas laminina e entactina [5].

A laminina é encontrada principalmente na lâmina basal e subendotelial, enquanto que a fibronectina e vários tipos de colágeno estão presentes no interstício, particularmente como parte das fibras reticulares. Estão envolvidas no processo de adesão em fungos, parasitas e bactérias como moléculas-alvo [6-8].

A regulação do *turnover* das macromoléculas da MEC é crítica para uma série de processos biológicos importantes. Uma degradação mais localizada dos seus constituintes é necessária quando há migração através da lâmina basal, como a dos leucócitos através da lâmina basal vascular para os tecidos, em resposta a infecções ou lesões, ou quando células cancerosas migram por via sanguínea ou linfática, no processo de metástase. A degradação de constituintes da matriz, como colágeno, laminina e fibronectina, ocorre via enzimas proteolíticas extracelulares, secretadas no local pelas células e geralmente das classes das metaloproteases que dependem de Ca^{+2} ou Zn^{+2} ou serinoproteases. Essa degradação é controlada por inibidores específicos [72, 73].

As integrinas são os principais receptores utilizados pelas células animais para ligação à MEC. Essas proteínas são heterodímeros e atuam como ligadoras transmembrana que medeiam as interações bidirecionais entre a matriz e o citoesqueleto de actina [74]. Desta forma, a MEC pode influenciar na organização do citoesqueleto (polimerização), do mesmo modo que microfilamentos de actina influenciam a orientação das moléculas de fibronectina secretadas, desde que mediadas pelas integrinas [2, 75].

As células suportam a maioria das alterações, por meio dos componentes do citoesqueleto, que são fortes filamentos protéicos intracelulares que cruzam o citoplasma de cada célula epitelial [76]. Na membrana plasmática, os filamentos do citoesqueleto são ligados

às proteínas transmembrana, onde junções são formadas entre as superfícies de células adjacentes com a subjacente lâmina basal. As células são conectadas pela ligação dos elementos do citoesqueleto de uma célula ao de outra ou a MEC, formando as junções ancoradoras (quadro 1).

Quadro 1 – Junções Ancoradoras das Células e sua relação com diferentes elementos:

Junção	Proteína de Ligação Transmembrana	Ligante Extracelular	Fixação Intracelular do Citoesqueleto
• Aderentes (célula-célula)	Caderinas (E-caderina)	Caderinas na célula vizinha	Filamentos de actina
• Desmossomos	Caderinas (desmogleína e desmocolina)	Caderinas na célula vizinha	Filamentos intermediários
• Aderentes (célula-matriz)	Integrinas	Proteínas da MEC	Filamentos de actina
• Hemidesmosmos	Integrinas	Proteínas da MEC (lâmina basal)	Filamentos intermediários (queratinas)

As junções aderentes são sítios de ligação para feixes de filamentos de actina, enquanto que os desmossomos e hemidesmosmos são sítios de ligação para filamentos intermediários, e compõem os principais tipos de junções ancoradoras presentes nos tecidos. As caderinas, pertencentes às classes das moléculas de adesão célula-célula (CAMs), são responsáveis pela união das células. A maior parte das caderinas

funciona como proteínas transmembrana de ligação que medeiam as interações entre os microfilamentos de actina [77].

2.2.2. Citoesqueleto

A rede complexa e dinâmica de proteínas filamentosas que se estende por todo o citoplasma celular, é definida como o citoesqueleto. Tem funções diversificadas, como o deslocamento de células sobre um substrato, organização espacial citoplasmática, fornecimento da maquinaria necessária para movimentos intracelulares, manutenção dos contatos intercelulares, via de transporte para organelas, além de dar forma, força e polaridade à célula [63]. Desta forma, está envolvido na cicatrização de lesões, na coagulação sangüínea, na migração celular, entre outros processos essenciais para a homeostase do organismo, assim como na inflamação degenerativa, na fibrose cística, na formação de placas de ateroma em vasos sangüíneos e na origem de células metastáticas [78].

As diferentes atividades do citoesqueleto dependem de três tipos de filamentos protéicos que são os microfilamentos de actina, os microtúbulos e os filamentos intermediários. Caracterizam-se por serem estruturas poliméricas helicoidais, altamente dinâmicas, que interagem entre si, capazes de polimerizar-se e despolimerizar-se rapidamente, graças às proteínas acessórias. Cada tipo de filamento é formado a partir de uma subunidade protéica diferente: a actina, nos filamentos de actina, tubulina nos microtúbulos e uma família de proteínas fibrosas, como as queratinas, vimentinas e lâminas que compõem os filamentos intermediários [79].

Os microtúbulos são heterodímeros constituídos pelos monômeros de α e β tubulina, que apresentam ligações não covalentes. São estruturas polares, onde o crescimento ocorre na extremidade “mais” (+) e a despolimerização ocorre na extremidade

“menos” (-). As extremidades “menos”, na maioria das células, apresentam-se imersas numa estrutura chamada centrossomo, enquanto que as “mais”, estão livres para aumentarem pela adição de moléculas de tubulina.

O centrossomo localiza-se próximo ao núcleo e ao complexo de Golgi. Os microtúbulos são os organizadores primários do citoesqueleto, responsáveis pelo posicionamento e via de transporte das organelas, através de suas proteínas motoras e estão intimamente relacionados à divisão celular. As principais proteínas motoras são a cinesina, que se desloca no sentido da extremidade “menos” para a “mais”, a dineína, que se desloca no sentido oposto e a miosina, que se desloca ao longo dos filamentos de actina, sendo mais abundante na musculatura esquelética. Os túbulos membranosos do retículo endoplasmático alinham-se com os microtúbulos e estendem-se quase até a borda da célula, enquanto o aparelho de Golgi se localiza próximo ao centrossomo. Tratando-se as células com drogas que despolimerizam os microtúbulos, o retículo se colapsa para o centro da célula, enquanto o aparelho de Golgi se fragmenta em pequenas vesículas que ficam dispersas pelo citoplasma [80].

Os microtúbulos em geral atuam de forma isolada, enquanto os filamentos de actina atuam na forma de redes ou feixes. Os filamentos de actina apresentam-se distribuídos logo abaixo da membrana plasmática e estão ligados entre si por várias proteínas. Sinais extracelulares podem induzir uma reorganização local do córtex de actina sob a região correspondente na membrana. Assim, por exemplo, podem empurrar a membrana para fora, formando finas e longas microespículas chamadas lamelipódios, ou puxar a membrana plasmática para dentro, como ocorre na divisão celular [78, 80].

Os filamentos intermediários são proteínas fibrosas e alongadas, presentes ao redor do núcleo, abaixo do envelope nuclear. Estendem-se para a periferia celular, interagindo com a membrana plasmática. São organizados, na sua maioria, de forma polimerizada e de acordo com o polipeptídeo que os constituem, adquirem formas tecido-específicas diferentes, como os filamentos de queratina, das células epiteliais, os neurofilamentos das células nervosas, os filamentos gliais dos astrócitos, os filamentos de desmina das células musculares, os filamentos de vimentina dos fibroblastos e as lâminas nucleares, que formam a lâmina fibrosa que se estende sob o envelope nuclear [81].

A família das queratinas, também chamadas citoqueratinas, é a que apresenta a maior diversidade entre suas subunidades. As proteínas dessa família formam os filamentos de queratina em células epiteliais, onde são descritos pelo menos 20 tipos diferentes, com base na sua seqüência de aminoácidos. Nas células epiteliais, os filamentos de queratina estão conectados às junções celulares especializadas: os desmossomos, que unem células vizinhas e os hemidesmossomos que ancoram as células à membrana basal, formando uma rede contínua que se estende por todo o epitélio [82].

2.3. *Paracoccidioides brasiliensis*

O entendimento de uma determinada doença infecciosa e sua evolução só é possível quando se conhecem os mecanismos e fatores de virulência do agente etiológico, somado à compreensão da resposta do hospedeiro. Os conhecimentos dos eventos que ocorrem neste processo são essenciais para se desenvolver no futuro terapias que possibilitem a inibição do patógeno em sua capacidade de colonizar e estabelecer a infecção e, para isto, o bloqueio da interação é o local ideal.

Considerando-se a paracoccidioidomicose, muito já se conhece a respeito do seu agente etiológico, *Paracoccidioides brasiliensis*, de sua estrutura antigênica e da resposta inflamatória, envolvendo os mecanismos de defesa imune humano e em modelos animais. Contudo, o conhecimento sobre os mecanismos de patogenicidade e sobre os fatores de virulência deste fungo precisa ainda ser mais conclusivos.

A paracoccidioidomicose foi descrita inicialmente em 1908 por Adolpho Lutz no Brasil. Esta doença é geograficamente limitada à América Latina, com regiões de maior endemicidade no Brasil, Colômbia e Venezuela seguidas por outras áreas menos endêmicas como Bolívia, Paraguai, Argentina, Uruguai e outros territórios na América Central. A doença afeta principalmente homens, estando mais relacionada aos trabalhadores que se dedicam à atividade agrícola. Várias hipóteses têm sido postuladas relativas ao habitat de *P.brasiliensis* [83-87].

O nicho ecológico de sua fase saprofítica é desconhecido, presumindo-se que micélios, clamidoconídios e, provavelmente, conídios estejam no solo, água e em plantas à temperatura ambiente e que seriam essas suas formas infectantes [87]. Foi sugerido que o microrganismo precisa de um reservatório heterotérmico, capaz de mantê-lo na fase leveduriforme e, também da existência de um nicho no subsolo. A demonstração de *P.brasiliensis* em tatus parece concordar com esta hipótese [85, 88, 89]. O homem e o tatu convivem no mesmo habitat do fungo e ambos servem como testemunhos da presença deste fungo na natureza. Os locais úmidos foram sugeridos como os prováveis micronichos do fungo. As reserváreas até agora delineadas estão localizadas onde o clima é quente e onde há abundância de rios [90].

A relação entre o fungo e o meio ambiente não está totalmente definida, apesar de seu isolamento esporádico do solo, [83, 86, 91, 92, 93] de ração para cães contaminada com solo e de plantações de café em Ibiá-MG [94, 95], além de sua ocorrência esporádica em animais domésticos e silvestres [96, 97, 98, 84]. A sua manifestação em hospedeiros humanos pode ser variada, causando lesões em áreas cutâneas e/ou mucosas, de comprometimento orgânico múltiplo e de evolução prolongada [99, 100].

A via inalatória foi sugerida como a principal via de acesso das formas infectantes do fungo ao pulmão. Os dados obtidos em estudos experimentais com camundongos inoculados por via intranasal [101], a existência de infecções assintomática ou subclínicas [102, 103], o prolongado período de incubação da doença [104-106] e a demonstração de involução de lesões pulmonares no homem [107] sugerem a via inalatória como a principal via para a penetração do fungo no hospedeiro [101, 108].

A paracoccidiodomicose manifesta-se em indivíduos na faixa etária entre 30 e 49 anos, com predomínio de homens infectados em relação às mulheres na proporção aproximada de 15:1. Entretanto, a freqüência de paracoccidiodomicose infecção, detectada por testes cutâneos com antígenos de *P.brasiliensis*, é alta entre indivíduos de 15 a 19 anos [109]. Além disso, a constatação de que até a puberdade ambos os sexos contraem a doença igualmente levou a suspeita de que fatores hormonais poderiam interferir na resistência à doença. Acredita-se que o número reduzido de mulheres afetadas esteja relacionado a um efeito protetor promovido pelos hormônios femininos. Estudos *in vitro* demonstraram que as transformações micélio-levedura e conídio-levedura são inibidas na presença de estrógenos [111, 112, 113, 114, 110].

As manifestações clínicas da micose caracterizam-se como de uma doença granulomatosa apresentando uma gama de sinais e

sintomas agrupados em dois padrões principais que definem as formas aguda e crônica. A forma aguda ou subaguda, também denominada forma juvenil da paracoccidioidomicose, geralmente afeta crianças, adolescentes e adultos jovens, e tem uma história clínica de curta duração, em média de um a dois meses, com o paciente apresentando manifestações clínicas compatíveis com o envolvimento do sistema mononuclear fagocitário. Nesta forma clínica, as mucosas e os pulmões são acometidos em menor frequência, apenas 5% dos casos [100, 115].

A paracoccidioidomicose ocorre desde a infância e casos da doença foram registrados em crianças de três anos de idade [116]. A paracoccidioidomicose apresenta-se na criança e no jovem sob a forma de infecção pulmonar primária sintomática, de curso regressivo ou progressivo. Quando de curso progressivo, costuma ser o início da forma disseminada [117].

A forma crônica tem duração prolongada, freqüentemente excedendo seis meses, com instalação lenta e gradual, afetando principalmente indivíduos adultos, do sexo masculino, acima de 30 anos de idade. Manifestações pulmonares são evidentes em mais de 90% dos adultos doentes e as lesões podem permanecer localizadas ou envolver mais de um órgão ou sistema. Nos tecidos desses pacientes há uma tendência à formação de granuloma organizado [100, 115].

Com relação à classificação taxonômica, muitos estudos nutricionais e fisiológicos foram descritos, porém sem uma correlação com propriedades fisiológicas e virulência, originando algumas controvérsias. *P.brasiliensis* foi classificado no Reino Fungi, Filo Eumycota, Sub-divisão Deuteromycotina, Classe Hyphomycetes, Ordem Moniliales, Família Moniliaceae [118]. No entanto, a redução da biosíntese dos sais de tetrazólio e a reação com canavanina-glicina-bromotimol foi similar a de *Cryptococcus*

neoformans, sugerindo uma relação com a sub-divisão Basidiomycotina. As comparações com seqüências de RNA revelaram uma estreita relação com *Histoplasma capsulatum* e *Blastomyces dermatitidis*, classificando *P.brasiliensis* como um provável membro da Classe Ascomycetes [119], ordem Onygenales e família Onygenaceae [119, 120].

P.brasiliensis é fungo dimórfico, termo-dependente, apresentando a forma miceliana (M), saprofítica, em temperaturas de 25 a 27°C. O aspecto das culturas nesta fase é cotonoso, esbranquiçado e microscopicamente observa-se a presença de filamentos hialinos, finos e septados. A fase leveduriforme (L) constitui a forma parasitária do fungo, sendo reproduzida em cultivos de 35 a 37°C. Apresentam-se como células arredondadas, de parede dupla e brotamentos múltiplos característicos, formando a denominada “roda de leme” [121].

A temperatura parece ser o principal fator que interfere no dimorfismo de *P.brasiliensis* [122], mas já foi demonstrado que o envolvimento de fatores nutricionais poderiam estar regulando esse fenômeno [123].

A parede celular da fase L é constituída por duas camadas, a externa de superfície rugosa devido à presença de mucopolissacárides é constituída por fibrilas de α -1,3 glucana e a interna, espessa e elétron-lucente, por quitina. A membrana plasmática é constituída por três unidades de membrana, sendo que a interna forma lamelas e túbulos, constituindo os mesossomos e os lomassomos. No citoplasma, observa-se um ou mais núcleos com nucléolos, retículo endoplasmático, ribossomos e mitocôndrias. Há ainda vacúolos e inclusões lipídicas que aparecem dispersos, em número e tamanho variados e grânulos de glicogênio que tendem a formar rosetas. A reprodução assexuada faz-se por brotamentos

múltiplos. Os blastoconídios formam-se por evaginações da parede e são imediatamente preenchidas pelo citoplasma. Quando a célula-filha está totalmente delimitada pela membrana plasmática, a parede celular é sintetizada revestindo a célula por completo e o blastoconídio libera-se da célula mãe [124, 125].

A fase M é constituída predominantemente por β -1,3 glucana, sendo que as demais estruturas celulares assemelham-se às da fase L. A fase miceliar produz conídios intercalares e terminais, os quais podem germinar e produzir células leveduriformes como as encontradas nos tecidos [126]. Os conídios menores de 5 μ m provavelmente têm importante papel na infecção humana, uma vez que desprendem-se facilmente da célula-mãe e são capazes de atingir os alvéolos pulmonares. Experimentos com modelo murino, após inoculação com suspensão de conídios de *P.brasiliensis* por instilação nasal, reproduziram a doença com disseminação hematogênica em 100% dos animais estudados [101, 114]. Pequenas variações morfológicas nas duas fases foram observadas, dependendo do meio de cultivo e da temperatura de incubação [127, 128]. Nos tecidos, a morfologia ultra-estrutural da fase L é semelhante [129].

O estudo das infecções fúngicas sistêmicas têm despertado grande interesse nos últimos anos, pois com o surgimento de patógenos resistentes às terapias antimicrobianas convencionais, tornou-se essencial à busca por novos métodos capazes de prevenir e controlar as doenças infecciosas. O entendimento e identificação de moléculas envolvidas na adesão de parasitas a diferentes substratos do hospedeiro é um dos caminhos a serem seguidos na descoberta de tratamentos eficientes para as micoses sistêmicas. Sabe-se que durante a disseminação por via hematogênica,

interações desta natureza constituem as primeiras etapas para o desenvolvimento de inúmeras infecções [130].

A prevenção de uma doença fúngica passa, obrigatoriamente, por um maior reconhecimento do próprio fungo, de seus fatores de virulência e dos fatores relacionados à interação com o hospedeiro. A aderência, a colonização, a disseminação e a propriedade do fungo para resistir aos ambientes hostis e escapar dos mecanismos de resposta imune do hospedeiro são fatores que auxiliam no desenvolvimento da doença. Assim, tanto os fatores de virulência como os mecanismos de defesa oferecidos pelo hospedeiro, requerem ação e interação de processos complexos, cujo conhecimento permitirá a melhor compreensão da patogenia.

Na definição de Casadevall e Pirofski (1999) [52], um componente do patógeno que causa dano ao hospedeiro, incluindo componentes essenciais para sua viabilidade, é considerado um determinante de virulência. Assim, vários candidatos a fatores de virulência foram preconizados para *P.brasiliensis* [131, 132, 133, 134, 20].

O conhecimento das estruturas que compõem a parede celular dos fungos contribui para a identificação de ligantes na superfície celular de patógenos. Fibrinogênio, fragmentos do complemento e vários componentes da matriz extracelular estão entre as proteínas do hospedeiro que podem se ligar às proteínas da parede celular dos fungos. Assim, componentes da parede celular podem funcionar como adesinas capazes de mediar as interações do fungo com tecidos do hospedeiro durante a infecção.

A composição da parede do fungo foi considerada provável fator de virulência deste agente [10, 133]. O dimorfismo de *P.brasiliensis* foi correlacionado com os componentes estruturais da parede. Assim, na fase miceliana ocorre o predomínio de β -(1,3)-glucana,

enquanto que na leveduriforme, predomina α -(1,3)-glucana [135]. A forma α da glucana foi encontrada em formas parasitárias de outros fungos como *Blastomyces dermatitidis* e *Histoplasma capsulatum*, conferindo alta rigidez da parede e resistência ao ataque de fagócitos [136].

San-Blas (1976) [135] documentou que mutantes de *P.brasiliensis*, deficientes de α -(1,3)-glucana, mostraram menor virulência. Contudo, amostras distintas de *P.brasiliensis* (192, 18 e 265) com taxas semelhantes desta glucana, mas com graus diferentes de virulência, contestaram a indicação da α -(1,3)-glucana, como fator de virulência [137].

Os resultados experimentais têm demonstrado variação entre as amostras deste fungo quanto à virulência, fato este que pode auxiliar na explicação quanto à existência de diferentes manifestações clínicas da doença [138], e por outro lado que esta é também influenciada pela estocagem e passagem *in vitro* dos isolados [110, 139, 140, 137, 141].

Foi demonstrado que indivíduos com os mecanismos de defesa intactos, apresentam fagócitos que produzem beta-glucanase e podem digerir rapidamente a parede miceliana, não só destruindo o fungo, como prevenindo o estabelecimento da infecção. Entretanto, se os mecanismos de defesa estão deficientes, a transformação do conídio para levedura ocorre e podem escapar das células fagocíticas [121].

Singer-Vermes *et al.*, (1989) [142], estudando sete diferentes amostras de *P. brasiliensis*, Pb265, IVICPb267, Pb192, IVICPb9, PbSN, Pb2052 e Pb18, quanto aos aspectos de patogenicidade e antigenicidade, verificaram que estas poderiam se comportar como de alta, média e baixa virulência. As amostras de baixa virulência apresentavam menor capacidade de induzir a produção de

anticorpos específicos. Os marcadores de virulência poderiam estar associados a fatores relacionados a antigenicidade. A amostra Pb18 mostrou-se mais virulenta que a amostra 265, em relação à sua DL₅₀ em camundongos de linhagem B10A. Com exceção da amostra Pb265, todas as outras induziram uma peritonite granulomatosa epitelióide que variou em intensidade. A amostra Pb18 disseminou-se em órgãos, como fígado, baço, pulmões, nódulos linfáticos e coração, enquanto que a amostra 265 atingiu fracamente os nódulos linfáticos.

Amostras de *P.brasiliensis*, recém isoladas de pacientes com diferentes formas clínicas, foram estudadas para avaliar uma possível associação entre a gravidade da doença humana e a virulência da amostra. Houve correlação entre a forma clínica da doença, da qual a cultura derivou, e o padrão de virulência observado em camundongo B10A [143].

O agente da paracoccidiodomicose, como muitos outros parasitas, sintetiza várias substâncias que apresentam características físico-químicas e biológicas de antígenos que participam direta ou indiretamente da relação parasita-hospedeiro.

A estrutura antigênica de *P.brasiliensis* é bastante complexa. Cerca de 60 componentes solúveis foram descritos incluindo glicoproteínas e proteínas com e sem atividade enzimática, onde muitos deles são comuns a outros fungos [144]. Estudos da correlação entre alguns destes componentes e seu papel na patogenicidade estão entre os assuntos abordados de grande importância.

Esforços no sentido de caracterizar a composição antigênica e de identificar um antígeno espécie-específico levaram diferentes autores a isolar um antígeno comum a todas as amostras. Este antígeno recebeu diferentes denominações: arco "A" por Restrepo, Drouhet (1970) [145], arco "E" (banda E2) por Yarzabal *et al.*, (1973)

[146] e arc "I" por Conti-Díaz *et al.*, (1973) [147]. Em 1986, Puccia *et al.*, [11] caracterizaram este antígeno como sendo uma glicoproteína de 43 kDa (gp 43) e demonstraram sua especificidade para *P.brasiliensis*. Mais tarde, esta glicoproteína foi considerada como molécula antigênica altamente específica para o diagnóstico sorológico da paracoccidiodomicose [148, 12, 149, 146, 150, 151].

Mendes-Giannini *et al.* (1989) [12] além de demonstrarem a especificidade da gp 43, comprovaram sua importância como um marcador sorológico da eficácia terapêutica, o que foi posteriormente confirmado por outros autores [14, 152, 153, 154]. Muito embora esta glicoproteína seja de valor para o diagnóstico sorológico na paracoccidiodomicose, a importância da gp 43 e dos demais antígenos de *P.brasiliensis* na resposta inflamatória do hospedeiro ainda não está esclarecida. A gp 43 possui uma atividade proteolítica, em pH ácido, capaz de hidrolizar caseína, elastina e colágeno [14, 155]. É possível que esta atividade proteolítica da gp 43 tenha um papel facilitador na penetração do fungo nos tecidos.

A localização ultraestrutural dos antígenos nas células fúngicas ainda é pouco estudada. Campo-Aasen *et al.*, (1980) [156], através de técnicas imunoenzimáticas, estudaram a distribuição do antígeno E/2 nas células leveduriformes de cultura em diferentes fases do crescimento. Sandoval *et al.*, (1996) [157] avaliaram também a distribuição da gp43 em formas fúngicas encontradas em tecidos muco-cutâneos. Strauss *et al.*, (1996) [158], empregando anticorpo monoclonal anti-gp 43, verificaram a distribuição deste antígeno na célula fúngica isoladamente.

A secreção de enzimas proteolíticas como as proteinases, lipases e fosfolipases, por algumas espécies fúngicas, com função metabólica, também podem desempenhar papel na patogênese da infecção, causando injúrias às células hospedeiras [159, 160].

Proteinases extracelulares podem estar envolvidas na aderência e sobrevivência do patógeno nas superfícies de mucosas [161], na invasão tecidual [162-164] e na digestão de imunoglobulinas [164, 165].

Proteinases foram detectadas em muitos protozoários e correlações foram feitas com a patogenicidade desses agentes, assim como em bactérias patogênicas, cujas proteinases têm capacidade de clivar imunoglobulinas IgG e IgA [166, 167, 164]. Proteinases extracelulares foram descritas em *Cryptococcus neoformans* [168], *Candida albicans* [169], *Sporothrix schenckii* [170], *Coccidioides immitis* [165] e *Aspergillus fumigatus* [171].

A produção de enzimas proteolíticas em meio de cultura, por formas miceliares e leveduriformes de *P.brasiliensis*, foi verificada por Mendes-Giannini *et al.*, (1990) [14]. Atividade proteolítica foi associada a glicoproteína de 43 kDa em colágeno, elastina e caseína. Estes resultados foram demonstrados por outros autores [149, 173, 15, 172]. Esta glicoproteína tem também papel nos mecanismos de adesão de *P.brasiliensis* [16, 17]. Estas evidências têm apontado a gp 43 como sendo um dos principais fatores de virulência de *P.brasiliensis*.

Outros estudos demonstraram atividade de uma serino-tiol proteinase [19] e mais recentemente, foi observado que esta foi capaz de clivar componentes da membrana basal da matriz extracelular, incluindo a laminina, fibronectina, colágeno tipo IV e proteoglicanas [18].

Fungos patogênicos desenvolvem muitas estratégias para sobrevivência em ambientes hostis, nos diversos compartimentos corporais, adaptando o metabolismo para altas temperaturas e desenvolvendo mecanismos para evadir-se das defesas do hospedeiro. Produção de cápsula, utilização da via alternativa do complemento, supressão da produção de citocinas e a redução da

atividade fungicida de macrófagos, são alguns exemplos de distúrbios imunoregulatórios ou de evasão das defesas imunes pelos fungos [133, 174].

A modulação da resposta imune por antígenos de *P.brasiliensis* foi avaliada em modelo experimental, utilizando-se hamsters infectados via intratesticular. A retirada dos testículos, na terceira semana de infecção, aumentou a sobrevivência dos animais, prevenindo a depressão da imunidade celular e induzindo uma substancial redução dos níveis de antígenos no soro, quantificados por imunoenensaio [175].

Outros estudos *in vitro*, demonstraram que antígenos de *P.brasiliensis*, principalmente a gp 43 [176] têm um efeito supressivo na proliferação de linfócitos, podendo ser considerados críticos nos distúrbios imunoregulatórios observados na paracoccidioidomicose [134].

Níveis altos de antígenos, no soro podem levar a formação de imunocomplexos, que estimulam subpopulações de células T com atividade supressora, ou interferem com a atividade das células natural killer [177].

Outro mecanismo central de evasão de defesas do hospedeiro, apresentado por fungos, é a interferência na atividade de fagócitos. Formas leveduriformes de *P.brasiliensis* são ativamente fagocitadas por células mononucleares, e freqüentemente encontradas no citoplasma de células gigantes em tecidos de indivíduos acometidos com a doença. Os macrófagos constituem uma das principais defesas do organismo contra a invasão e também, são responsáveis por uma variedade de funções microbicidas, além de ativar o sistema imune. Macrófagos ativados podem exercer um papel central na resistência de micoses sistêmicas, como a histoplasmose [178] e paracoccidioidomicose [179], assim como, formas patogênicas destes fungos dimórficos são relativamente resistentes aos

polimorfonucleares neutrófilos [131], tendo sido caracterizados por apresentarem atividade fungistática [180] ou fungicida, quando ativados por citocinas [181].

Através de microscopia eletrônica, foi demonstrado que *P.brasiliensis* multiplica-se no interior de macrófagos residentes, peritoneais e pulmonares, indicando que estes não são fungicidas para leveduras intracelulares [179], somente se ativados por linfocinas [182]. Também, foi sugerido que *in vivo* *P.brasiliensis* multiplica-se após a ingestão por macrófagos não ativados [110].

P.brasiliensis, não é um parasita essencialmente intracelular, contudo pode ser observado no citoplasma de células epiteliais [183]. Esta interação pode ser considerada como um mecanismo de escape ao sistema imune do hospedeiro, iniciando-se outras perspectivas ao estudo da patogênese deste fungo [16, 38, 36, 39].

A interação tipo microrganismo-célula e microrganismo-matriz extracelular, observada em alguns fungos como *P.brasiliensis*, *Blastomyces dermatitidis*, *Histoplasma capsulatum* e *Cryptococcus neoformans*, ocorre quando formas leveduriformes possuem ligantes em sua parede ou cápsula que permitem adesão e/ou disseminação a outros tecidos. Assim, a adesão é um ponto crítico na infecção.

Recentemente, a ligação da gp 43 a laminina da matriz extracelular, foi considerada um dos fatores de virulência de *P.brasiliensis* [133, 134], uma vez que esta molécula está envolvida na adesão à lâmina basal e outros componentes da matriz extracelular e conseqüentemente desempenha um papel na disseminação de microrganismos e tumores malignos [184].

Assim, as moléculas de adesão de *P.brasiliensis* podem estar diretamente implicadas nas várias fases da doença, como a instalação, replicação e disseminação nos tecidos hospedeiros, assim como o estímulo do “burst” oxidativo [185] e síntese de citocinas pelos fagócitos [181], envolvidos na resistência do hospedeiro contra

a doença, ou seja, fatores envolvidos na interação *P.brasiliensis*-célula hospedeira.

2.4. Interação patógeno-célula hospedeira

A habilidade das células em interagir uma com as outras de maneira ordenada, depende de múltiplas interações adesivas entre as células adjacentes e seus ambientes extracelulares, mediadas pelas moléculas de adesão celular [1]. Tais moléculas funcionam como receptores de superfície celular, os quais não apenas mantêm as células unidas, mas disparam sinais físicos e bioquímicos que regulam uma variedade de funções, tais como proliferação celular, expressão gênica, diferenciação, apoptose e migração. Também, como muitas outras moléculas de superfície celular, elas são utilizadas como porta de entrada para alguns patógenos [2]. Assim, os microrganismos patogênicos subvertem as moléculas de adesão do hospedeiro para entrar nas células hospedeiras e para disseminar a fim de promover sua sobrevivência [4].

O reconhecimento de células hospedeiras pelo patógeno requer a presença de moléculas complementares em sua superfície. Assim, as bases moleculares da adesão, aparentemente variam de acordo com a natureza do patógeno. Essa interação específica é mediada por moléculas referidas como adesinas, que se combinam com estruturas complementares das células hospedeiras referidas como receptores [186].

Várias proteínas da matriz extracelular, como a laminina, colágeno, fibronectina, fibrinogênio, são receptores potenciais para os microrganismos. Estas glicoproteínas, normalmente não são expostas na superfície do epitélio e endotélio. Entretanto, qualquer tipo de trauma que altere o tecido do hospedeiro pode levar a exposição de membranas basais e tornar acessível seus componentes.

Foi demonstrado que formas promastigotas de *Leishmania sp* em modelos *in vitro*, ligam-se a fibronectina, e esta facilitaria a associação com fagócitos mononucleares e a adesão às superfícies de células do hospedeiro [187]. Brittingham *et al.*, (1999) [188] caracterizaram a gp 63 como um ligante de fibronectina neste parasita. Foi verificado também que a contribuição desta adesina foi mais pronunciada quando os ensaios foram realizados na presença de complemento, sugerindo que os receptores para o complemento e fibronectina devem cooperar na eficiência da adesão dos parasitas aos macrófagos.

Na disseminação da levedura *Candida sp* estão envolvidos componentes da matriz extracelular como laminina, fibronectina e colágeno tipo IV. As adesinas até agora identificadas de *C.albicans* incluem receptores para os fragmentos do complemento iC_{3b} e C_{3d} [21, 189] laminina [22, 190], fibrinogênio [25, 26], fibronectina [27-29] e diferentes componentes da matriz extracelular incluindo colágeno tipo IV [30, 31] e a entactina [190]. A maioria destas adesinas são glico(mano)proteínas presentes na parte externa da parede celular e possuem propriedades similares a lectinas ou integrinas, reconhecendo nas células hospedeiras glicosídeos com resíduos fucosil ou peptídeos contendo a seqüência arginina-glicina-ácido aspártico (RGD) [23, 61].

Ainda, na parede celular de *C.albicans* estão presentes proteínas hidrofóbicas que influenciam na adesão deste microrganismo às proteínas da matriz extracelular [191]. Recentemente, Masuoka *et al.*, (1999) [192] caracterizaram três anticorpos monoclonais designados 6C5, 5F8 e 5D8 que reconheceram diferentes proteínas hidrofóbicas da parede desta levedura. Estes anticorpos inibiram a ligação de tubos germinativos às proteínas da matriz imobilizadas, sugerindo assim, o envolvimento destas na adesão de *C.albicans*.

A habilidade de conídios de *Aspergillus fumigatus* ligarem-se às proteínas da matriz extracelular foi investigada por Bromley *et al.*, (1996) [193]. Esta ligação foi específica e dose-saturante quando proteínas purificadas como fibrinogênio, fibronectina, laminina, colágeno tipo I e IV foram utilizadas. Além disso, a pré-incubação dos conídios com o peptídeo RGD (Arg-Gly-Asp) inibiu a ligação a fibronectina e colágeno tipo I em 50%.

A interação entre conídios de *A.fumigatus* e laminina, sua degradação [32, 33] e a interação com outras proteínas da matriz extracelular [194-196] foram bastante estudadas. Considerável redução da adesão foi observada, quando células do fungo foram tratadas com tripsina, sugerindo a presença de interação proteína-proteína. Foi identificada uma adesina de 37 kDa que se ligou tanto a laminina quanto a fibronectina [195, 197]. Outros estudos envolvendo microscopia eletrônica demonstraram que sítios ligantes de laminina estão distribuídos na camada mais externa dos conídios de *A.fumigatus*. Após ensaio por imunoblot foi caracterizada uma glicoproteína de 72 kDa, presente no extrato de parede celular do conídio, ligante da laminina [33].

Foi também demonstrado por microscopia de imunofluorescência que os conídios de *Penicillium marneffe* exibem ligantes de laminina [198] e uma proteína de 20 kDa foi identificada em extrato de parede celular deste fungo e posteriormente caracterizada como ligante tanto de laminina como de fibronectina, sugerindo que estas duas proteínas compartilham o mesmo receptor [199].

Uma adesina de 50 kDa, presente em extrato de componentes da parede celular de *H.capsulatum* foi identificada como ligante para a laminina e foi reconhecida por anticorpos contra um receptor para laminina de 67 kDa presente em células tumorais de camundongos [34].

Ambas as fases morfológicas de *Sporotrix schenckii* (conídios e leveduras) podem ligar-se significativamente ao colágeno tipo II, laminina e fibronectina [196]. Foi observado que as leveduras e conídios aderiram de forma similar aos fragmentos proteolíticos de fibronectina contendo a região de 120 kDa, domínio de ligação celular, que inclui uma sequência RGD, e 40 kDa, domínio de ligação da heparina [200].

Estudos ultraestruturais mostraram que após duas horas de infecção, micoplasmas aderem e penetram na superfície da célula hospedeira. *Mycoplasma penetrans* liga-se seletivamente a fibronectina imobilizada, uma interação que não foi inibida pelo fragmento de 70 kDa contendo um domínio da fibronectina de ligação da heparina-gelatina. Microscopias confocal e de imunofluorescência demonstraram que a interação de *M.penetrans* com células alvo, dispara um sinal que causa recrutamento de vários componentes do citoesqueleto, incluindo tubulina e α -actinina e agregação de proteínas fosforiladas [201].

As prováveis adesinas de *P. brasiliensis* e seus receptores celulares estão sendo estudados e identificados. A adesão e invasão fúngica foram observadas quando células cultivadas *in vitro* foram incubadas com *P.brasiliensis*, onde pequenos brotos aderiram inicialmente às células e, decorrido algum tempo, estruturas esféricas foram observadas no citoplasma, com aparente migração para o núcleo [36].

A ligação de *P.brasiliensis* a laminina foi demonstrada em modelo *in vitro* de cultura de células MDCK (células de rim de cachorro Madin-Darby) [17]. Uma solução de laminina marcada com ^{125}I foi incubada com amostras de Pb 18 e Pb 339, sendo a seguir inoculadas em células MDCK e observado um aumento significativo da aderência do fungo quando recoberto com laminina às mesmas. Paralelamente, foi verificado aumento da virulência desta amostra

após inoculações no testículo de hamster e, por provas de imunoblot, comprovaram que a laminina tem a capacidade de se ligar à gp 43 [202]. Com base nestes dados, propuseram que este revestimento poderia também explicar a disseminação do fungo no hospedeiro a partir do foco infeccioso.

Ao utilizar o modelo de culturas celulares, Hanna (1996) [16] e Uemura (1996) [203] estudaram a cinética do processo de interação da amostra 113 de *P. brasiliensis* às culturas celulares Vero e HeLa, respectivamente, e os prováveis fatores envolvidos nesta interação. Esta amostra foi capaz de aderir às células epiteliais após 30 minutos e aparentemente por um pequeno túbulo. Ao redor da área de adesão, puderam ser observadas alterações nas membranas celulares, com presença de cavitações circunscritas ao redor do elemento fúngico e também vacúolos [16, 38, 203]. Nestes estudos, a amostra 113 de *P. brasiliensis* apresentou também um mecanismo de invasão celular em células Vero e Hela.

Esta invasão pode ocorrer, uma vez que muitos microrganismos patogênicos têm a capacidade de induzir sua internalização em células epiteliais, ativando um mecanismo de fagocitose forçada, onde sinais extracelulares específicos podem estimular o rearranjo do seu citoesqueleto, no sítio de contato com o microrganismo, passando a se comportar como um fagócito "não profissional" [204, 205]. O parasitismo intraepitelial como mecanismo de infecção em paracoccidioidomicose humana é ainda reduzido à especulação. Os trabalhos de Brito *et al.*, (1973) [183] apontaram para a presença de células fúngicas sem parede nas porções intracelulares dos constituintes ectodermais de embriões de galinha, bem como a presença de células típicas de *P. brasiliensis* sobre e dentro de células epiteliais. Os autores sugeriram que *P. brasiliensis* apresentar-se-ia na forma de protoplasto para penetrar nas células

do hospedeiro e a parede fúngica regenerar-se-ia posteriormente, adquirindo sua morfologia característica.

Células não fagocíticas como as epiteliais e fibroblastos não codificam receptores CR₃ e, normalmente, não fagocitam. No entanto, muitos patógenos intracelulares são capazes de entrar nestas células, talvez, por mecanismos envolvendo integrinas e o citoesqueleto.

Todos os organismos eucarióticos possuem actina. Esta proteína é a mais abundante do citoesqueleto, constituindo, freqüentemente, 5% ou mais do total das proteínas celulares. Cada molécula de actina (actina-G) consiste de um único polipeptídeo com 43 kDa, sendo 375 aminoácidos contendo uma molécula de ATP firmemente associada. Os filamentos de actina podem formar estruturas estáveis ou lábeis nas células. Filamentos estáveis formam o núcleo das microvilosidades e constituem um componente crucial da maquinaria contrátil das células musculares. Muitos movimentos celulares, no entanto, dependem das estruturas lábeis construídas a partir dos filamentos de actina [63].

A polimerização *in vitro* da actina pura necessita de ATP e de íons monovalentes e divalentes, geralmente K⁺ e Mg⁺⁺. Quando esses íons são adicionados a monômeros de actina na presença de ATP, ocorre uma fase de latência inicial, na qual os novos filamentos são iniciados, seguidos de uma fase de polimerização rápida e o alongamento dos filamentos. Muitos patógenos entéricos invadem células de mamíferos em cultura, influenciando os rearranjos da actina que resultam na formação de pseudópodes (lamelipódios) e na internalização da bactéria [205].

Salmonella spp força também as células hospedeiras a ingeri-las, mas o processo parece ser diferente da fagocitose forçada encontrada em outras bactérias. A ligação de *S.typhimurium* ou *S.choleraesuis* às células de cultura causa alteração na superfície

destas, que lembram a queda de gotas d'água em uma superfície sólida (efeito “splash”). Este efeito resulta na internalização da bactéria no interior da vesícula endocítica. A membrana da célula hospedeira fica deformada parecendo enrugada ou encrespada. A internalização e o efeito de enrugamento são acompanhados por extenso rearranjo da actina. Durante este processo há um aumento dos níveis de cálcio intracelular, um sinal que ativa as enzimas para a despolimerização da actina. Após a entrada da bactéria, a polimerização do filamento da actina retorna ao [7, 206].

Yersinia enterocolítica e *Y.pseudotuberculosis* codificam uma proteína de superfície denominada invasina, que medeia a aderência e a entrada destas bactérias nas células epiteliais [207]. As células epiteliais podem ligar-se a invasina e esta interação envolve várias integrinas [207, 208]. Como anteriormente mencionado, as integrinas estão ligadas ao citoesqueleto e, por sua vez, os inibidores do filamento de actina bloqueiam a entrada da maioria das bactérias patogênicas em células não fagocíticas [3, 209].

Salmonella ou *Shigella* ao entrarem nas células epiteliais, promovem grande condensação de actina ao redor dos organismos invadidos [7, 210], à semelhança do que ocorre na fagocitose. Há também uma grande condensação de α -actinina, tropomiosina, talina e integrinas, envolvendo a bactéria englobada [211].

Assim, é provável que os organismos invasores liguem-se diretamente ou via matriz extracelular as integrinas ou suas assemelhadas na superfície do hospedeiro. Após esta ligação, é disparado um sinal na célula hospedeira para que os filamentos da actina liguem-se ao receptor da membrana, possivelmente via talina e outras proteínas e assim possibilitem a entrada do parasita na célula. Uma vez dentro da célula, alguns microrganismos são capazes de causar significativa rearranjo no citoesqueleto. As drogas que estabilizam e desestabilizam os filamentos de actina são

ferramentas importantes para o estudo do seu comportamento dinâmico na célula.

As citocalasinas são metabólitos fúngicos de baixo peso molecular que se ligam a actina das células, influenciando numa variedade de atividades associadas à contratilidade. O efeito desta droga sobre a internalização bacteriana foi estudado em uma variedade de espécies de bactérias e de células eucarióticas do hospedeiro. A observação mais freqüente foi que a citocalasina D diminui a internalização bacteriana em células eucarióticas implicando na participação da F-actina na endocitose bacteriana [212].

Listeria monocytogenes e *Shigella flexneri* entram nas células hospedeiras e dissolvem a membrana vacuolar, deixando-os livres no citoplasma. Ambos organismos causam então um grande rearranjo da actina, responsável pela capacidade de invasão dessas bactérias. A adição de citocalasina D inibe a entrada e invasão bacteriana intra e intercelular, indicando que o rearranjo da actina é essencial para a infecção de outras células.

Em uma série de estudos de interação entre *Escherichia coli* enteropatogênica e células HeLa, foi demonstrado que este patógeno causa agregação da actina após sua adesão a estas células [213]. Evidências existem também do envolvimento de filamentos de actina na interiorização de *Trypanosoma cruzi* em células de mamíferos [214, 215].

A citocalasina D teve pouco ou nenhum efeito sobre a invasão da forma tripomastigota de *T.cruzi* às células, enquanto que inibiu a entrada de *S.typhimurium* em células epiteliais [216]. A invasão de *Toxoplasma gondii* em células de hospedeiro vertebrado é dependente de filamentos de actina do parasita, mas não da célula hospedeira. A invasão da célula hospedeira por *T.gondii* é

ativamente aumentada por um sistema contrátil baseado na actina do parasita [217].

Em cultura de fibroblastos humanos incubados com *C.albicans*, dois estágios foram observados: a aderência das leveduras à superfície das células e a desorganização dos filamentos do citoesqueleto actínico. Segundo os autores, a fibronectina foi à mediadora desta adesão e a desordem do citoesqueleto foi atribuída a ação direta de toxinas sobre a actina ou às suas proteínas associadas [218].

Algumas evidências têm sugerido que para a ocorrência da internalização de patógenos em fagócitos não profissionais, são requeridas proteínas ligantes de fibronectina (FnBPs). Assim, em cepa mutante de *S.aureus* incapaz de expressar as FnBPs, foi verificada uma dramática redução na habilidade de entrar em células epiteliais *in vitro* [208]. Porém, também foi demonstrado em trabalho similar, que houve uma compensação por outras moléculas de superfície, pela falta de FnBPs, permitindo ao microrganismo ligar-se às células [219].

Foi proposto um modelo, onde a fibronectina seria uma molécula bifuncional, que formaria uma "ponte" entre a FnBP e o receptor celular (provavelmente as integrinas) que se liga a fibronectina ou outro componente da matriz extracelular e interage com o citoesqueleto de actina. Vários patógenos intracelulares, bem caracterizados, são interiorizados ligando-se as integrinas, que têm potencial para induzir uma notável transdução, conduzindo ao rearranjo do citoesqueleto. Porém, enquanto este "modelo de ponte" pode ser apoiado através de evidências circunstanciais, várias linhas sugerem que os patógenos podem ligar-se diretamente a um receptor da célula hospedeira.

Foi também observada uma inibição da internalização de *S.aureus* quando tratadas com fibronectina solúvel, talvez pelo

bloqueio do sítio de ligação da FnBP. Além disso, a afinidade de ligação da fibronectina à integrina é mais baixa que a de ligantes como as invasinas e geralmente não é suficientemente alta para induzir a internalização. Os autores também demonstraram que a interação da fibronectina com as integrinas é muito fraca para mediar a internalização; assim, partículas artificiais ou bactérias cobertas com fibronectina, não foram internalizadas [207]. Desta forma, outras investigações são necessárias para explicar a internalização de patógenos em fagócitos “não profissionais”.

Outros constituintes do citoesqueleto, além dos microfilamentos de actina, foram estudados e importantes resultados foram evidenciados. A interação de adesinas bacterianas de *Streptococcus* do grupo B com filamentos de citoqueratina foi também relatada empregando-se modelos *in vitro* de cultura de células A₅₄₉ (linhagem epitelial do trato respiratório inferior). As bactérias tratadas com tripsina, não se ligaram a citoqueratina, demonstrando que a interação é mediada via adesina de natureza protéica e superficial do patógeno. Os autores sugeriram que a aderência a citoqueratina pode ser importante na colonização dos epitélios queratinizados e mesmo causar injúrias celulares em outros locais [220].

Burkholderia cepacia é um patógeno oportunista em pacientes com fibrose cística pulmonar que se liga, através do pili, aos filamentos de citoqueratina. Como esta classe de citoqueratina é quase que exclusivamente intracelular e em células epiteliais estendem-se e interagem com os desmossomos [221], estas interações somente poderiam ocorrer, se houvesse a internalização da bactéria no meio intracelular. Foi sugerido que este mecanismo facilitaria a translocação da bactéria através das barreiras epiteliais, evadindo-se das defesas do hospedeiro [222].

Como uma das conseqüências da internalização de patógenos em células epiteliais, a modulação do fenômeno da apoptose, foi

muito investigada [223, 224]. Este fenômeno é essencial na regulação da população de células, na homeostase e também em certas condições patológicas, como câncer.

A indução de apoptose por patógenos foi bem caracterizada em certas infecções virais [225], bacterianas [226-228] e em protozoários [229]. Como consequência, os patógenos podem alcançar o meio extracelular, eliminar células fagocíticas, evadir da resposta imune ou estimular a resposta inflamatória [230, 231].

Staphylococcus aureus, além da persistência em hospedeiros saudáveis, é bem conhecida a sua habilidade em induzir infecções crônicas e resistentes à terapia convencional [232]. Embora também não seja um patógeno intracelular, foi extensivamente documentada a entrada em células epiteliais, endoteliais e osteoblastos. Estes mecanismos foram sugeridos como uma possibilidade de manutenção de um nicho intracelular, podendo promover a colonização em longo prazo no hospedeiro, determinando assim, o caráter da infecção crônica. Foi também observado que durante seu ciclo de invasão celular, esta bactéria induz sua interiorização, através do rearranjo dos microfilamentos de actina; internalizada esta bactéria escapa da vesícula endossomal; multiplica-se no citoplasma celular e alcança o meio extracelular, induzindo apoptose na célula hospedeira, através de toxinas [233].

Quanto aos prováveis mecanismos de interação de *P.brasiliensis* às células, poucas informações estão disponíveis. Assim, dando continuidade a esta linha de pesquisa, foram estudadas a interação de *P.brasiliensis* e células epiteliais de duas linhagens diferentes (células renais e alveolares) com ênfase na expressão de moléculas complementares na superfície da célula fúngica e na célula hospedeira como os componentes da matriz extracelular e o comprometimento de constituintes do citoesqueleto durante a

interação fungo-célula e a indução da apoptose como consequência da invasão.

2. Objetivos

O presente estudo teve como objetivos:

- Determinar as bases moleculares da adesão e invasão de *P.brasiliensis* em cultura de células não fagocíticas, das linhagens Vero (células epiteliais de rim de macaco verde da África) e A₅₄₉ (células epiteliais do trato respiratório inferior – pneumócitos tipo I);
- Estudar a interação de componentes de *P.brasiliensis* (amostra 18) com laminina, fibronectina e colágeno tipo I, constituintes da matriz extracelular;
- Avaliar o comprometimento de microfilamentos de actina, microtúbulos e citoqueratina, componentes do citoesqueleto, durante a invasão de *P.brasiliensis* às células;
- Avaliar a indução da apoptose nas células epiteliais pelo *P.brasiliensis*, em sua fase leveduriforme.

4. Material e Métodos

4.1. Microrganismos

Foram empregadas as amostras 18 (para os ensaios em cultura de células) e 113 (para a obtenção de filtrado de cultura) de *P.brasiliensis* na fase leveduriforme, procedentes da micoteca da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FM-USP). As amostras foram isoladas de pacientes com paracoccidiodomicose do Brasil. Durante a realização deste trabalho, as amostras de *P.brasiliensis* foram mantidas em meio PYG (peptona, extrato de levedura e glicose) a 35°C e repicadas a cada 3-4 dias. Como controle da virulência das amostras de *P.brasiliensis*, foi feito um retro isolamento a cada três meses, a partir de células Vero em monocamada infectadas. Para tanto, uma suspensão das amostras de *P.brasiliensis* 18 e 113 foi deixada em contato com as células em cultura por 5 horas a 37°C. Após, o sobrenadante foi descartado e adicionado ao tapete 1 mL de água milli-Q estéril. As células lisadas foram centrifugadas a 2000rpm por 10 minutos, o “pellet” distribuído em tubos contendo meio PYG e incubados a 35°C.

4.2. Preparo dos antígenos de *P.brasiliensis*

4.2.1. Antígeno “cell-free”

Este antígeno foi obtido da amostra 18, na fase leveduriforme (L). Cerca de 300mg de crescimento com 3-4 dias em meio PYG foram adicionados em 1mL de tampão salina fosfato (PBS), pH 7,4, 0,01M estéril. Esta mistura foi agitada em “vortex” por 30 segundos e centrifugada a 2500 rpm por 1 minuto. O sobrenadante (antígeno “cell-free”) foi retirado, separado em alíquotas e armazenado a -20°C. A concentração protéica foi quantificada pelo método de

Lowry *et al.*, (1951) [234] e em seguida a amostra foi avaliada por SDS-PAGE.

4.2.2. Filtrado de cultura

Os componentes exocelulares foram obtidos a partir da amostra 113 de *P.brasiliensis* fase “L”. As leveduras, com 5 dias de crescimento em meio de Fava Netto, foram inoculadas em 500mL de meio de Negroni modificado por Siqueira (1982) [235] e incubado a 35°C por 15 dias, em estufa agitadora. Após esse período, as células foram tratadas com Timerosal na concentração final de 0,2g/L e foram incubadas nas mesmas condições durante 4 dias. A partir daí, foi feita a diálise do filtrado de cultura contra polietilenoglicol 20.000 (Sigma). Os extratos concentrados foram analisados quanto aos teores protéicos pelo método de Lowry *et al.*, (1951) [234] e avaliados por SDS-PAGE. Finalmente, foram separados em alíquotas e congelados a -70°C.

4.2.2.1. Fracionamento e purificação do antígeno de 43kDa

O filtrado de cultura da amostra 113 foi utilizado para a obtenção do antígeno de 43kDa. Para tanto, foi empregada a técnica de cromatografia de filtração em gel. Colunas com as resinas Sephacryl S-200 e S-100 (Pharmacia) de 3,0 x 70cm e 1,9 x 90 cm foram utilizadas, respectivamente. As colunas, acopladas no aparelho LKB-Frac 100 (Pharmacia), foram equilibradas com solução fisiológica tamponada com fosfato (PBS) pH 7,4, 0,01 M e previamente calibradas com azul de dextran. Após, foram aplicados 2,0 mL da amostra de filtrado de cultura, já avaliada por SDS-PAGE, na coluna constituída de resina Sephacryl S-200, alíquotas de 2,0 mL foram sendo coletadas e analisadas pela absorvância a 280 nm e reunidas em “pool” de acordo com os picos obtidos para

serem concentradas em polietilenoglicol e submetidas a diálise. A avaliação do eluato foi efetuada por SDS-PAGE. As frações ricas em antígeno de 43kDa foram novamente submetidas à cromatografia, em coluna constituída de resina Sephacryl S-100 e, novamente, avaliadas em SDS-PAGE.

4.3. Preparo dos anticorpos policlonais específicos

4.3.1. Anti- “cell-free” de *P. brasiliensis*

O soro anti “cell-free” de *P. brasiliensis* da amostra 18, foi produzido a partir do antígeno “cell-free”, obtido como foi descrito em 3.2.1. Amostras de 0,2, 0,5, 0,7 e 1,0 mL do antígeno foram inoculadas por via sub-cutânea em coelho, intercaladas as inoculações a cada 4 dias, sendo que nas duas primeiras a suspensão foi emulsificada com adjuvante completo de Freund e, nas seguintes, com o adjuvante incompleto de Freund. Decorridos 15 dias da última inoculação, foi realizada uma sangria de prova e a avaliação do título de anticorpos produzidos foi feita através da técnica de Immunoblot. Em seguida, foram feitas 4 doses de reforço de 1,0 mL cada, com um intervalo de 15 dias entre cada aplicação. Nova sangria de prova foi realizada e, após 15 dias da última inoculação, fez-se a sangria total. O anticorpo obtido foi precipitado com sulfato de amônio (descrito no item 4.3.3.), separado em alíquotas e estocado a -70°C .

4.3.2. Anti-fração de 43kDa

O anticorpo foi preparado segundo esquema de imunização proposto por Yarzabal *et al.*, (1976) [150] e Mendes-Giannini *et al.*, (1989) [12].

O soro anti-43 kDa foi preparado em coelho, pela inoculação intradérmica da fração de 43 kDa, purificada por meio de

cromatografia de filtração em gel e emulsificada com adjuvante completo de Freund v/v nas duas primeiras inoculações e com adjuvante incompleto de Freund nas restantes. Inicialmente, foram injetadas quatro doses de 1,0 mL cada, com intervalos de sete dias e, após 15 dias da última inoculação, foi realizada uma sangria de prova, cujo soro foi avaliado por imunodifusão. Após estas inoculações, foram realizadas novas injeções de reforço com 1,0 mL cada, em intervalos semanais, até a obtenção de um título desejável, sendo que, a partir daí, foi feita a sangria total. O título de anticorpos foi avaliado pelas técnicas de imunodifusão dupla e imunoblot. A seguir, foi realizada a precipitação com sulfato de amônio (descrito a seguir) e o anticorpo foi separado em alíquotas e estocado a -70°C .

4.3.3. Precipitação das imunoglobulinas totais

Para a separação das imunoglobulinas, foi realizada a precipitação com sulfato de amônio 1,56 M, pH 6,5. Os anticorpos específicos foram diluídos 1:2 em tampão salina fosfato (PBS), e mantidos sob agitação constante em banho de gelo. A seguir, foi adicionado o sulfato de amônio, gota a gota. Os anticorpos foram deixados 12 horas a 4°C , e centrifugados sob refrigeração a 5000 rpm por 30 minutos. O sobrenadante foi separado e o precipitado lavado com sulfato de amônio 40% e novamente centrifugado. O precipitado foi ressuspendido em PBS e submetido a diálise contra PBS pH 7,2 por 12 horas a 4°C . A seguir, os anticorpos foram novamente avaliados por imunoblot, fracionados em alíquotas e estocados a -70°C .

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

Os componentes protéicos do antígeno foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio, SDS-PAGE, sob condições redutoras, usando sistema tampão descontínuo de Laemmli (1970) [236] e Studier (1973) [237].

A separação dos componentes foi efetuada em gel a 10%, e em gel de empilhamento a 5% de acrilamida. O gel foi preparado a partir de uma solução estoque contendo 30% por peso de acrilamida e 0,8% por peso de bis-acrilamida. No gel de separação a polimerização foi feita em solução contendo 1,5M de Tris-HCl, pH 8,8 e 0,4% de SDS, em presença de 0,1% v/v de N,N,N',N'-tetrametil-etilenodiamina (TEMED) e 0,1% de persulfato de amônio. O gel de empilhamento foi polimerizado em presença de 0,5M de Tris-HCl pH 6,8 e 0,4% de SDS, além de 0,1% de persulfato de amônio e 0,05% v/v de TEMED. Para o preparo da amostra foram utilizados 64 μ L de antígeno diluído em tampão de amostra (1:4), consistindo de 62,5mM de Tris-HCl [tris (hidroxi-metil) aminometano] pH 6,8, 2% de SDS, 10% de glicerol, 0,5M de ditiotreitól e 0,002% de azul de bromofenol.

As proteínas foram dissociadas pelo aquecimento da amostra em banho-maria com água fervente por 3 minutos.

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

A corrida eletroforética foi realizada a 10mA (50V) até que o corante penetrasse no gel de separação e a 20mA (120V) até que atingisse o fim do gel. O tampão de corrida é constituído de Tris 0,075M, glicina 0,57M e SDS 0,1%, pH 8,3. A seguir, os géis foram corados pelo nitrato de prata, segundo o método descrito por Nielsen e Brown (1984) [238].

4.4.1. Immunoblot – titulação dos anticorpos policlonais

Os antígenos representados pelo “cell-free” (amostra18) e por filtrado de cultura (amostra 113) foram submetidos a SDS-PAGE e transferidos do gel para membranas de nitrocelulose, por eletroforese, conforme descrito por Towbin *et al.* (1979) [239]. Após a eletroforese, os géis foram apostos sobre membranas de nitrocelulose, recobertos com papel de filtro e comprimidos com esponjas de poliuretano. Todos os materiais foram previamente embebidos em tampão de transferência bicarbonato de sódio e metanol, pH 9,9 e, em seguida, encaixados em placas acrílicas perfuradas e mergulhados na câmara de eletroforese contendo o mesmo tampão. A transferência foi feita por 18 horas à voltagem constante de 20V. A membrana foi então corada por Ponceau S (0,5% p/v em 5% v/v de ácido acético) para a localização das bandas protéicas transferidas. Após lavagem de 15 minutos, as membranas de nitrocelulose contendo os antígenos foram cortadas em tiras (blots), incubadas com solução bloqueadora (5% de leite desnatado em PBS) por 4 horas. Os soros adequados foram diluídos, colocados sobre as tiras e deixados em contato, sob agitação, 12 horas em temperatura ambiente.

A seguir, as tiras foram lavadas com PBS 0,01M pH 7,2 por 3 vezes, com trocas a cada 10 minutos, para a retirada do excesso do soro. Então foram incubadas por 2 horas com conjugado imunoenzimático, soro anti-IgG de coelho marcado com peroxidase

(Sigma). O excesso de conjugado foi retirado com novo ciclo de lavagens. As tiras foram reveladas para evidenciação dos complexos antígeno-anticorpo formados com o substrato cromógeno, consistindo de 0,005g de diaminobenzidina (DAB) diluída em 30 mL de PBS acrescido de 150 μ L de água oxigenada. A reação foi bloqueada com água destilada.

4.5. Cultura de células

Neste estudo, foram selecionadas duas linhagens celulares contínuas:

- células Vero: células epiteliais de rim normal de macaco verde da África
- células A₅₄₉: células epiteliais respiratórias – pneumócitos tipo I

4.5.1. Cultivo contínuo e tripsinização

As linhagens celulares foram mantidas em cultivo contínuo, isto é, em monocamadas. As células foram cultivadas em garrafas de vidro tipo xarope, em meio 199 (células Vero) e DMEM (células A₅₄₉) (Adolfo Lutz), suplementado com 10% de soro fetal bovino. As culturas foram mantidas em estufa a 36,5°C. Decorridos 3-4 dias, as garrafas de células foram submetidas a tripsinização. Para isto, a monocamada celular formada foi lavada com 1mL de ATV- solução de tripsina 0,2% e EDTA 0,02% (Adolfo Lutz) e, após a lavagem, esta foi desprezada e acrescentado mais 1 mL de ATV. Seguidos 1-2 minutos, as células foram homogeneizadas com volumes variáveis do meio correspondente acrescido de 10% de soro fetal bovino (SFB). Nesta etapa, a tripsina (ATV) foi neutralizada pelo soro fetal bovino presente no meio de cultura. O volume total da suspensão celular obtida foi diluído em meio acrescido de 10% de soro fetal

bovino e transferido para outras garrafas, de modo a se obter uma concentração celular de 10^6 células/mL.

4.5.2. Detecção de contaminantes nas linhagens celulares

4.5.2.1. Bactérias e fungos

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

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

4.5.2.2. Micoplasmas

Os micoplasmas são os menores organismos de vida livre existentes e, durante muito tempo, foram conhecidos como PPLO (pleuropneumonie like organisms). São os contaminantes mais freqüentes das linhagens celulares (57 a 92%), originários de fonte humana, bovina e suína.

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

Inicialmente, para se pesquisar a presença de micoplasma nas células, tomou-se cerca de 0.5mL do sobrenadante da cultura e semeou-se em caldo PPLO.

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

4.5.3. Estocagem de células à baixa temperatura

As linhagens foram estocadas através da técnica de congelamento em nitrogênio líquido (N₂ líquido). Para isto, foi necessária a adição de Dimetilsulfóxido (DMSO), substância preservadora não tóxica às células.

4.5.3.1. Técnica de congelamento das linhagens

Foi utilizada a técnica de congelamento lento das linhagens, evitando-se, assim, a formação de cristais de gelo no interior das células.

As células que foram congeladas encontravam-se em fase logarítmica de crescimento e livres de contaminantes. As garrafas contendo o cultivo celular foram tripsinizadas, como já descrito no item 3.5.1 e diluídas em meio próprio acrescido de 10% de soro fetal bovino na concentração de 2×10^6 cel/mL. Após a tripsinização, as células foram centrifugadas a 3000 rpm por 15 min, desprezou-se o sobrenadante e ao “pellet” foram adicionados: Soro Fetal Bovino 20% + 4 mL de meio e DMSO + 4 mL do meio.

A suspensão celular acrescida de meio, SFB e DMSO, foi separada em alíquotas de 2.0mL, acondicionada em ampolas especiais para congelamento (Cryotube Nunc - 340711/50) e congelada em freezer -20°C por 24h, sendo após transferida para freezer -70°C por 24 horas e, finalmente, transferida para o tambor de nitrogênio líquido.

4.5.3.2. Descongelamento das linhagens

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

4.6. Ensaio de infecção de *P.brasiliensis* às células epiteliais

4.6.1. Cultivo de células em lamínula

Os ensaios de infecção foram realizados em placas de 24 orifícios contendo no interior uma lamínula redonda (Deckglaser). Para os testes, foi padronizada uma suspensão celular de 2×10^6 células/mL. Assim, após a tripsinização e homogeneização da suspensão celular, uma alíquota foi retirada da garrafa, diluída em meio de cultivo e realizada a contagem das células em hemocitômetro, para a obtenção da concentração desejada por meio de diluições. Ao término desta etapa, uma alíquota dessa suspensão

de células foi dispensada em cada orifício da placa que foi incubada a 36.5°C por 24 horas, tempo para a formação da monocamada celular sobre a lamínula. A partir daí, as células foram utilizadas para os testes de adesão e invasão.

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

P.brasiliensis (amostra 18) foi cultivado em meio PYG durante três dias a 35°C e, após, uma suspensão foi feita correspondente a 10⁶ células/mL, de acordo com leitura em espectrofotômetro (D.O._{550nm} = 0.5).

4.6.1.2. Realização do teste

Após a formação do tapete celular sobre as lamínulas contidas na placa de 24 orifícios, por cerca de 24h, o sobrenadante da cultura foi desprezado e as células lavadas por três vezes com 1,0 mL cada de PBS estéril 0,05M, com pH 7,2. Em seguida, cada poço foi inoculado com 300µL da suspensão padronizada de *P.brasiliensis* em PBS acrescida de 300µL de meio. A seguir, as células infectadas foram incubadas em estufa a 36.5°C, em diferentes períodos de tempo.

4.6.1.3. Períodos de infecção

Foi padronizado como período mínimo de infecção o menor tempo de contato do patógeno com as células, que permitiu a observação da adesão de células fúngicas às células epiteliais. Foram avaliados os tempos de 30 minutos e de uma, duas, três e cinco horas. Em todos os testes foram feitos controles com células não infectadas.

Após o período de infecção, as células foram lavadas cinco vezes com PBS 0,05M pH 7,2, eliminando-se, desta forma, células fúngicas não aderentes às culturas celulares. As células infectadas foram fixadas com paraformaldeído a 4% por um período de duas horas, à temperatura ambiente.

4.6.2. Avaliação da cinética de interação de *P.brasiliensis* às culturas epiteliais

Após o tempo de fixação das células, as lamínulas foram lavadas cinco vezes com PBS 0,05M, pH 7,2, e secas em temperatura ambiente. A seguir, foram coradas pelo ácido periódico de Schiff (P.A.S.) modificado.

As lamínulas foram montadas sobre lâminas, após as colorações e observadas em microscópio óptico comum e em microscópio confocal a laser, para avaliação da cinética de interação em função do tempo de contato fungo-célula, assim como, da linhagem celular utilizada. Para tanto, foram realizadas contagens de fungos nas células e, assim, calculada a porcentagem de infecção.

4.6.3. Avaliação da adesão de *P.brasiliensis* às células por Microscopia Eletrônica de Varredura

Após a fixação das lamínulas em paraformaldeído a 4%, o material foi lavado com tampão cacodilato e submetido a uma bateria de banhos de imersão, de 15 minutos cada, em alcóois 30%, 50%, 70%, 90% e 100%, e a operação repetida por 3 vezes. Em seguida, o material foi submetido ao CO₂ líquido, pelo método do ponto crítico e, após a desidratação completa, o material foi colocado em câmara de vácuo (gás Argônio) sendo, a seguir, realizada a metalização com ouro (“sputtering”) por, aproximadamente, 15 minutos. A observação do material foi feita em microscópio de

varredura da marca Jeol - JSM - T330A, do Instituto de Biociências da UNESP, em Botucatu.

4.7. Interação de *P.brasiliensis* com as células epiteliais e componentes da matriz extracelular (MEC)

4.7.1. Reação de imunoperoxidase “in situ”

As lamínulas contendo células infectadas com *P.brasiliensis*, devidamente fixadas, sofreram, inicialmente, uma digestão enzimática com proteinase K (25µg/mL) em Tris-HCl 0,05M e Cloreto de Cálcio 20mM, pH 8,0 por três minutos a 37°C no escuro. A seguir, foram lavadas em PBS e incubadas com soro normal de coelho (diluído a 1:40 em PBS) por uma hora a 37°C em câmara úmida, para o bloqueio de reações inespecíficas. As lamínulas foram lavadas em PBS por três vezes e, em seguida, foi feita a incubação com anticorpos primários específicos anti-*P.brasiliensis* e anti-MEC:

- anti- “cell-free” de *P.brasiliensis* amostra 18 diluído a 1:100 em PBS e BSA a 1% por uma hora;
- anti-gp 43 de *P.brasiliensis*, diluído a 1:50 em PBS e BSA a 1% por uma hora;
- anti-colágeno tipo I (Sigma), diluído a 1:25 em PBS e BSA a 1% por uma hora;
- anti-fibronectina (Sigma), diluído a 1:50 em PBS e BSA a 1% por uma hora;

As lamínulas foram submetidas a três lavagens sucessivas em PBS e posterior incubação com os anticorpos monoclonais anti-IgG de coelho e anti-IgG de camundongo biotinilados (Sigma), para anticorpos anti-*P.brasiliensis*, anti-fibronectina e anticorpos anti-

colágeno tipo I respectivamente, diluídos a 1:200 em tampão PBS, por uma hora em câmara úmida a 37°C. Ao término do período de incubação, seguiram-se lavagens em PBS e subsequente incubação com o complexo Streptavidina-Biotina-Peroxidase (S-ABC) a 2µg/mL em PBS, em câmara úmida a 37°C por 30 minutos. Novas lavagens foram realizadas e, em seguida, as lamínulas foram submetidas à revelação com 0,05mg de diaminobenzidina (DAB) em 30 mL de PBS e 150µL de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) até a observação de uma leve tonalidade castanha. A reação foi bloqueada usando-se água e em seguida, as lamínulas foram contra-coradas com hematoxilina de Mayer por um minuto, passando posteriormente em água amoniacal por alguns segundos e, a seguir, algumas vezes em água de torneira. As lamínulas foram secas, montadas em “permount”, observadas em microscópio Leica e documentadas. Os controles negativos foram feitos substituindo-se os anticorpos primários por tampão fosfato.

4.7.2. Reação de imunofluorescência indireta

As células Vero e A₅₄₉, cultivadas sobre lamínulas e infectadas com *P.brasiliensis* (amostra 18) foram submetidas à reação de imunofluorescência indireta. Inicialmente, as lamínulas foram permeabilizadas por duas vezes, com 0,5% de Triton X-100 em PBS durante 15 minutos em temperatura ambiente. Após lavagem em PBS-T (PBS adicionado de 0,25% de Tween 80) gelado, foram bloqueadas por uma hora a 37°C com PBS, leite desnatado (Molico) a 5% e BSA a 3%. Após lavagem em PBS-T gelado, foram incubadas com os anticorpos primários anti-*P.brasiliensis* e anti-MEC, abaixo discriminados, durante uma hora a 37°C em PBS, leite desnatado (Molico) a 3% e BSA a 1%:

- anti-“cell-free” de *P. brasiliensis* amostra 18 diluído a 1:100;

- anti-gp 43 diluído a 1:50;
- anti-fibronectina diluído a 1:50 (Sigma);
- anti-laminina diluído a 1:50 (Sigma);

Decorrido o tempo de incubação, as lamínulas foram lavadas com PBS-T gelado e incubadas com soro anti-IgG de coelho marcado com fluoresceína (FITC) (Sigma), diluído a 1:60 em Azul de Evans, durante uma hora a 37°C e ao abrigo da luz. Foi feita então, uma última lavagem com PBS-T gelado e as lamínulas foram montadas com glicerina tamponada. O material foi examinado e documentado em microscópio óptico de fluorescência Leica.

Os controles das reações foram feitos substituindo-se os anticorpos primários por tampão fosfato.

4.8. Envolvimento do citoesqueleto na invasão de P.brasiliensis às células epiteliais

4.8.1. Microfilamentos de actina

4.8.1.1. Dinâmica dos microfilamentos de actina de células Vero durante o cultivo

As células foram cultivadas sobre lamínulas em tubos de Leighton com meio 199 suplementado com 10% de soro fetal bovino. Após os períodos de uma, três, cinco, oito, 24 e 48 horas, as lamínulas foram lavadas com PBS e fixadas com paraformaldeído 4% em PBS por duas horas à temperatura ambiente.

4.8.1.2. Marcação com faloidina para visualização dos filamentos de actina

A faloidina é uma toxina que se liga a actina polimérica, estabilizando-a e interferindo com o retículo endoplasmático e outras estruturas ricas em actina [212, 240].

Foi feita uma reação de imunofluorescência direta com as lamínulas fixadas com paraformaldeído. Após lavagem, as lamínulas foram permeabilizadas com solução de Triton X 100, 0,5% em PBS por 20 minutos. Nova lavagem foi feita e, a seguir, adicionou-se o conjugado faloidina-FITC no título de 1:50 em Azul de Evans, por 50 minutos a 37°C, no escuro. As lamínulas foram novamente lavadas e montadas em lâmina com glicerina tamponada. As lâminas foram examinadas em microscópio de imunofluorescência (Leica) e, para documentação, foi usado filme Fujicolor super HG de 400 asas.

4.8.1.3. Efeito da citocalasina D sobre células Vero infectadas com *P.brasiliensis*

Citocalasinas são metabólitos fúngicos de baixo peso molecular que se ligam a actina. Influem em uma variedade de atividades de células eucarióticas associadas com contratilidade. A citocalasina D é usada com maior freqüência para esclarecer o efeito da actina sobre a internalização de microrganismos [240].

Foi utilizada a amostra 18 de *P.brasiliensis* na fase leveduriforme e células Vero e A₅₄₉ cultivadas sobre lamínulas em placas de 24 orifícios. O tratamento com a citocalasina D foi feito de dois modos:

- incubação das células Vero com a citocalasina D, antes da infecção com *P. brasiliensis*;
- incubação das células Vero com a citocalasina D, antes e durante a infecção com *P. brasiliensis*.

Foi preparada uma solução estoque de citocalasina D em dimetilsulfóxido (DMSO), na concentração de 1mg/mL. A diluição da droga para a realização dos testes foi feita usando-se o meio de cultivo das células (meio 199 acrescido de 10% SFB), obtendo-se concentrações de 1,0 e 10µg/mL, segundo Wells *et al.*, (1998) [212].

Foi feita uma suspensão de *P.brasiliensis* (amostra 18) em PBS estéril para obtenção de uma suspensão turva e homogênea, correspondente a 10⁶células/mL, de acordo com leitura em espectrofotômetro (D.O._{550nm} = 0.5).

As células foram, inicialmente, pré-incubadas com a citocalasina D em diferentes concentrações, por 30 minutos e a 37°C.

Depois de realizados os testes de incubação prévia das células com a droga, foi feito o teste de infecção com *P.brasiliensis* por cinco horas a 37°C. Em seguida, o tapete celular foi lavado com PBS e fixado em paraformaldeído a 4%.

4.8.1.4. Microfilamentos de actina na invasão de *P.brasiliensis* às células Vero e A₅₄₉

Foi feita uma reação de imunofluorescência dupla com as lamínulas tratadas com citocalasina D e com lamínulas não tratadas, que serviram como controle positivo da reação. O uso de dois fluoróforos possibilitou a visualização do fungo intracelular, descrito por Heesemann e Laufs (1985) [241].

A reação foi feita usando-se anticorpo primário anti-“cell-free” da amostra 18 para marcação do fungo e como anticorpo secundário, soro anti-IgG de coelho marcado com isotiocianato de tetrametil rodamina (TRITC); para a visualização do citoesqueleto actínico foi utilizada faloidina-FITC.

As lamínulas contendo o tapete celular infectado com *P.brasiliensis* foram permeabilizadas com Triton 0,5% em PBS por

duas vezes a temperatura ambiente. Após lavagem em PBS-T gelado, foram incubadas com o anticorpo primário anti- “cell-free” da amostra 18 (1:100) durante uma hora a 37°C em PBS, leite desnatado (Molico) a 3% e BSA a 1%.

Após novas lavagens em PBS gelado, as lamínulas foram incubadas com anti-IgG de coelho marcado com TRITC no título de 1:100 durante uma hora a 37°C em PBS-T. Seguiram-se novas lavagens e incubação com o conjugado faloidina-FITC em azul de Evans por 30 minutos a 37°C. Após a última lavagem com PBS-T gelado, as lamínulas foram montadas com glicerina entre lâminas, examinadas e documentadas em microscópio óptico de fluorescência (Leica) e confocal a laser (Zeiss).

4.8.2. Microtúbulos

4.8.2.1. Efeito da colchicina sobre células infectadas com *P.brasiliensis*

A colchicina é uma droga que estabiliza microtúbulos, assim como promove o rompimento dos filamentos de tubulina do citoesqueleto. É empregada para avaliar o papel dos microtúbulos na internalização microbiana.

Foi utilizada a amostra 18 de *P.brasiliensis* na fase leveduriforme e células Vero e A₅₄₉ cultivadas sobre lamínulas, em placas de 24 orifícios.

Foi preparada uma solução estoque de colchicina em tampão salina fosfato, na concentração de 1mg/mL. A diluição da droga para a realização dos testes foi feita usando-se o meio de cultivo das células (meio 199 acrescido de 10% SFB), obtendo-se assim concentrações de 5µg/mL, segundo Wells *et al.*, (1998) [212].

Foi feita uma suspensão de *P.brasiliensis* (amostra 18) em PBS estéril, para obtenção de uma suspensão turva e homogênea,

correspondente a 10^6 células/mL, ajustada por meio de leitura em espectrofotômetro ($D.O_{.550nm} = 0.5$).

As células foram pré-incubadas com a droga por 30 minutos a 37°C e a seguir, foi realizada incubação com *P. brasiliensis* por cinco horas a 37°C. Em seguida, o tapete celular foi lavado com PBS e fixado em paraformaldeído a 4%.

4.8.2.2. Microtúbulos na invasão de *P.brasiliensis* às células Vero e A₅₄₉

A avaliação do envolvimento dos microtúbulos na invasão celular por *P.brasiliensis* foi verificada pela reação de imunofluorescência dupla com as células tratadas e com células não tratadas, como controle positivo da reação. O uso de dois fluoróforos possibilitou a visualização do fungo intracelular, como foi descrito por Heesemann e Laufs (1985) [241].

A reação foi feita usando-se anticorpo primário anti-“cell-free” da amostra 18 (1:100) para marcação do fungo e como anticorpo secundário, soro anti-IgG de coelho marcado com TRITC (Sigma) a 1:60; para a visualização dos microtúbulos foi utilizado anti- β tubulina (Sigma) a 1:100.

A reação foi processada, da mesma forma que para os microfilamentos de actina (item 3.8.1.4.) e as lamínulas analisadas em microscopia óptica de fluorescência e confocal a laser.

4.8.3. Ensaio de plaqueamento

Foi realizado um ensaio de plaqueamento, para a recuperação de leveduras, em função do tempo de contato com as células e de tratamentos prévios. Para tanto, células Vero foram cultivadas em garrafas na concentração de 10^6 células/mL e, após atingir a semi-confluência do tapete (24h), seguiu-se o seguinte protocolo, em duplicata:

- Quatro garrafas com células Vero receberam tratamento prévio com 10µg/mL de citocalasina e a seguir, foram incubadas com suspensão de *P.brasiliensis* nos tempos de uma, duas, três e cinco horas, a 37°C;
- Quatro garrafas com células Vero receberam tratamento prévio com 5µg/mL de colchicina e a seguir, foram incubadas com suspensão de *P.brasiliensis* nos tempos de uma, duas, três e cinco horas, a 37°C;
- Quatro garrafas com células Vero não receberam tratamento prévio e foram incubadas com suspensão de *P.brasiliensis* nos tempos de uma, duas, três e cinco horas, a 37°C;
- Decorridos os períodos do tempo de incubação, o sobrenadante da cultura foi desprezado, eliminando-se leveduras não aderentes e restos celulares; o tapete foi lavado três vezes com PBS estéril e foram adicionados 5,0mL de água deionizada para lisar células; após o total desprendimento do tapete, a suspensão foi plaqueada em meio de cultura [242] e as placas foram incubadas a 37°C por sete dias;
- Após o tempo de incubação, as colônias isoladas foram quantificadas.

4.8.4. Filamentos Intermediários: Citoqueratina

Foi utilizada a amostra 18 de *P.brasiliensis* na fase leveduriforme e células Vero e A₅₄₉ cultivadas sobre lamínulas em placas de 24 orifícios.

As células foram incubadas com suspensão de *P.brasiliensis* correspondente a 10⁶ células/mL por diferentes períodos de tempo.

A seguir, o tapete celular foi lavado com PBS e fixado em paraformaldeído a 4%.

A avaliação do comprometimento da citoqueratina na interação fungo-célula foi verificada através da reação de imunofluorescência dupla, como foi anteriormente descrito (item 3.8.1.4.).

A reação foi processada utilizando-se anticorpo primário anti-“cell-free” da amostra 18 a 1:100 para marcação do fungo e, como anticorpo secundário, soro anti-IgG de coelho marcado com Phycoerithrin (Sigma) a 1:60; para a visualização dos filamentos de citoqueratina foi utilizado o anticorpo monoclonal anti-pan citoqueratina (Sigma) a 1:4.

As análises foram realizadas em microscópio óptico de fluorescência e confocal a laser.

4.8.5. Microscopia confocal a laser

A análise do material por microscopia confocal foi realizada com lamínulas contendo células Vero e A₅₄₉, infectadas com *P.brasiliensis* durante vários tempos, assim como lamínulas contendo somente os fungos. Assim, as diversas técnicas empregadas para microscopia óptica e já descritas anteriormente (PAS, Giemsa, Imunofluorescência), também foram utilizadas para análise em microscopia confocal. Utilizando-se os vários recursos disponíveis, como imagens em terceira dimensão, código de cores, histograma e galeria de cortes, entre outros [243], foi possível a visualização de maiores detalhes sobre a adesão e invasão celular por *P.brasiliensis*.

O padrão de reconhecimento de *P.brasiliensis* frente a anticorpos anti-MEC, anti-citoesqueleto e anti-*P.brasiliensis* foi também avaliado pela reação de imunofluorescência. Para tanto, a amostra 18 de *P.brasiliensis*, foi fixada com paraformaldeído a 4% sobre lâminas silanizadas, para demonstração de antígenos. As

lâminas foram incubadas com leite desnatado a 5% e BSA a 1% em PBS, por 30 minutos a 37°C, para o bloqueio de reações inespecíficas. Após esse período, foram lavadas em PBS e Tween 20 a 0,2% por três vezes, sob agitação. Os anticorpos primários usados foram anti-fibronectina (1:50), anti-laminina (1:50), anti- β tubulina (1:100), anti-citoqueratina (1:4) e anti- “cell-free” da amostra 18 de *P.brasiliensis* (1:100) diluídos em PBS, leite desnatado a 5% e BSA 1%.

Decorrido o tempo de incubação, as lâminas foram lavadas em PBS e Tween 20 a 0,2% e incubadas com o conjugado anti-IgG (coelho ou camundongo) biotinizado (Sigma) no título de 1:1000 durante uma hora a 37°C e ao abrigo da luz. Após nova lavagem, foi feita uma última incubação com o complexo revelador avidina-TRITC no título de 1:70 por uma hora a 37°C, lavagem com PBS-T e foram montadas com p-fenilenodiamina em tampão glicerol. Os controles das reações foram feitos substituindo-se os anticorpos primários por tampão fosfato. O material foi examinado e documentado em microscópio confocal de varredura a laser (LSM-410-Zeiss) do Departamento de Patologia do Instituto Oswaldo Cruz Rio de Janeiro (RJ).

4.9. Comprometimento do citoesqueleto por componentes antigênicos de *P.brasiliensis*

Foram avaliados os efeitos da gp 43 e do antígeno “cell-free” de *P.brasiliensis* sobre componentes do citoesqueleto. Para tanto, células Vero foram ajustadas a 10^6 células/mL e 200 μ L desta suspensão foram adicionadas na placa de microtitulação com 24 orifícios, seguindo-se incubação a 36,5°C em atmosfera saturada com 5% de CO₂, até a formação do tapete celular, em cerca de 24 horas. Após a formação do tapete, as células foram lavadas 3 vezes

com PBS e foram adicionados 100 μ L de meio de cultivo com 10% de soro fetal bovino. A seguir, foram inoculados 100 μ L dos antígenos gp 43 e “cell-free”, em várias concentrações e a placa foi incubada nas mesmas condições já descritas, por cinco horas, tempo de multiplicação celular.

Ao término do tempo de incubação, as células foram lavadas e fixadas com paraformaldeído por duas horas. As análises do comprometimento do citoesqueleto foram realizadas através de imunofluorescência indireta, empregando-se anticorpos monoclonais anti-actina (Sigma) a 1:25 e anti-pan citoqueratina (Sigma) a 1:4.

Em paralelo, foram feitos controles de viabilidade celular com azul de Tripán, descartando, assim, concentrações de antígenos que promoveram a citotoxicidade.

4.10. Avaliação do sobrenadante das culturas celulares infectadas com *P.brasiliensis*

Tapetes confluentes de células foram cultivados em lamínulas contidas em placas de microtitulação. A seguir, suspensão padronizada de *P.brasiliensis* foi inoculada no tapete celular por cinco horas e a placa foi incubada a 36.5°C. Após este período, o sobrenadante da cultura foi recolhido e centrifugado. O precipitado foi desprezado e o sobrenadante foi avaliado por imunoblot. Para tanto, amostras do sobrenadante de cultura de células infectadas e não infectadas por *P.brasiliensis* foram submetidas a uma eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS e, em seguida, transferidas para membrana de nitrocelulose, como já foi descrito (item 4.4.2.). Após a transferência, a membrana foi cortada em tiras e estas bloqueadas com leite desnatado (Molico) a 5% em PBS por quatro horas. A seguir, foi adicionado soro anti-citoqueratina a 1:2, anti-actina a 1:25 e anti-tubulina a 1:50,

seguinto-se incubação por 18 horas à temperatura ambiente. Ao término deste período, as tiras foram lavadas com PBS, seis vezes, com trocas a cada 10 minutos e foi adicionado o conjugado anti-IgG de camundongo marcado com peroxidase (Sigma), por duas horas em temperatura ambiente. As tiras foram novamente lavadas com PBS e, finalmente, foi adicionado o revelador o-fenilenodiamino (OPD) acrescido de peróxido de hidrogênio, diluído em PBS. A reação foi interrompida com água destilada e as tiras foram secas em papel de filtro e analisadas quanto as suas frações.

4.11. Componentes de *P.brasiliensis* que interagem com constituintes do citoesqueleto

Para verificar os componentes de *P.brasiliensis* que interagem preferencialmente com os constituintes do citoesqueleto, foi feito um imunoblot. Para tanto, antígeno “cell-free” de *P.brasiliensis* foi submetido a uma eletroforese em gel de poliacrilamida e transferidos para membrana de nitrocelulose, como já descrito (item 4.4.2.). Após a transferência e bloqueio, as tiras foram incubadas com soro anti-actina (diluído a 1:25), anti-citoqueratina (diluído a 1:2) e anti-tubulina (diluído a 1:50), seguindo-se incubação por 18 horas à temperatura ambiente.

Após o tempo de incubação, as tiras foram processadas como já descrito anteriormente (item 4.10) e ao final, as frações foram determinadas.

4.12. Ocorrência de apoptose em células infectadas com *P.brasiliensis*

Para a determinação da apoptose em cultura de células infectadas por *P.brasiliensis*, foi empregada a técnica “TUNEL” (Terminal deoxy-transferase mediated X-dUTP Nick End Labeling)

que tem como princípio a marcação específica de seqüências de DNA da fragmentação que ocorre durante o processo de apoptose celular [244].

Para tanto, em lamínulas contendo células infectadas com *P.brasiliensis* em tempos de uma, duas, três e cinco horas, e células não infectadas, como controle negativo, após a fixação e lavagens, foram adicionadas solução de bloqueio composta por leite desnatado a 5% e BSA a 3% em PBS e incubadas por uma hora a 37°C. Após este tempo, as lamínulas foram lavadas em PBS-T gelado e incubadas com a mistura dos componentes do “TUNEL” com sonda fluorescente (Boehringer Mannheim), transferase terminal (TdT) e a sonda marcada com fluoresceína (d-UTP fluoresceína), por uma hora a 37°C. Durante este tempo, na extremidade 3' dos fragmentos apoptóticos de DNA foram incorporados os nucleotídeos marcados com fluoresceína, catalisados pela transferase terminal. Após lavagens com PBS-T gelado, as lamínulas foram contra-coradas com azul de Evans por 30 minutos a 37°C e novamente lavadas com PBS-T. As lamínulas foram montadas com p-fenilenodiamino e observadas em microscópio óptico de fluorescência.

5. Resultados

5.1. Componentes antigênicos de *P.brasiliensis*

O perfil eletroforético do antígeno “cell-free” da amostra 18 de *P.brasiliensis* demonstrou bandas que variaram de 109 a 14 kDa, sendo majoritárias as bandas de 109, 76, 70, 50, 48, 43, 41, 18 e 14 kDa.

O perfil protéico, dos vários lotes de filtrados de cultura, mostrou a presença marcante das bandas de 43 e 70 kDa. A fração de 43 kDa foi obtida do filtrado de cultura, após a cromatografia de exclusão molecular.

5.2. Titulação dos anticorpos policlonais anti- *P.brasiliensis*

5.2.1. Titulação por imunoblot

O soro anti-“cell-free” da amostra 18 de *P.brasiliensis* reconheceu 10 frações antigênicas do respectivo antígeno, sendo que as bandas de 70 e 43 kDa apresentaram marcação mais intensa. Como controle positivo, foi utilizado soro de paciente com paracoccidiodomicose, diluído a 1:40 e como controle negativo, soro de coelho, diluído 1:40. A diluição de 1:100 foi escolhida como aquela que evidenciava fortemente as bandas majoritárias de 43 e 70 kDa.

O soro anti-gp 43 kDa reconheceu intensamente e de maneira específica a fração de 43 kDa presente em filtrado de cultura. Foi estabelecida a diluição de 1:50 para a sua utilização.

5.2.2. Titulação por imunofluorescência indireta

O anticorpo anti-“cell-free” da amostra 18 de *P.brasiliensis* foi avaliado pela técnica de imunofluorescência indireta, contra *P.brasiliensis*, (por imagens de microscopia óptica e confocal a laser) e contra células infectadas por *P.brasiliensis* (por imagens de microscopia óptica). Marcação intensa e contínua da parede fúngica foi observada quando o soro foi diluído a 1:100. Os antígenos superficiais foram marcados de

maneira semelhante em células leveduriformes de diferentes tamanhos, sendo mais acentuada em células fúngicas com brotamento (*figura 1A e 1B*). O tapete celular infectado por *P.brasiliensis* não apresentou reatividade, mostrando que este é específico, assim como a reatividade com antígenos superficiais envolvidos na interação com as células (*figura 1C*).

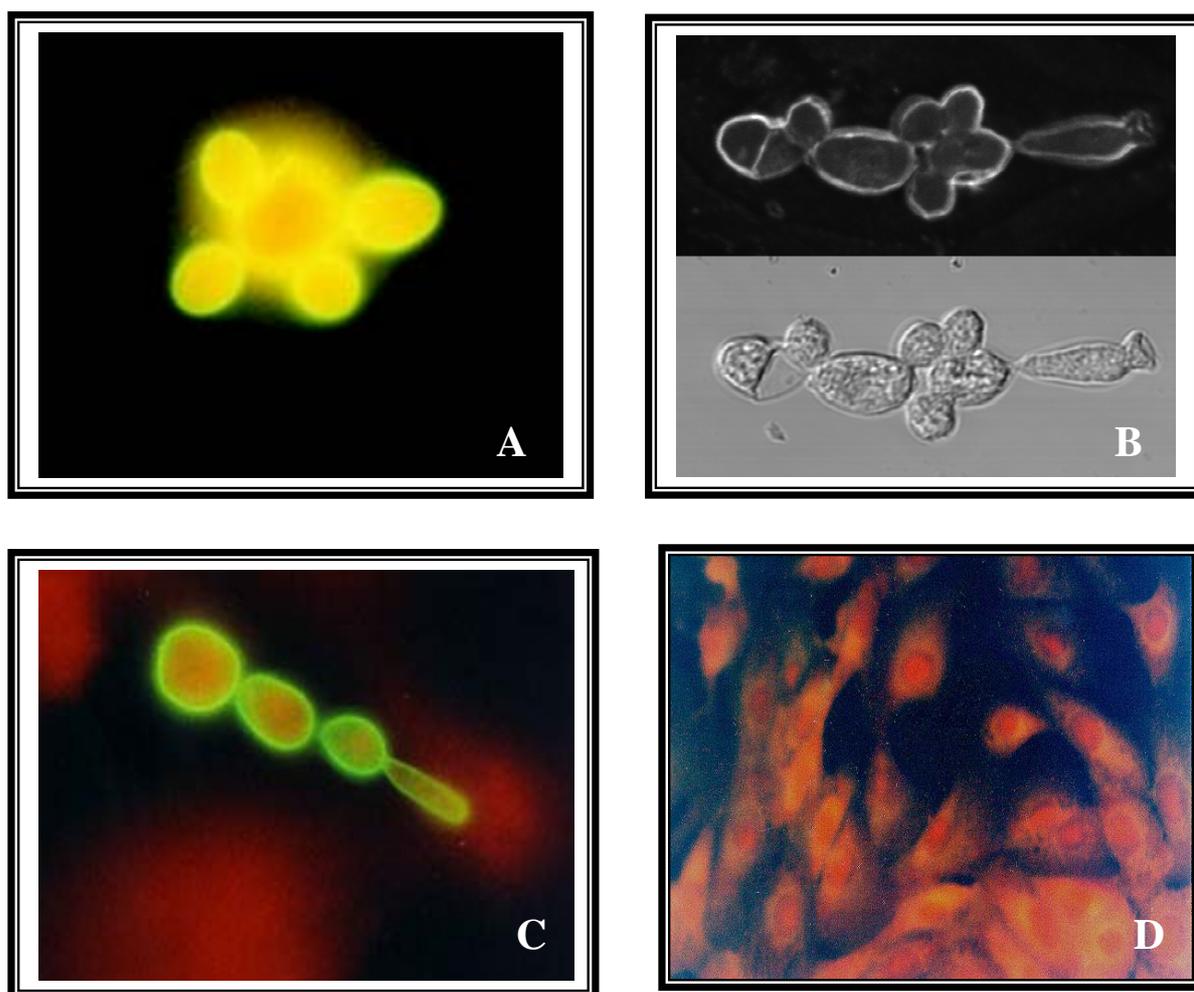


Figura 1- Padrão de reconhecimento de *P.brasiliensis*, amostra 18, frente ao soro anti-“cell-free” a 1:100, revelado por imunofluorescência indireta: (A) *P.brasiliensis* por imagens de microscopia óptica (100x); (B) *P.brasiliensis* em microscópio confocal a laser (60x); (C) células Vero após três horas de contato com *P.brasiliensis* ilustradas por microscopia óptica (100x) e (D) tapete celular não infectado por *P.brasiliensis* por microscopia óptica (40x).

A reação de *P.brasiliensis* com o soro anti-fração de 43 kDa diluído a 1:50, demonstrou a alta reatividade deste anticorpo, que marcou intensamente a superfície da levedura, com padrão semelhante ao do soro anti- “cell-free” (figura 2A e 2 B). A figura 2C ilustra a marcação específica do soro no fungo em tapete celular infectado, demonstrando a especificidade do anticorpo assim como o padrão de reatividade com antígenos de superfície envolvido na interação com as células.

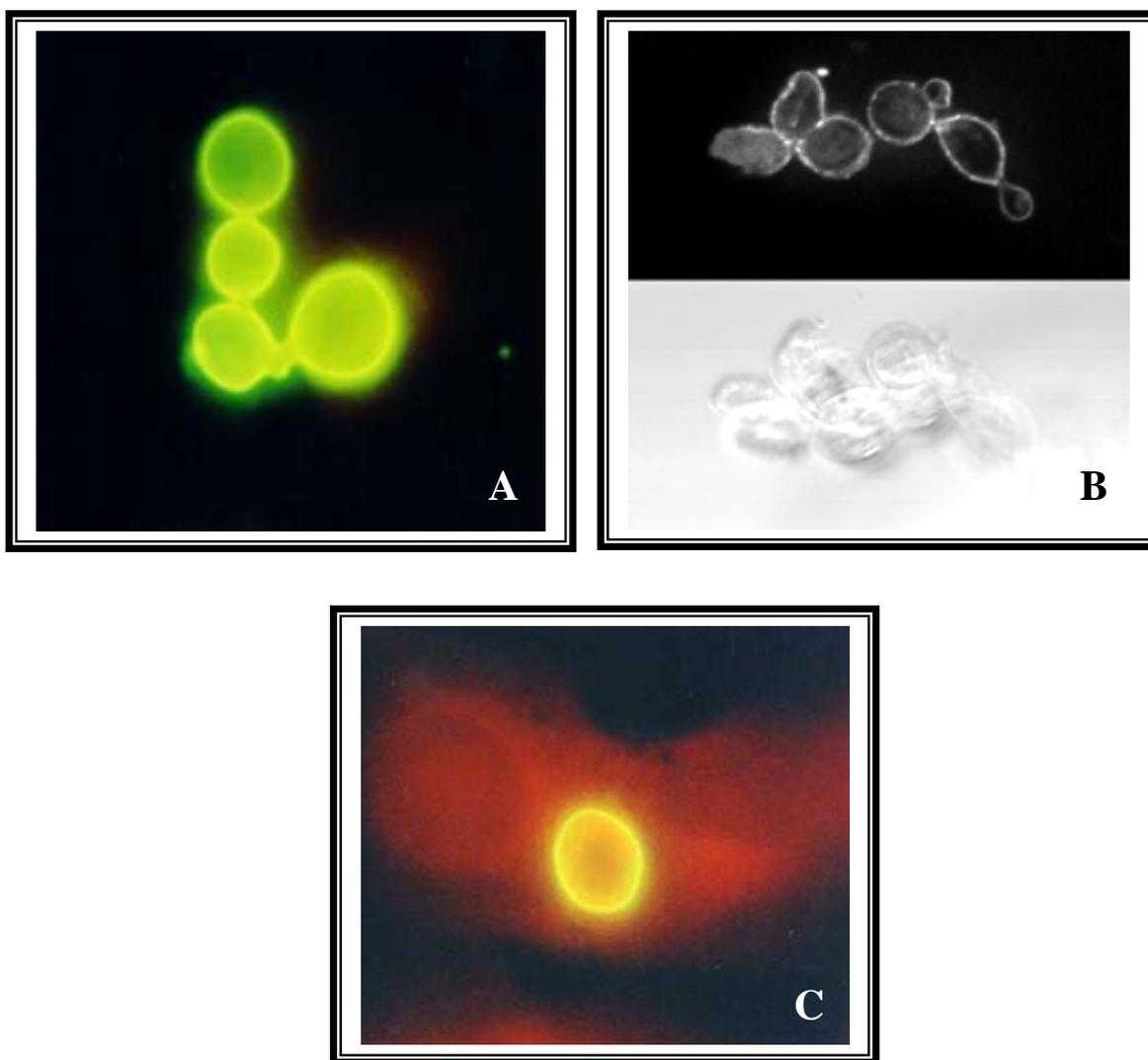


Figura 2 - Padrão de reconhecimento de *P.brasiliensis*, amostra 18, frente ao soro anti- gp 43 a 1:50, revelado por imunofluorescência indireta: (A) *P.brasiliensis* por microscopia óptica (100x); (B) *P.brasiliensis* por imagens em microscopia confocal a laser e (C) células Vero após três horas de contato com *P.brasiliensis* ilustradas por microscopia óptica (100x).

5.3. Cinética da interação de *P.brasiliensis* às culturas epiteliais

Para a determinação da cinética de interação fungo-célula, foram realizadas contagens em duplicata dos fungos em 100 células, determinando-se a porcentagem de infecção. A adesão ocorreu a partir de 30 minutos de contato, nas duas linhagens e um acréscimo no número de leveduras foi observado, de forma similar nas duas linhagens utilizadas, nos tempos subsequentes.

A ocorrência de fungos no interior das células ocorreu a partir de duas horas de contato dos fungos com as células Vero e uma hora em contato com a linhagem celular respiratória. No período de cinco horas de contato, houve uma frequência maior de brotos, indicando uma multiplicação do fungo, nas duas linhagens celulares. Os resultados estão apresentados na *figura 3*.

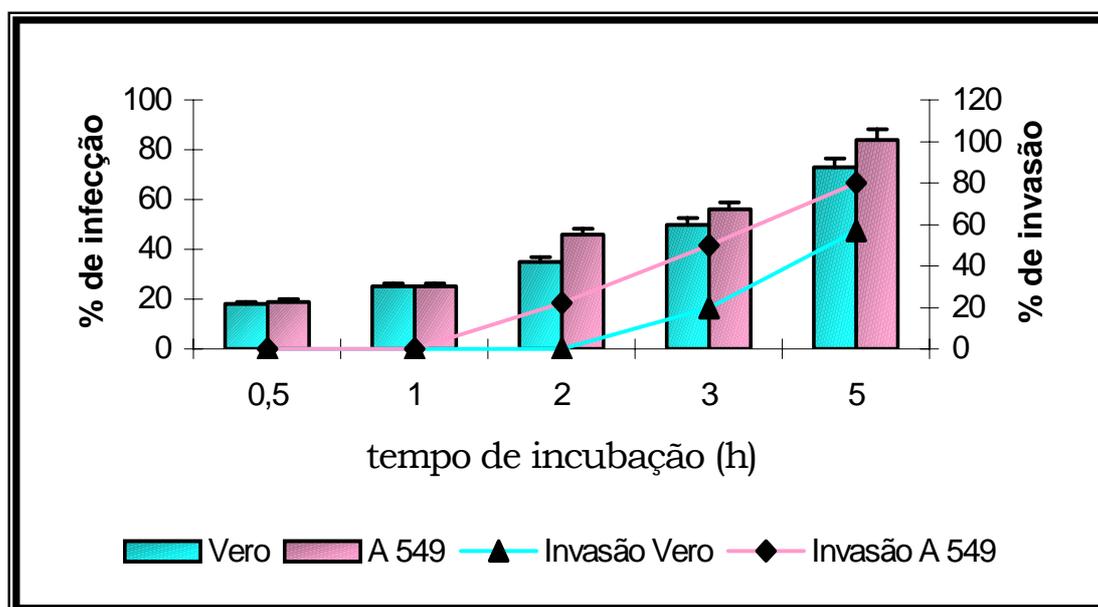
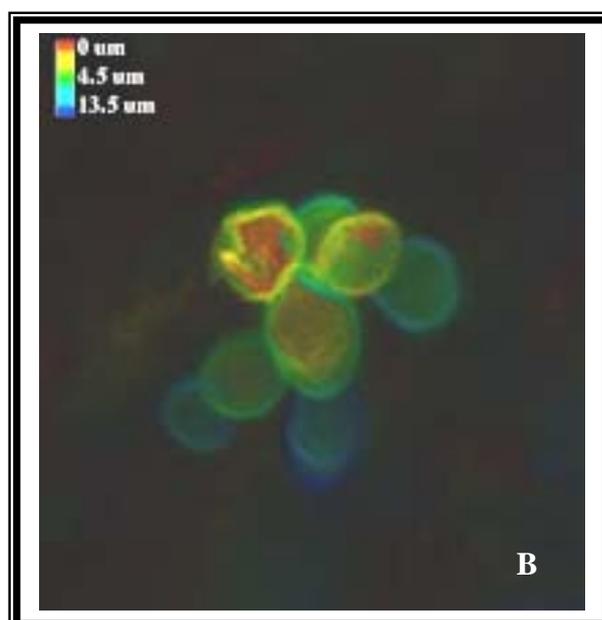
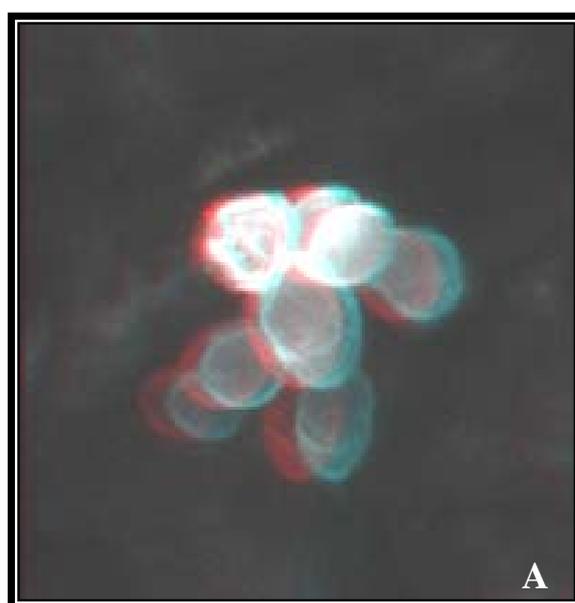


Figura 3 – Cinética da adesão e invasão da amostra 18 de *P.brasiliensis* em função do período de incubação (horas) com células das linhagens Vero e A₅₄₉. A porcentagem de infecção, ou seja a adesão e a invasão, está representada por histogramas e a porcentagem de invasão representada por linhas. Resultados expressos a partir da média e desvio padrão de quatro experimentos realizados em duplicata.

A complexidade morfológica da interação *P.brasiliensis*-célula, pode ser melhor evidenciada por imagens de microscopia confocal a laser. Através destas imagens, pode ser observado fungo e seus brotamentos (*figura 4*). A cinética da interação com as células, ou seja, a adesão de *P.brasiliensis* às células Vero (*figura 5A*), assim como o início da invasão (*figura 5B e 5C*) foi analisada e formas intracelulares do fungo foram observadas com formação de vacúolo intracitoplasmático (*figura 6*), multiplicação fúngica no citoplasma da célula (*figura 7*), assim como uma tendência de migração nuclear pela levedura (*figura 6 e 8*). Uma íntima interação do fungo com a membrana nuclear foi observada como mais um dos eventos da cinética da infecção, após a invasão fúngica (*figura 8*).



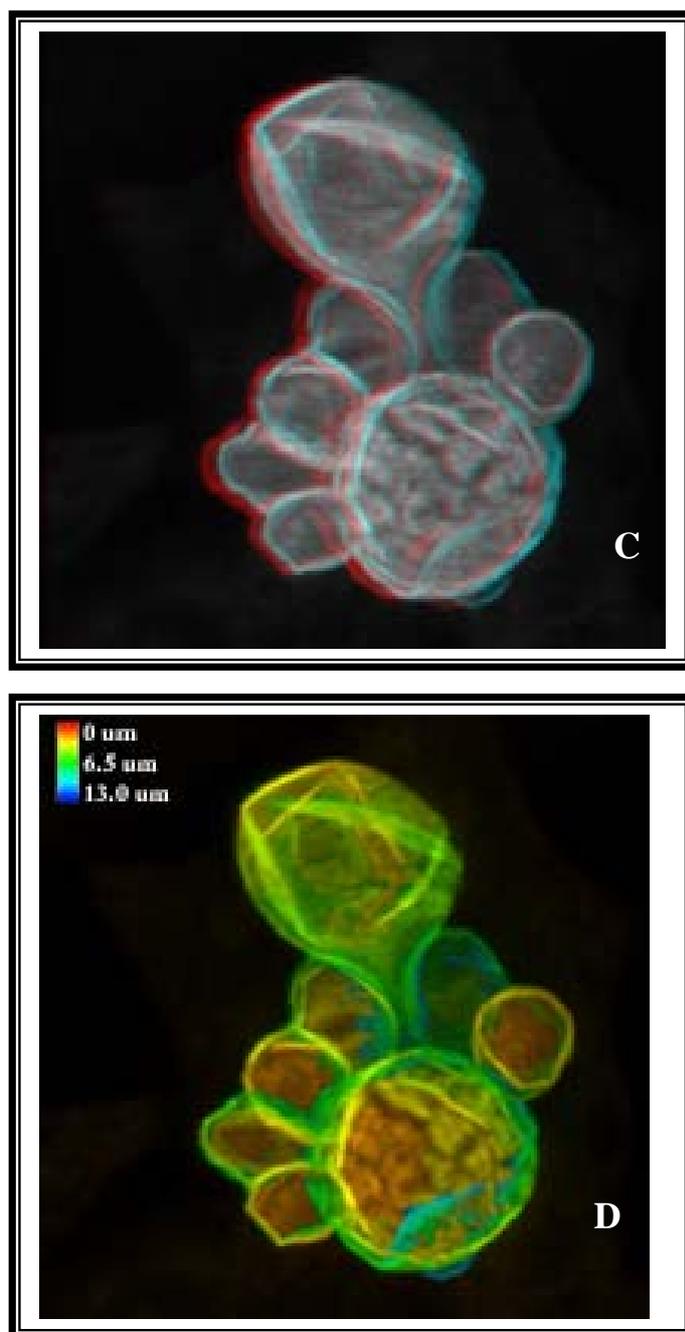


Figura 4 – *P.brasiliensis* amostra 18, analisado por microscopia confocal a laser:
(A) e (C) Imagens em terceira dimensão e os respectivos códigos de cores (B) e (D).

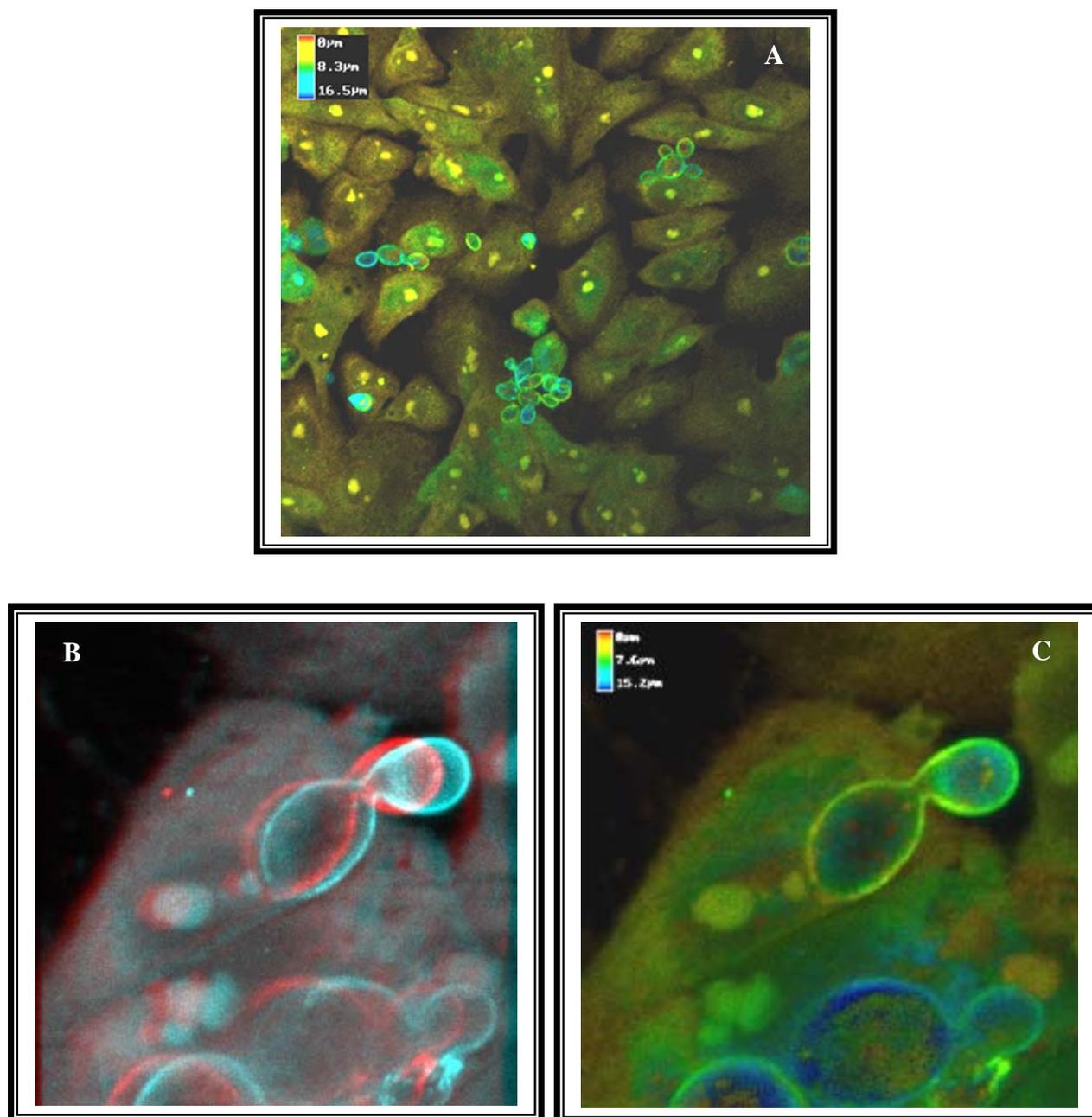


Figura 5 – (A) Adesão da amostra 18 de *P.brasiliensis* às células Vero após duas horas de infecção; (B e C) leveduras parcialmente interiorizadas após três horas de contato: (B) imagens em 3D e (C) o código de cor, analisadas por microscópio confocal a laser.

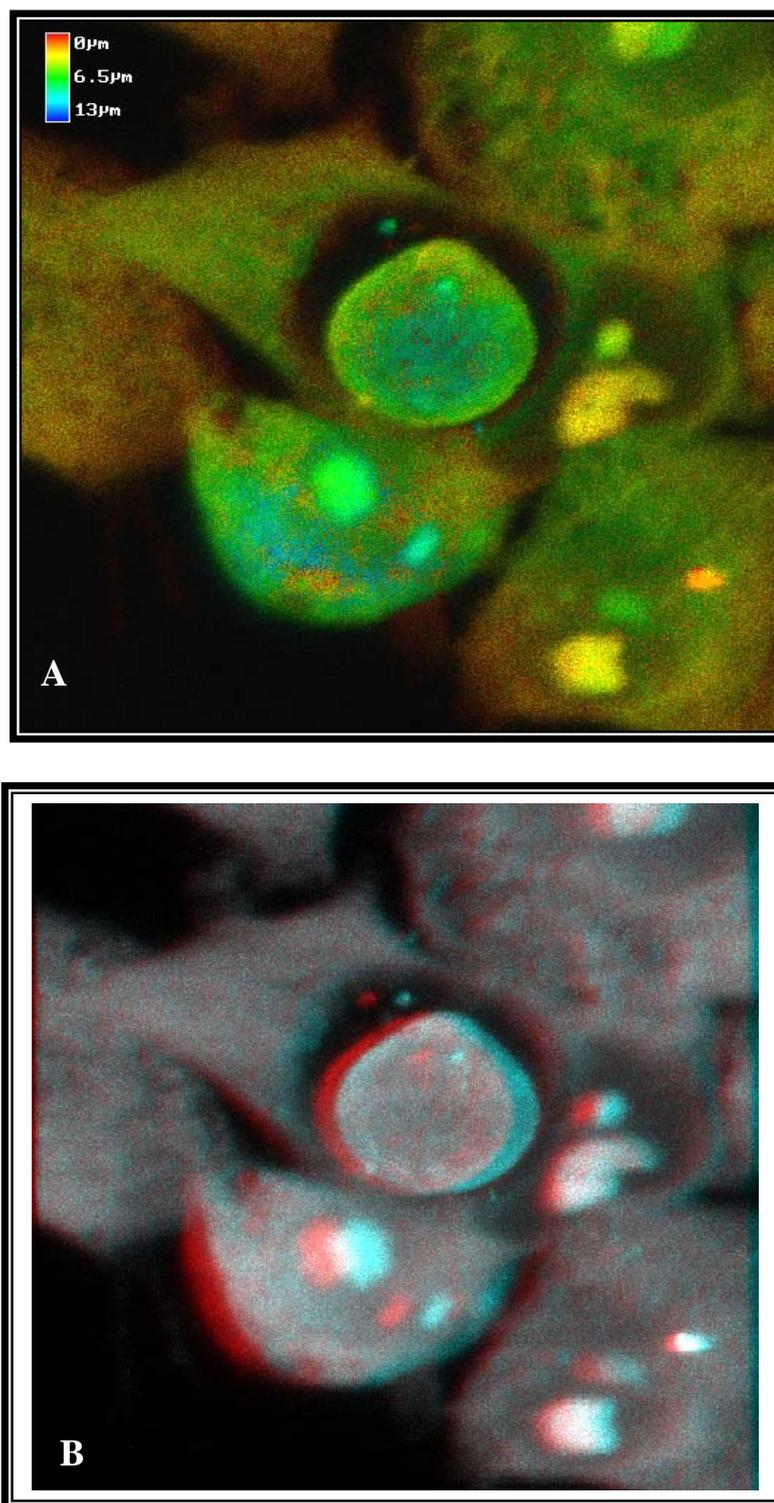


Figura 6 - Invasão da amostra 18 de *P. brasiliensis* às células Vero após três horas de infecção analisado por microscópio confocal a laser, demonstrando vacúolo e uma tendência de migração do fungo para o núcleo celular: (A) Código de cores e (B) Imagem em 3D.

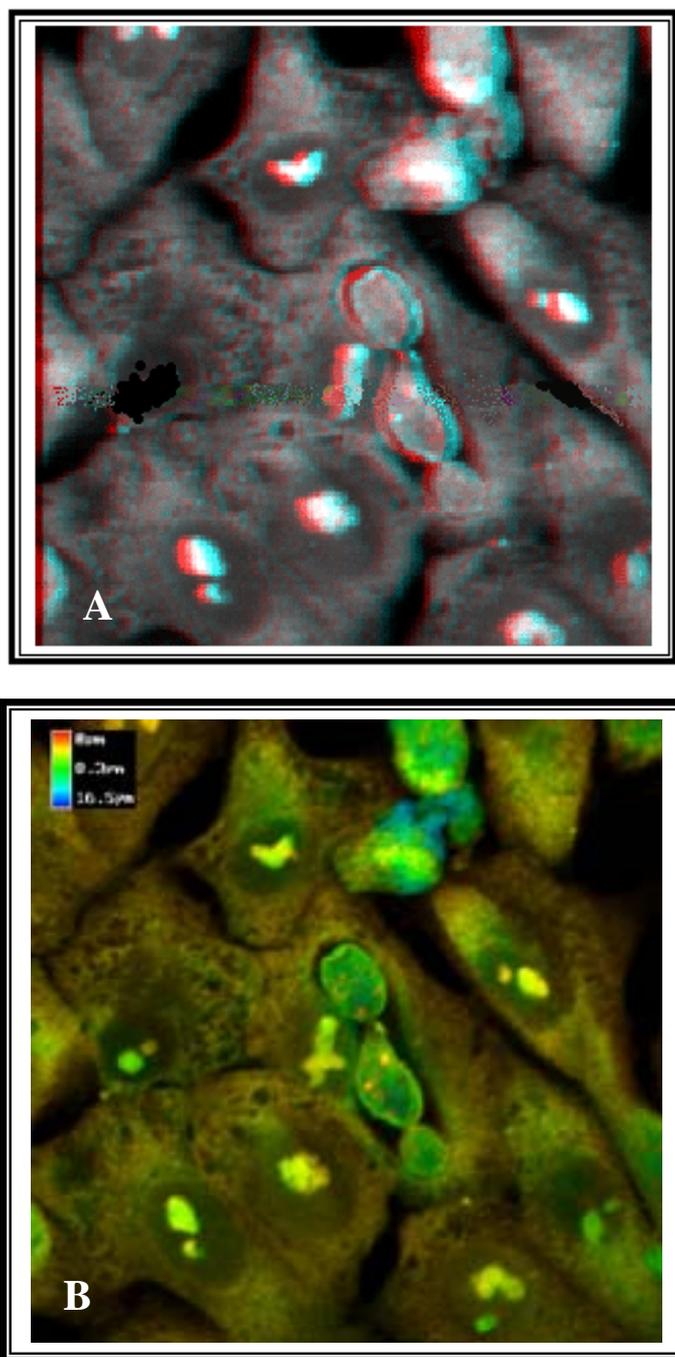


Figura 7 - Invasão da amostra 18 de *P.brasiliensis* às células Vero após cinco horas de infecção analisada por microscópio confocal a laser, demonstrando vacúolo e a multiplicação do fungo no citoplasma celular: (A) Imagem em 3D e (B) Código de cores.

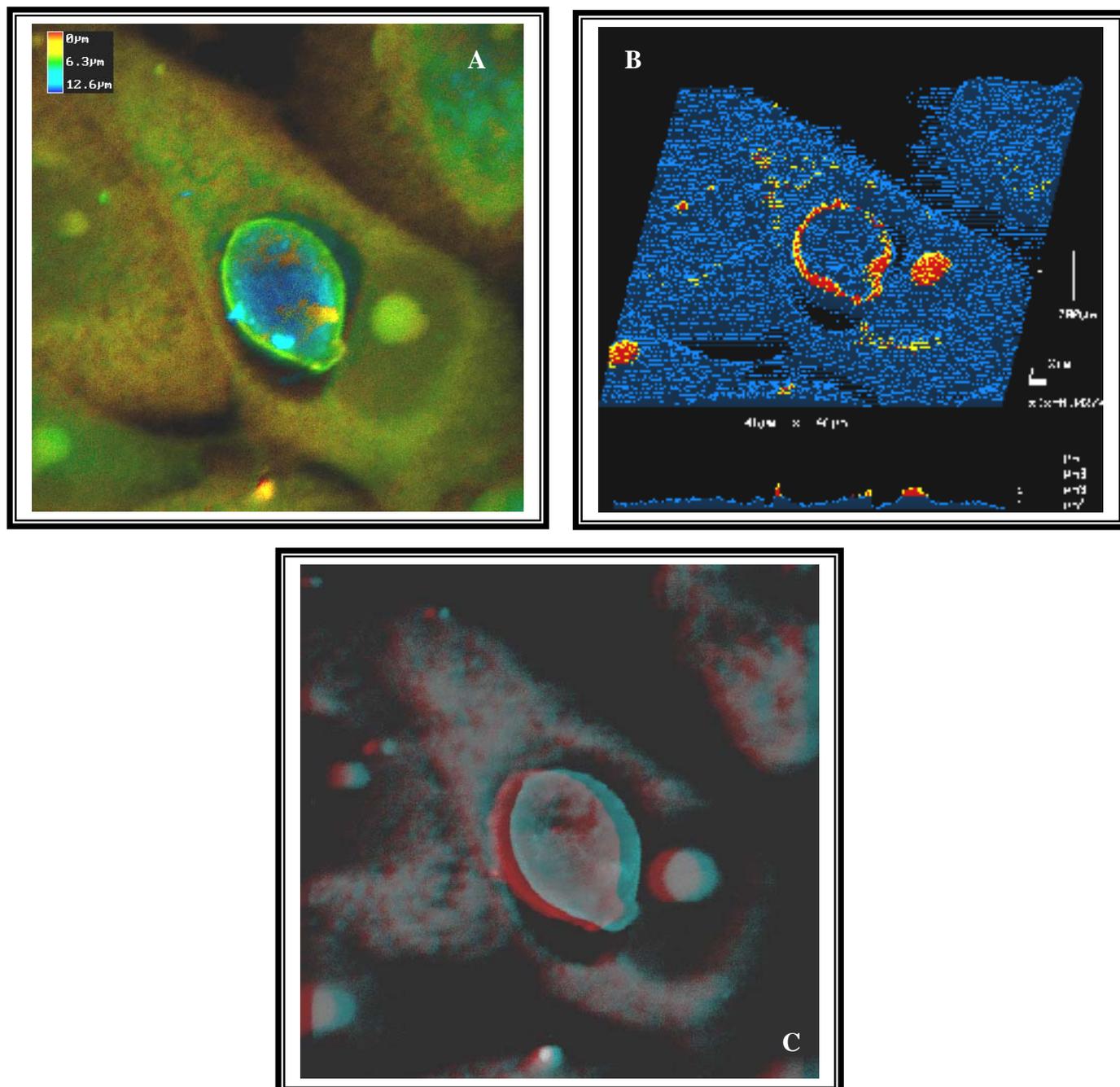


Figura 8 - *P. brasiliensis* (amostra 18) no citoplasma da célula Vero, após cinco horas de infecção, com aparente interação com a membrana nuclear, analisada por microscópio confocal a laser: (A) Código de cores, (B) histograma e (C) imagem 3D.

5.4. Avaliação da adesão de *P.brasiliensis* às células por Microscopia Eletrônica de Varredura

A adesão de *P.brasiliensis* às culturas celulares pode ser observada em maiores detalhes por esta metodologia. As fibrilas da parede fúngica foram bem evidenciadas, sugerindo a correta preservação do material durante a confecção da técnica.

Uma seqüência de eventos ocorrem após a interação fungo-célula. A *figura 9* demonstra *P.brasiliensis* aderido à célula Vero, através de estrutura semelhante a um tubo, sendo, provavelmente, um dos primeiros eventos da interação. Alterações da membrana da célula, no sítio de contato com o fungo foram verificadas, sugerindo a ação de substâncias citolíticas, como mecanismo que precede a internalização fúngica na célula, assim como alteração da membrana celular (*figura 10*). Após cinco horas de contato com as células a multiplicação fúngica ocorreu, como demonstrado na *figura 11*, onde a célula encontra-se altamente infectada por leveduras em diferentes fases do desenvolvimento. Nesta etapa de multiplicação fúngica, a célula apresentou-se com alterações evidentes e com a viabilidade comprometida, quando corada com azul de Tripan.



Figura 9 – Interação entre *P.brasiliensis* e células Vero após uma hora de contato, demonstrando a adesão através de estrutura semelhante a um tubo, analisada por microscopia eletrônica de varredura (960x).



Figura 10 – Interação entre *P.brasiliensis* e células Vero após três horas de contato, demonstrando a levedura parcialmente internalizada, ilustrada por microscopia eletrônica de varredura (850x).

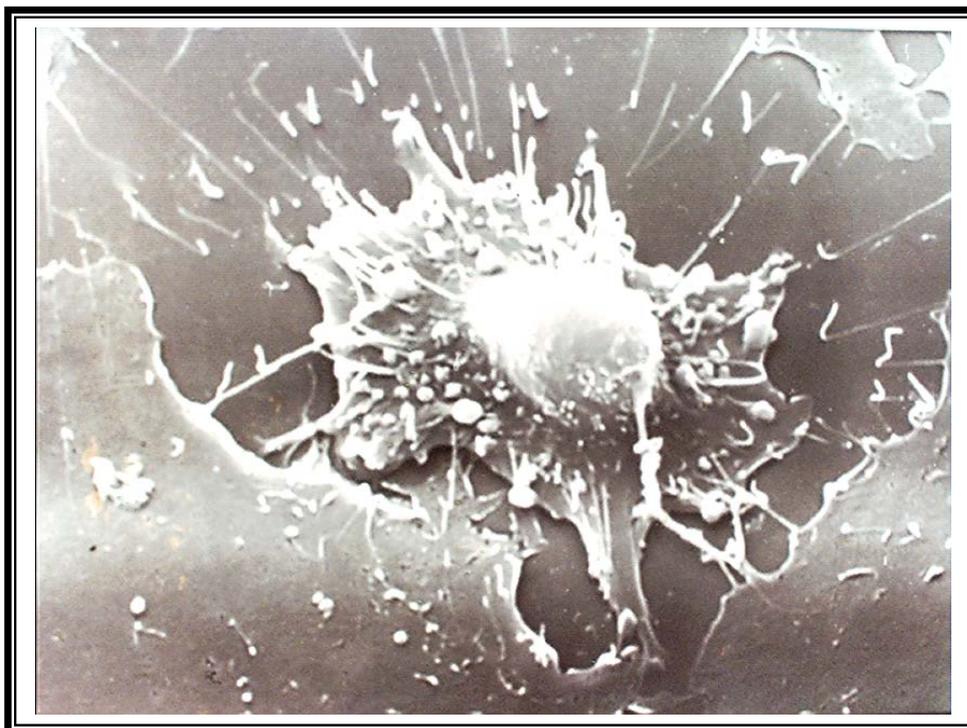


Figura 11 – Interação entre *P.brasiliensis* e células Vero após cinco horas de contato, demonstrando leveduras em estágios diferentes de desenvolvimento, assim como um comprometimento na forma celular, demonstradas por microscopia eletrônica de varredura (424x).

5.5. Interação de *P.brasiliensis* com as células epiteliais e componentes da matriz extracelular (MEC)

5.5.1. Reação de imunoperoxidase “in situ”

Esta técnica foi empregada em ensaios com células infectadas por três horas com *P.brasiliensis*. Pode ser demonstrado o padrão de marcação e a localização de antígenos superficiais fúngicos, assim como de componentes da MEC, durante a interação fungo-célula. Os soros anti-“cell-free” amostra 18 e anti-gp 43 reagiram de maneira específica com as leveduras, marcando a parede de forma contínua e mais acentuada nos

contatos focais com as células, demonstrando a presença de antígenos superficiais fúngicos na cinética de interação com as células (*figura 12*).

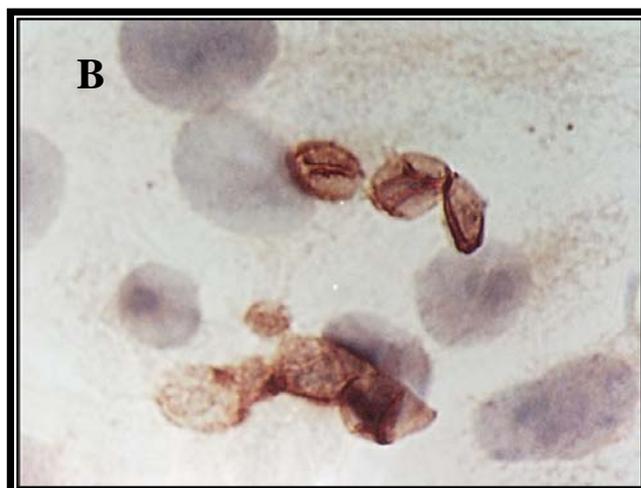


Figura 12 – Padrão de reconhecimento da amostra 18 de *P.brasiliensis* e células Vero após três horas de contato, revelados por imunoperoxidase (100x): (A) soro anti- “cell-free” diluído a 1:100 e (B) Soro anti-gp 43 diluído a 1:50.

O padrão de reconhecimento das células epiteliais frente ao soro anti-fibronectina foi diferenciado. Em campos onde não havia elementos fúngicos, apareceu um padrão filamentososo de fibronectina (*figura 13A*), porém, nos sítios de contato fungo-célula observou-se com um padrão difuso no citoplasma das células e algumas vezes em regiões de projeções das vilosidades das membranas celulares. Com relação ao fungo, foi evidenciada uma marcação ao longo de toda a parede, sendo mais forte em um ou mais pontos específicos (*figura 13B*).

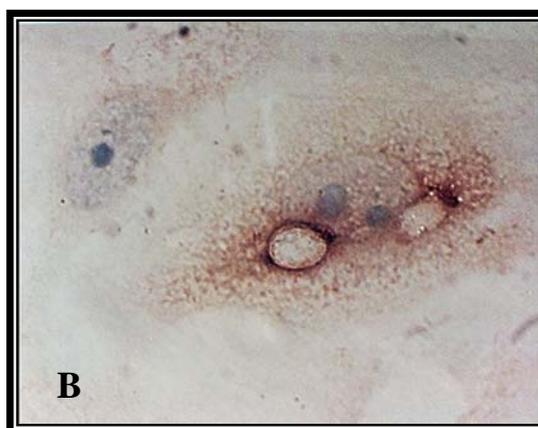
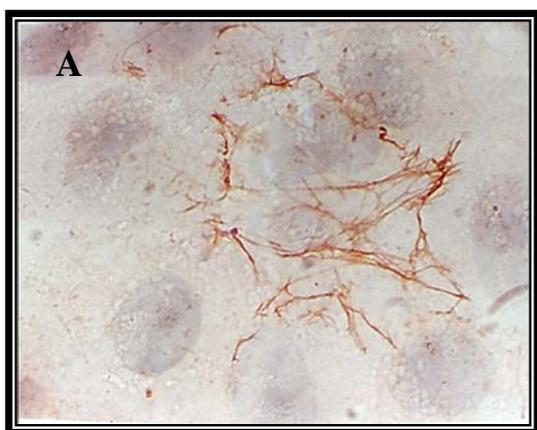


Figura 13 – Padrão de reconhecimento da amostra 18 de *P.brasiliensis* e células Vero, após três horas de contato, pelo soro anti-fibronectina a 1:100, revelado por imunoperoxidase (100x): (A) Células Vero, (B) células Vero infectadas por *P.brasiliensis*.

A marcação do tapete celular infectado com o anticorpo anti-colágeno tipo I, revelou um padrão fraco e puntiforme nas células e forte marcação na parede fúngica, semelhante ao padrão de marcação do fungo com soro anti-*P.brasiliensis*, assim como nas áreas de contato com a célula (figura 14).

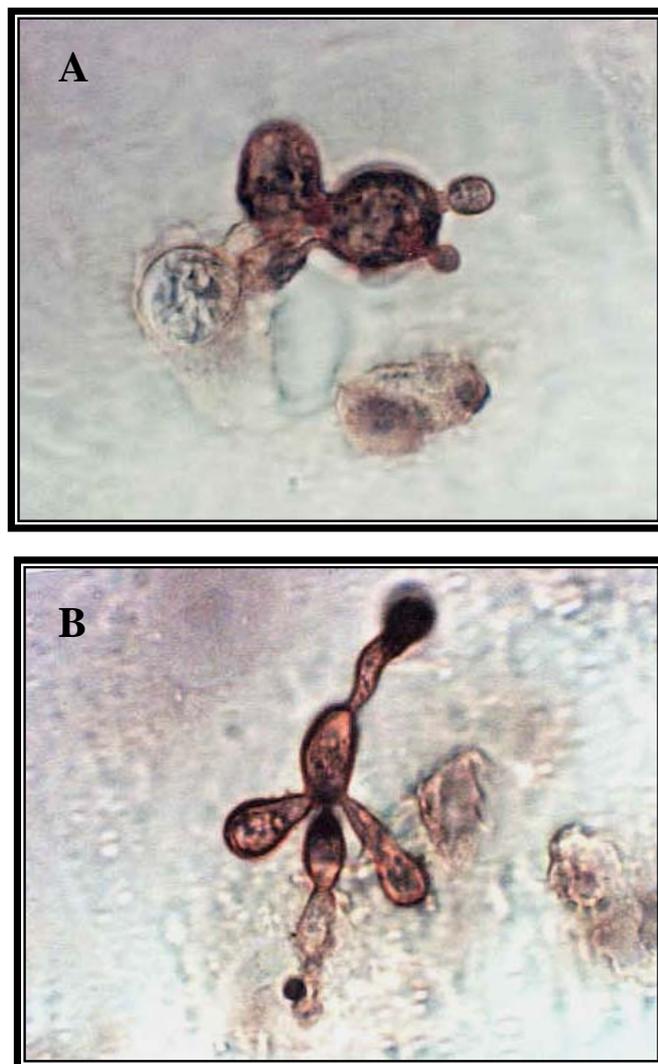


Figura 14 – Padrão de reconhecimento da amostra 18 de *P.brasiliensis* e das células após três horas de exposição ao fungo, pelo soro anti-colágeno tipo I, diluído a 1:50, revelado por imunoperoxidase: (A) células A₅₄₉ (100x) e (B) células Vero (100x).

5.5.2. Reação de imunofluorescência indireta

O padrão de laminina, principal componente da membrana basal, foi avaliado tanto na célula fúngica como nas culturas celulares. Os resultados demonstraram que *P.brasiliensis* é capaz de ligar-se à laminina. Pela técnica de imunofluorescência em microscopia confocal a laser (*figura 15*), pontos específicos de marcação foram observados, ou seja, alguns componentes fúngicos reconheceram o soro anti-laminina, sendo mais evidente nas células brotantes.

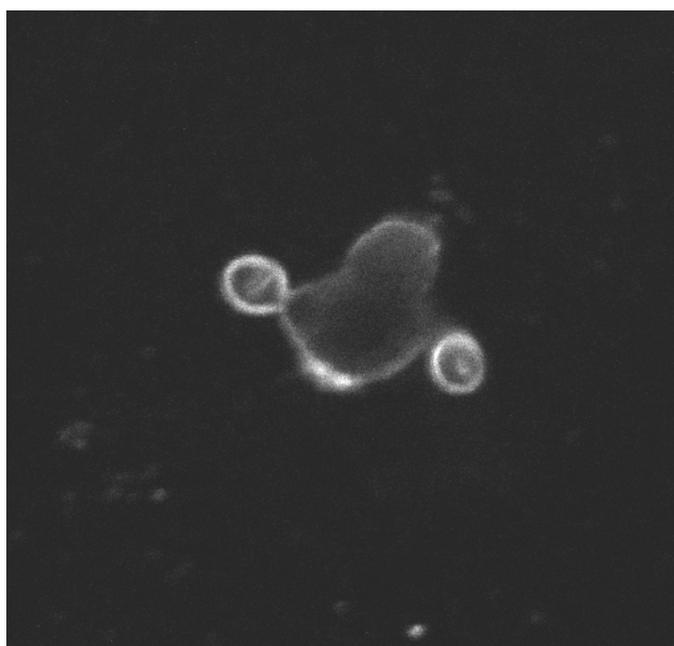


Figura 15 – Padrão de reconhecimento da amostra 18 de *P.brasiliensis* frente ao soro anti-laminina diluído a 1:25, revelado por imunofluorescência indireta e analisado por microscopia confocal a laser.

Imunofluorescência indireta em imagens de microscopia óptica, evidenciaram o padrão de laminina nas células Vero e A₅₄₉, distribuído de forma não uniforme e difusa, assim como a marcação ao redor da área de contato fungo-célula (*figuras 16 e 17*). Uma marcação mais evidenciada da laminina foi observada em campos só com células, assim como a demonstração de um padrão misto entre forma difusa e filamentosa (*figuras 16B e 17B*). Em campos apresentando células infectadas, foi observada a marcação intensa no fungo e nos contatos focais com a célula (*figuras 16A e 17A*).

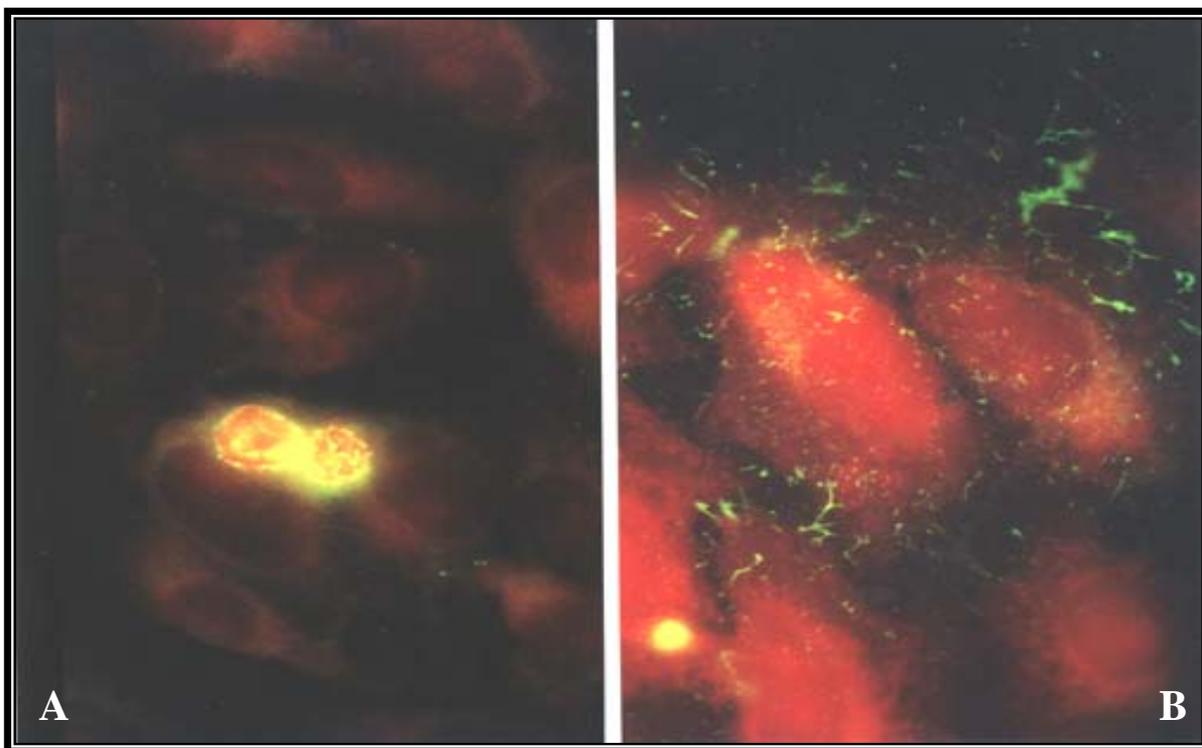


Figura 16 – Padrão de reconhecimento da amostra 18 de *P.brasiliensis* e das células Vero, em tapete infectado por duas horas, frente ao soro anti-laminina a 1:25, revelado por imunofluorescência em microscópio óptico (100x): (A) marcação acentuada na área de contato célula-fungo e (B) campo sem leveduras demonstrando o padrão de laminina nas células.

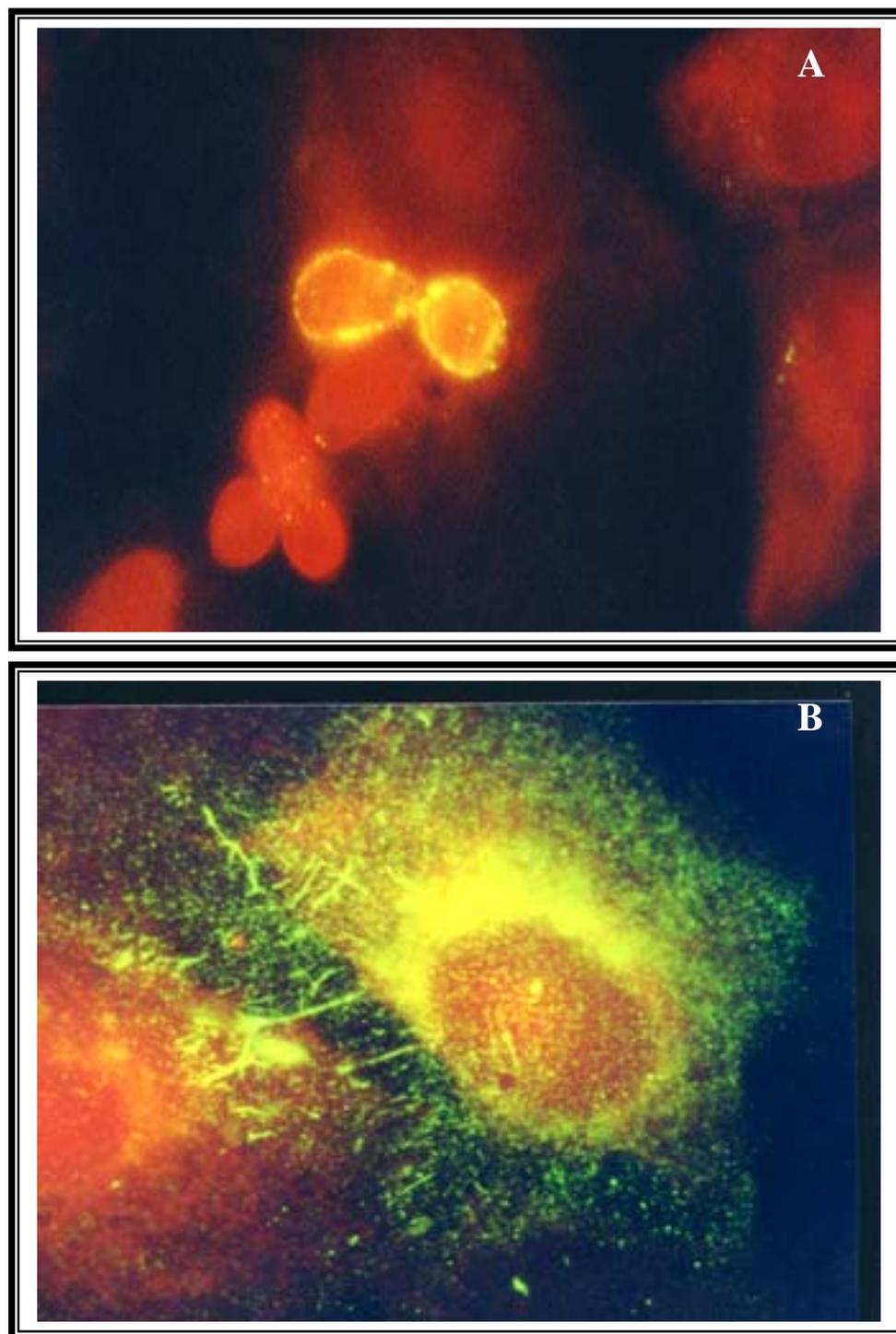


Figura 17 – Padrão de reconhecimento da amostra 18 de *P.brasiliensis* e das células A₅₄₉, frente ao soro anti-laminina diluído a 1:25, revelado por imunofluorescência indireta em microscópio óptico (100x): (A) células infectadas por duas horas, demonstrando marcação do soro em pontos distribuídos na parede fúngica na área de contato com as células e (B) padrão de laminina em células não infectadas.

A localização e o padrão da fibronectina nas células leveduriformes de *P.brasiliensis*, assim como no tapete celular infectado foi observado por imunofluorescência indireta. Componentes de *P.brasiliensis* foram capazes de reconhecer o anticorpo e um padrão granular e em pontos específicos ao longo da parede foi evidenciado em imagem de microscopia confocal a laser de imunofluorescência indireta (figura 18).

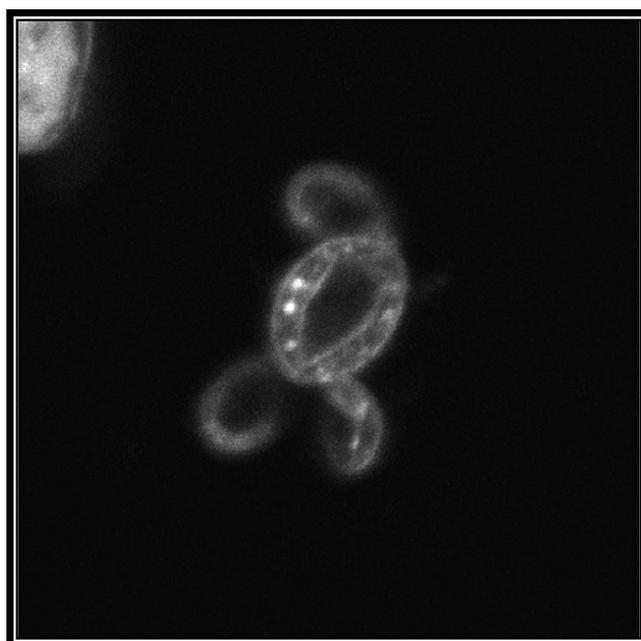


Figura 18 – Padrão de reconhecimento da amostra 18 de *P.brasiliensis* frente ao soro anti-fibronectina a 1:50, revelado por imunofluorescência em microscópio confocal a laser.

A reação com o anticorpo anti-fibronectina nas células infectadas por *P.brasiliensis*, demonstrou a presença marcante da fibronectina durante a interação fungo-célula e um padrão filamentoso e difuso nas células, assim como no fungo foram mais evidenciados nos sítios focais de contato (figuras 19, 20 e 21).

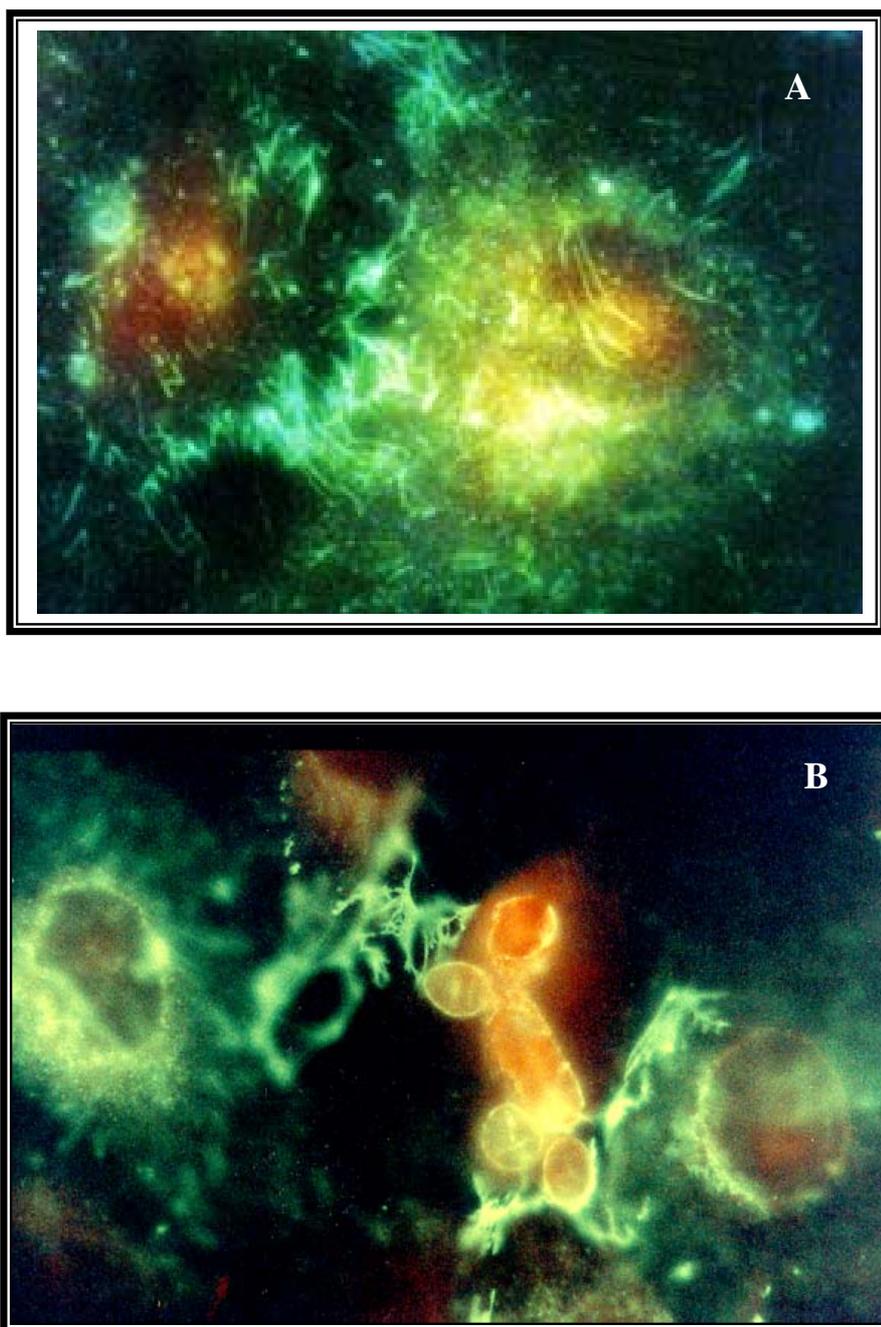


Figura 19 – Padrão de reconhecimento da amostra 18 de *P.brasiliensis* e das células Vero infectadas, frente ao soro anti-fibronectina a 1:50, revelado por imunofluorescência indireta em microscópio óptico (100x): (A) Marcação nas células Vero e (B) padrão da fibronectina após duas horas de exposição *P.brasiliensis*-células.

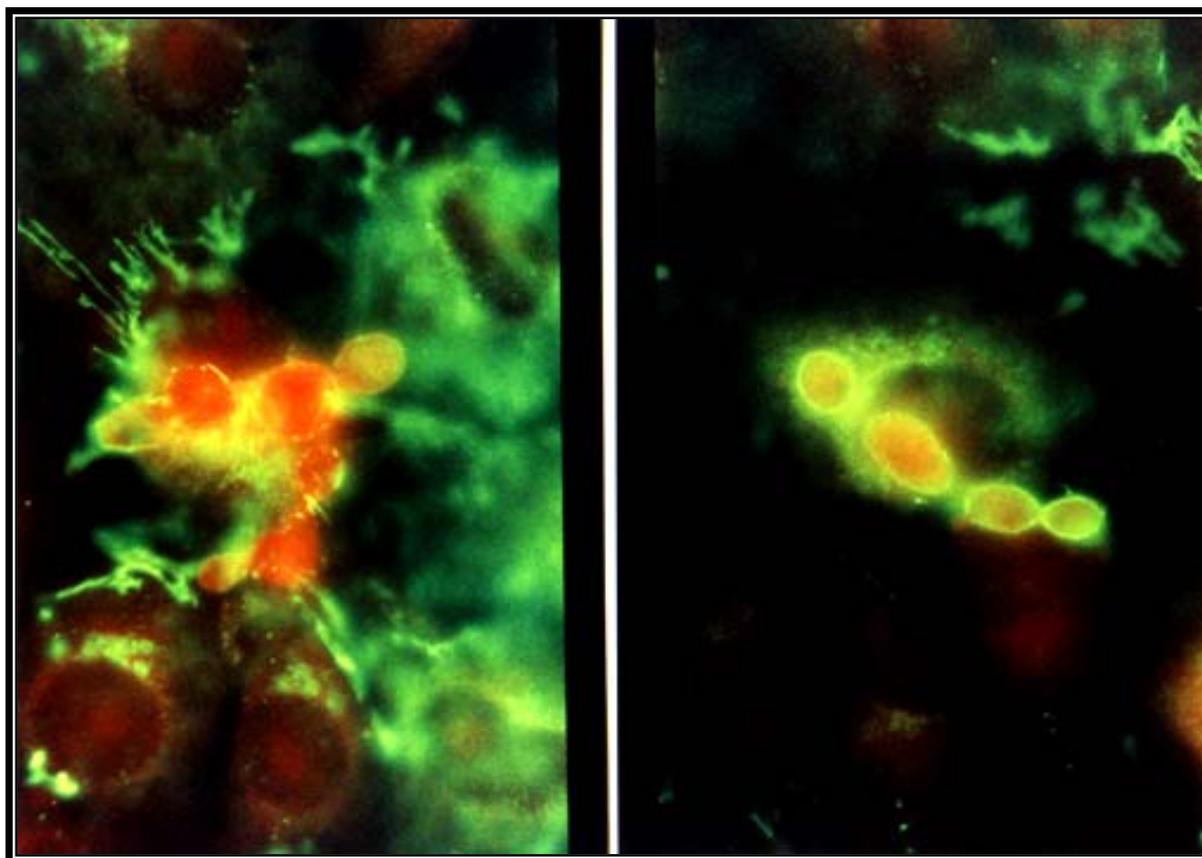


Figura 20 – Padrão de reconhecimento da amostra 18 de *P.brasiliensis* e das células Vero, após três horas de contato, frente ao soro anti-fibronectina a 1:50, revelado por imunofluorescência indireta em microscópio óptico (100x).

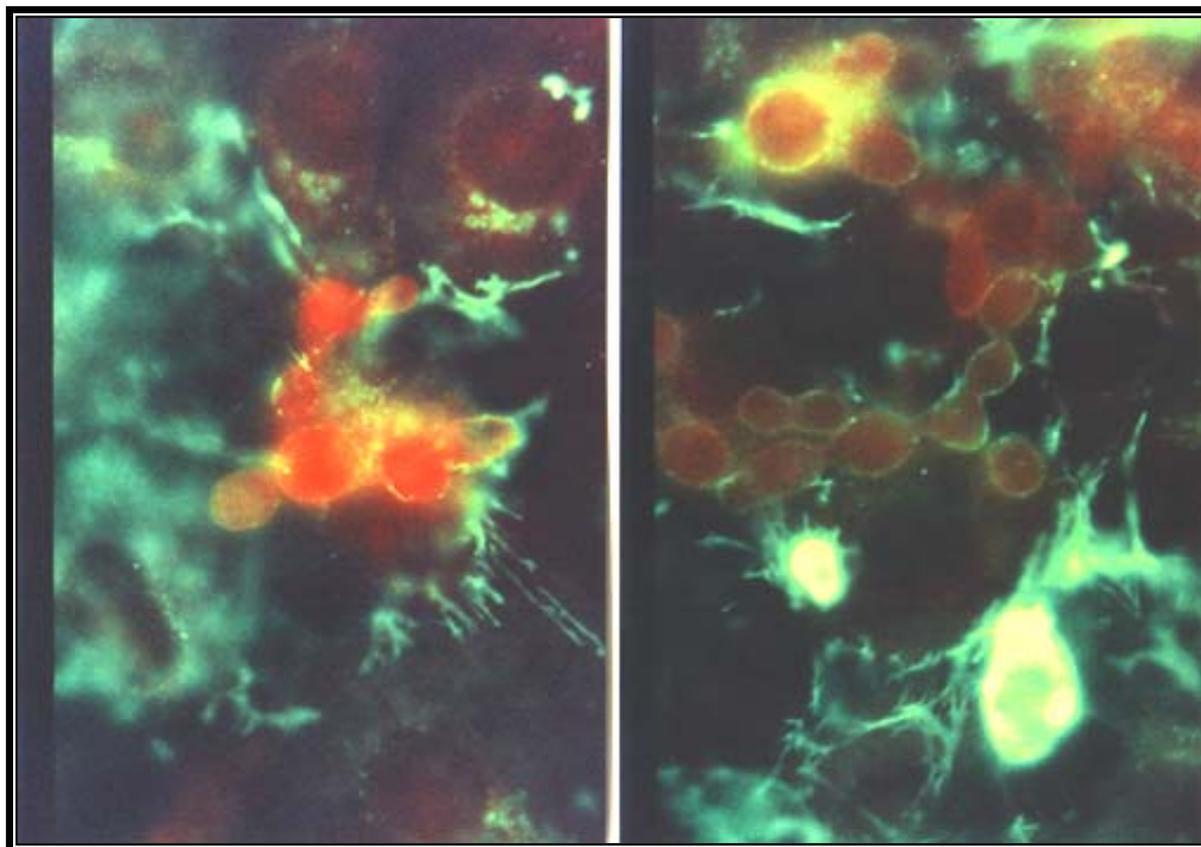


Figura 21 – Padrão de reconhecimento de *P.brasiliensis*, amostra 18, e células A₅₄₉, frente ao soro anti-fibronectina a 1:50, após duas horas de contato, revelado por imunofluorescência indireta em microscópio óptico (100x).

5.6. Envolvimento do citoesqueleto na invasão de *P.brasiliensis* às células epiteliais

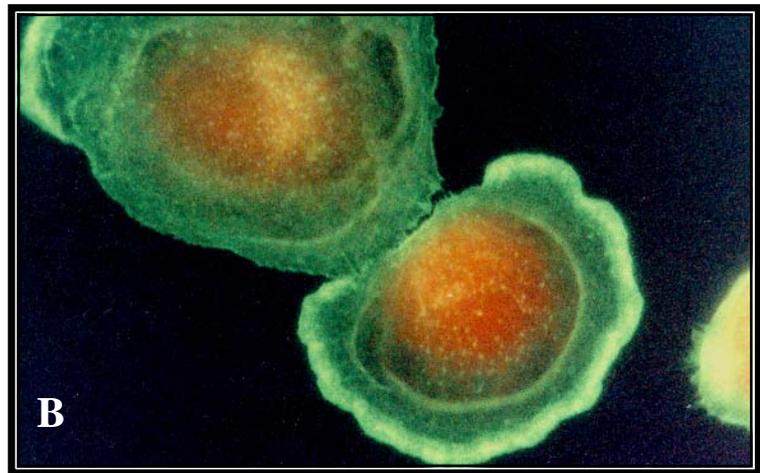
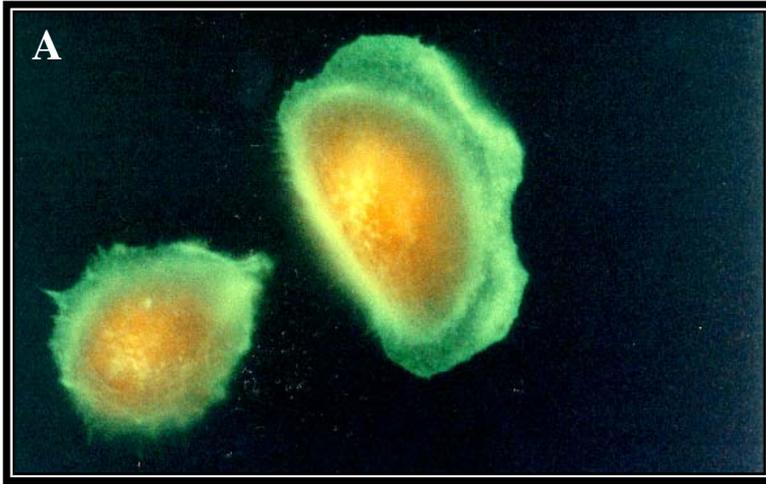
5.6.1. Microfilamentos de actina

5.6.1.1. Dinâmica dos microfilamentos de actina de células Vero durante o cultivo

Foi estudada a estrutura dos filamentos de actina das células Vero durante a formação da monocamada celular. A cinética do desenvolvimento demonstrou uma polimerização progressiva dos monômeros de actina, de formas difusas até as formas filamentosas com padrões característicos.

Células globulares de tamanho pequeno aderiram ao substrato (lamínula) mostrando expansões periféricas. Após uma hora de cultivo, a actina concentrou-se na membrana como um anel compactado, com aparência descontínua, ocasionalmente, devido a diferenças na intensidade ao redor da célula (*figura 22 A e B*). No período de três horas, a actina foi identificada no citoplasma, mostrando uma reação positiva com vários níveis de intensidade e um aspecto difuso (*figura 22 C*).

Após oito horas de incubação, foi observada uma maior área de contato das células com a lamínula, tornando-se maiores, conseqüentemente o anel actínico tornou-se mais centralizado e menos intenso enquanto que as bordas das células tornaram-se irregulares (*figura 22 D*). As células, após 24h de incubação, já se apresentavam poligonais sem anel actínico, alongadas, com diâmetros iguais e aproximadamente 95% das células, mostraram uma polimerização intensa de actina, ou seja, as fibras em rede. Com esse tempo de cultura, as células já se encontravam em estágio de sub-confluência, isto é, ligadas uma as outras através das fibras actínicas (*figura 22 E*). Após 48h, as células estavam em estágio de confluência e a monocamada formada, sendo que a maioria das células apresentava intenso feixe de actina nas áreas de contato com as células vizinhas (*figura 22 F*).



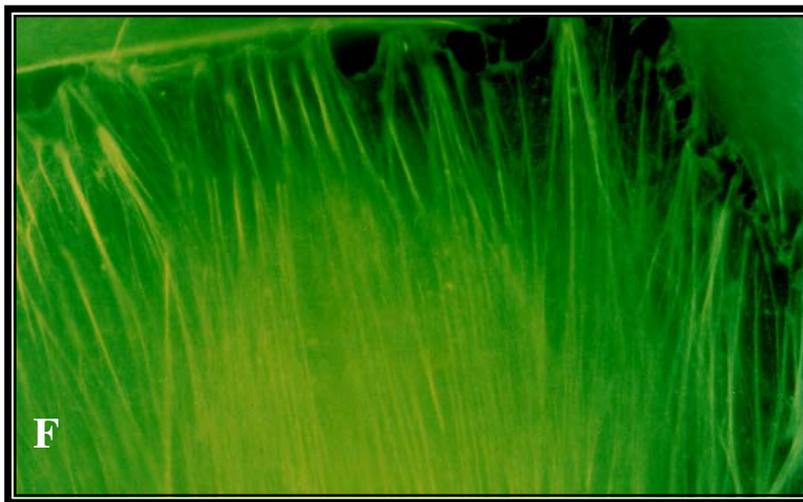
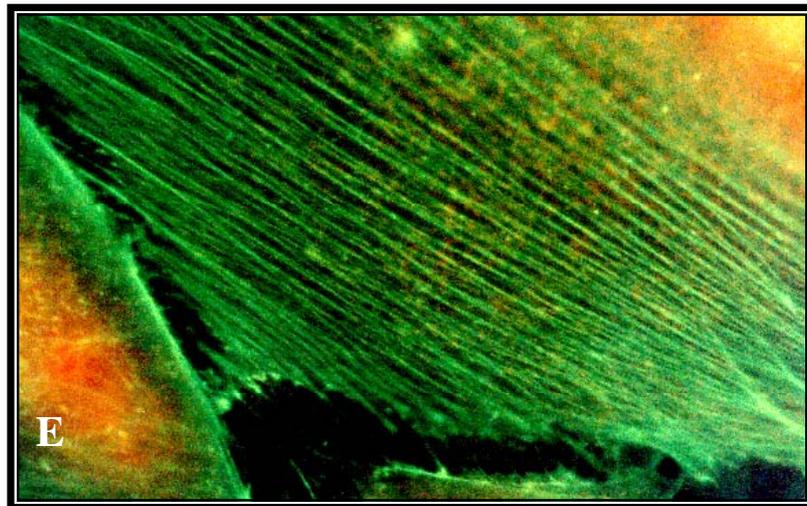
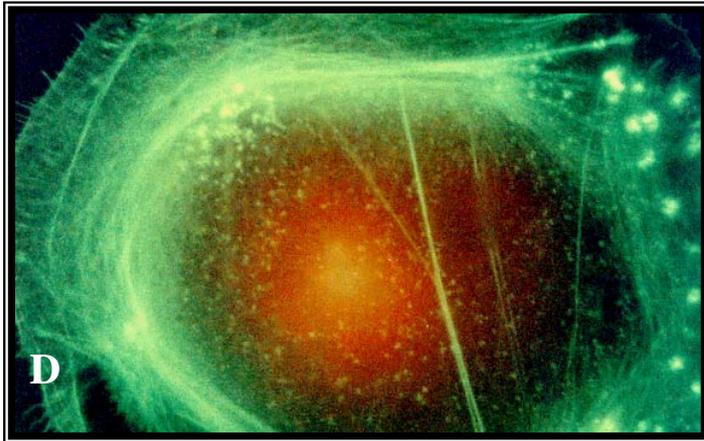


Figura 22 - Cinética do desenvolvimento dos microfilamentos de actina de células Vero cultivadas em diferentes períodos de tempo, marcadas com faloidina-FITC e analisadas por microscopia óptica (100x): (A e B) uma hora, (C) três horas, (D) oito horas, (E) 24h e (F) após 48h.

5.6.1.2. Dinâmica dos microfilamentos de actina de *P.brasiliensis* na interação com as células

Imunofluorescência indireta foi realizada com soro anti-actina, para a observação dos filamentos de actina de *P.brasiliensis*, durante a interação com a célula. Alteração no citoesqueleto da actina fúngico e celular foi demonstrada durante a interação. Nos eventos iniciais, ou seja, na adesão, o citoesqueleto de actina do fungo apresentou-se de maneira difusa por toda a extensão da parede, com uma marcação suave, após uma hora de infecção de *P.brasiliensis* nas células (figura 23 A). Em tempos maiores de incubação, ocorreu uma modificação deste padrão de organização, onde com três horas de contato com as células A₅₄₉ foi observada uma marcação mais intensa em alguns pontos no fungo, próximo dos contatos focais com a célula, sugerindo uma reorganização da forma antes difusa, para a polimerizada (figura 23 B).

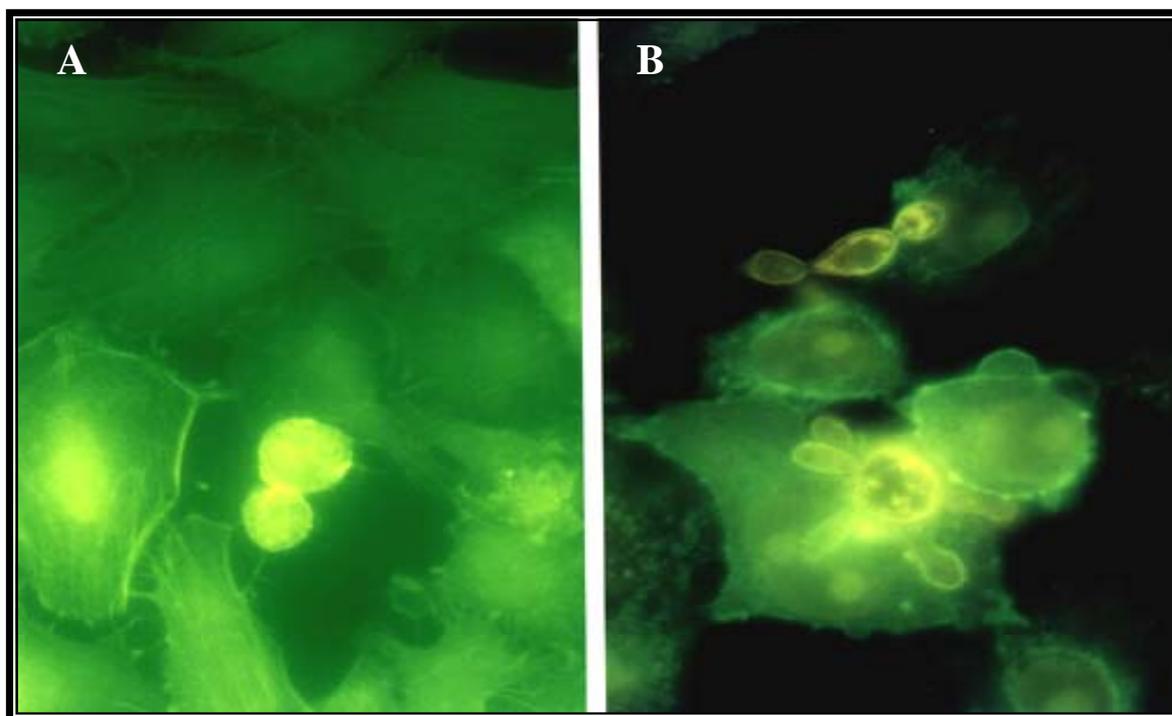


Figura 23 – Células A₅₄₉ e *P.brasiliensis*, avaliados por imunofluorescência indireta, frente ao soro anti-actina, demonstrando uma organização no citoesqueleto fúngico na interação com a célula, em microscopia óptica (100x): (A) após uma hora e (B) após três horas de incubação.

Uma concentração maior de actina celular, próximo da área de contato com o fungo foi observada, demonstrando um rearranjo do citoesqueleto, precedendo a interiorização fúngica (*figura 24*).

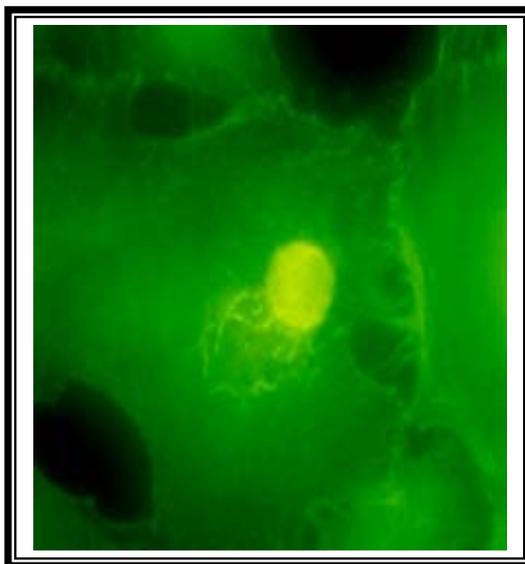


Figura 24 - Células A₅₄₉ e *P.brasiliensis*, avaliados por imunofluorescência indireta, frente ao soro anti-actina, demonstrando uma organização no citoesqueleto celular na área de contato com o fungo, após duas horas de incubação, em microscopia óptica (100x).

5.6.1.3. Microfilamentos de actina na invasão de *P.brasiliensis* às células Vero e A₅₄₉

5.6.1.3.1. Interação de *P.brasiliensis* com células tratadas com citocalasina D

O tratamento das células Vero com a citocalasina D, nas concentrações de 1 e 10 µg/mL, promoveram uma inibição na internalização de *P.brasiliensis*. Formas fúngicas não foram observadas no interior das células tratadas com esta droga. Este dado foi confirmado quando se utilizou uma marcação dupla que possibilitou a visualização do fungo. Na concentração de 1µg/mL, o citoesqueleto apresentou-se ainda organizado enquanto que a concentração de 10µg/mL, promoveu total desarranjo do

mesmo, sendo esta escolhida para os ensaios (*figura 25*). A citocalasina D não causou efeito significativo na viabilidade celular, quando foi empregado corante vital Azul de Tripan.

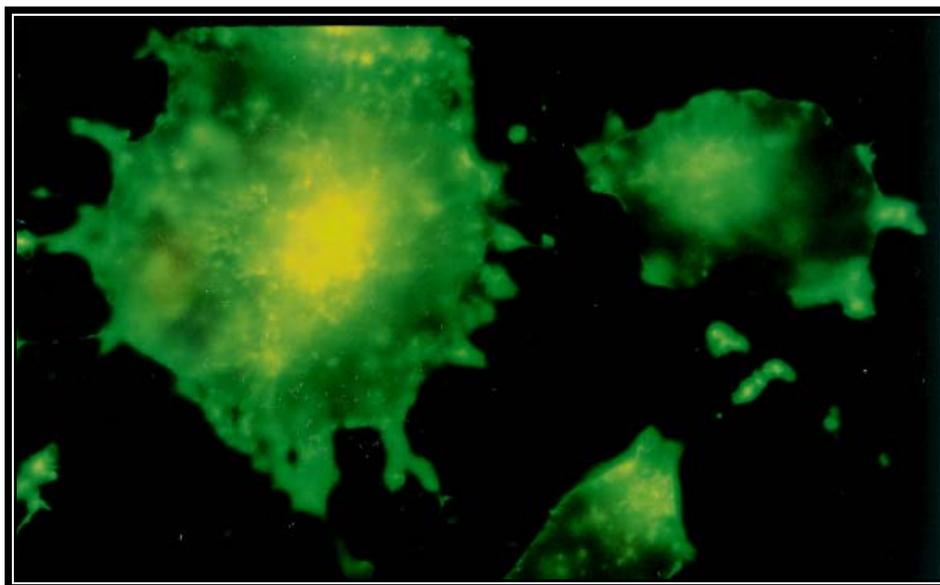


Figura 25 - Células Vero infectadas com *P.brasiliensis* por cinco horas, após sofrer tratamento com citocalasina D na concentração de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, reveladas por imunofluorescência indireta dupla, empregando-se como marcação primária o anti- “cell-free” de *P.brasiliensis* e a faloidina-FITC e anti-IgG TRITC como anticorpo secundário (100x).

5.6.1.3.2. Interação de *P.brasiliensis* com células sem tratamento prévio

Foi observado o envolvimento dos microfilamentos de actina na interação *P.brasiliensis*-células epiteliais. As *figuras 26,27 e 28* demonstram a levedura internalizada na célula, observando-se o fungo e a superfície celular em focos diferentes e o citoesqueleto sem rompimentos, aparentemente organizado de forma íntegra e de maneira semelhante à sua organização original, diferindo nas fibras actínicas mais curtas que as das células normais não infectadas. Maiores detalhes desta interação foram observados pelas

imagens de microscopia confocal a laser, como demonstrado nas *figuras 28 a 30*.

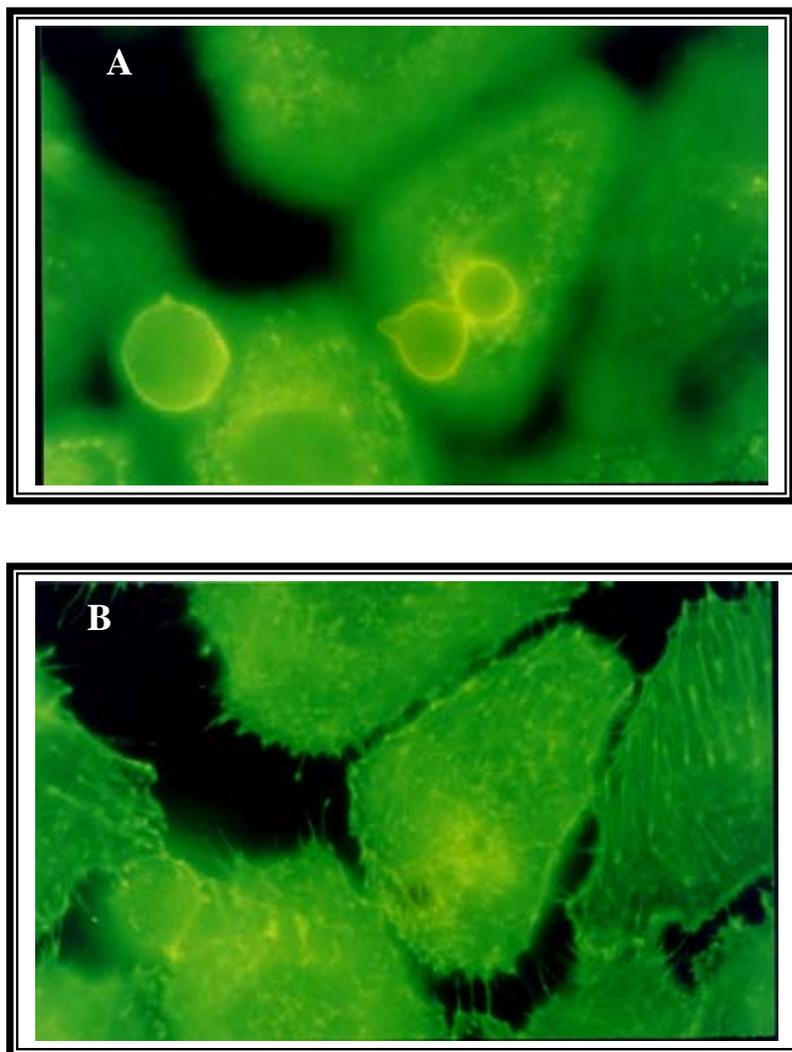


Figura 26 – Parasitismo intracelular de *P.brasiliensis* em células Vero durante o período de cinco horas, analisado por imunofluorescência indireta dupla, empregando-se como marcação primária o anti - “cell-free” de *P.brasiliensis* e a faloidina - FITC e como anticorpo secundário anti-IgG TRITC (100x): (A) foco no fungo, demonstrando alterações acentuadas na morfologia, durante a invasão celular e (B) foco nas células, demonstrando o citoesqueleto reorganizado.

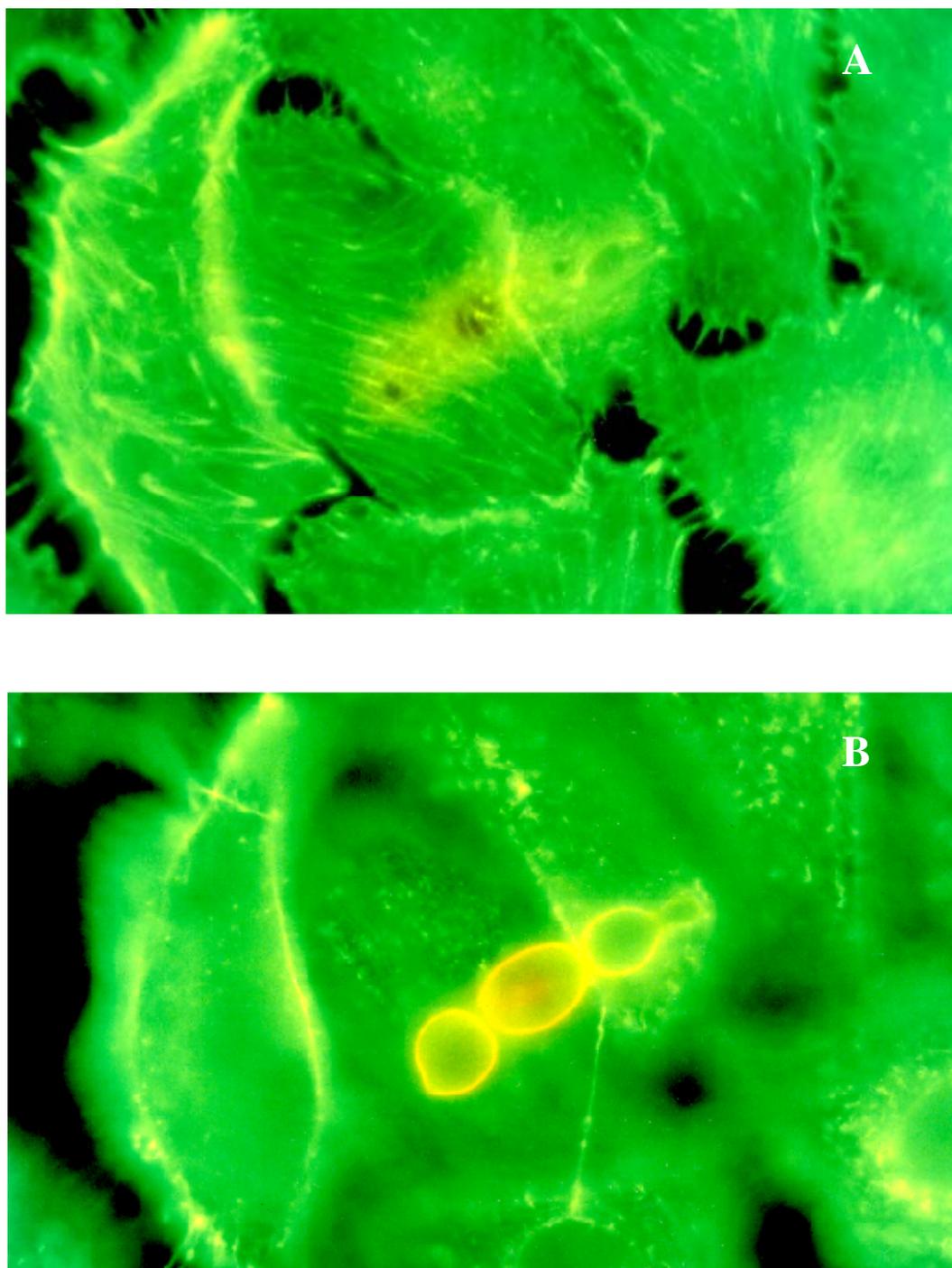


Figura 27 – Parasitismo intracelular de *P.brasiliensis* em células Vero durante o período de cinco horas, analisadas por imunofluorescência indireta dupla, empregando-se como marcação primária o anti- “cell-free” de *P.brasiliensis* e a faloidina- FITC e como anticorpo secundário anti-IgG TRITC (100x): (A) foco nas células e (B) foco no fungo.

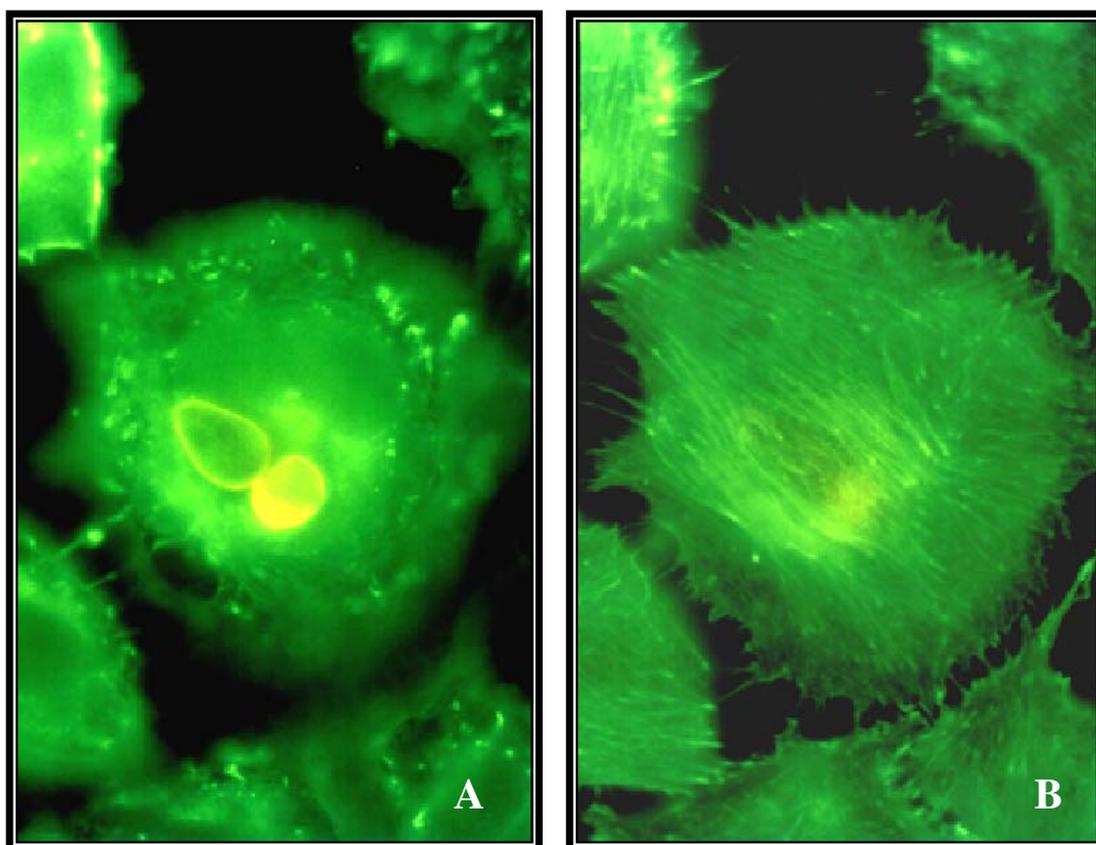


Figura 28 – Parasitismo intracelular de *P.brasiliensis* em células A₅₄₉ durante o período de três horas, analisadas por imunofluorescência indireta dupla, empregando-se como marcação primária o anti- “cell-free” de *P.brasiliensis* e a faloidina- FITC e como anticorpo secundário anti-IgG TRITC (100x): (A) foco no fungo, em íntimo contato com as estruturas internas da célula e (B) foco nas células, demonstrando o citoesqueleto reconstituído, após a invasão fúngica.

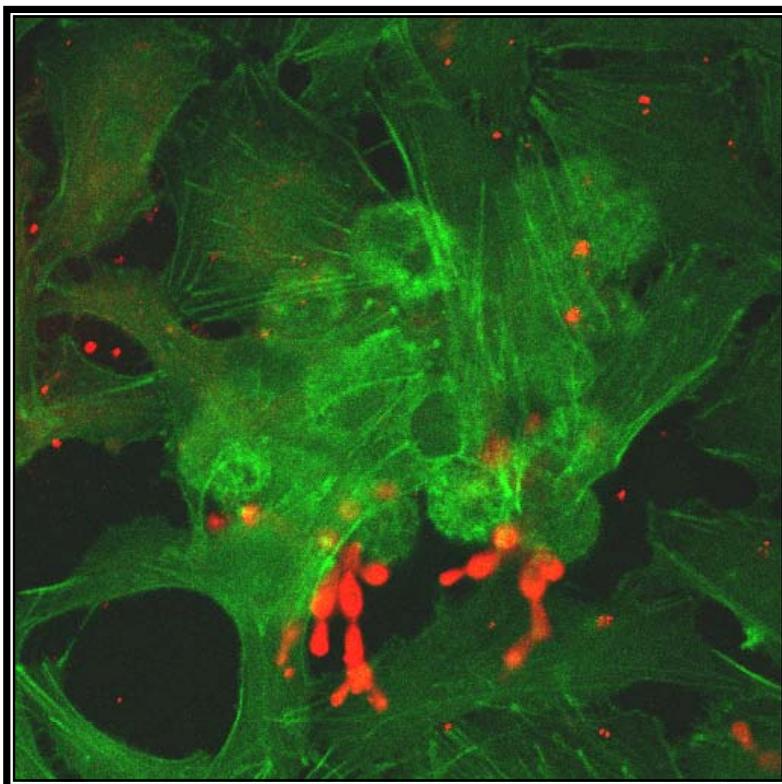


Figura 29 – Parasitismo intracelular de *P.brasiliensis* em células Vero durante o período de cinco horas, analisadas por imunofluorescência indireta dupla, empregando-se como marcação primária o anti “cell-free” de *P.brasiliensis* e faloidina- FITC e como anticorpo secundário anti-IgG TRITC, analisado por microscopia confocal a laser, demonstrando alterações no citoesqueleto de actina celular, assim como muitas leveduras interagindo com as células.

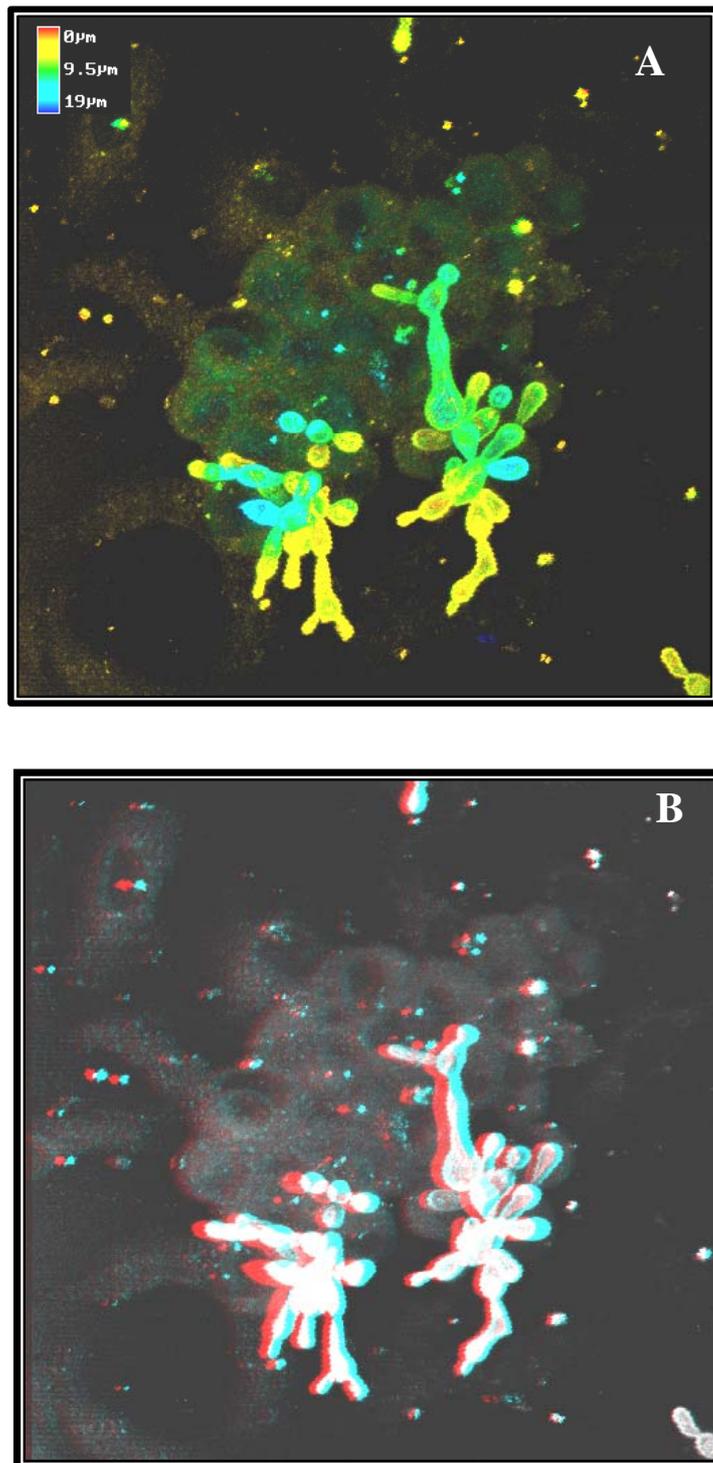


Figura 30 – Parasitismo intracelular de *P.brasiliensis* em células Vero, após cinco horas de contato, analisado por imunofluorescência indireta dupla, empregando-se como marcação primária o anti - “cell-free” de *P.brasiliensis* e faloidina-FITC e como anticorpo secundário anti-IgG TRITC, por microscopia confocal a laser: (A) código de cores e (B) imagem em 3D.

5.6.2. Microtúbulos na invasão de *P.brasiliensis* às células epiteliais Vero e A₅₄₉

5.6.2.1. Interação de *P.brasiliensis* com células tratadas com colchicina

Na *figura 31A*, pode-se observar a organização padrão dos microtúbulos a partir de um centrosomo, em células não tratadas (*figura 30 A*). Após o tratamento com colchicina, apareceram as alterações no conjunto dos microtúbulos das células, sem, no entanto, interferir na viabilidade, podendo ser demonstrada célula tratada em processo de divisão (*figura 31B*). O tratamento das células com esta droga reduziu de modo intenso a interiorização das leveduras às duas linhagens celulares utilizadas.

A *figura 32A* demonstra células não tratadas com a droga enquanto que a *figura 32B* mostra células tratadas com a colchicina e expostas às leveduras, ilustrando o conjunto de microtúbulos de maneira desorganizada com os monômeros de β tubulina espalhados pelo citoplasma e ausência de leveduras. As *figuras 32C* e *32D* ilustram células não tratadas com a droga e infectadas com *P.brasiliensis*, analisadas através de imunofluorescência indireta dupla.

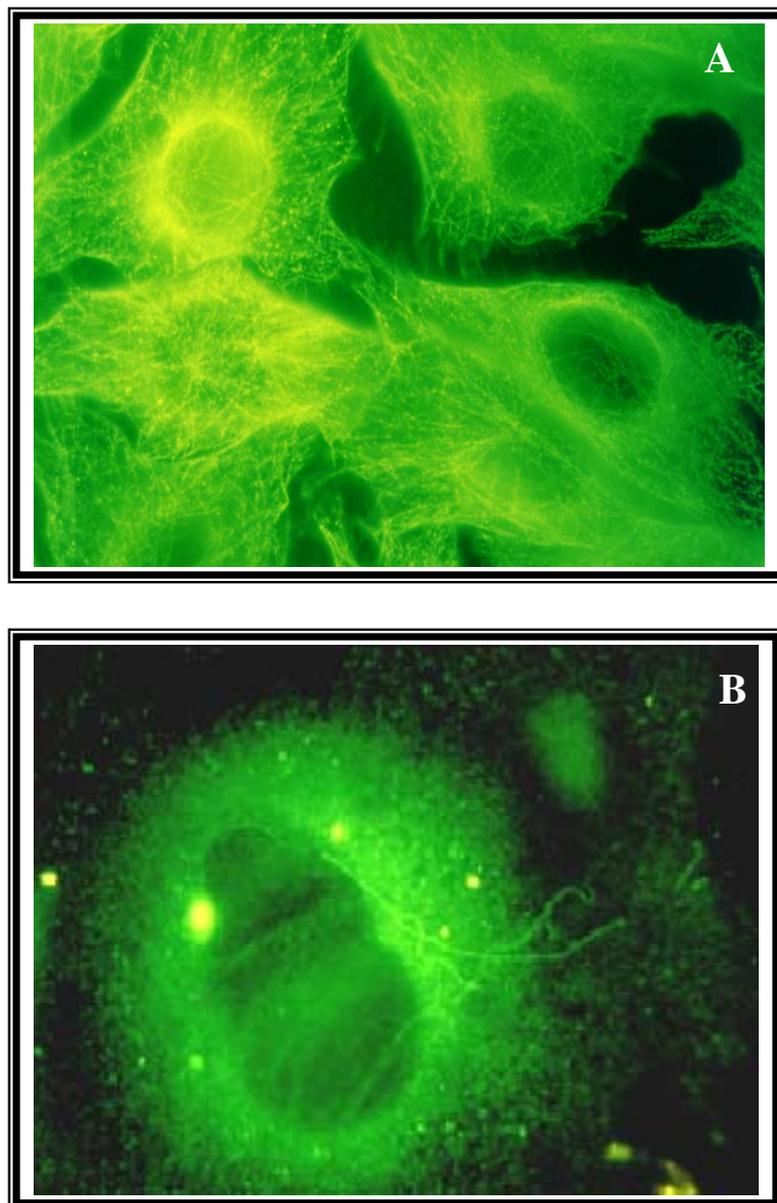


Figura 31 - Padrão de microtúbulos das células Vero, marcadas com anticorpo monoclonal anti- β tubulina e anti-IgG FITC em ensaio de imunofluorescência indireta analisada em microscopia óptica (100x). (A) células normais e (B) célula tratada com colchicina $10\mu\text{g}/\text{mL}$.

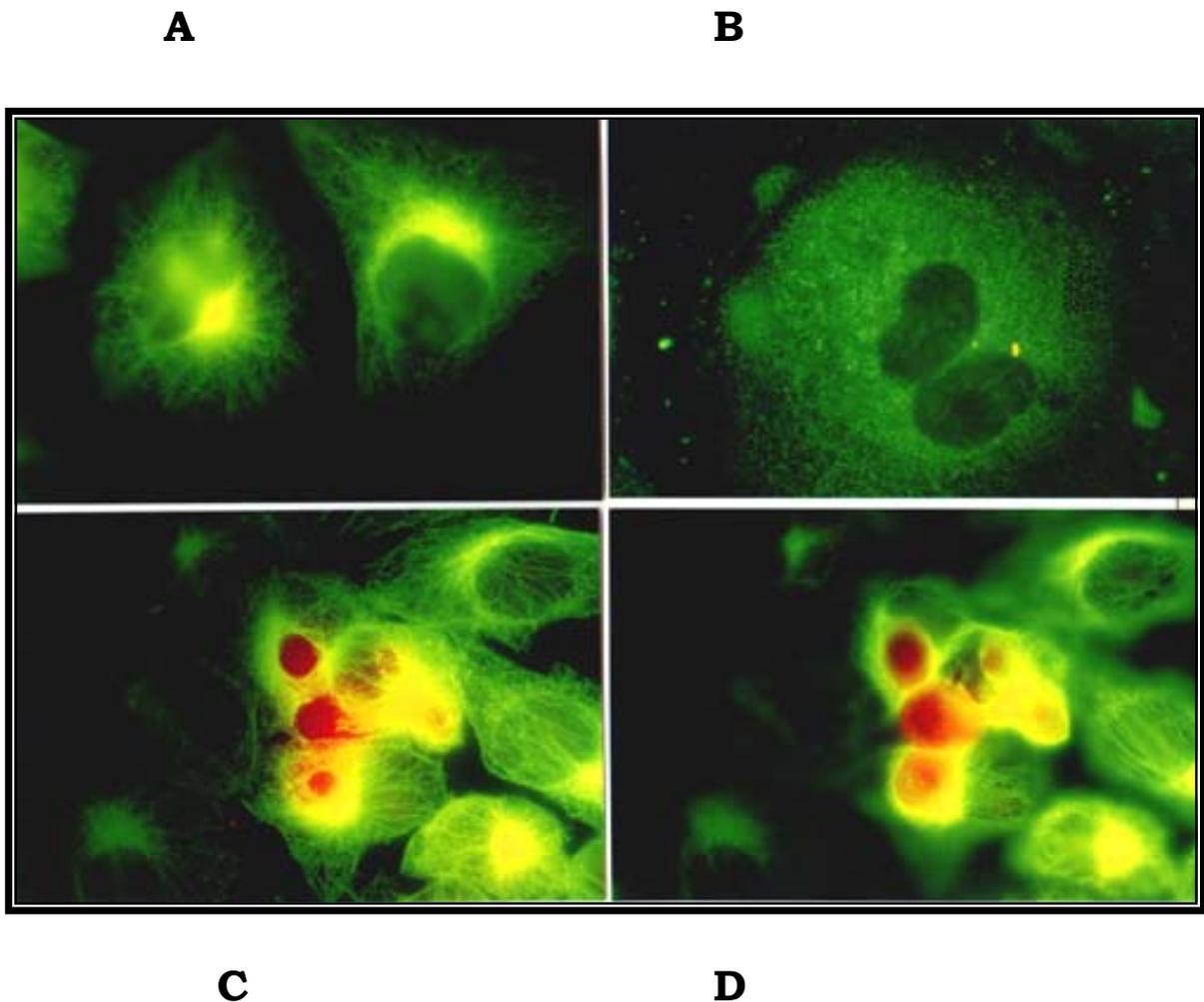


Figura 32 – Imunofluorescência indireta dupla em células A₅₄₉ após cinco horas de contato com *P.brasiliensis*, empregando-se como anticorpos primários anti-“cell-free” e anti- β tubulina e anti-IgG FITC e TRITC como anticorpos secundários, analisada através de microscopia óptica (100x): (A) controle de células não tratadas e não infectadas; (B) célula tratada com colchicina em processo de divisão (5 μ g/mL); (C) foco nas células não tratadas, pós infecção e (D) foco nos fungos, demonstrando íntimo contato com o conjunto de microtúbulos assim como multiplicação.

5.6.2.2. Interação de *P.brasiliensis* com células sem tratamento prévio

As células infectadas com *P.brasiliensis* e marcadas com soro anti- β tubulina demonstraram uma tendência de migração do fungo em direção ao centróssomo celular, através dos microtúbulos (*figuras 33 e 34*), indicando uma orientação intracitoplasmática da levedura pelos filamentos de tubulina.

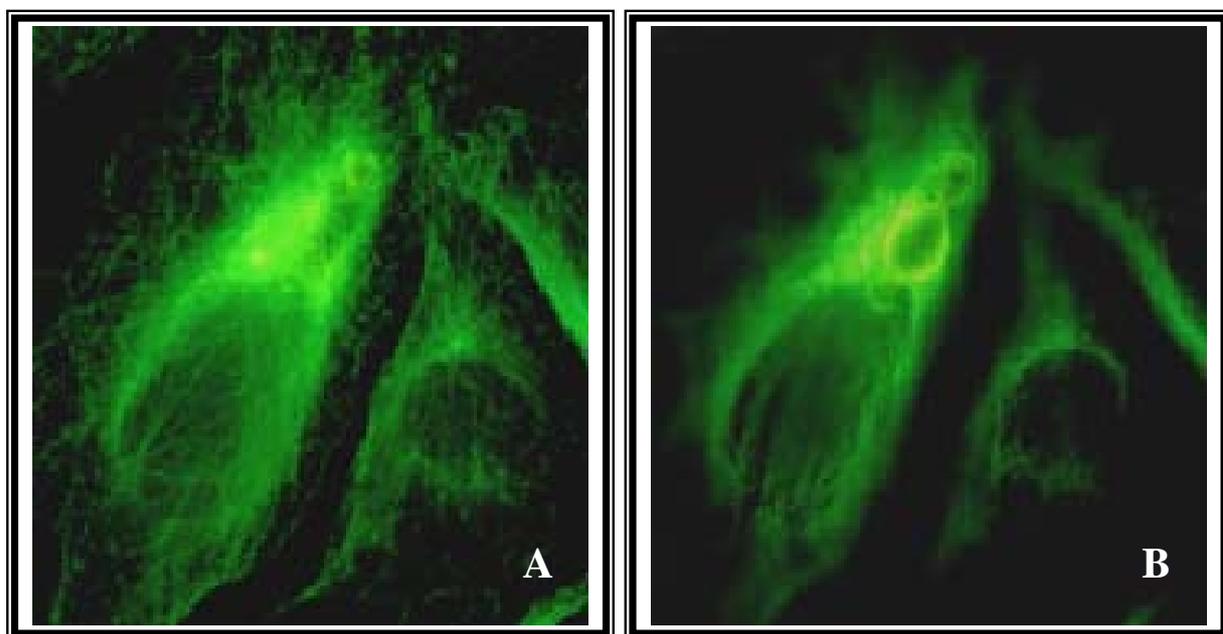


Figura 33 – Imunofluorescência indireta dupla em células Vero após cinco horas de contato com *P.brasiliensis*, empregando-se como anticorpos primários anti - “cell-free” e anti- β tubulina e como anticorpos secundários anti-IgG FITC e TRITC, analisada por microscopia óptica (100x): (A) célula infectada com foco nas células e (B) com foco no fungo, localizado próximo ao centróssomo celular.

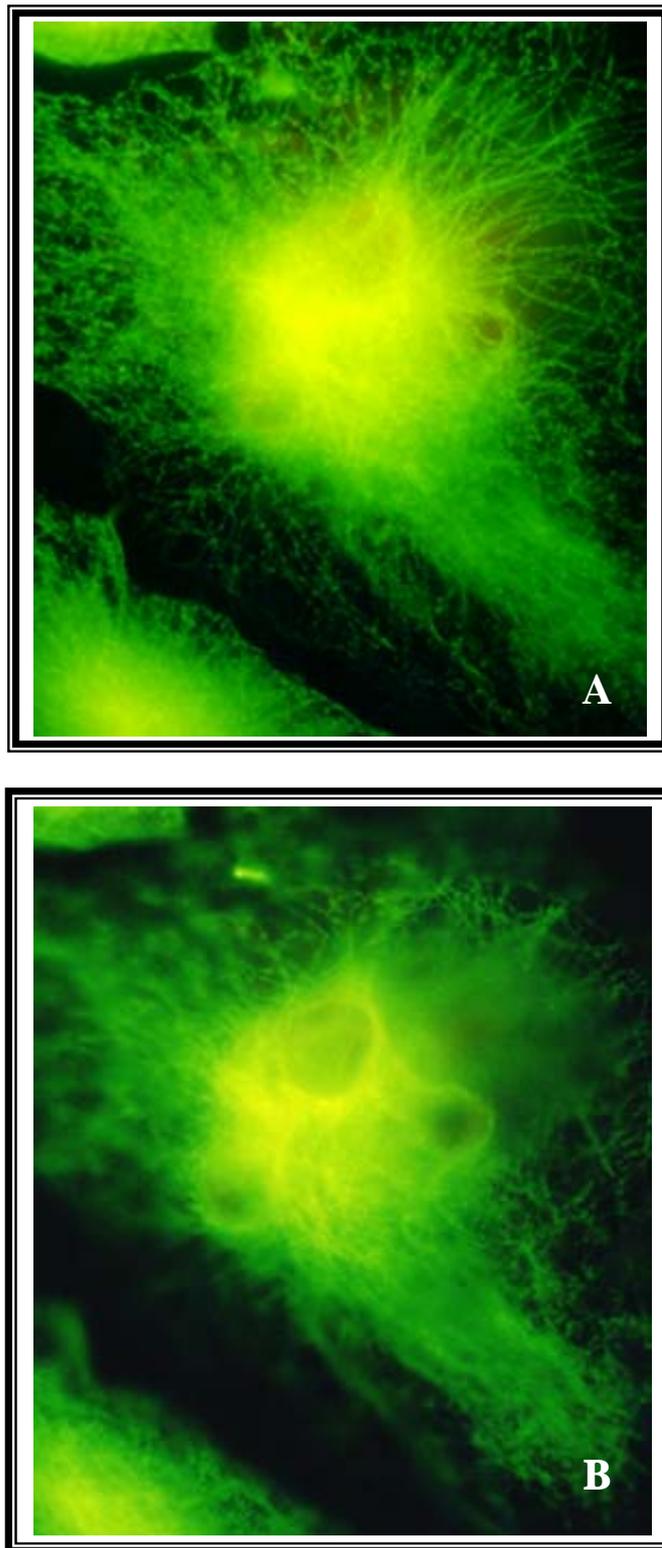


Figura 34 - Imunofluorescência indireta dupla em células Vero após cinco horas de contato com *P.brasiliensis*, empregando-se anti - “cell-free” e anti- β tubulina como anticorpos primários e anti-IgG TRITC e FITC como anticorpos secundários, por microscopia óptica (100x): (A) foco nas células e (B) foco nos fungos.

Maiores detalhes da complexa interação de *P.brasiliensis* com os microtúbulos foram observados pelas imagens obtidas em microscópio confocal a laser, demonstrando a posição do fungo no citoplasma associado aos polímeros de tubulina, assim como a confirmação da proximidade do fungo com o centrossomo celular, ilustrados nas *figuras 35, 36 e 37*.

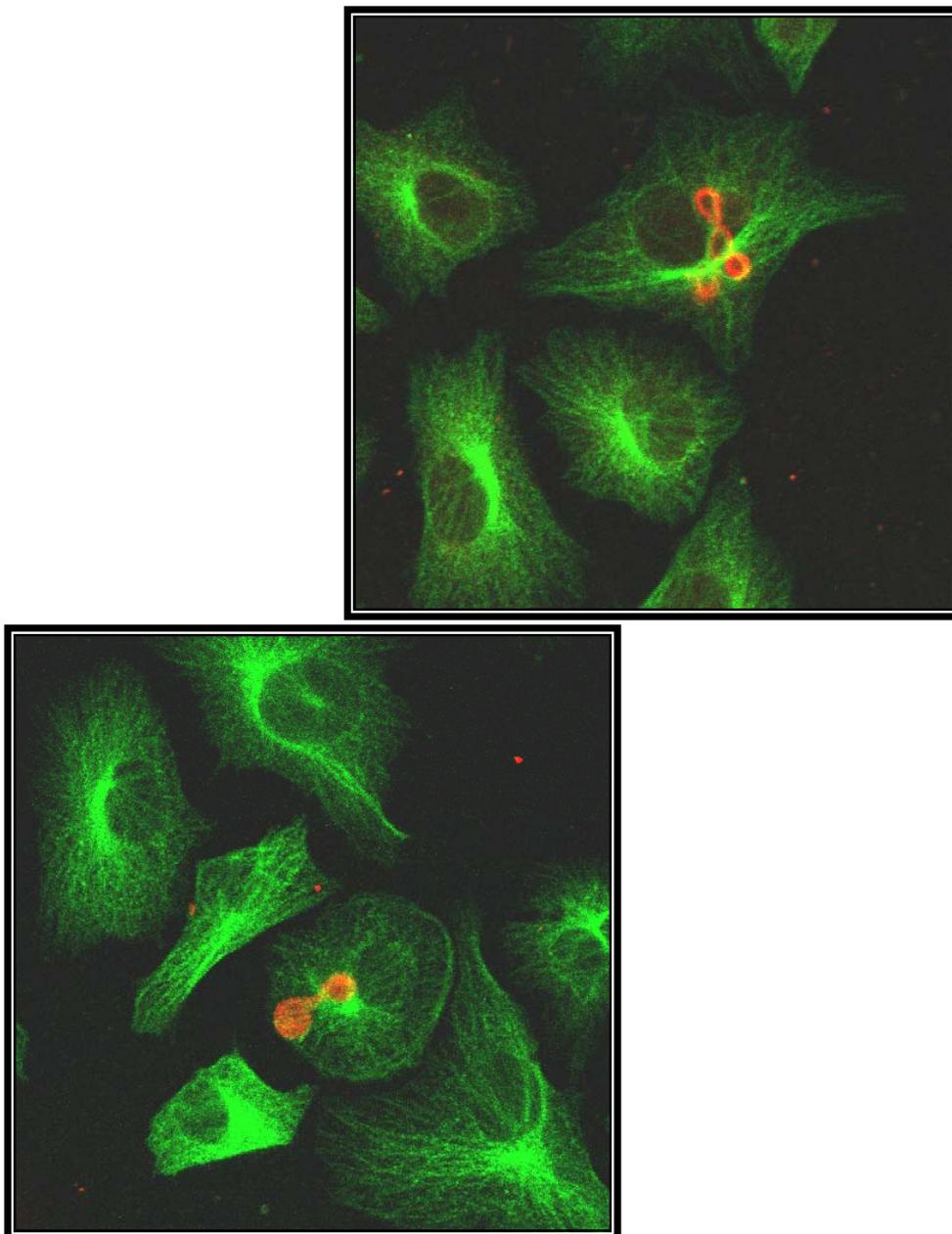


Figura 35 – Imunofluorescência indireta dupla em células A₅₄₉ (A) e Vero (B) após cinco horas de contato com *P.brasiliensis*, empregando-se como anticorpos primários anti- “cell-free” e anti- β tubulina e como anticorpos secundários anti-IgG FITC e TRITC, analisada por microscopia confocal a laser. As imagens demonstram a associação dos microtúbulos pelas leveduras na sua localização intracitoplasmática.

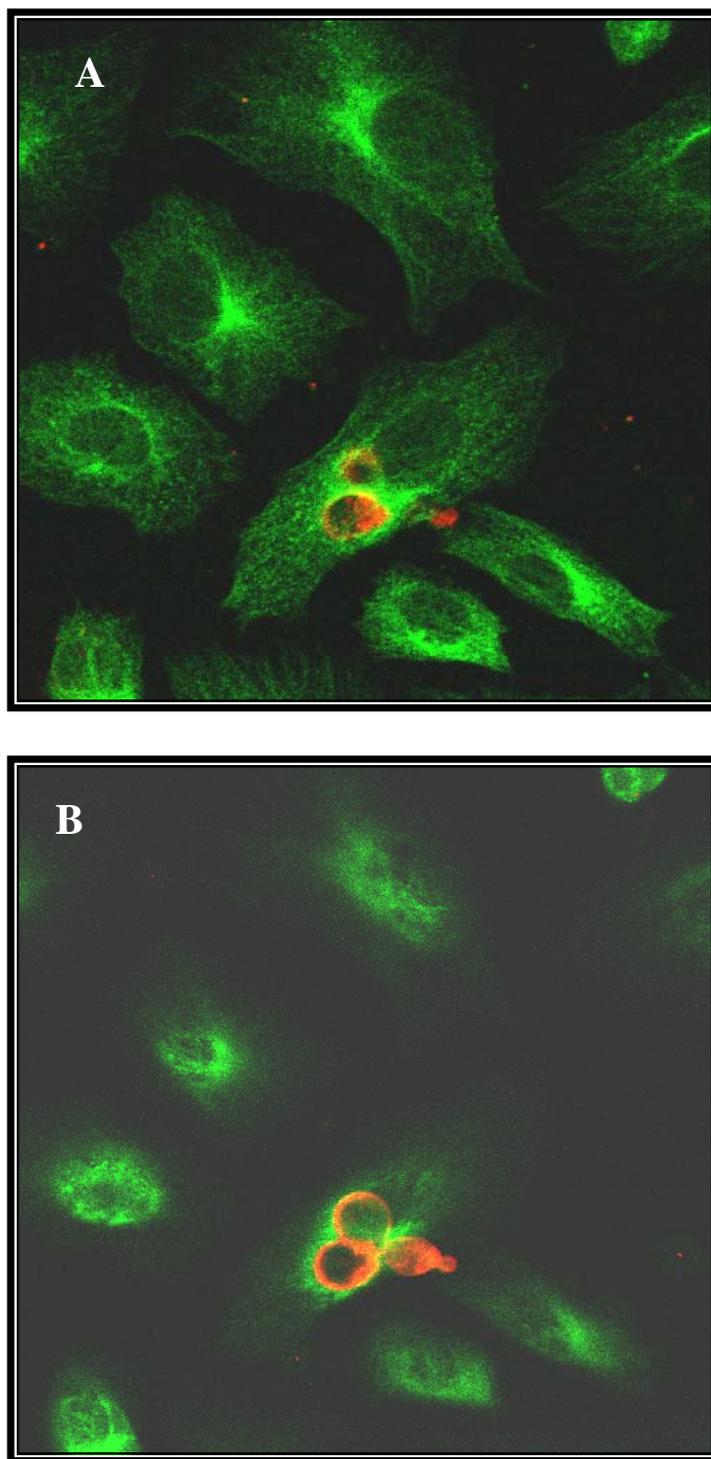


Figura 36 – Imunofluorescência indireta dupla em células A₅₄₉ após três horas de contato com *P.brasiliensis*, empregando-se como anticorpos primários anti- “cell-free” e anti- β tubulina e os anti-IgG FITC e TRITC como anticorpos secundários, analisada por microscopia confocal a laser: (A) detalhe na célula e (B) detalhe no fungo.

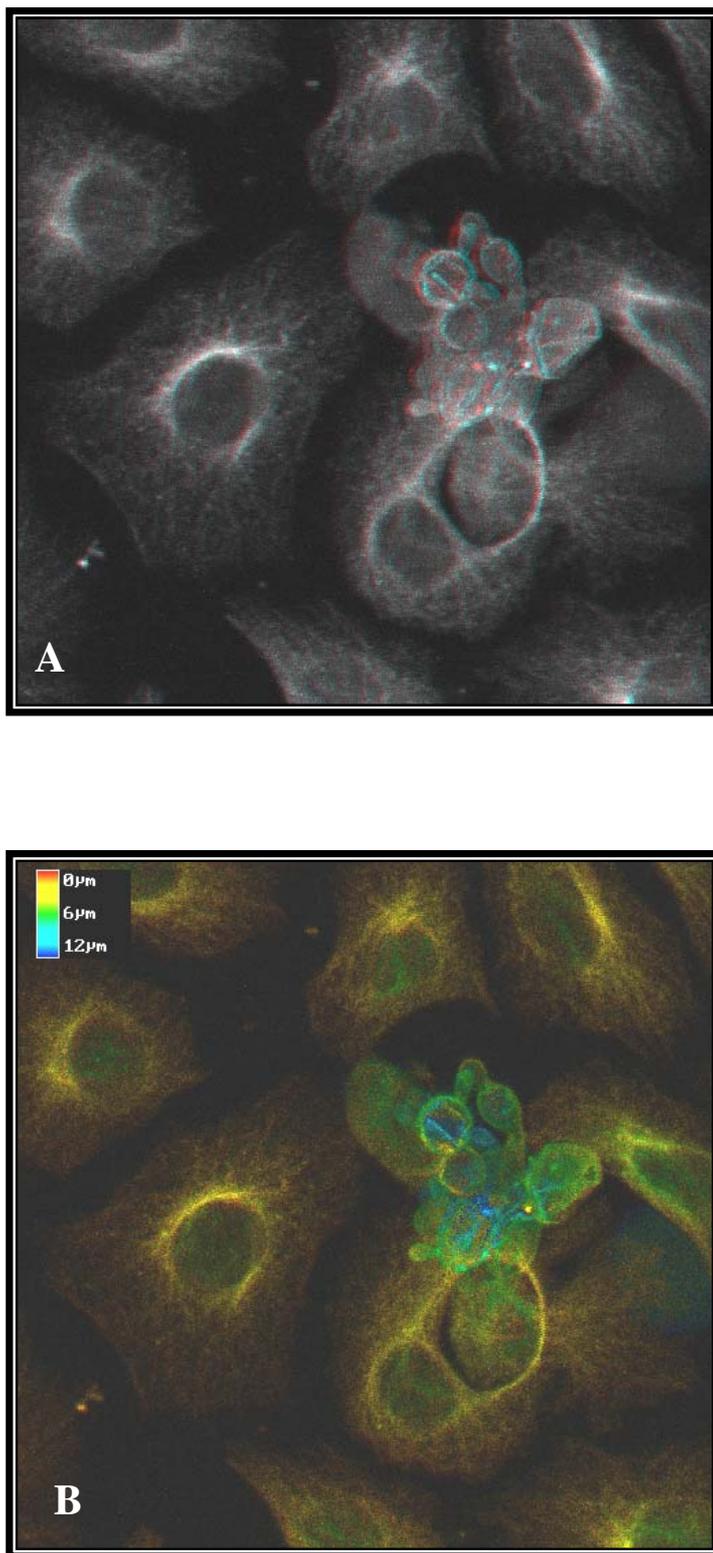


Figura 37 – Imunofluorescência indireta dupla em células A₅₄₉ após três horas de contato com *P.brasiliensis*, empregando-se como anticorpos primários anti- “cell-free” e anti-β tubulina e os anti-IgG FITC e TRITC como anticorpos secundários, analisada por microscopia confocal a laser: (A) imagem em 3D e (B) código de cores.

5.6.3. Ensaio de plaqueamento

Uma sensível inibição da infecção de *P.brasiliensis* foi observada nas células tratadas com colchicina e citocalasina em todos os tempos de exposição. Esta inibição, já observada nos ensaios em lamínulas, foi confirmada, através da quantificação das colônias isoladas. Sendo assim, em períodos de tempo caracterizados, predominantemente, pela adesão fúngica (uma e duas horas), foram isoladas colônias das células tratadas com colchicina e citocalasina, porém em número muito inferior, quando comparado ao controle de células não tratadas. Em períodos de tempo, onde é observada a invasão fúngica nas células (três e cinco horas), a inibição foi ainda mais significativa, como observado na *figura 38*.

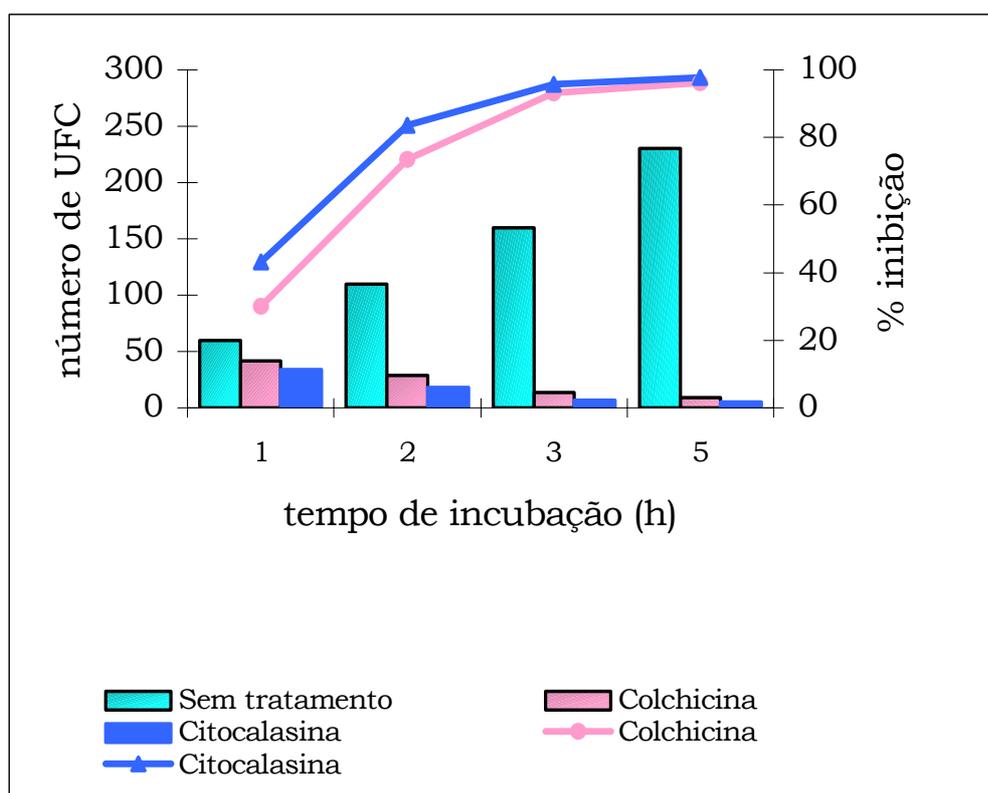


Figura 38 – Ensaio de plaqueamento de *P.brasiliensis* em função do período de contato e do tratamento das células Vero: com colchicina (5 μ g/mL), citocalasina (10 μ g/mL) e sem tratamento prévio, expressos em número de Unidade Formadora de Colônias (UFC) pelos histogramas e a porcentagem de inibição pelas linhas.

5.6.4. Filamentos Intermediários: Citoqueratina

A localização e disposição dos filamentos de citoqueratina foram visualizados através da técnica de imunofluorescência indireta. Um padrão filamentososo e muito organizado, ao redor do envoltório nuclear e prolongando-se como extensões até a membrana plasmática das células foi observado quando foi empregado o soro anti-citoqueratina (*figuras 39 e 40*).

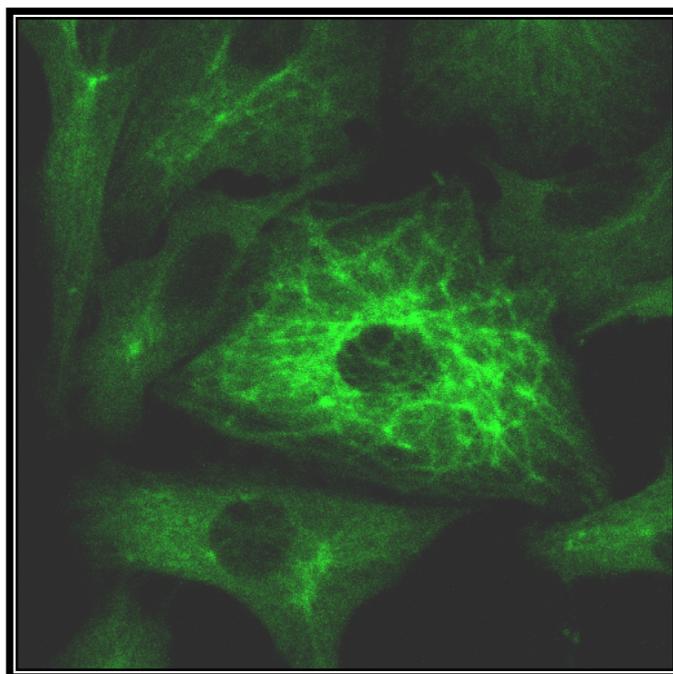


Figura 39 – Imunofluorescência indireta em células A₅₄₉, empregando-se o soro anti-pan citoqueratina como anticorpo monoclonal primário e o anti-IgG FITC como anticorpo secundário, analisada por microscopia confocal a laser, demonstrando o padrão dos filamentos intermediários de citoqueratina.

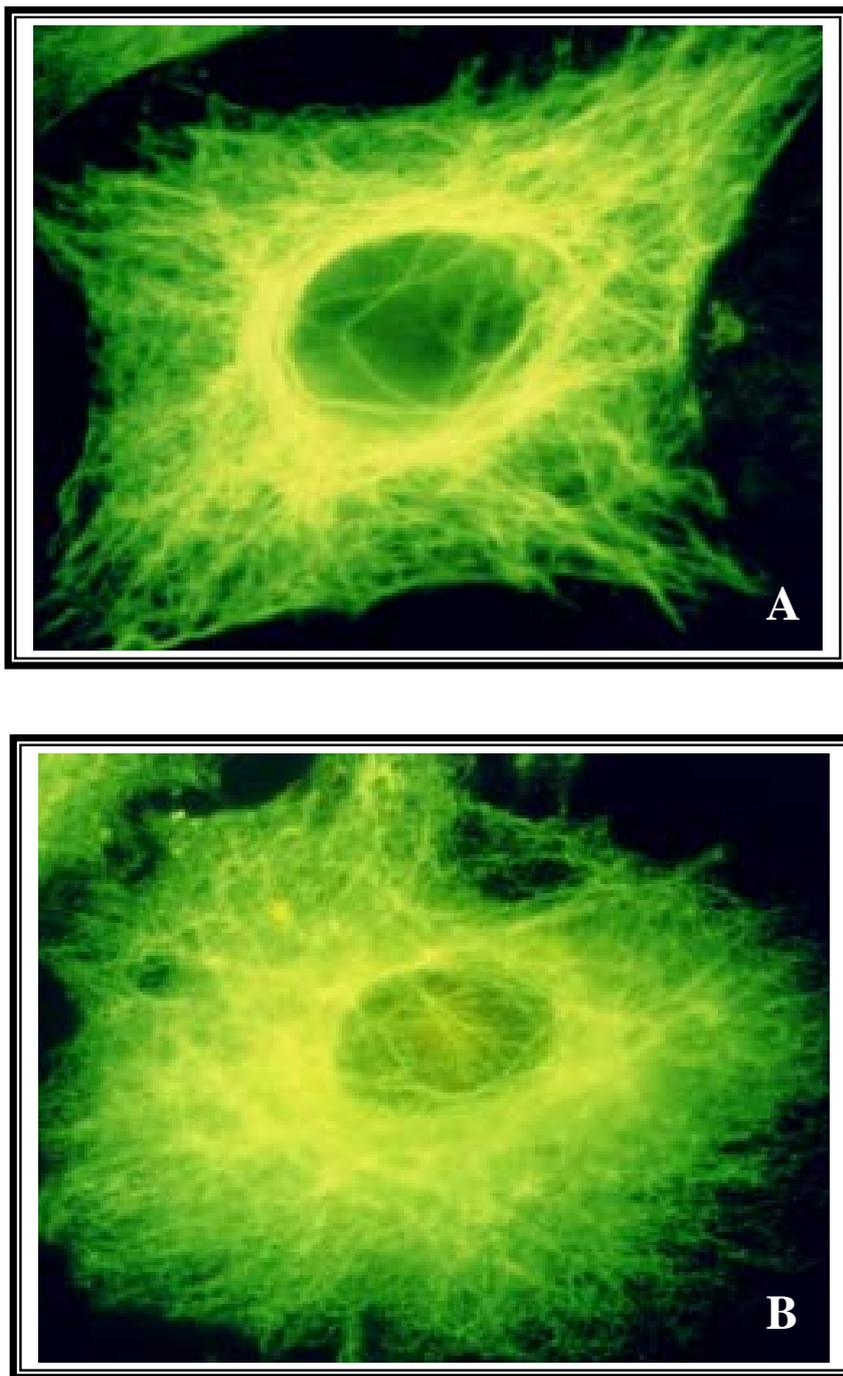


Figura 40 – Imunofluorescência indireta, empregando-se como anticorpo monoclonal primário o anti-pan citoqueratina e como secundário o anti-IgG FITC, analisada através de microscopia óptica, demonstrando o padrão dos filamentos intermediários de citoqueratina: (A) células Vero e (B) células A₅₄₉.

Uma elevada afinidade entre a citoqueratina celular e constituintes fúngicos foi também mostrada em microscopia confocal a laser. Como demonstrado na *figura 41*, o padrão de reconhecimento do fungo pelo soro anti-citoqueratina assemelhou-se a um padrão de marcação com soro anti-“cell-free” de *P.brasiliensis*.



Figura 41 – Padrão de reconhecimento da amostra 18 de *P.brasiliensis*, frente ao soro anti-citoqueratina a 1:20, revelado por imunofluorescência indireta em microscópio confocal a laser (60x).

Durante a interação com *P.brasiliensis*, o padrão de marcação apresentou-se diferenciado de acordo com o período de contato fungo-célula. Na adesão fúngica não ocorreu comprometimento da citoqueratina, como se pode observar na *figura 42*. Porém, houve nítida alteração no padrão de marcação da citoqueratina das células em tempos maiores de contato fungo-célula onde ocorreu a invasão. A *figura 43* demonstra o desarranjo e a destruição da estrutura dos filamentos intermediários de citoqueratina por *P.brasiliensis*, durante a cinética da invasão e multiplicação.

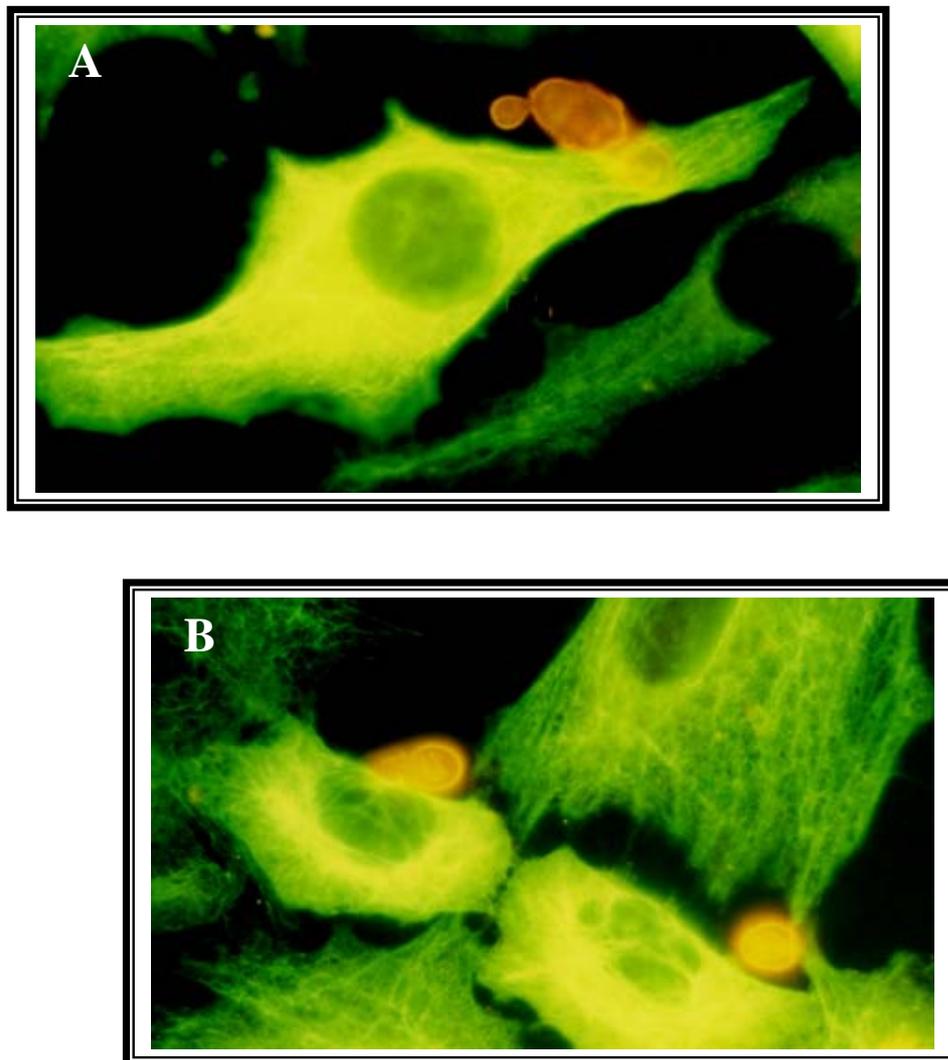


Figura 42 – Imunofluorescência dupla indireta empregando-se o anti- “cell-free” de *P.brasiliensis* e anti-citoqueratina, como anticorpos primários e marcação secundária com anti-IgG FITC e Phycoerithrin, respectivamente, analisadas por microscopia óptica (100x): células após uma hora de exposição ao *P.brasiliensis*: (A) células A₅₄₉ e (B) células Vero.

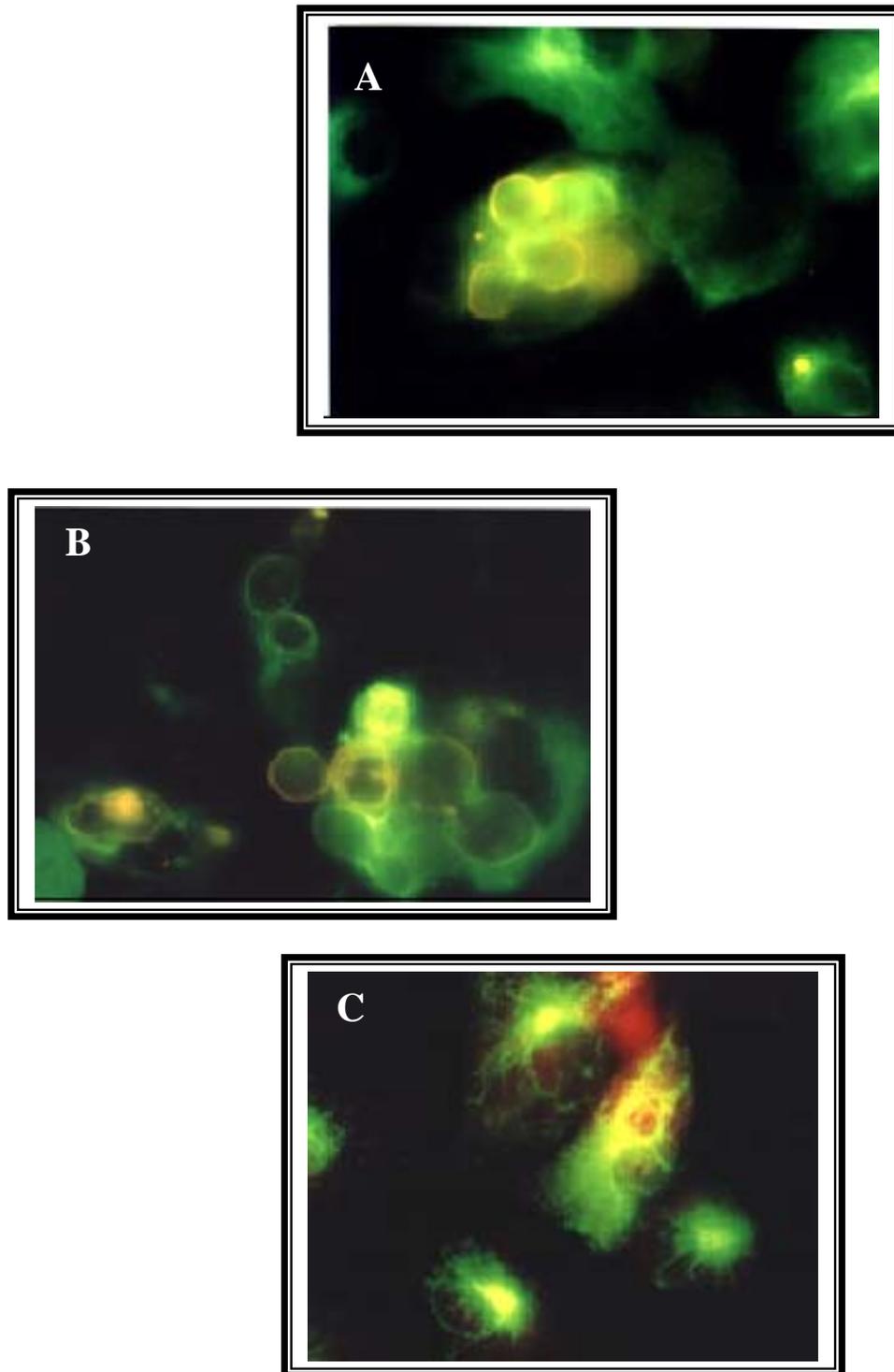


Figura 43 – Imunofluorescência dupla indireta empregando-se o anti- “cell-free” de *P.brasiliensis* e anti-citoqueratina, como anticorpos primários e marcação secundária com anti-IgG FITC e Phycoerithrin, respectivamente, analisados por microscopia óptica (100x): células Vero infectadas com as leveduras após (A) duas, (B) três e (C) cinco horas.

As imagens de microscopia confocal a laser, demonstraram a invasão e multiplicação fúngica, assim como uma intensa degradação dos filamentos rígidos de citoqueratina em períodos de três horas de contato. Os resultados estão demonstrados na *figura 44*.

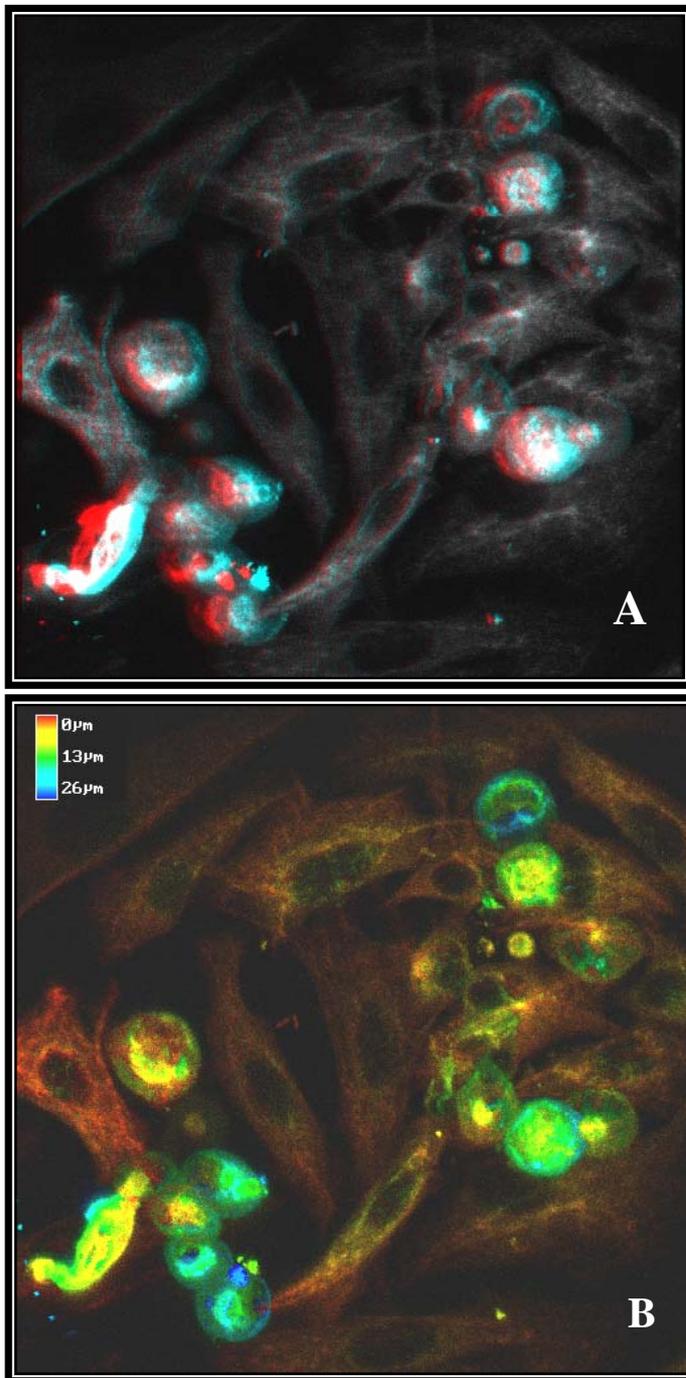


Figura 44 – Imunofluorescência dupla indireta em células A₅₄₉ após três horas de contato fungo-célula, empregando-se o anti- “cell-free” de *P.brasiliensis* e anti-citoqueratina como anticorpos primários e marcação secundária com anti-IgG FITC e Phycoerithrin, respectivamente, analisadas por microscopia confocal a laser: (A) imagem em 3D e (B) código de cores.

5.7. Comprometimento do citoesqueleto por componentes antigênicos de *P.brasiliensis*

As células foram tratadas com diferentes concentrações da gp 43 para avaliação de sua atividade na organização dos filamentos de actina, citoqueratina e tubulina do citoesqueleto. Os efeitos citotóxicos do antígeno foram controlados com o corante vital azul de Tripan; assim, somente células viáveis, após tratamento com o antígeno, foram selecionadas para a marcação do citoesqueleto.

Não foi observada nenhuma atividade da gp 43 nos microtúbulos celulares.

5.7.1. Microfilamentos de actina

A atividade da gp 43 nos microfilamentos de actina foi demonstrada através de imunofluorescência direta com faloidina. Este antígeno, em concentrações maiores que 50µg/mL, destruiu o citoesqueleto de actina, demonstrando seu efeito citotóxico, enquanto em concentrações variando entre 25 e 3,125µg/mL, alterou o arranjo do citoesqueleto de actina de maneira nítida, revelando seu efeito citopático. A *figura 45*, demonstra a disposição da actina em célula normal, que se apresenta polimerizada e arranjada em forma de feixes de fibras e após tratamento com a gp 43 na concentração de 12,5µg/mL, quando se observa destruição das fibras actínicas, que se apresentaram arranjadas em forma de mosaico. Efeitos morfológicos semelhantes foram observados em células tratadas com antígeno “cell-free”, diferindo na concentração empregada (dado não mostrado).

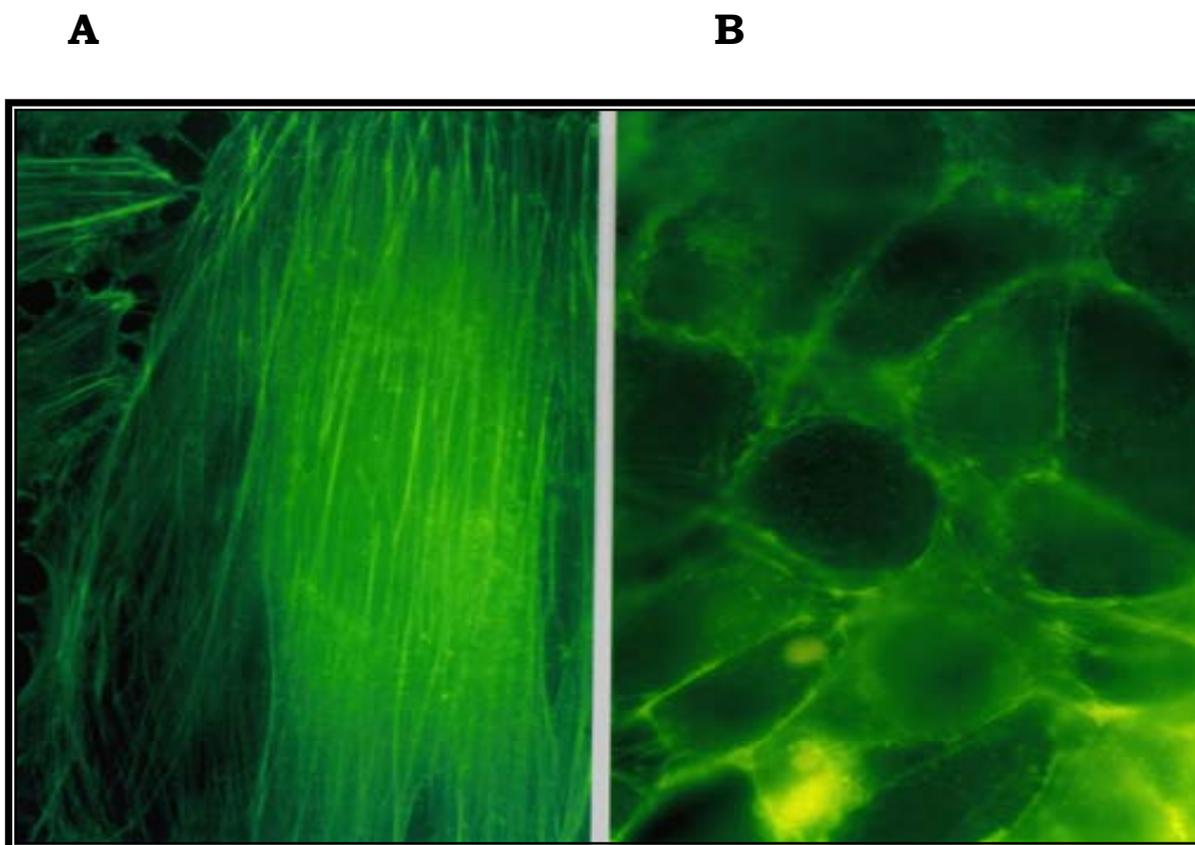


Figura 45 – Imunofluorescência indireta empregando-se a faloidina-FITC para marcação do citoesqueleto de actina das células Vero, analisadas por microscopia óptica: (A) células sem tratamento e (B) células tratadas com gp 43 na concentração de 12,5µg /mL.

4.7.2. Filamentos de citoqueratina

A atividade da gp 43 sobre os filamentos de citoqueratina das células, foi estudada através de imunofluorescência indireta, empregando-se o soro anti-citoqueratina. Em concentrações acima de 50µg/mL, promoveu a destruição da integridade dos rígidos filamentos de citoqueratina, assim como da viabilidade celular, porém em concentrações variando entre 12,5 e

32,5µg/mL, este antígeno promoveu a destruição do arranjo filamentososo da citoqueratina, alterando a forma celular, quando comparada com célula sem tratamento prévio, como revela a *figura 46*.

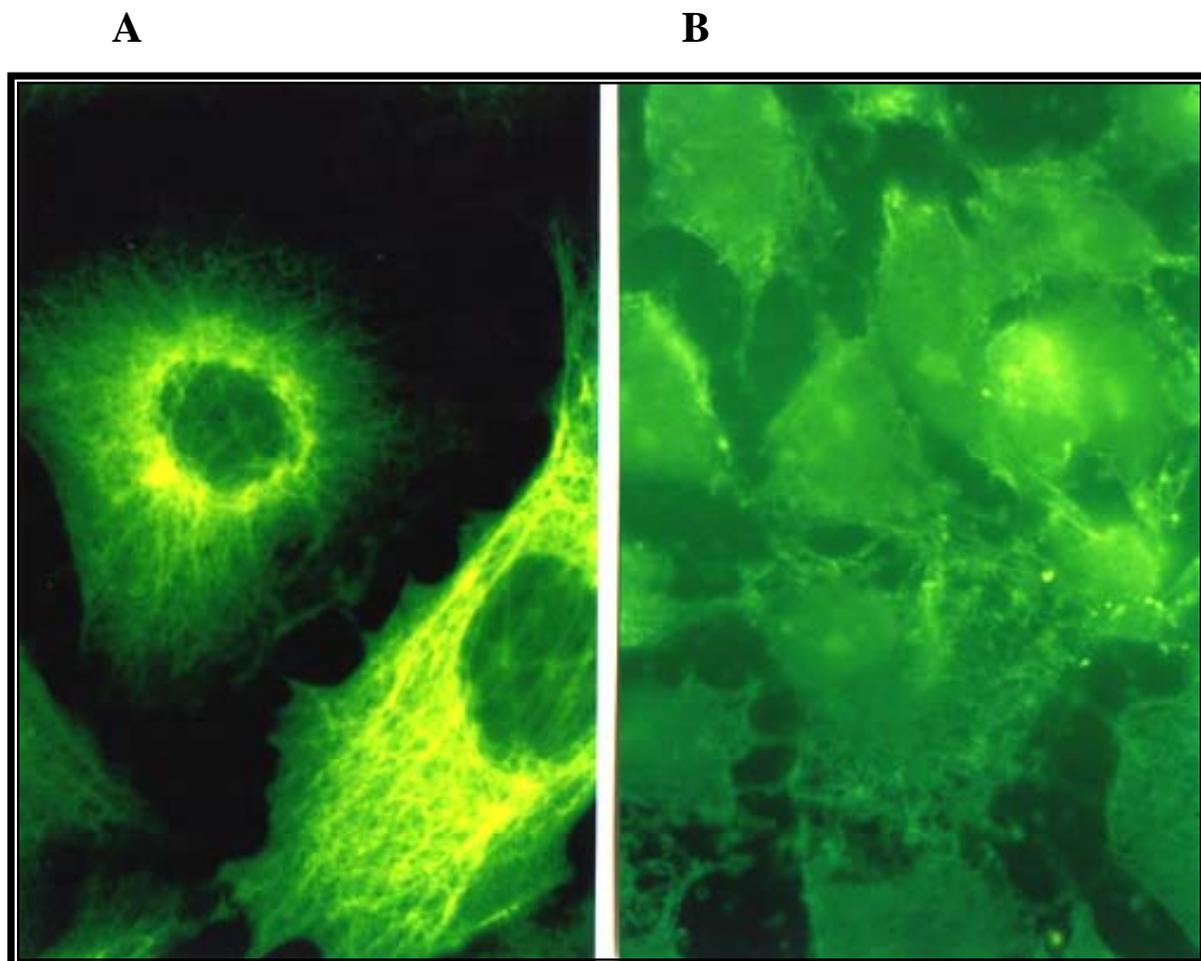


Figura 46 – Imunofluorescência indireta empregando-se o anti-citoqueratina e anti-IgG FITC para marcação dos filamentos intermediários das células Vero, analisadas por microscopia óptica: (A) células sem tratamento e (B) células tratadas com gp 43 na concentração de 22,5µg /mL.

5.8. Avaliação do sobrenadante das culturas celulares infectadas com *P.brasiliensis*

Componentes do sobrenadante das culturas infectadas com *P.brasiliensis* foram transferidos para membranas de nitrocelulose e avaliados contra soro anti-actina, anti-tubulina e anti-citoqueratina. Os resultados estão ilustrados

na *figura 47*, onde foram observadas bandas de 43, 94 kDa e uma banda de elevada massa molecular, reconhecidas pelo soro anti-actina; bandas de 40, 43, 67, 94 kDa e uma de elevada massa molecular, foram reconhecidas pelo soro anti-citoqueratina. Não houve reconhecimento frente ao soro anti-tubulina. Nenhuma banda reativa em tiras de sobrenadante de cultura infectada por uma hora com *P.brasiliensis* foi observada (dado não mostrado).

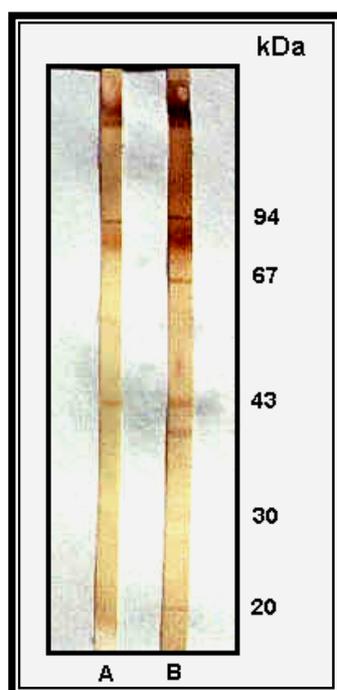


Figura 47 – Imunoblot de sobrenadante de cultura de células A₅₄₉, frente aos soros: (A) anti-actina a 1:100 e (B) anti-citoqueratina a 1:10.

5.9. Componentes de P.brasiliensis que interagem com constituintes do citoesqueleto

Tiras de membranas de nitrocelulose contendo antígeno “cell-free” foram ensaiadas frente a soros específicos do citoesqueleto, por imunoblot. Os resultados demonstraram o não reconhecimento do soro anti-tubulina pelos constituintes superficiais de *P.brasiliensis*, assim como a presença de banda

de 43 kDa reconhecida pelo soros anti-actina e anti-citoqueratina, como ilustra a *figura 48*.

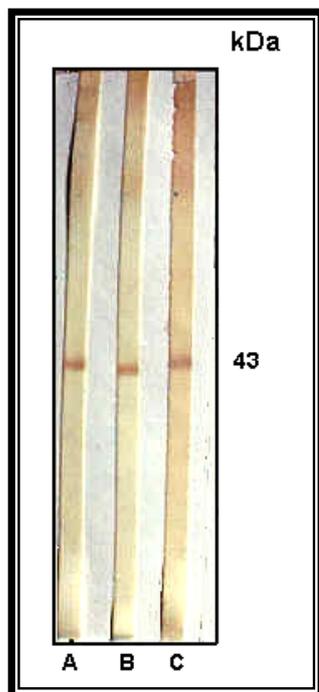


Figura 48 – Imunoblot de antígenos “cell-free” de *P.brasiliensis* frente aos soros: (A) anti-actina a 1:100, (B) anti-citoqueratina a 1:10 e (C) anti-gp 43 a 1:50.

5.10. Ocorrência de apoptose em células infectadas com *P.brasiliensis*

Apoptose é uma função celular essencial no desenvolvimento e homeostase de organismos multicelulares; representa a morte induzida pela célula agonizante, que provê as armas para sua própria destruição.

Uma vez que células apoptóticas características foram observadas em outros ensaios, uma técnica mais específica e sensível foi realizada para confirmar estes dados.

A indução da apoptose foi verificada em lamínulas contendo células Vero infectadas com *P.brasiliensis*, em vários tempos de incubação, utilizando-se células não infectadas como controle, através da técnica “TUNEL” com sonda fluorescente. Por esta técnica, pode-se marcar células que estão sofrendo fragmentação de DNA, característica específica da morte celular programada, assim como determinar o número de células apoptóticas. Fragmentação do DNA foi observada nas células após uma hora de infecção, porém não de forma significativa. Após duas horas de infecção, um grande aumento no número de células que sofreram apoptose foi observado, assim como a presença de formas nucleares características. Entre três e cinco horas, a fragmentação nuclear foi evidente, formando os corpos apoptóticos. Em células com fragmentação de DNA, *P.brasiliensis* foi observado até três horas de contato. As células controles apresentaram 2% de células apoptóticas. Os resultados estão demonstrados nas *figuras 49 a 53*.

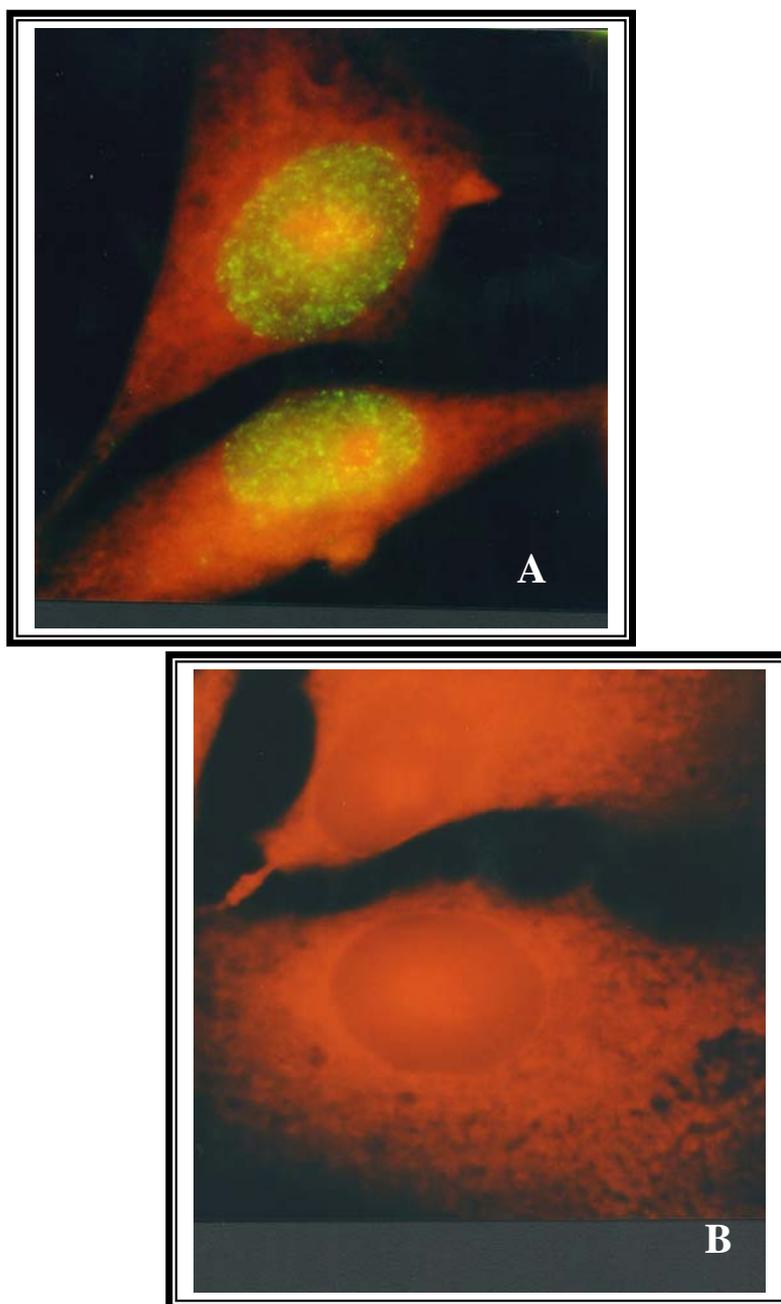


Figura 49 – Células Vero não infectadas, marcadas pela técnica do “TUNEL”: (A) células com fragmentação de DNA, características de apoptose e (B) células normais. Imagens de microscopia óptica (100x).

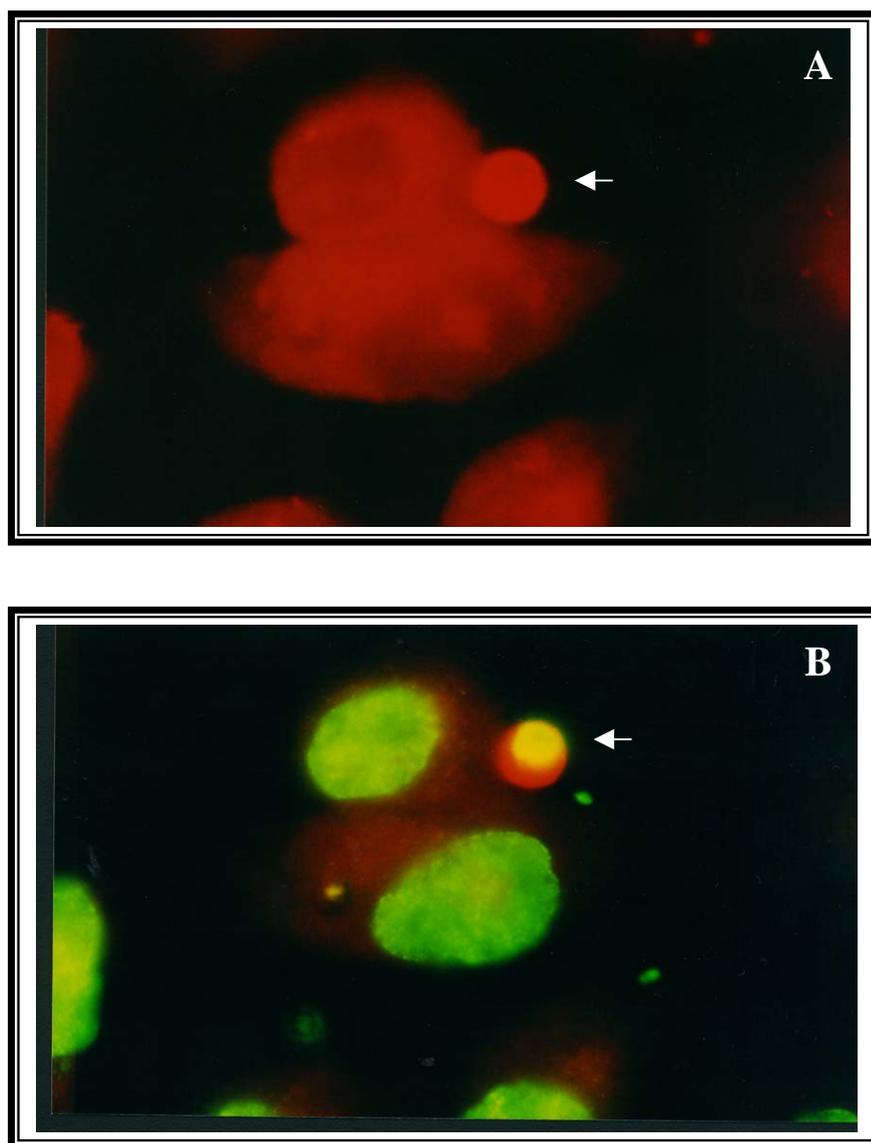


Figura 50 - Células expostas por uma hora a *P.brasiliensis*, marcadas pela técnica do “TUNEL” assim como com soros anti- “cell-free” de *P.brasiliensis* e anti-IgG TRITC, demonstrando a fragmentação de DNA e mudanças morfológicas evidentes, características de apoptose e *P.brasiliensis* (seta): (A) filtro TRITC e (B) filtro FITC. Imagens de microscopia óptica (100x).

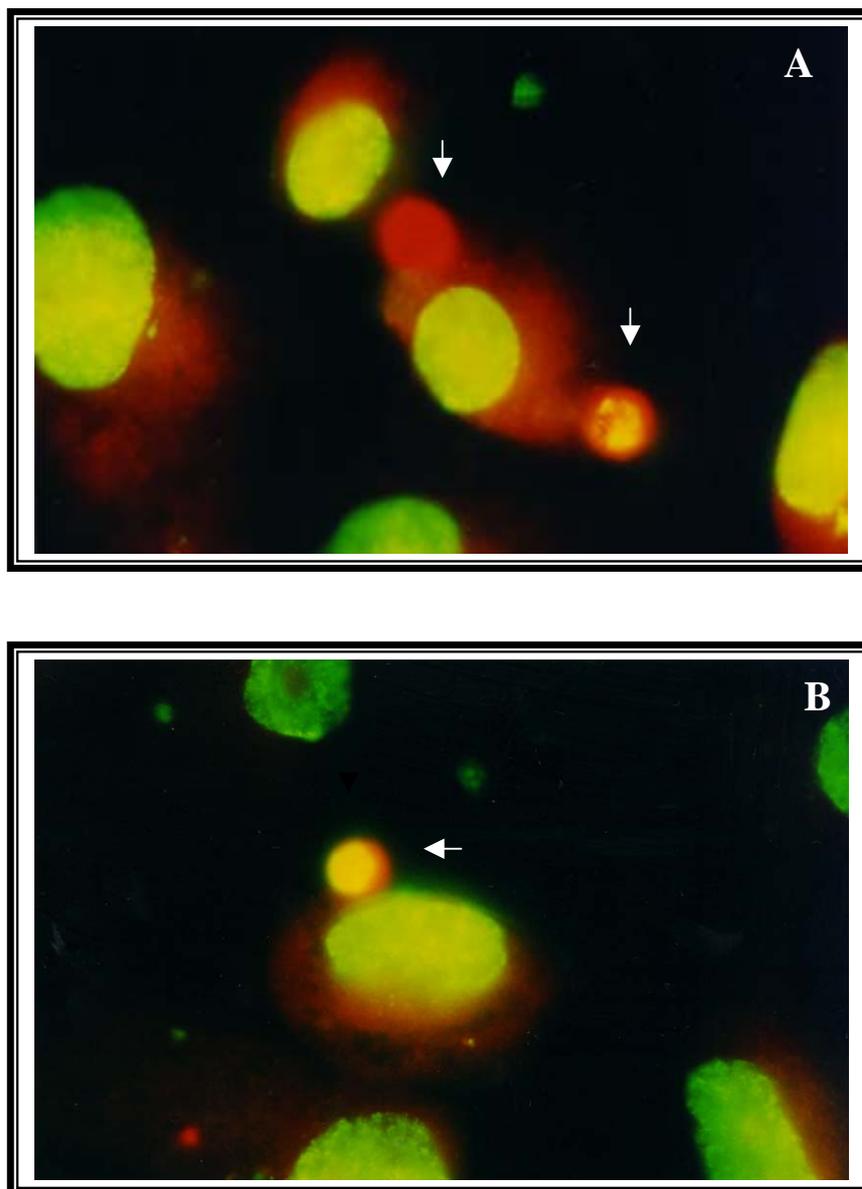


Figura 51 - Células expostas por duas horas a *P.brasiliensis*, marcadas pela técnica do “TUNEL”, assim como com soros anti- “cell-free” de *P.brasiliensis* e anti-IgG TRITC, demonstrando a fragmentação de DNA e mudanças morfológicas drásticas nas células e *P.brasiliensis* (seta): (A) e (B) filtro FITC. Imagens de microscopia óptica (100x).

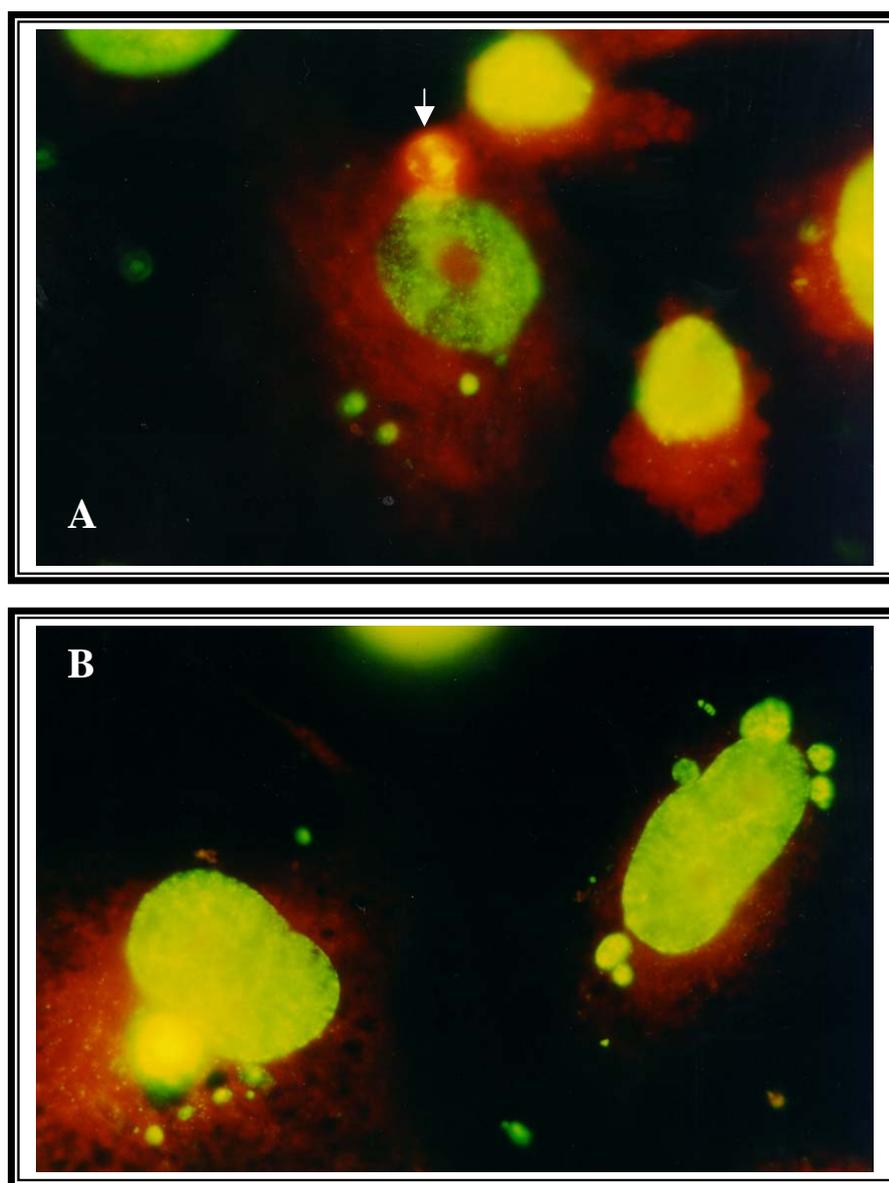


Figura 52 - Células expostas por três horas a *P.brasiliensis*, marcadas pela técnica do “TUNEL”, assim como com soros anti-“cell-free” de *P.brasiliensis* e anti-IgG TRITC, demonstrando a fragmentação de DNA e corpos apoptóticos. (A) Presença de *P.brasiliensis* na célula (seta) e (B) Células apoptóticas. Imagens de microscopia óptica, filtro FITC (100x).

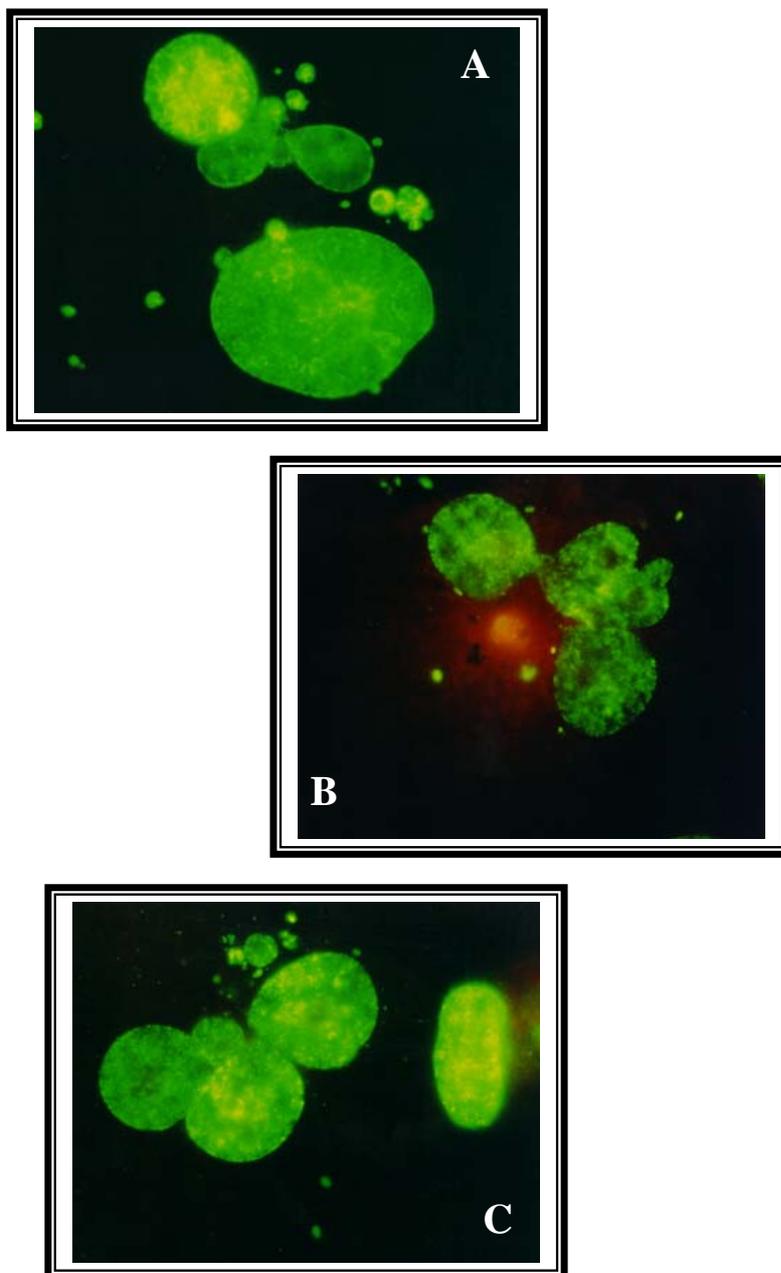


Figura 53 - Células expostas por cinco horas a *P.brasiliensis*, marcadas pela técnica do “TUNEL”, assim como com soros anti- “cell-free” de *P.brasiliensis* e anti-IgG TRITC, demonstrando células apoptóticas sem a presença de *P.brasiliensis*: (A), (B) e (C) filtro FITC. Imagens de microscopia óptica (100x).

Células apoptóticas características foram também observadas em outros ensaios, de forma não rara. A presença de várias células apoptóticas foram reveladas em técnica de imunofluorescência indireta dupla, para marcação da actina celular, como demonstrado na *figura 54*.

A presença de levedura internalizada pode ser demonstrada em célula apoptótica, nos mesmos ensaios de imunofluorescência indireta dupla, como observado na *figura 55*.

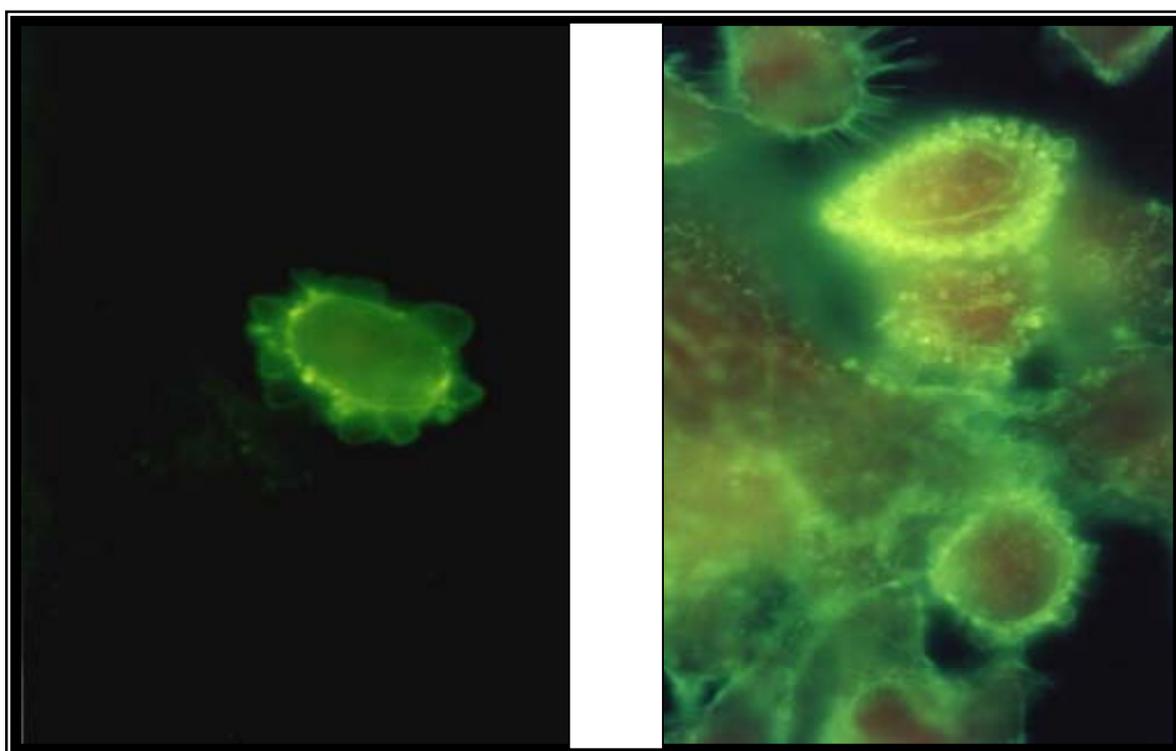


Figura 54 - Imunofluorescência indireta dupla, com marcação do citoesqueleto actínico das células Vero com faloidina-FITC, após três horas de contato com *P.brasiliensis*, marcado pelo anti-“cell-free” e anti-IgG TRITC, demonstrando a presença de células apoptóticas no tapete infectado, analisados por microscopia óptica (100x).

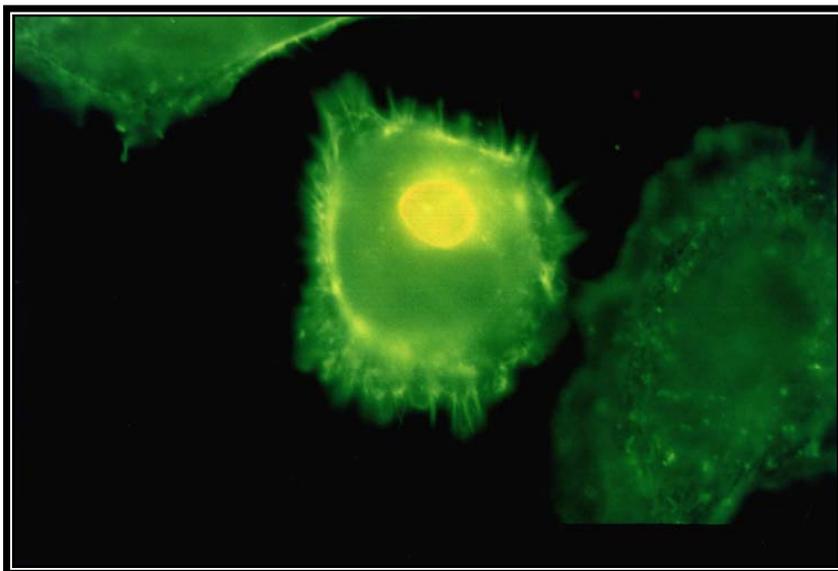


Figura 55 - Imunofluorescência indireta dupla, com marcação do citoesqueleto actínico das células Vero pela faloidina-FITC, após três horas de contato com *P.brasiliensis*, marcado pelo anti-“cell-free” e anti-IgG TRITC, demonstrando a presença de célula apoptótica com levedura no seu interior, analisada por microscopia óptica (100x).

Células apoptóticas características foram também observadas em lamínulas contendo tapete celular infectado com *P.brasiliensis* durante três horas, analisadas por microscopia eletrônica de varredura, como demonstrado nas *figura 56*.

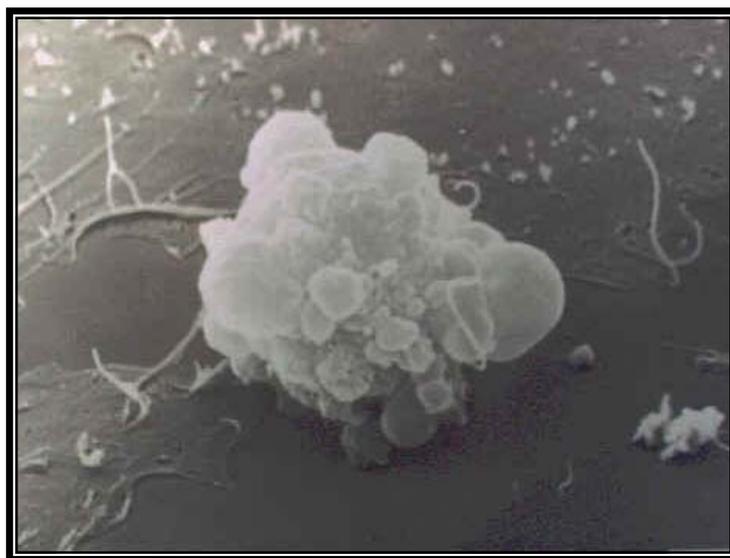


Figura 56 - Microscopia Eletrônica de Varredura demonstrando células apoptóticas no tapete de células Vero infectado por *P.brasiliensis* por três horas (800x).

Imagens de microscopia confocal a laser possibilitaram a observação de características bastante complexas da interação fungo-célula, em períodos de três horas de contato. Adesão, invasão, multiplicação fúngica, assim como a ocorrência de células apoptóticas no mesmo campo estão demonstradas na *figura 57*.

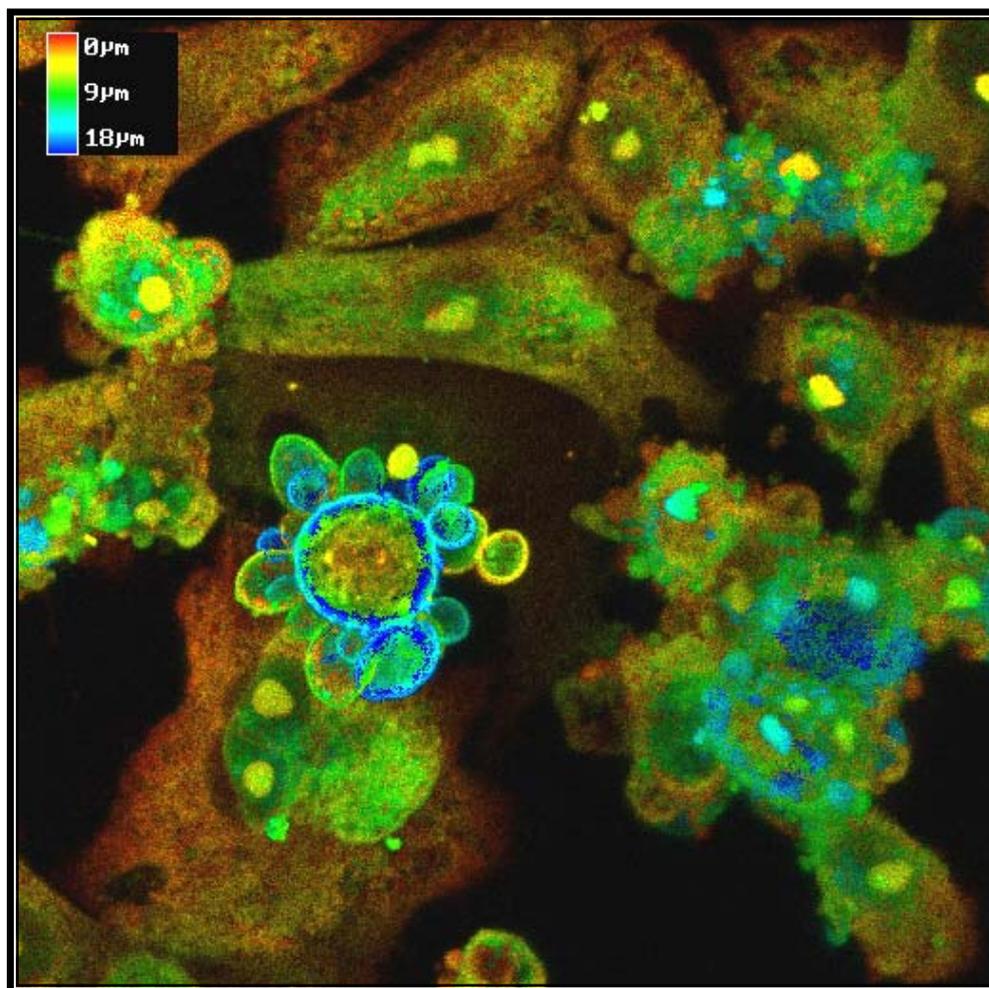


Figura 57 A – Interação entre *P.brasiliensis* e células Vero, após três horas de contato, demonstrando adesão, multiplicação e células apoptóticas ilustrada por microscopia confocal a laser, pelo código de cores.

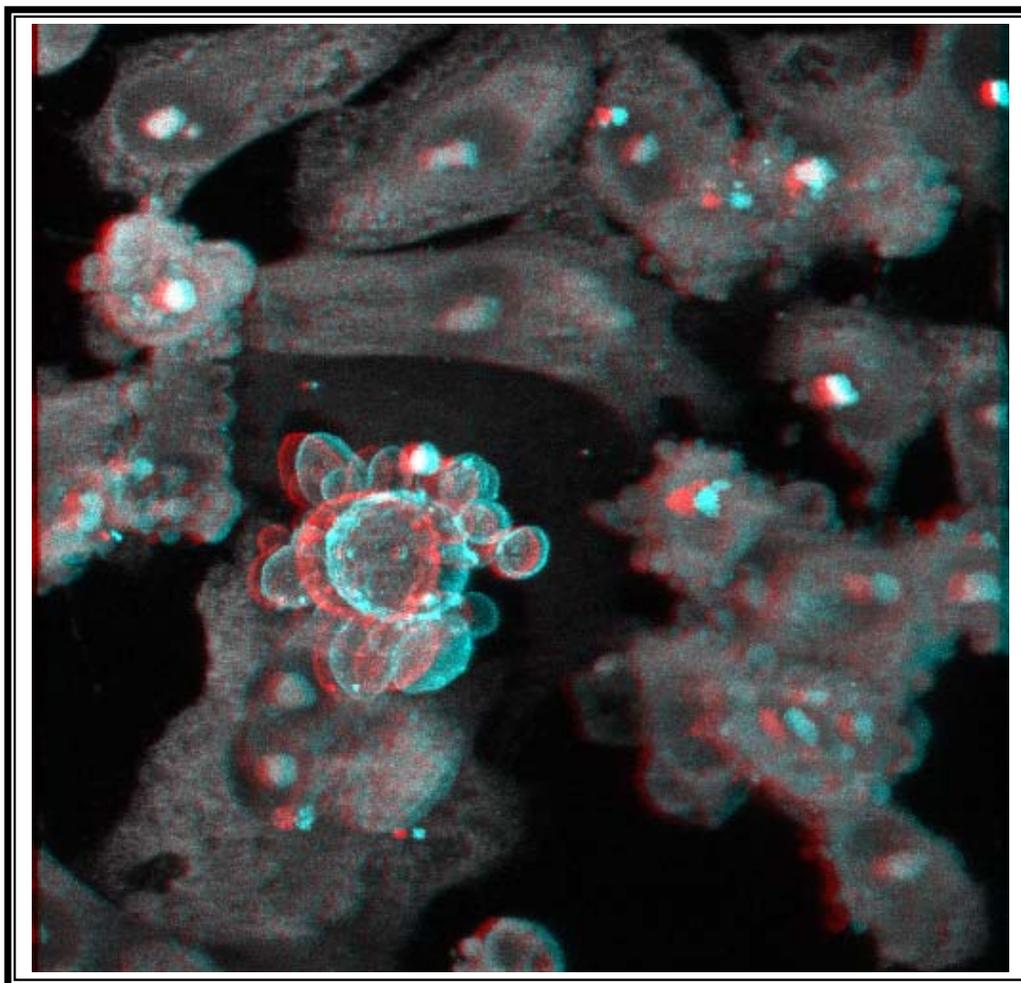


Figura 57 B – Interação entre *P.brasiliensis* e células Vero, após três horas de contato, demonstrando adesão, multiplicação e células apoptóticas ilustrada por microscopia confocal a laser, pela imagem em 3D.

6. Discussão

Os mecanismos utilizados pelos patógenos estão também relacionados às funções da resposta imune do hospedeiro, ou seja, a interação microrganismo-hospedeiro, modificando definições antigas onde a habilidade em causar doença era considerada como uma característica invariável do patógeno [52].

A virulência microbiana é considerada uma propriedade complexa, onde o agente infeccioso poderia penetrar as barreiras protetoras do hospedeiro e sobreviver aos muitos mecanismos de defesa, desde que pudesse adaptar-se ao ambiente, de maneira a torná-lo favorável à multiplicação e, finalmente produzir a doença, ou seja, produzir substâncias ou condições que causassem perturbações fisiológicas e patológicas [254].

Em estudos recentes sobre patogênese microbiana, centrada principalmente no patógeno, foram salientadas as características da superfície microbiana, como determinante crítico da virulência. Neste sentido, os constituintes químicos da superfície microbiana seriam a distinção principal entre microrganismos patogênicos e não patogênicos. Assim, a adesão microbiana às superfícies celulares, foi considerada condição primordial para a colonização e primeiro passo na patogênese.

Sob a perspectiva da patogênese, a interação parasita-hospedeiro pode ou não redundar em situações onde se observam alterações nocivas ao hospedeiro. As células, os tecidos e os órgãos podem sofrer processos lesivos como os de necrose celular, apoptose e transformação maligna, assim como inflamação granulomatosa, fibrose

(como resultado de inflamação crônica) e tumor. Tais alterações podem ser mediadas pelos patógenos ou pelo hospedeiro [52].

A patogênese microbiana definida em termos de injúria ao hospedeiro permite a inclusão de muitas variáveis que afetam a relação patógeno-hospedeiro. Nesta visão, a virulência é uma propriedade do patógeno, mas modulada pela susceptibilidade ou resistência do hospedeiro.

No caso de infecções sistêmicas fúngicas, o estudo da interação fungo-célula hospedeira, poderá servir para a melhor compreensão dos mecanismos de patogenicidade e, futuramente, para o desenvolvimento de novas estratégias com a finalidade de circunscrever a infecção fúngica.

Para a adesão, o microrganismo deve encontrar o tecido alvo e necessita de mecanismos de evasão, subversão ou circunvenção das defesas iniciais do hospedeiro. A partir daí, para o seu estabelecimento pode ocorrer à multiplicação ou persistência do mesmo, culminando em injúrias ao hospedeiro.

No decorrer destas etapas, o microrganismo desenvolve estratégias de acordo com as respostas do hospedeiro, ou seja, se este é suscetível ou resistente. Assim, se o microrganismo for apto a desenvolver certas estratégias, pode ser patogênico, ou mesmo se originalmente for parasita extracelular, poderá desenvolver mecanismos que possibilitem a sua interiorização celular.

A paracoccidiodomicose apresenta um amplo espectro de manifestações clínicas, variando desde formas cutâneas a formas sistêmicas. O fungo pode atingir vários tecidos com ênfase ao pulmão [246]. Os mecanismos de disseminação, bem como as etapas para a passagem do compartimento intravascular para o parênquima de

diferentes órgãos não são bem conhecidos, porém observando-se os aspectos clínicos polimórficos, pode-se sugerir que diferentes mecanismos de virulência estão envolvidos, em função das diferentes respostas do hospedeiro [20].

Com relação ao *P. brasiliensis* foi demonstrado, em trabalhos anteriores, a capacidade de adesão, seguido aparentemente de invasão de células epiteliais de linhagem contínua [36, 16, 247]. A adesão de amostras de *P. brasiliensis* às células epiteliais ocorreu após 30 minutos e amostras mais virulentas para animais [141] apresentaram também maior capacidade de adesão [16, 38].

Na continuação desta linha de trabalho, estudou-se os fatores envolvidos na aderência, em duas linhagens celulares contínuas, Vero (epitelial de rim de macaco verde da África) e A₅₄₉ (linhagem epitelial do trato respiratório – pneumócito tipo I) e a amostra 18 de *P. brasiliensis*.

A adesão de células de *P. brasiliensis* aos tecidos do hospedeiro deve ser um dos passos cruciais no estabelecimento da paracoccidiodomicose. A habilidade do fungo em aderir às células epiteliais pode representar um mecanismo no qual o fungo evitaria o muco que recobre os ductos respiratórios e o movimento das células ciliares, tendo então papel na patogênese. Entretanto, pouco é conhecido como este mecanismo ocorre *in vivo*.

O padrão da cinética de interação de *P. brasiliensis* às duas linhagens celulares foi semelhante, porém distinto em termos de tempo. Pode ser verificado um aumento linear no número de leveduras aderidas em função do tempo de exposição às células, porém na linhagem celular respiratória, a invasão celular foi observada em período menor (uma hora) em relação às células do epitélio renal (duas horas). Apesar de serem células transformadas, cujos receptores

diferem de células teciduais, maior afinidade bioquímica foi observada entre *P.brasiliensis* e células do epitélio respiratório, corroborando com os dados da doença *in vivo*.

Várias proteínas do hospedeiro como laminina, colágeno, e fibronectina são potenciais ligantes celulares de microrganismos [248, 249, 186, 62]. Estas glicoproteínas normalmente não são expostas na superfície do epitélio e endotélio. Entretanto, qualquer tipo de trauma que altere o tecido do hospedeiro pode levar a exposição de membranas basais e tornar acessível seus componentes como laminina, colágeno tipo IV e entactina [195].

Proteínas da matriz extracelular são implicadas na adesão em uma variedade de patógenos extra e intracelulares aos tecidos do hospedeiro ou células. O envolvimento de adesinas fúngicas com receptores de componentes da matriz e citoesqueleto foi verificado através da utilização de várias técnicas.

A laminina é uma glicoproteína da matriz ligada a membrana basal e sua interação com moléculas de superfície celulares e receptores promovem a adesão célula-célula, a migração das células e a diferenciação celular. Este componente consiste de três grandes cadeias polipeptídicas α (A); β (B₁) e γ (B₂), arranjas em uma estrutura cruciforme [250, 70]. Esta proteína possui múltiplos domínios que desempenham um importante papel não apenas na adesão celular normal, mas também durante a invasão tecidual e metástase pelas células tumorais e microrganismos patogênicos [251]. Proteínas ligantes da laminina podem contribuir para a patogênese da infecção por mediar a adesão aos ligantes do hospedeiro e retenção do fungo nos tecidos.

P.brasiliensis foi capaz de ligar-se a laminina. Pela técnica de imunofluorescência em microscopia óptica, pode ser observado o padrão filamentososo da laminina distribuído de forma difusa no citoplasma celular, semelhante nas duas linhagens de células empregadas, ou seja, Vero e A₅₄₉. No tapete celular infectado forte marcação ao redor da área de contato fungo-célula foi evidenciada, assim como um padrão puntiforme, sugerindo a degradação da laminina ao redor desta área.

O uso do microscópio de varredura confocal a laser através da confocalidade e varredura de imagens gera imagens refletidas e transmitidas, possibilitando uma análise apurada dos aspectos funcionais e morfológicos [243]. Assim, pela microscopia confocal a laser, pode ser caracterizado o padrão de marcação do soro anti-laminina em alguns pontos delicados e distribuídos no próprio fungo, e marcação mais acentuada nos brotos. Com base nestas observações, pode-se supor que *P.brasiliensis*, além de utilizar esta proteína no processo de adesão às células hospedeiras, também expressa proteínas com seqüências semelhantes, podendo utilizá-la como mecanismo de virulência, como foi sugerido para bactérias [252, 253, 54].

A fibronectina, outro componente estudado, é uma glicoproteína de aproximadamente 440 kDa, com duas subunidades similares, que podem variar de peso molecular. A principal função desta proteína, que é encontrada em líquidos biológicos, coágulo sangüíneo e matriz extracelular, parece estar relacionada à sua habilidade em mediar a adesão da maioria das células [254, 255]. A ligação de fibronectina por alguns microrganismos representa um passo crucial na colonização de tecidos do hospedeiro e desenvolvimento da infecção [256, 34]. A fibronectina liga-se a uma variedade de componentes, incluindo

proteoglicanas, colágenos, glicosaminoglicanas, actina e glicose. Para tanto, liga-se às superfícies de muitas células eucarióticas e procarióticas. Em células eucarióticas, estas interações produzem mudanças na morfologia da célula e do citoesqueleto [257].

A distribuição da fibronectina no tapete celular infectado ou não, assim como em *P.brasiliensis*, foi avaliada através de diferentes metodologias. Padrão filamentososo da fibronectina foi observado no tapete celular, em áreas não infectadas, assim como de maneira difusa distribuída ao longo do citoplasma das células epiteliais e mais intensamente nos sítios de contato fungo-célula no tapete infectado. Também, houve reatividade do soro em alguns pontos distribuídos de forma grosseira na parede fúngica, em imagens de microscopia confocal. Assim, seqüências moleculares coincidentes com as da fibronectina estariam presentes, provavelmente como constituintes da levedura.

Os resultados aqui demonstrados em relação a fibronectina, são semelhantes aos de Kubo *et al.*, (1994) [258] que, através do emprego de cultura de queratinócitos humano, observaram que estas células podem sintetizar, secretar e depositar fibronectina na matriz pericelular.

Por imunofluorescência, foi evidenciada a fibronectina distribuída como grânulos intracelulares e como fibras curtas e radiais entre as células e o substrato. A presença de fibronectina nos sítios de contato célula-substrato foi sugerida com função de molécula de adesão. Uma variação do padrão de marcação ocorreu em decorrência do contato de *P.brasiliensis* com as células, sugerindo a degradação.

Em estudo da interação entre trofozoítas de *Entamoeba histolytica* com fibronectina, foi demonstrada a capacidade de ligação do

protozoário com o substrato, a degradação da fibronectina e a liberação de peptídeos ao meio pela cepa invasiva, enquanto que para cepa não invasiva, a degradação não foi detectada [257].

Dziewanoswka *et al.*, (1999) [219] investigaram o papel de adesinas para a fibronectina na superfície de *S.aureus*, nos eventos de internalização por células epiteliais. Foi observado que para a internalização eficiente da bactéria, foi necessário a expressão de ligantes para fibronectina na superfície da bactéria. Amostra mutante, incapaz de expressar estes ligantes, demonstraram redução de 95% na habilidade de invadir as células. Em contraste, a adesão da amostra mutante não foi tão reduzida, apenas 40%, quando comparada com a amostra selvagem, demonstrando que outras moléculas de superfície compensaram a falta do ligante de fibronectina na amostra mutante.

Em outro estudo, Yan *et al.*, (1998) [259] observaram que a hemoglobina em meio definido induzia a expressão de um receptor de superfície em *C.albicans* que interagia com o domínio de ligação celular da fibronectina. A presença de múltiplos sítios ligantes de fibronectina nos patógenos deve ser característica da habilidade destes em interagir com proteínas da matriz extracelular.

Estes dados corroboram os resultados apresentados, onde *P.brasiliensis* assim como *S.aureus* e *C.albicans*, expressa em suas superfícies diferentes ligantes para constituintes da MEC, podendo explorar múltiplos mecanismos de adesão nas células hospedeiras.

A parede celular pode guardar uma relação evolutiva com a matriz extracelular, uma vez que diversos microrganismos, como *P.brasiliensis*, apresentam em sua superfície estruturas homólogas às proteínas da matriz.

Os microrganismos aderem fortemente às células ou podem encontrar uma rota para a invasão e coexistência intracelular [186].

O colágeno é o principal constituinte da MEC e representa o maior alvo para a ligação de muitas espécies de microrganismos [67, 62]. Klotz, em 1990 [30] mostrou que *Candida albicans* liga-se ao colágeno tipo I e IV imobilizados. Gil *et al.*, (1996) [195], observaram que conídios de *Aspegillus fumigatus* ligam-se ao colágeno I (maior componente da interstício) e colágeno IV (principal componente da membrana basal juntamente com a laminina).

Pela técnica de imunoperoxidase, pode ser observada a ligação de adesinas fúngicas ao colágeno tipo I. O colágeno apresentou-se distribuído ao longo do citoplasma da célula epitelial de maneira difusa e com baixa reatividade, porém nas áreas de contato com o fungo e nas células adjacentes, este padrão de marcação apresentou-se bastante intensificado, sugerindo a ligação de constituintes fúngicos homólogos ao colágeno, com receptores celulares, assim como a possível secreção de colágeno *in loco* pelas células, durante a interação com o fungo.

Provavelmente, devido à rede que os componentes da matriz formam pela ligação uns com os outros é que *P.brasiliensis* se liga às várias proteínas da MEC aqui estudadas. Desta forma, múltiplos alvos de ligação estão simultaneamente presentes e adjacentes na MEC. Sabe-se que *in vivo* a ligação dos componentes da MEC possivelmente envolva múltiplos receptores e diferentes ligantes.

A susceptibilidade do hospedeiro depende em parte do dano epitelial que expõe a membrana subendotelial. Levando-se em consideração a arquitetura da matriz extracelular, a membrana basal, logo abaixo do epitélio e de células endoteliais, pode ser exposta por injúria tecidual, aumentando o acesso para a laminina e colágeno tipo

IV [260]. Depois disso, o fungo traspassa a membrana basal, encontra a fibronectina e colágeno tipo I no espaço intersticial. Se o fungo ganhar acesso ao espaço intravascular encontrará fibronectina plasmática [195].

Assim como a ligação integrina-matriz nas células dos tecidos hospedeiros, a afinidade de ligação da gp 43, uma adesina de *P.brasiliensis*, com a laminina da matriz extracelular foi caracterizada pelo parâmetro de k_d (constante de dissociação no equilíbrio) estimado em 3,7 nM [17]. O receptor de laminina descrito em *S.aureus* apresentou um k_d de 2,9 nM [261]. Ao estudar a proteína ligante de *H.capsulatum*, McMahon *et al.*, (1995) [34] observaram um k_d de 1,6 nM. No caso de *Trypanosoma cruzi*, a proteína que interage com laminina teve um k_d estimado em 12 nM [262]; em *C.albicans* a proteína ligante de laminina teve um k_d de 1,3 nM [22].

Assim, comparando-se os dados da literatura, pode-se constatar que a ligação da gp 43 de *P.brasiliensis* e laminina não é uma interação muito estável.

Nos tecidos normais, os receptores (integrinas) normalmente estão presentes a uma concentração de 10 a 100 vezes maior na superfície celular que os receptores para hormônios e outras moléculas sinalizadoras. Esta disposição faz sentido, uma vez que a ligação simultânea, porém fraca, às várias moléculas da matriz permite que as células explorem o ambiente sem perder sua ligação à matriz. Se a ligação fosse muito forte, as células possivelmente iriam tornar-se ligadas à matriz de maneira irreversível, não teriam a capacidade de movimentarem-se, um problema inexistente se a ligação envolvesse múltiplas adesões fracas. Completando este raciocínio, as células tumorais, para formar metástase, devem rastejar através da lâmina

basal e outras matrizes extracelulares durante a migração para a corrente sangüínea e de lá para outros sítios [263]. Nestes casos, para o “turnover” das macromoléculas da matriz é necessário uma degradação mais localizada dos componentes. Enzimas proteolíticas extracelulares, a saber, metaloproteinases e serinoproteinases, são secretadas no local pelas células hidrolisando as proteínas. Desta maneira, as ligações se desfazem, liberando as células para uma próxima ligação em local mais distante, caracterizando o mecanismo de metástase [73].

Recentemente, foi observado que uma serino-tiol proteinase identificada por Carmona *et al.*, (1995) [19] foi capaz de clivar componentes da membrana basal da matriz extracelular, incluindo a laminina, fibronectina, colágeno tipo IV e proteoglicanas [18].

Associando-se aos dados aqui apresentados, com a capacidade deste fungo em produzir esta proteinase, pode-se inferir que a habilidade de adesão aos componentes da MEC, assim como a degradação, pode constituir-se num importante mecanismo para a invasão tecidual. É plausível imaginar que *P. brasiliensis* deva utilizar mecanismos de adesão e invasão teciduais semelhantes aos utilizados pelas células metastáticas para a colonização tecidual e disseminação.

Pacientes com paracoccidiodomicose, algumas vezes apresentam fibrose pulmonar, exibindo limitações respiratórias importantes [264-266]. Aparentemente, a fibrose inicia-se simultaneamente ao processo inflamatório e a formação do granuloma [267].

Conduzindo estudos em modelos de infecção experimental, foram descritos com detalhes, não somente as características da resposta inflamatória, mas também os elementos constitutivos da fibrose [268-270].

Assim, dados histopatológicos de paracoccidiodomicose experimental, utilizando camundongos inoculados via intra-peritoneal, demonstraram que componentes celulares e da MEC atuaram como elementos temporários e com papel flutuante na resposta do hospedeiro ao *P.brasiliensis*, no curso da infecção. Resultados similares foram descritos em autópsia de pulmão [271]. Na evolução da doença, a síntese da matriz extracelular iniciou-se pela deposição de material fibrinóide, intensificando-se de modo gradativo, especialmente durante e após a fase granulomatosa, com a deposição de colágeno, proteoglicanas e glicoproteínas.

Durante o desenvolvimento, os granulomas exibiram sua própria matriz extracelular, composta por proteoglicanas sulfatadas e ácidas, colágenos tipos I e III, e fibras reticulares (observadas em um padrão tipo rede ao redor do granuloma). Segundo os autores, maiores ou menores quantidades de fibrose podem ser o resultado do desequilíbrio entre a síntese e a degradação do colágeno nos tecidos, como também sugerido para esquistossomose [270]. A presença de proteoglicanas foi considerada de fundamental importância na configuração, movimento, metabolismo e na diferenciação das células hospedeiras, influenciando também o citoesqueleto. Para as proteoglicanas, foi atribuído papel principal na organização estrutural e funcional da matriz extracelular. Foi sugerida a presença de fibronectina ou outra glicoproteína, durante o desenvolvimento do processo inflamatório [269].

Nas últimas fases de progressão do granuloma, foi observada a presença de áreas reparadas no centro de algumas reações granulomatosas, caracterizadas pela substituição do tecido necrótico por uma rede densa de fibras colagenosas e proteoglicanas [272]. Estas áreas foram, praticamente, preenchidas pelos fungos, podendo ser um

meio excelente para a multiplicação destes, favorecendo o crescimento e prevenindo a ação fungicida dos componentes da inflamação.

Os agentes fúngicos possuem propriedades para sobreviver no tecido hospedeiro, e como aqui demonstrado, tem mecanismos específicos de ligação aos componentes da matriz, como o colágeno, possibilitando a sua permanência até mesmo quando todas as condições são hostis. Esta propriedade motivaria uma resposta pelo hospedeiro, na tentativa de equilibrar a relação parasita-hospedeiro e limitar a disseminação.

Na realidade, os granulomas previnem a disseminação e multiplicação dos fungos. Porém, estes continuam viáveis e com mecanismos que permitem o escape e o espalhamento ao longo do organismo, resultando em uma recorrência, estabelecendo assim um padrão cíclico da doença [270].

Outro aspecto abordado neste trabalho foi o provável mecanismo de invasão de *P.brasiliensis* às células *in vitro*. Muitos microrganismos patogênicos tem a capacidade de induzir sua entrada em células não fagocíticas. O processo é semelhante à fagocitose e requer a reorientação do citoesqueleto, no foco de contato com o patógeno [205].

Quatro possíveis mecanismos para a invasão tem sido propostos, baseados nas mudanças morfológicas ocorridas na célula: (1º) endocitose mediada via receptor [273]; (2º) endocitose dependente de microtúbulos [274, 275]; (3º) mecanismo “ziper” e (4º) mecanismo da macropinocitose [205].

O primeiro mecanismo de invasão envolve uma clássica endocitose mediada por receptor que promove uma rota normal de entrada para uma variedade de superfícies celulares. Envolve ligação do microrganismo aos receptores transmembrana que possuem em sua

calda citoplasmática um sinal de internalização, conhecido por proteínas adaptadoras citosólicas. Este mecanismo é conhecido como endocitose mediada por um receptor dependente de clatrina, onde não ocorre envolvimento dos filamentos de actina.

O segundo mecanismo, pouco conhecido envolve a polimerização dos microtúbulos da célula hospedeira e foi identificado em poucos casos, como em *Neisseria gonorrhoeae* [276, 277] e *Campylobacter jejuni* [275].

O mecanismo de “ziper” é caracterizado como a fagocitose convencional, onde ocorre o englobamento do microrganismo pela célula hospedeira com formação de membrana ao redor do mesmo e requer o rearranjo do citoesqueleto de actina [278].

O mecanismo da macropinocitose, bastante estudado em bacteriologia, envolve um enrugamento na membrana celular, facilitando a ingestão do patógeno e neste, não só o citoesqueleto de actina participa, mas também proteínas acessórias.

O mecanismo da invasão celular de *Yersinia* sp, *Listeria* sp e *Neisseria* sp em células epiteliais, que não resultam em alterações da superfície celular, está baseado no clássico modelo da fagocitose de eritrócitos por macrófagos, via receptor Fc, ou seja, o “ziper” [279, 280].

Em contraste, na macropinocitose a natureza da interação é mais complexa. O patógeno, através de certos sinais, estimula proteínas citosólicas a exercer um efeito direto no citoesqueleto, resultando em um rápido rearranjo de actina, promovendo a internalização. Exemplos de patógenos com tais habilidades são *Salmonella* sp e *Shigella* sp [281, 209] e *N.gonorrhoea* [276].

Após o contato inicial com *S.typhimurium*, ocorre uma dramática resposta na superfície da célula epitelial, caracterizada por projeções

da membrana, conseqüência do rearranjo do citoesqueleto que promove o englobamento passivo da bactéria, em um processo altamente dinâmico. Envolve alta polimerização da actina no sítio de contato, assim como o envolvimento de talina, α -actinina e vinculina [63].

O citoesqueleto é formado por uma rede complexa de proteínas filamentosas que se estendem por todo o citoplasma. Sua estrutura é altamente dinâmica, permitindo uma reestruturação constante, modificando assim, a forma e divisão celular como resposta ao meio ambiente [282].

P.brasiliensis tem capacidade para invadir células epiteliais (respiratórias e de rim) *in vitro*, assim como sobreviver na forma intracitoplasmática, onde se multiplica dentro de um vacúolo, como demonstraram os resultados de microscopia confocal a laser.

A levedura internalizada na célula foi observada por imunofluorescência indireta em microscopia óptica, quando o fungo e a superfície celular foram visualizados em focos diferentes, e o citoesqueleto aparecia sem rompimentos, aparentemente organizado e de forma íntegra, de maneira semelhante à sua organização original, porém com fibras de “stress” mais curtas que as das células normais não infectadas [283].

A actina celular, constituinte mais abundante do citoesqueleto, está presente em formas variadas dentro de células epiteliais polarizadas. Tem funções importantes como a movimentação e forma da célula. Actinas monoméricas formam um “pool” globular (G-actina) distribuídas de forma difusa ao longo do citoplasma da célula. Formas filamentosas, oligoméricas, polimerizadas, (F-actina) são encontradas em vários locais, incluindo a extremidade terminal e estendendo no

core das microvilosidades e regiões de contatos intercelulares, em associação com caderinas e integrinas nos sítios de adesão focais [78].

As citocalasinas são metabólitos fúngicos de baixo peso molecular que se ligam a actina e causam vários efeitos que dependem do tipo de célula e densidade, assim como também da sua concentração e tipo. Citocalasinas assemelham-se às proteínas “capping” porque se ligam nas extremidades onde ocorre a polimerização dos filamentos de actina, inibindo a associação e dissociação de subunidades de actina. Citocalasinas despolimerizam a F-actina, clivam filamentos, estabilizam oligômeros, estimulam a atividade de ATPase da F-actina, e interagem com G-actina. (De modo geral, mudam a organização da actina de rede isotrópica para acumulações focais [240, 284].

A ligação de citocalasinas nas extremidades farpadas dos filamentos de actina pode ter uma função adicional relacionada a adesões focais celulares. Proteínas de adesão transmembrana (integrinas) ligam componentes da matriz extracelular ao substrato formando placas densas citoplasmáticas associadas com actina polimerizada, denominadas fibras de “stress” [240]. Citocalasinas influenciam várias atividades associadas a contratibilidade em células eucarióticas, além de prevenir a divisão do citoplasma, inibir a motilidade celular e causar modificações na forma da membrana celular [212].

Se a citocalasina D interferir com internalização microbiana, deduz-se que a F-actina tem papel na internalização, que é mediada pela própria célula hospedeira e não pelo patógeno. A observação mais freqüente é que a citocalasina D diminui a internalização microbiana

em células eucarióticas que necessitam da F-actina na endocitose microbiana célula-hopedeira-dirigida.

Quando empregada, a citocalasina D não teve efeito significativo na viabilidade celular e através de marcação com faloidina marcada, foram observadas alterações características nos filamentos de actina. Porém, uma inibição da invasão de *P.brasiliensis* foi observada em células Vero tratadas com citocalasina D, resultado confirmado por ensaio de plaqueamento. Assim, um provável mecanismo de internalização do fungo seria o da endocitose.

Os resultados também demonstraram uma provável modificação na actina da levedura durante a interação com a célula. Nos tempos menores de exposição (uma hora) do fungo às células Vero, pode ser observada tênue marcação do citoesqueleto fúngico; nos períodos de duas horas de incubação, eventos precedentes a internalização, polimerização da actina da célula na área de contato com o fungo, assim como marcação acentuada em pontos focais no fungo; em tempos maiores de contato, onde se observou a invasão fúngica, a marcação apresentou-se mais evidente e em alguns pontos específicos do citoplasma fúngico. Pode-se sugerir que na interação fungo-célula, ocorreram transformações significativas no citoesqueleto da célula e do patógeno, demonstrando uma característica altamente dinâmica durante a cinética da invasão celular.

A função da gp 43 na interação fungo-célula, assim como seus efeitos no citoesqueleto (actina, citoqueratina e tubulina) foram verificados através do tratamento das células *in vitro* com a glicoproteína purificada, e posterior marcação com soro específico. Foi demonstrado o efeito da gp 43 nos filamentos de actina, modificando nitidamente a rede dos microfilamentos de actina. Especulou-se que a

gp 43, diminuindo a concentração crítica da actina requerida para polimerização e estabilizando os filamentos de actina, favoreceria também a extensão das protusões da célula do hospedeiro, fato exigido na entrada da levedura. Assim, seria esperado que a gp 43 promovesse uma diminuição na polimerização de actina no local de entrada da levedura.

Este fato pode sugerir que a gp 43 estaria envolvida na concentração e organização dos filamentos de actina na área próxima da invasão, mas devido a sua atividade de adesina [17], também ligar-se-ia a actina, permitindo a reorganização do filamento no local de entrada. Foram observados folhetos da membrana plasmática envolvendo e engolfando a levedura (após três horas com células Vero), por microscopia eletrônica [38]. Assim, um outro mecanismo provável de internalização das leveduras seria através de um processo semelhante a macropinocitose, necessitando-se outros estudos conclusivos.

Os microtúbulos, através da polimerização e despolimerização dos monômeros de tubulina, são os responsáveis pelo posicionamento das organelas no citoplasma, sendo a via de transporte das mesmas que são carregadas pelas proteínas motoras, conectadas nos filamentos.

A colchicina é uma droga que estabiliza microtúbulos, assim como, promove o rompimento dos filamentos de tubulina do citoesqueleto. É empregada para avaliar o papel dos microtúbulos na internalização microbiana. Assim como a citocalasina D, esta droga não apresentou efeito tóxico para a célula [212] e não altera microfilamentos de actina, junções intercelulares ou a permeabilidade celular [285].

Quando empregada, reduziu significativamente a internalização das leveduras às duas linhagens celulares utilizadas, resultado confirmado por ensaio de plaqueamento.

As células infectadas com *P.brasiliensis* e marcadas com anti- β tubulina demonstraram uma íntima associação entre as leveduras e os microtúbulos, após três horas de contato com células Vero e duas horas de contato com as células da linhagem respiratória. Também, foi marcante a tendência de migração do fungo em direção ao centróssomo celular, através dos microtúbulos. Estes resultados ilustraram uma orientação intracitoplasmática da levedura pelos filamentos de tubulina.

A fagocitose é um processo ativo de englobamento de partículas relativamente grandes (maiores que $0,5\mu\text{m}$ de diâmetro) levando a sua subsequente internalização. Fagócitos profissionais, tais como, macrófagos e neutrófilos, têm papel importante nas defesas do hospedeiro (degradação de microrganismos) e na homeostase (eliminação de células apoptóticas) [279]. Outros tipos de células, como as epiteliais, não são normalmente consideradas fagocíticas, mas são capazes de internalizar partículas extracelulares [278]. Hipoteticamente, na célula epitelial com levedura aderida, ocorreria o mesmo fenômeno, como observado em fagócitos profissionais. Assim, na zona de contato fungo-célula, ocorreu uma modificação do citoesqueleto, através da polimerização da actina, como demonstraram os resultados. Na seqüência, o centróssomo deslocaria os microtúbulos para esta zona de contato, que reorientaria o aparelho de Golgi de forma a determinar um foco direcional com o microrganismo. O fungo seria internalizado e envolto em membrana e o citoesqueleto se rearranjaría novamente, como também observado. No citoplasma, a

levedura estaria posicionada com as vesículas secretórias lisossomais. O arsenal microbicida da célula epitelial é relativamente fraco, quando comparado com macrófagos e outros fagócitos, assim a levedura internalizada poderia continuar viável no citoplasma, funcionando como um mecanismo de escape.

Na paracoccidiodomicose, a habilidade fungicida de neutrófilos é bastante questionada, onde leveduras fagocitadas foram observadas, porém viáveis, sugerindo uma baixa capacidade dos neutrófilos para os digerir [286], sendo-lhes atribuída atividade fungistática [270]. Leveduras foram demonstradas multiplicando-se dentro de macrófagos não ativados [182], porém os macrófagos são células importantes na paracoccidiodomicose [134].

O mecanismo pelo qual o fungo poderia modular o comportamento fungicida do macrófago depende da especificidade de receptores de membrana, da sua natureza, assim como da complementaridade com ligantes fúngicos [131]. A identificação das moléculas superficiais do fungo, que medeiam esta interação e os respectivos receptores dos macrófagos, seriam importantes para o entendimento deste aspecto da interação patógeno-hospedeiro.

Provavelmente, nas células epiteliais e também nos fagócitos há receptores que favoreçam a levedura, na interação parasita-hospedeiro, promovam a invasão e ainda possibilitam a coexistência e multiplicação fúngica dentro delas, viabilizando futura disseminação a outros tecidos. Talvez a resistência ou a susceptibilidade de um hospedeiro para *P.brasiliensis*, poderia ser o estímulo para mecanismos de adesão em células fagocíticas por excelência ou fagocíticas “não profissionais”.

Como a citocalasina D, bloqueia a superfície apical, mas não a basolateral das células, assim como também, qualquer tratamento que comprometa as junções intercelulares resulta em uma redistribuição de receptores das células para o lado apical, poder-se-ia especular que tal redistribuição modularia negativamente a internalização fúngica pelas células, fato que poderia explicar o efeito inibitório na internalização fúngica pelas células epiteliais.

Assim, baseados nos resultados de microscopia e do plaqueamento, foi sugerida a necessidade da polimerização da actina (bloqueada através da citocalasina D) e dos microtúbulos (rompidos pela colchicina), assim como a integridade dos receptores e a exposição da superfície apical, para a internalização de *P.brasiliensis* pelas células epiteliais *in vitro*.

Embora estudos adicionais sejam necessários para melhor entender o real mecanismo da internalização fúngica nas células *in vitro*, os resultados apresentados sugerem que *P.brasiliensis* pode entrar em células, preferencialmente pela superfície apical, por um mecanismo dependente da polimerização da F-actina e tubulina.

As citoqueratinas são proteínas fibrosas, presentes na lâmina nuclear, abaixo do envelope nuclear e que também se estendem para a periferia, onde interagem com a membrana citoplasmática e junções celulares. Tem como função principal dar resistência e sustentação às células e estão classificadas como filamentos intermediários do citoesqueleto [221].

O padrão filamentoso de citoqueratina foi observado nas linhagens celulares em todo o citoplasma e principalmente ao redor do núcleo, além da extensão até os limites da membrana celular. Células leveduriformes quando marcadas com soro anti-citoqueratina

apresentaram uma alta reatividade, sugerindo constituintes fúngicos similares aos da citoqueratina do citoesqueleto.

Alta afinidade, foi também demonstrada, entre a citoqueratina celular e adesinas fúngicas. Porém, houve uma diminuição da marcação da citoqueratina das células, em tempos maiores de contato fungo-célula, sugerindo uma degradação da mesma pelo fungo através da secreção de enzimas específicas.

Tal fato, não foi observado com os outros constituintes do citoesqueleto (actina e tubulina), onde só ocorreu interação entre fungo-célula, enquanto que com a citoqueratina, aparentemente, houve a degradação de substrato como consequência desta interação. A presença de proteases específicas talvez tenha um papel importante na internalização e até na translocação de fungos pelas barreiras epiteliais, que apresentam alta concentração de queratina, que lhes confere resistência natural.

Em geral, a citoqueratina está presente nas membranas citoplasmáticas de epitélios simples, como o epitélio respiratório, e tem função de ancorar o citoesqueleto à membrana protoplasmática.

Assim, *P.brasiliensis* ligou-se aos receptores de citoqueratina na superfície celular, como também demonstrado por imunoblot, através da gp 43 e através de atividade de protease poderia danificar a célula, como demonstrado nas células tratadas com gp 43 e o citoesqueleto de queratina marcado. Também, devido à distribuição de citoqueratina em uma grande área intracelular, a ligação somente poderia ocorrer após a internalização da levedura.

Células epiteliais injuriadas têm níveis altos de citoqueratina expostos [220]. Assim, *P.brasiliensis* poderia aderir preferencialmente às superfícies danificadas, por outros mecanismos, e ligar-se

posteriormente a citoqueratina. Esta ligação pode não ser um fator de virulência, mas sim um mecanismo de defesa do hospedeiro, uma vez que *P.brasiliensis* podendo ligar-se aos epitélios descamativos, também poderá ser eliminado juntamente com a esfoliação.

As conseqüências celulares são desconhecidas para fungos causadores de micoses sistêmicas, uma vez que poucos relatos estão disponíveis na literatura. Foi demonstrado que o papilomavírus promove rearranjo e destruição dos filamentos intermediários [287]. Bactérias como *S.aureus*, *S.pyogenes* e *S.agalactiae* interagem com a citoqueratina 8, presente em células de linhagem respiratória A₅₄₉. Empregando-se cultura de células epiteliais bucais e cepas *Burkholderia cepacia*, foi demonstrado a interação com a citoqueratina 13, por este microrganismo oportunista que causa doença em pulmões de pacientes com fibrose cística [222].

A demonstração definitiva destes fatos requer outros ensaios, pois o papel da interação de *P.brasiliensis* com a citoqueratina na patogênese da doença ainda está obscuro.

A imunoreatividade do sobrenadante da cultura frente aos anticorpos de citoesqueleto (actina, citoqueratina e tubulina), foi avaliada por imunoblot. Os resultados demonstraram a presença de bandas de 43, 70, 88 e 94 kDa, frente ao soro anti-actina e bandas de 40, 43, 55, 70, 86 e 94 kDa frente ao anti-citoqueratina e não houve reatividade frente ao anti-tubulina. Assim, enquanto a adesão parece ser mediada por proteínas superficiais fúngicas com certos receptores de constituintes da matriz extracelular, a interação do fungo com citoesqueleto promove a sua internalização na célula e parece envolver componentes antigênicos elaborados pelo fungo durante a interação com a célula.

A apoptose é uma função celular essencial no desenvolvimento e homeostase de organismos multicelulares; representa a morte induzida pela célula agonizante, que provê as armas para sua própria destruição. Uma das características principais de tal morte programada é a expressão de receptores de superfície específicos que permitem ao fagócito reconhecê-las e engolfá-las, evitando que conteúdos celulares possam causar destruição de tecido, inflamação e apresentação de antígenos intracelulares. Durante a apoptose, as células morrem em anonimato imunológico. A modulação da apoptose em situações patológicas foi descrita para algumas doenças [288, 244].

Ativação ou inibição da apoptose são dois mecanismos que podem estar associados à doença. Exemplo de ativação de apoptose está descrito nas desordens neurodegenerativas, ou a inibição da apoptose resulta em replicação celular descontrolada [289, 290].

Um modelo foi proposto onde, em contraste com a clássica morte imunologicamente silenciosa, as células cometem suicídio no processo inicial da inflamação. Este novo papel para a apoptose poderia ser importante em muitas doenças, inclusive em síndromes infecciosas e talvez em outros processos inflamatórios não infecciosos [291, 290].

Com a indução de apoptose em macrófagos, os microrganismos poderiam realizar duas tarefas: primeiro, matar a célula microbicida mais efetiva no tecido e, assim, evitar sua própria morte; e segundo, estimulando a resposta inflamatória, invadir o tecido como consequência dos danos teciduais desta resposta [288, 292].

Papéis diferentes para a apoptose são atribuídos em diferentes infecções, como por exemplo, a deleção de massas celulares, a inibição

da apoptose e a iniciação da inflamação. Porém, não há nenhuma evidência de fungos que inibem a apoptose.

Em alguns exemplos de apoptose induzida por bactérias, foi verificado que sempre resultam em inflamação: salmonelose, difteria, choque letal por toxina de antraz e listeriose [293].

Mecanismos de apoptose são relevantes na patogênese de infecções microbianas e inflamatórias, talvez até mesmo podendo ser considerada um evento pro-inflamatório [294].

Com base em resultados *in vitro*, foi observada a indução de apoptose em células epiteliais por *P.brasiliensis*, como uma das conseqüências da invasão celular (fato usualmente observado em fagócitos profissionais). A indução da apoptose foi verificada em lamínulas contendo células epiteliais infectadas com *P.brasiliensis*, em vários tempos de incubação, e células não infectadas como controle, empregando-se a técnica do “TUNEL” com sonda fluorescente [244]. Através desta técnica, pode-se marcar células que estão sofrendo fragmentação de DNA, característica específica da morte celular programada, assim como determinar o número de células apoptóticas. Assim, células expostas ao fungo por uma hora, já apresentavam fragmentação de DNA e um aumento significativo no número de células apoptóticas foi verificado em tempos maiores de contato. A partir de três horas foram evidenciados corpos apoptóticos bem característicos e raras leveduras foram observadas nestas células. Também, não foi verificada uma indução significativa de apoptose em tempos menores que uma hora de infecção, assim como no controle não infectado. Desta forma, a modulação da apoptose foi dependente do tempo de exposição ao *P.brasiliensis*.

Considerando que as leveduras levariam algum tempo para alcançar os sítios comuns de infecção, o aparecimento de células apoptóticas em nossos experimentos *in vitro*, poderiam ter importância com a cinética *in vivo*.

A presença de levedura dentro da célula apoptótica, pode ser explicada uma vez que as membranas da célula agonizante não estão íntegras, a levedura poderia escapar antes da morfologia se tornar evidente. Então, para determinar se a indução de apoptose nestas células é diretamente ou indiretamente causada pela invasão fúngica, foi feita uma contagem de células apoptóticas no controle e nas células infectadas. As células controles apresentaram células apoptóticas em número insignificante (2%), demonstrando que a ativação da programação da morte celular foi induzida pelas leveduras. Como nos tempos de três e cinco horas, a maioria das células apoptóticas foram as não infectadas, a indução da apoptose poderia ocorrer por componentes secretados pelo fungo.

A indução da apoptose foi demonstrada em cultura de monócitos infectados com *S.pyogenes*. A comparação entre a cepa selvagem e uma mutante isogênica, protease negativa, indicaram que a produção da exotoxina B, uma cisteínoprotease, foi a responsável pela extensão dos efeitos apoptóticos [295].

Os resultados apresentados aqui demonstram que *P.brasiliensis* é capaz de induzir apoptose *in vitro*, porém experimentos mais acurados conduzidos *in vivo* são necessários para melhor elucidação desta interação, principalmente nas fases iniciais da infecção.

A sobrevivência de *P.brasiliensis* no ambiente intracelular pode beneficiá-lo, por ser um mecanismo protetor contra a resposta imune e os antimicrobianos. Contudo, especula-se a vantagem na modulação

da apoptose. Desde que fagócitos “não profissionais” não possuem maquinaria microbicida eficiente como os macrófagos, a morte delas pode não comprometer a homeostase do organismo. Contudo, a morte de células com *P.brasiliensis* fagocitado, poderia prover uma rota de disseminação a sítios distantes, como focos metastáticos. Outra hipótese seria que estas células apoptóticas com o fungo fagocitado, serviriam como um veículo para a entrada em macrófagos sem o estímulo das atividades microbicidas.

Uma provável sucessão de eventos nas células epiteliais *in vitro* poderia consistir da adesão, translocação das leveduras para o citoplasma das células, multiplicação e a indução de apoptose, porém a correlação com a patogênese *in vivo* poderia elucidar talvez a presença da resposta inflamatória inicial observada na paracoccidioidomicose.

A ocorrência da apoptose foi observada, em números aumentados, em células epiteliais alveolares, em indivíduos com fibrose idiopática pulmonar (IPF). Este resultado possibilitou uma provável explicação para perda prévia de células epiteliais observada na fibrose pulmonar, e também que esta perda é crítica a uma fibrose subsequente [296]. Se é ou não verdadeiro este fato, entender e manipular os reguladores da morte da célula epitelial pulmonar poderia prover novas perspectivas quanto ao início deste processo inexorável.

Assim, aqui foram estudadas e descritas as características da interação entre *P.brasiliensis* e células epiteliais *in vitro*. A adesão foi demonstrada, assim como a interação de *P.brasiliensis* com proteínas da matriz extracelular, expandindo, desta forma, o número de componentes com os quais *P.brasiliensis* pode interagir. Esta abordagem foi bastante útil e promissora, pois permitiu a análise a

nível molecular, impossível de se obter em outros modelos. Também, pela atividade proteolítica dos antígenos solúveis de *P.brasiliensis* poderia haver a degradação da laminina e fibronectina no sítio de contato, aumentando a atividade invasiva. Melhor caracterização desta interação seria necessária para estabelecer a identidade completa das adesinas do fungo e a similaridade com outros receptores de proteínas da MEC, possibilitando a compreensão desde a migração até a invasão de tecidos pelos fungos.

O envolvimento do citoesqueleto foi também avaliado e proposto prováveis mecanismos para a interiorização celular do microrganismo. A atividade da gp 43 também foi demonstrada na invasão. Esta propriedade de coexistir na forma intracelular poderia explicar diversos aspectos da relação parasita-hospedeiro *in vivo*, como o estabelecimento de infecções crônicas.

Outro importante dado foi a modulação da apoptose por *P.brasiliensis* nas células. A repercussão destes resultados, assim como analogias com situações *in vivo*, ainda é incerta, contudo eles sugerem que *P.brasiliensis* é um patógeno com alto potencial adaptativo e versátil, com várias possibilidades de virulência, porém a patogênese é modulada pelo hospedeiro.

Os resultados *in vitro* aqui apresentados e os de novos estudos conduzidos *in vivo*, poderão conduzir ao conhecimento da dinâmica da doença e, talvez, no futuro contribuir para o desenvolvimento de terapias que aborem a capacidade de colonização do fungo, modificando assim a interação patógeno-hospedeiro.

7. Conclusões

- Houve maior afinidade de *P.brasiliensis* pelas células epiteliais respiratórias (A₅₄₉), observada na cinética de interação com as células.
- Anticorpos anti-fibronectina, anti-laminina e anti-colágeno I foram reativos nas células das duas linhagens empregadas, assim como em *P.brasiliensis*, sugerindo a presença destes constituintes da matriz extracelular nas células e seqüências protéicas semelhantes nos fungos, assim como a participação destes na adesão.
- A fibronectina e a laminina apresentaram-se com padrões diferentes nas células quando infectadas (puntiforme e difuso) ou não (filamentoso e difuso), sugerindo que durante a interação fungo-célula, além da ligação destes com constituintes fúngicos, ocorreu também a degradação.
- Os filamentos de actina e os microtúbulos estão envolvidos durante a invasão de *P.brasiliensis* às células, uma vez que a citocalasina D e a colchicina inibiram este mecanismo, sugerindo que a endocitose pode ser um dos mecanismos de invasão.
- Aparentemente, a gp 43 está envolvida na interação com os filamentos de actina e citoqueratina celulares.
- A elaboração de componentes antigênicos pelo fungo, foi observada, durante a interação com a célula. Alguns desses componentes foram reconhecidos por soros anti-actina e anti-citoqueratina, sugerindo sua participação na invasão.
- *P.brasiliensis* ligou-se aos filamentos de citoqueratina e, aparentemente, produziu componentes que os degradaram de acordo com o tempo de exposição às células.

- Apoptose nas células, foi evidenciada, como uma das conseqüências da invasão por *P.brasiliensis*.

8. Referências Bibliográficas

- 01 Troyanovsky, S.M. Mechanism of cell-cell adhesion complex assembly. *Curr.Opin. Cell Biol.* 1999; **11**: 561-566.
- 02 Buckley, C.D., Rainger, G.E., Bradfield, P.F., Nash, G.B., and Simmons, D.L. Cell adhesion: more than just glue. *Mol.Membr.Biol.* 1998; **15**:167-176.
- 03 Finlay, B.B. & Falkow, S. Common themes in microbial pathogenicity. *Microbiol.Rev.* 1989; **53**:210-230.
- 04 Ho, M. & White, N.J. Molecular mechanisms of cytoadherence in malaria. *Am.J.Physiol.* 1999; **276**:1231-1242.
- 05 Liakra, K.A. & Artio-Harmernen, H. Distribution of the extracellular matrix proteins tenascin, fibronectin and vitronectin in fetal infant and adult human spleens. *J.Histochem.Cytochem.* 1992; **40**:1203-1210.
- 06 Finlay, B.B. Cell adhesion and invasion mechanisms in microbial pathogenesis. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 1990; **2**:815-820.
- 07 Finlay, B.B. Molecular genetic approaches to understanding bacterial pathogenesis. Molecular biology of bacterial infections. Current status and future perspectives. New York: Cambridge University Press, 1992.
- 08 Klotz, S.A. & Moca, R.D. Endothelial cell contraction increases *Candida* adherence to exposed extracellular matrix. *Infect.Immun.* 1988; **56**:2495-2498.
- 09 Franco, M.F. Host-parasite relationship in paracoccidioidomycosis. *J.Med.Vet. Mycol.* 1987; **25**:5-18.
- 10 San-Blas, G. Cell wall of fungal human pathogens: its possible role in host-parasite relationships. A review. *Mycopathologia* 1982; **79**:159-184.
- 11 Puccia, R., Schenkman, S., Gorin, P.A.J., Travassos, L.R. Exocellular components of *Paracoccidioides brasiliensis*: identification of a specific antigen. *Infect.Immun.* 1986; **53**:199-206.
- 12 Mendes-Giannini, M.J.S., Bueno, J.P., Shikanai-Yasuda, M.A., Ferreira, A.W., Masuda, A. Detection of the 43.000-molecular-weight glycoprotein

- in sera of patients with paracoccidioidomycosis. *J.Clin.Microbiol.* 1989; **27**:2842-2845.
- 13 Salina, M.A., Shikanai-Yasuda, M.A., Mendes, R.P., Barraviera, B., Mendes-Giannini, M.J.S. Detection of circulating *Paracoccidioides brasiliensis* antigen in urine of paracoccidioidomycosis patients before and during treatment. *J.Clin.Microbiol.* 1998; **36**:1723-1728.
- 14 Mendes-Giannini, M.J.S., Moraes, R.A., Ricci, T.A. Proteolytic activity of the 43,000 molecular weight antigen secreted by *Paracoccidioides brasiliensis*. *Rev.Inst.Med.Trop.* 1990; **32**:385-387.
- 15 Travassos, L.R., Puccia, R., Carmona, P., Taborda, C., Rodrigues, E., Rodrigues, M., Silveira, J., Almeida, I. Biochemistry and molecular biology of the main diagnostic antigen of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Arch.Med.Res.* 1995; **26**: 297-304.
- 16 Hanna, S.A. Estudo dos mecanismos e fatores de virulência de *Paracoccidioides brasiliensis* em culturas de células. Dissertação (Mestrado). Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista. Rio Claro, 1996, 166p.
- 17 Vicentini, A.P., Gesztes, 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.* 1994; **62**:1465-1469.
- 18 Puccia, R., Carmona, A.K., Gesztes, J.L., Juliano, L., Travassos, L.R. Exocellular proteolytic activity of *Paracoccidioides brasiliensis*: cleavage of components associated with the basement membrane. *Med.Mycol.* 1998; **36**:354-358.
- 19 Carmona, A.K., Puccia, R., Oliveira, M.C.F., Rodrigues, E.G., Juliano, L. Characterization of an exocellular serine-thiol proteinase activity in *Paracoccidioides brasiliensis*. *Biochem.J.* 1995; **309**:209-214.
- 20 Mendes-Giannini, M.J.S., Hanna, S.A., Ricci, L.C. Salina, M.A. Fatores envolvidos na patogênese fúngica. *Rev.Ciê.Farm.São Paulo* 1997; **18**(2):207-229.

- 21 Alace, S., Larcher, C., Ebenbichler, C. Isolation and biochemical characterization of the iC_{3b} receptor of *Candida albicans*. *Infect.Immun.*1993; **61**:1395-1399.
- 22 Bouchara, J.P., Tronchin, G., Annaix, V., Robert, R., Senet, J.M. Laminin receptors on *Candida albicans* germ tubes. *Infect. Immun.* 1990; **58**:48-54.
- 23 Calderone, R.A. Recognition between *Candida albicans* and host cells. *Trends. Microbiol.* 1993; **1**:55-58.
- 24 Lopez-Ribot, J.L., Casanova, M., Monteagudo, C. Sepulveda, P., Martinez, J.P. Evidence for the presence of a high-affinity laminin-receptor-like molecule on the surface of *Candida albicans* yeast cells. *Infect. Immun.* 1994; **62**:742-746.
- 25 Bouali, A., Robert, R., Tronchin, G., Senet, J.M. Characterization of binding of human fibrinogen to the surface of germ tubes and mycelium of *Candida albicans*. *J.Gen. Microbiol.* 1987; **133**:545-551.
- 26 Casanova, M., Lopez-Ribot, J.L., Monteagudo, C., Lombart-Bosch, A., Sentandreu, R., Martinez, J.P. Identification of a 58-kilodalton cell surface fibrinogen-binding mannoprotein from *Candida albicans*. *Infect.Immun.* 1992; **60**:4221-4229.
- 27 Kalo, A., Segal, E., Sahar, E., Dyan, S. Interaction of *Candida albicans* with genital mucosal surfaces: involvement of fibronectin in adherence. *J.Infect.Dis.* 1988; **157**:1253-1256.
- 28 Klotz, S.A. & Smith, R.L. A fibronectin receptor on *Candida albicans* mediates adherence of the fungus to extracellular matrix. *J. Infect. Dis.* 1991; **163**:604-610.
- 29 Skerl, K.G., Calderone, R.A., Segal, E., Sreevalsan, T., Scheld, W. M. *In vitro* binding of *Candida albicans* yeast cells to human fibronectin. *Can.J.Microbiol.* 1983; **30**: 221-227.
- 30 Klotz, S.A. Adherence of *Candida albicans* to components of the subendothelial extracellular matrix. *FEMS Microbiol. Lett.* 1990; **68**:249-254.

- 31 Klotz, S.A., Smith, R.L., Stewart, B.W. Effect of an arginine-glycine-aspartic acid-containing peptide on hematogenous candidal infections in rabbits. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1992; **36**:132-136.
- 32 Tronchin, G., Bouchara, J.P., Ferron, M., Larcher, G., Chabasse, D. Cell surface properties of *Aspergillus fumigatus* conidia: correlation between adherence, agglutination and rearrangements of the cell wall. *J. Microbiol.* 1993; **41**: 714-742.
- 33 Tronchin, G., Esnalt, K., Renier, G., Filmon, R., Chabasse, D., Bouchara, J.P. Expression and identification of a laminin-binding protein a *Aspergillus fumigatus* conidia. *Infect. Immun.* 1997; **1**:9-15.
- 34 Mc Mahon, J.P., Wheat, J., Sobel, M.E., Pasula, R., Downing, J.F., Martin, W.J. Murine Laminin binds to *Histoplasma capsulatum*. A possible mechanism of dissemination. *J.Clin.Inv.* 1995; **96**:1010-1017.
- 35 Lima, O.C., Figueredo, C.C., Morandi, V., Lopes-Bezerra, L.M. Adhesion of *Sporothrix schenckii* to several extracellular matrix proteins. In: Simec – 5º Simpósio Brasileiro Sobre Matriz Extracelular, Angra dos Reis - RJ, 1998.
- 36 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.* 1994; **32**:189-197.
- 37 Mendes-Giannini, M.J.S., Ricci, L., Uemura, M.A., Toscano, E., Arns, C.W. Invasion of Vero cells by *Paracoccidioides brasiliensis*. *Rev. Arg. Micol.* 1992; **15**:29-36.
- 38 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.* 2000; **2**(8): 877-884.
- 39 Monteiro da Silva, J.L. Aderência, ligação a fibronectina e invasão de *P.brasiliensis* em cultura de células Vero. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – Universidade Estadual Paulista. Araraquara, 2000, 120p.

- 40 Kadurgamuwa, J.L., Rhode, M., Wehland, J. Intercellular spread of *Shigella flexneri* through a monolayer mediated by membranous protusions and associated with reorganozation of the cytoskeletal protein vinculin. *Infect.Immun.* 1991; **43**:3463-3471.
- 41 Kihlström, E. Infection of HeLa cells with *Salmonella typhimurium* 395 MS and MR10 bacteria. *Infect. Immun.* 1977; **17**:290-295.
- 42 Smith, T. An attempt to interpret present-day uses of vacines. *JAMA* 1913; **60**:1591-1599.
- 43 Zinsser, H. Infection and resistance. New York: The Macmillan Company 1914. p.1-27.
- 44 Lipsitch, M. & Moxon, E.R. Virulence and transmissibility of pathogens: what is the relationship? *Trends Microbiol.* 1997; **5**:31-37.
- 45 Watson, D.W & Brandly, C.A. Virulence and pathogenicity. In Clifton, C.E., Raffel, S., Barker, H.A. (ed.). Annual review of microbiology. Stanford, California: Annual Reviews, Inc. 1949. p.195-571.
- 46 Dubos, R.J. The bacterial cell. London, United Kingdom: Harvard University Press1945. p.188-228.
- 47 Smith, H. Microbiol surfaces in relation to pathogenicity. *Bacteriol.Rev.* 1977; **41**:475-500.
- 48 Hoeprich, P.D. Host-parasite relationships and the pathogenesis of infectious disease. In Hoeprich, P.D. (ed.). Infectious diseases. Philadelphia, Pa: Harper & Row 1983. p.45-60.
- 49 Falkow, S. Molecular Koch's postulates applied to microbial pathogenicity. *Rev. Infect. Dis.* 1988; **10**(Suppl 2): S274-S276.
- 50 Brubaker, R.R. Mechanisms of bacterial virulence. *Annu.Rev. Microbiol.* 1985; **39**:21-50.
- 51 Deitsch, K.W., Moxon, E.R. Wellems, T.E. Shared themes of antigenic variation and virulence in bacterial protozoal and fungal infections. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 1997; **61**:281-293.

- 52 Casadevall, A. & Pirofski, L.A. Host-pathogen interactions: redefining the basic concepts of virulence and pathogenicity. *Infect. Immun.* 1999; **67**:3703-3713.
- 53 Sparling, P.F. Bacterial virulence and pathogenesis: an overview. *Rev. Infect. Dis.* 1983; **5**(Suppl.4): S637-S646.
- 54 Finlay, B.B & Falkow, S. Common themes in microbial pathogenicity revisited. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 1997; **61**:136-169.
- 55 Evans, Z.A. Tissue responses to the blastospores and hyphae of *Candida albicans* in the mouse. *J.Med.Microbiol.* 1970; **9**: 307-310.
- 56 Jones, G.W. & Isaacson, R.E. Proteinaceous bacterial adhesins and their receptors. *Crit. Rev. Microbiol.* 1983; **10**:229-260.
- 57 Noble, W.C. Observation on the surface flora of the skin and the skin pH. *Braz.J. Dermatol.* 1968; **80**: 279-284.
- 58 Watanabe, T., Sato, H., Hatakeyama, Y., Matsuzawa, T., Kawai, M., Aizawa, C. Cloning of the gene coding for *Staphylococcus hyicus* exfoliative toxin B and its expression in *Escherichia coli*. *J.Bacteriol.* 2000; **182**(14): 4101-4103.
- 59 Kimura, L.H. & Pearsall, N.N. Adherence of *Candida albicans* to human buccal epithelial cells. *Infect. Immun.* 1978; **21**:64-68.
- 60 Beachey, E. H. Epithelial cell binding of group A streptococci by lipoteichoic acid on fimbriae censored of M protein. *J.Infect.Dis.* 1981; **143**:315-345.
- 61 Fukasawa, Y. & Kagaya, K. Molecular bases of adhesion of *Candida albicans*. *J.Med. Vet. Mycol.* 1997; **35**:87-99.
- 62 Patti, J.M., Allen, B.L., McGavin, M.J., Hook, M. MSCRAMM-mediated adherence of microorganisms to host tissues. *Annu. Rev. Microbiol.* 1994; **48**:585-617.
- 63 Dramsi, S. & Cossart, P. Intracellular pathogens and actin cytoskeleton. *Annu. Rev.Cell Dev. Biol.* 1998; **14**:137-166.
- 64 Stappert, J., Kemler, R. Intracellular associations of adhesion molecules. *Curr.Opin. Neurobiol.* 1993; **3**: 60-66.

- 65 Ekblom, P., Vestweber, D., Kemler, R. Cell-matrix interactions and cell adhesion during development. *Annu. Rev. Cell Biol.* 1986; **2**:27-48.
- 66 Wight, T.N., Kinsella, M.G., Qwarnström, E.E. The role of proteoglycans in cell adhesion, migration and proliferation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 1992; **4**: 793-801.
- 67 Kostrzynska, M., Schalen, C., Wadstrom, T. Specific binding of collagen type IV to *Streptococcus pyogenes*. *FEMS Microbiol.Lett.* 1989; **50**:229-233.
- 68 Van Der Rest, M. & Garrone, R. Collagen family of proteins. *FASEB J.* 1991; **5**: 2814-2824.
- 69 Kleinman, H. K., Cannon, F.B., Laurie, G.W., Hassel, J.R., Aumailley, M., Terranova, V.P., Martin, G.R., Dubois-Dalcq, M. Biological activities of laminin. *J.Cell Bioch.* 1985; **27**:317-325.
- 70 Timpl, R., Rodhe, H., Gehron Robey, P., Rennard, S.I., Foidart, J.M., Martin, G.R. Laminin a glycoprotein from basement membranes. *J.Biol.Chem.* 1979; **254**: 9933-9937.
- 71 Burgeson, R.E., Chiquet, M., Deutzmann, R., Ekblom, P., Engel, J., Kleinman, H., Martin, G.R., Meneguzzi, G., Paulsson, M., Sanes, J. A new nomenclature for the laminins. *Matrix Biol.* 1994; **14**: 209-211.
- 72 Chen, W.T. Membrane proteases: roles in tissue remodeling and tumour invasion. *Curr. Opin. Cell Biol.* 1992; **4**:802-809.
- 73 Matrisian, L.M. The matrix-degrading metalloproteinases. *Bioassays* 1992; **14**:455-463.
- 74 Hynes, R.O. Integrins: a family of cell surface receptors. *Cell* 1987; **48**:549-554.
- 75 Colognato, H., Winkelmann, D.A., Yurchenco, P.D. Laminin polymerization induces a receptor-cytoskeleton network. *J.Cell Biol.* 1999; **145**(3): 619-631.
- 76 Ingber, D.E. Cellular tensegrity: defining new rules of biological design that govern the cytoskeleton. *J.Cell Science* 1993; **104**:613-627.

- 77 Diamond, J.M. The epithelial junction: bridge, gate and fence. *Physiologist* 1977; **20**:10-18.
- 78 Bershadsky, A. D., Vasiliev, J.M. Cytoskeleton. New York: Plenum Press, 1988.
- 79 Amos, L.A. & Amos, W.B. Molecules of the cytoskeleton. New York: Guilford Press, 1991.
- 80 Kreis, T.E. Role of microtubules behavior of organization of the Golgi apparatus. *Cell Motil. Cytoskeleton* 1990; **15**:67-70.
- 81 Stewart, M. Intermediate filament structure and assembly. *Curr. Opin. Cell Biol.* 1993; **5**: 3-11.
- 82 Coulombe, P.A. The cellular and molecular biology of keratins: beginning a new era. *Curr. Opin. Cell Biol.* 1993; **5**:17-29.
- 83 Albornoz, M.B. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from rural soil in Venezuela. *Sabouraudia* 1971; **9**:248-253.
- 84 Naiff, R.D., Ferreira, L.C.L., Barret, T.V., Naiff, M.F., Arias, J.R. Enzootic paracoccidioidomycosis in armadillos (*Dasypus novemcinctus*) in the State of Para. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 1986; **28**:19-27.
- 85 Naiff, R.D. & Barret, T.V. Novos registros de *Paracoccidioides brasiliensis* em tatus (*Dasypus novemcinctus*). In: XI Congresso Brasileiro de Parasitologia, São Paulo Brasil, 1989.
- 86 Negroni, P. El *Paracoccidioides brasiliensis* vive saprofiticamente en el suelo argentino. *Prensa Med. Argent.* 1966; **53**: 2381-2382.
- 87 Restrepo, A. The ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*: a puzzle still unsolved. *J. Med. Vet. Mycol.* 1985; **23**:323-334.
- 88 Bagali, E., Sana, A., Coelho, K.I., Alquati, S., Miyaji, M., Camargo, Z.P. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillos (*Dasypus novemcinctus*) captured in an endemic area of paracoccidioidomycosis. *Am.J.Trop.Med.Hyg.* 1998; **58**:505-512.
- 89 Silva-Vergara, M.L., Martinez, R., Camargo, Z.P., Malta, M.H., Maffei, C.M., Chadu, J.B. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from

- armadillos (*Dasypus novemcinctus*) in an area where the fungus was recently isolated from soil. *Med. Mycol.* 2000; **38**:193-199.
- 90 Restrepo-Moreno, A. Ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*. In: Franco M., Lacaz, C.S., Restrepo Moreno C., Del Negro G. (ed.). Boca Raton: CRC Press, Paracoccidioidomycosis 1994.
- 91 Franco, M., Bagali, E., Scapolio, S., Lacaz, C.S. A critical analysis of isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from soil. *Med. Mycol.* 2000; **38(3)**: 185-191.
- 92 Negroni, P. Estudios sobre la ecologia del *Paracoccidioides brasiliensis* en la Argentina. *Torax* 1968; **17**: 60-62.
- 93 Rogers, A.L. & Beneke, E.S. Human pathogenic fungi recovered from brazilian soils. *Mycopathol. Mycol. Appl.* 1964; **22**:15-20.
- 94 Ferreira, M.S., Freitas, L.H., Lacaz, C.S., Del Negro, G.M.B., Melo, N.T., Garcia, N.M., Assis, C.M., Salebian, A., Heins Vaccari, E.M. Isolation and characterization of a *Paracoccidioides brasiliensis* strain from a dog food probably contaminated with soil in Uberlândia, Brazil. *J. Med. Vet. Mycol.* 1990; **28**:253-6.
- 95 Vergara, M.L.S., Martinez, R., Chadu, M.A., Madeira, M., Silva, G.F., Maffei, C.M.L. Isolamento de nova amostra do *Paracoccidioides brasiliensis* em plantaço de café. In: VI Encuentro International Sobre Paracoccidioidomycosis. II Simposio Iberoamericano Sobre Relation Hongo-Hospedeiro, Montevideo-Uruguai, 1996, p.80.
- 96 Costa, E.O., Fava Netto, C. Contribution to the epidemiology of paracoccidioidomycosis and histoplasmosis in the State of São Paulo, Brazil. Paracoccidioidin and Histoplasmin intradermic test in the domestic animals. *Sabouraudia* 1978; **16**:93-101.
- 97 Greer, D.L., Bolanos, B. Role of bats in the ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*. The survival of *Paracoccidioides brasiliensis* in the intestinal tract of fructivorous bat. *A. lituratus*. *Sabouraudia* 1977; **15**:273-82.
- 98 Mós, E.N. & Fava Netto, C. Contribuição ao estudo da paracoccidioidomycose. Possível papel epidemiológico dos cães. Estudo

- sorológico e anátomo-patológico. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 1974; **16**:154.
- 99 Del Negro, G., Lacaz, C.S., Fiorillo, A.M. Paracoccidioidomicose (Blastomicose sul americana). São Paulo: Sarvier 1982.
- 100 Franco, M., Lacaz, C.S., Restrepo-Moreno, A., Del Negro, G. Paracoccidioidomycosis. Boca Raton: CRC Press, 1994.
- 101 Mc Ewen, J.G., Bedoya, V., Patino, M.M., Salazar, M.E., Restrepo, A. A experimental murine paracoccidioidomycosis induced by inhalation of conidia. *J. Med. Mycol.* 1987; **25**:165-175.
- 102 Lacaz, C.S., Passos Filho, M.C.R., Fava Netto, C., Macarron, B. Contribuição para o estudo da “blastomicose-infecção”. Inquérito com a paracoccidioidina. Estudo sorológico e clínico-radiológico dos paracoccidioidinos-positivos. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 1959; **1**:245.
- 103 Posada, G.H. Encuesta sobre la tuberculosis, la histoplamosis y la paracoccidioidomycosis en un hospital de tuberculosos. *Antioq. Med.* 1968; **18**:49-51.
- 104 Molese, A., Pane, A., Viangiani, A., Pagano, A. Su un caso di granulomatosi paracoccidioidea (Malattia di Lutz-Splendore De Almeida). *G.Mal.Infec.* 1957; **9**:241-242.
- 105 Oliveira, H. & Baptista, A.P. Um caso de blastomicose sul americana (23 anos de incubação). Ação da sulfametoxipiridazina. *Coimbra Med.* 1960; **7**:661-664.
- 106 Pereiro, M.M. Dos casos de blastomycosis sulamericana observados en España. *Acta Dermo-Sifilogr. Madrid* 1974; **65**:509.
- 107 Motta, L.C. Granulomatose paracoccidióidica. Forma orgânica isolada. *Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. São Paulo* 1956; **11**:353-355.
- 108 Restrepo-Moreno, A. Mycosis in Colombia. A review of the national literature. *Torax* 1968; **17**(1): 99-103.

- 109 Londero, A.T. Epidemiologia. In: Del Negro, G., Lacaz C.S., Fiorillo A.M. (ed.). Paracoccidioidomicose. São Paulo: Sarvier 1982, p. 85-90.
- 110 Brummer, E., Restrepo, A., Hanson, L.H., Stevens, D.A. Virulence of *Paracoccidioides brasiliensis*: The influence of *in vitro* passage and storage. *Mycopathologia* 1990; **109**:13-18.
- 111 Restrepo, A., Salazar, M.E., Cano, L.E., Stover, E.P., Feldman, D., Stevens, D.A. Estrogens inhibit mycelium to yeast transformation in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*: implications for resistance of females to paracoccidioidomycosis. *Infect. Immun.* 1984; **46**:346-353.
- 112 Restrepo-Moreno, A. Paracoccidioidomycosis. In Murphy, J.W., Friedman, H., Bendinlli. (ed.). Fungal infections and immune responses. New York: Plenum Press 1993. p. 251-76.
- 113 Salazar, M.E., Restrepo, A., Stevens, D.A. Inhibition by estrogens of conidium to yeast conversion in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Infect.Immun.* 1988; **56**:711-713.
- 114 San-Blas, G. Paracoccidioidomycosis and its etiologic agent *Paracoccidioides brasiliensis*. *J.Med.Vet.Mycol.* 1993; **31**: 99-113.
- 115 Mendes, R.P. The gamut of clinical manifestations. In: Paracoccidioidomycosis. Franco M., Lacaz C.S., Restrepo Moreno A., Del Negro G. Paracoccidioidomycosis. (ed.) Boca Raton: CRC Press 1994.
- 116 Rios-Gonçalves, A.J., Terra, G.M.F., Rosembaum, R., Nogueira, S.A., Mesquita, C.C., Londero, A.T. Paracoccidioidomicose em crianças de três anos de idade. Apresentação de dois casos. *Arq.Bras.Med.* 1996; **70**:73-79.
- 117 Colares, S.M., Marcantônio, S., Zambonato, S., Severo, L.C. Paracoccidioidomicose aguda/subaguda disseminada. Primeiro caso no Rio Grande do Sul. *Rev.Soc.Bras.Med.Trop.* 1998; **31**(6):563-567.
- 118 Saint-Germain, G. & Summerbell, R. Identifying filamentous fungi: a clinical laboratory handbook. Belmont, CA: Star Publ. 1995.
- 119 Bialek, R., Ibricevic, A., Fothergill, A., Begerow, D. Small subunit ribosomal DNA sequence shows *Paracoccidioides brasiliensis* closely

- related to *Blastomyces dermatitidis*. *J.Clin.Microbiol.* 2000; **38**(9): 3190-3193.
- 120 Guarro, J., Gené, J., Stchigel, A.M. Developments in fungal taxonomy. *Clin.Microbiol.Rev.* 1999; **12**(3):454-500.
- 121 Lacaz, C.S. *Paracoccidioides brasiliensis*: morphology, evolutionary cycle, maintenance during saprophytic life, biology, virulence, taxonomy. In: Franco M., Lacaz C. S., Restrepo Moreno A., Del Negro G. *Paracoccidioidomycosis*. (ed.) Boca Raton: CRC Press *Paracoccidioidomycosis* 1994. p.20-27.
- 122 San-Blas, F. & San-Blas, G. Bioquímica y dimorfismo en *Paracoccidioides brasiliensis*. In: Del Negro, G., Lacaz, C.S., Fiorillo, A.M. *Paracoccidioidomycosis*. (ed.) São Paulo: Sarvier 1982, p.35-58.
- 123 Paris, S., Duran-Gonzales, M., Mariat, F. Nutritional studies on *Paracoccidioides brasiliensis* the role of organic sulfur in dimorphism. *J.Med.Vet.Mycol.* 1985; **23**:85-92.
- 124 Carbonell, L.M. Cell wall during the budding process of *Paracoccidioides brasiliensis* and *Blastomyces dermatitidis*. *J. Bacteriol.* 1967; **94**:213-223.
- 125 Queiroz-Telles, F.F. Aspectos ultra estruturais da parede celular do *P. brasiliensis* nas fases micelial e leveduriforme. *Rev. Path. Trop.* 1987; **16**:47-61.
- 126 Edwards, M.R., Salazar, M.E., Samsonoff, W.A., Cano, L.E., Ostrander, G.A., Restrepo, A. Electron microscopic study of conidia produced by the mycelium of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Mycopathologia* 1991; **114**:169-177.
- 127 Bustamante, S.B., Mcewen, J.G., Tabares, A.M., Arango, M., Restrepo-Moreno, A. Characteristics of the conidia produced by the mycelial form on the *Paracoccidioides brasiliensis*. *Sabouraudia* 1985; **23**:407-414.
- 128 Travassos, L. R. Immunochemistry of *Paracoccidioides brasiliensis* antigens. In: Franco, M., Lacaz, C. S., Restrepo-Moreno, A., Del Negro, G. *Paracoccidioidomycosis* (ed.) Boca Raton: CRC Press 1994.

- 129 Furtado, J.S., Brito, T., Freymuller, E. The structure and reproduction of *Paracoccidioides brasiliensis* in human tissue. *Sabouraudia* 1967; **5**:226-229.
- 130 Ofek, I., Kahane, I., Sharon, N. Toward anti-adhesion therapy for microbial diseases. *Trends Microbiol.* 1996; **4**:297-299.
- 131 Almeida, S.R., Unterkircher, C.S., Camargo, Z.P. Involvement of the major glycoprotein (gp 43) of *Paracoccidioides brasiliensis* in attachment to macrophages. *Med. Mycology* 1998; **36**(6): 405-411.
- 132 Brummer, E., Castaneda, E., Restrepo, A. Paracoccidioidomycosis: an update. *Clin. Microbiol. Rev.* 1993; **6**: 89-117.
- 133 Hogan, L.H., Klein, B.S., Levitz, S.M. Virulence factors of medically important fungi. *Clin. Microbiol. Rev.* 1996; **9**(4): 469-488.
- 134 Kurokawa, C.S., Sugizaki, M.F., Peraçoli, M.T. Virulence factors in fungi of systemic mycoses. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 1998; **40**:125-135.
- 135 San-Blas, G., San-Blas, F., Ormaechea, E., Serrano, L.E. Cell wall analysis of adenine requiring mutant of the yeast like form of *Paracoccidioides brasiliensis* strain IVIC Pb9. *Sabouraudia* 1977; **15**:297-303.
- 136 Hogan, L.H. & Klein, B.S. Altered expression of surface a 1,3-glucan in genetically related strain of *Blastomyces dermatidis* that differ in virulence. *Infect. Immun.* 1994; **62**:3543-3546.
- 137 Zacharias, D., Veda, A, Moscardi-Bachi, M., Franco, M., San-Blas, G.A. A comparative histopathological, immunological and biochemical study of experimental intravenous paracoccidioidomycose induced in mice by three *Paracoccidioides brasiliensis* isolates. *J. Med. Vet. Mycol.* 1986; **24**: 445-454.
- 138 Franco, M., Mendes, R.P, Moscardi-Bachi, M. Paracoccidioidomycosis. *Bailliere's Clin. Trop. Med. Commun. Dis.* 1989; **4**:185-220.
- 139 Kashino, S.S., Singer-Vermes, L.M., Calich, V.L.G., Burger. E. Alterations in the pathogenicity of one *Paracoccidioides brasiliensis*

- isolate do not correlate with its *in vitro* growth. *Mycopathologia* 1990; **109**:173-180.
- 140 Peraçoli, M.T.S., Sugizaki, M.F., Mendes, R.P., Naiff, R.D., Sartori, A., Montenegro, M.R. Estudo da virulência de amostra de *Paracoccidioides brasiliensis* isolada de tatu (*Dasypus novemcinctus*). *Rev.Argent.Micol.* 1992; **15**:41-45.
- 141 Svidzinski, T.I., Miranda-Neto, M.H., Santana, R.G., Fischman, O., Colombo, A.L. *Paracoccidioides brasiliensis* isolates obtained from patients with acute and chronic disease exhibit morphological differences after animal passage. *Rev.Inst.Med.Trop. São Paulo* 1999; **41**(5): 279-283.
- 142 Singer-Vermes, L.M., Burger, E., Franco, M.J., Moscardi Bachi, M., Mendes-Giannini, M.J.S., Calich, V.L.C. Evaluation of the *Paracoccidioides brasiliensis* isolates in susceptible in bred mice. *J. Med. Vet. Mycol.* 1989; **27**:71-82.
- 143 Singer-Vermes, L.M., Burger, E., Calich, V.L.G., Modesto Xavier, L.H. Pathogenicity and immunogenicity of *Paracoccidioides brasiliensis* isolates in the human disease and in experimental murine model. *Clin.Exp.Immunol.* 1994; **97**:113-119.
- 144 Yarzabal, L. Composición antigênica do *Paracoccidioides brasiliensis*. In: Del Negro, G., Lacaz, C.S., Fiorillo, A. M. *Paracoccidioidomicose* (ed.) São Paulo: Sarvier 1982.
- 145 Restrepo, M. A. & Drouhet, E. Étude des anticorps précipitants dans la blastomycose sud-américaine par l'analyse immunoélectrophorétique des antigènes de *Paracoccidioides brasiliensis*. *Ann. Inst. Pasteur* 1970; **119**:338-346.
- 146 Yarzabal, L. A., Bigueti, J., Varicelle, T., Andrieu, S., Torres, J.M., Da Luz, S. Análisis imunquímica de extratos solubles de *Paracoccidioides brasiliensis*. *Sabouraudia* 1973; **11**: 80-88.

- 147 Conti-Díaz, I.A., Somma-Moreira, R.E., Gezuele, E., Giménez, A.C., Pena, M.I., Mackinnon, J.E. Immunoelectroosmophoresis-immunodiffusion in paracoccidioidomycosis. *Sabouraudia* 1973; **11**:39-41.
- 148 Camargo, Z.P., Unterkircher, C., Campoy, S.P., Travassos, L.R. Production of *Paracoccidioides brasiliensis* exoantigens for immunodiffusion tests. *J.Clin.Microbiol.* 1988; **26**:2147-2151.
- 149 Puccia, R., Takaoka, D.T., Travassos, L.R. Purification of the 43 kDa glycoprotein from the exocellular components excreted by *Paracoccidioides brasiliensis* in liquid cultura (TOM medium) [Short communication]. *J. Med.Vet.Mycol.* 1991; **29**:57-60.
- 150 Yarzabal, L.A., Andrieu, S., Bout, D., Naquira, F. Isolation of a specific antigen with alkaline phosphatase activity from soluble extracts of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Sabouraudia* 1976; **14**: 275-280.
- 151 Yarzabal, L.A., Bout, D., Naquira, F., Fruit, J., Andrieu, S. Identification and purification of the specific antigen of *Paracoccidioides brasiliensis* responsible for the immunoelectrophoretic band E. *Sabouraudia* 1977; **15**: 79-85.
- 152 Blotta, M.H.S. & Camargo, Z. P. Immunological response to cell-free antigens of *Paracoccidioides brasiliensis*: relationship with clinical forms. *J.Clin.Microbiol.* 1993; **31**:671-676.
- 153 Ferreira-Da-Cruz, M.F., Galvão-Castro, B., Daniel-Ribeiro, C. Isolation and antigenicity of the 43 kilodalton *Paracoccidioides brasiliensis* immunodominant antigen. *Infec.Immun.* 1992; **60**:2667-2671.
- 154 Puccia, R., Travassos, L.R. The 43 kDa glycoproteins from human pathogen *Paracoccidioides brasiliensis* and its deglycosylated form: excretion and susceptibility to proteolysis. *Arch. Biochem. Biophys.* 1991; **289**:298-302.
- 155 Vaz, C.A.C., Mackenzie, D.W.R., Hearn, V., Camargo, Z.P., Singer-Vermes, L.M., Burger, E., Calich, V.L.G. Gelatinase activity of exoantigens from virulent and non-virulent isolates of *Paracoccidioides brasiliensis* [Short communication]. *J. Med. Vet. Mycol.* 1994; **32**: 65-69.

- 156 Campo-Aasen, I., Cabral, N.A., Yarzabal, L. Sub-cellular localization of antigen E/2 of *Paracoccidioides brasiliensis*. An immunoenzymatic electron microscopy study. *Sabouraudia* 1980; **18**:167-171.
- 157 Sandoval, M.P., Brito, T., Sotto, M.N., Santos, R.T., Franco, M. F. Antigen Distribution in Mucocutaneous Biopsies of Human Paracoccidioidomycosis. *Int. J. Surg. Pathol.* 1996; **3**:181-88.
- 158 Strauss, A.H., Freymuller, E., Travassos, L.R., Takahashi, H.K. Immunochemical and subcellular localization of the 43 kDa glycoprotein antigen of *Paracoccidioides brasiliensis* with monoclonal antibodies. *J. Med. Vet. Mycol.* 1996; **34**:181-186.
- 159 Ogawa, H., Nozawa, Y., Roja Navanich, V. Fungal enzymes in the pathogenesis of fungal infection. *J. Med. Vet. Mycol.* 1996; **30**:189-196.
- 160 Rhodes, J.C. Virulence factors in fungal pathogens. *Microbiol. Sci.* 1988; **5**:252-254.
- 161 Borg, M. & Ruchel, R. Expression of extracellular acid proteinase by proteolytic *Candida* sp during experimental infection of oral mucosa. *Infec. Immun.* 1988; **56**:626-631.
- 162 Merckel, G.J. & Scofield, B.A. Conditions affecting the adherence of *Cryptococcus neoformans* to rat glial and lung cells *in vitro*. *J. Med. Vet. Mycol.* 1993; **31**:55-64.
- 163 Odds, F.C. *Candida albicans* proteinase as a virulence factor in the pathogenesis of fungal infection. *Zbl. Bakt. Ser. A.* 1985; **260**:539-542.
- 164 Ruchel, R. Cleavage immunoglobulin by pathogenic yeast of the genus *Candida*. *Microbiol. Sci.* 1986; **3**:316-319.
- 165 Yuan, L. & Cole, G.T. Isolation and characterization of an extracellular proteinase of *Coccidioides immitis*. *Infect. Immun.* 1987; **55**:1970-1978.
- 166 Gadasi, H., Kobilier, D. *Entamoeba histolytica* correlation between virulence and contents of proteolytic enzymes. *Exp. Parasitol.* 1983; **55**:105-110.

- 167 Loockwood, B. The use of a highly sensitive electrophoretic method to compare the proteinases of Trichomonads. *Mol.Biochem. Parasitol.* 1987; **24**:89-95.
- 168 Muller, H.E., Sethi, K.K. Proteolytic activity of *Cryptococcus neoformans* against human plasma proteins. *Med.Microbiol. Immunol.* 1972; **158**:129-134.
- 169 Ruchel, R. On the role of proteinases from *Candida albicans* in the pathogenesis of acronecrosis. *Zbl.Bakteriol.* 1983; **225**: 368-379.
- 170 Tsuboi, R., Sanada, T., Takamori, K., Agawa, M. Isolation and properties of extracellular proteinases from *Sporothrix schenckii*. *J.Bacteriol.* 1987; **169**:4101-4109.
- 171 Kothary, M.H., Chase, T., Macmillan, I.D. Correlation of elastase production by some strains of *Aspergillus fumigatus* with ability to cause pulmonary invasive aspergillosis in mice. *Infect. Immun.* 1991; **43**:320-325.
- 172 Assis, C.M., Gambale, W., Paula, C.R. Production of proteinase and phospholipase by *Paracoccidioides brasiliensis*. *Mycopathologia* 1999; **146**(1):13-17.
- 173 Bedoya-Escobar, V.I., Naranjo-Mesa, M.S., Restrepo-Moreno, A. Detection of proteolytic enzymes released by the dimorphic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *J.Med.Vet.Mycol.* 1993; **31**:299-304.
- 174 Vecchiarelli, A., Retini, C., Pietrella, D. Downregulation by cryptococcal polysaccharide of tumor necrosis factor alpha and interleukin-1 beta secretion from human monocytes. *Infect.Immun.* 1995; **63**: 2919-2923.
- 175 Coelho, K.I.R., Defaveri, J., Rezkallah-Iwasso, M.T., Peraçoli, M.T.S. Experimental paracoccidioidomycosis. In: Franco, M., Lacaz, C.S., Restrepo-Moreno, A., Del Negro, G. Paracoccidioidomycosis. (ed.) Boca Raton: CRC Press 1994.
- 176 Benard, G., Mendes-Giannini, M.J.S., Juvenale, M., Miranda, E.T., Duarte, A.J.S. Immunosuppression in paracoccidioidomycosis: T cell hyporesponsiveness to two *Paracoccidioides brasiliensis* glycoprotein

- that elicit strong humoral immune response. *J.Infect.Dis.* 1997; **175**:1263-1267.
- 177 Peraçoli, M.T.S., Soares, A.M.V.C., Mendes, R.P., Marques S.A., Pereira, P.C., Rezkallah-Iwasso M.T. Studies of natural killer cells in patients with paracoccidioidomycosis. *J.Med.Vet.Mycol.* 1991; **29**:373-380.
- 178 Wu-Hieh, B.W., Zlotinik, A., Howard, D.H., T-cell hybridoma produced lymphokine that activates macrophages to suppress intracellular growth to *Histoplasma capsulatum*. *Infect. Immun.* 1984; **43**:380-386.
- 179 Brummer, E., Hanson, L.H., Restrepo, A., Stevens, D.A. *In vivo* and *in vitro* activation of pulmonary macrophages by gamma-interferon for enhanced killing of *Paracoccidioides brasiliensis* or *Blastomyces dermatitidis*. *J.Immunol.* 1988; **140**:2786-2793.
- 180 Kurita, N., Oarada, M. Ito, E., Miyaji, M. Antifungal activity of human polymorphonuclear leucocytes against yeast cells of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Med.Mycol.* 1999; **37**:261-267.
- 181 Kurita, N., Oarada, M., Miyaji, M., Ito, E. Effect of cytokines on antifungal activity of human polymorphonuclear leucocytes against yeast cells of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Med.Mycol. (ISHAM)* 2000; **28**:177-182.
- 182 Brummer, E., Hanson, L.H., Restrepo, A., Stevens, D.A. Intracellular multiplication of *Paracoccidioides brasiliensis* in macrophages. *Infect.Immun.* 1989; **57**:2289-2294.
- 183 Brito, T., Furtado, J.S., Castro, R.M., Manini, M. Intraepithelial parasitism as an infection mechanism in human paracoccidioidomycosis. *Virchows Arch. [A]* 1973; **361**:129-138.
- 184 Lopes, J.D., Moura-Campos, M.C.R., Vicentini, A.P., Gesztesi, J.L., Souza, W., Camargo, Z.P. Characterization of glycoprotein gp43 the major laminin-binding protein of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Braz.J.Med.Biol.Res.* 1994; **27**:2309-2313.
- 185 Meloni-Bruneri, L.H., Campa, A., Abdalla, D.S., Calich, V.L., Lenzi, H.L., Burger, E. Neutrophil oxidative metabolism and killing of *P.brasiliensis*

- after air pouch infection of susceptible and resistant mice. *J.Leukoc.Biol.* 1996; **59**(4): 526-33.
- 186 Goosney, D.L., Gruenheid, S., Finlay, B.B. Gut Feelings: enteropathogenic *E.coli* (EPEC) interactions with the host. *Annu.Rev.Cell.Dev.Biol.* 2000; **16**:173-89.
- 187 Wyler, D.J., Sypek, J.P., McDonald, J. A. *In vitro* parasite monocyte interactions in human leishmaniasis: possible role of fibronectin in parasite attachment. *Infect. Immun.* 1995; **49**: 305-311.
- 188 Brittingham, A., Gang, C., Mcgwire, B.S., Chang, K., Mosser, D.M. Interaction of *Leishmania* gp 63 with cellular receptors for fibronectin. *Infect.Immun.* 1999; **67**:4477-4484.
- 189 Calderone, R.A., Linchan, L., Wadsworth, E., Sandberg, A.L. Identification of C_{3d} receptors on *Candida albicans*. *Infect.Immun.* 1988; **56**:252-258.
- 190 Lopez-Ribot, J.L. & Chaffin, W.L. Binding of the extracellular matrix component entactin to *Candida albicans*. *Infect. Immun.* 1994; **62**:4564-4571.
- 191 Silva, T.M., Glee, P.M., Hazen, K.C. Influence of cell surface hydrophobicity on attachment of *Candida albicans* to extracellular matrix proteins. *J.Med.Vet. Mycol.* 1995; **33**:117-122.
- 192 Masuoka, J., Wu, G., Glee, P.M., Hazen, K.C. Inhibition of *Candida albicans* attachment to extracellular matrix by antibodies which recognize hydrophobic cell wall proteins. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 1999; **24**:421-429.
- 193 Bromley, I.M. & Donaldson, K. Binding of *Aspergillus fumigatus* spores to lung epithelial cells and basement membrane proteins: relevance to the asthmatic lung. *Thorax* 1996; **51**:1203-1209.
- 194 Coulot, P., Bouchara, J.P., Renier, G., Annaix, V., Planchenault, C., Tronhin, G., Chabasse, D. Specific interaction of *Aspergillus fumigatus* with fibrinogen and its role in cell adhesion. *Infect. Immun.* 1994; **62**:2169-2177.

- 195 Gil, M.L., Penalver, M.C., Lopez-Ribot, J.L., O'Connor, J.E., Martinez, J.P. Binding of extracellular proteins to *Aspergillus fumigatus* conidia. *Infect. Immun.* 1996; **64**:5239-5247.
- 196 Lima, O.C., Figueredo, C.C., Morandi, V., Lopes-Bezerra, L.M. Adhesion of human pathogen *Sporothrix schenckii* to several extracellular matrix proteins. *Braz. J. Med. Biol. Research* 1999; **32**: 651-657.
- 197 Wasylinka, J.A. & Moore, M. M. Adhesion of *Aspergillus* species to extracellular matrix proteins: evidence for involvement of negatively charged carbohydrates on the conidial surface. *Infect. Immun.* 2000; **68**(6):3377-3384.
- 198 Hamilton, A.J., Jeavons, L., Youngchim, S., Vanittanaton, N., Hay, R.J.. Sialic acid-dependent recognition of laminin by *Penicillium marneffe* conidia. *Infect. Immun.* 1998; **66**:6024-6026.
- 199 Hamilton, A.J., Jeavons, L., Youngchim, S., Vanittanaton, N. Recognition of fibronectin by *Penicillium marneffe* conidia via sialic acid-dependent process and its relationship to the interaction between conidia and laminin. *Infect.Immun.* 1999; **67**:5200-5205.
- 200 Lima, O.C., Figueredo, C.C., Morandi, V., Lopes-Bezerra, L.M. Binding of the human pathogen *Sporothrix schenckii* to fibronectin and its fragments. In: SIMEC-5º Simpósio Brasileiro sobre Matriz Extracelular, Angra dos Reis - RJ, 1998.
- 201 Girón, J.A., Lange, M., Baseman J.B. Adherence, Fibronectin Binding, and Induction of Cytoskeleton Reorganization in Cultured Human Cells by *Mycoplasma penetrans*. *Infec.Immun.* 1996; **63**:197-208.
- 202 Vicentini, A.P., Moraes, J.Z., Gesztesi, J.L., Franco, M.F., De Souza, W., Lopes, J.D. Laminin-binding epitope on gp 43 from *Paracoccidioides brasiliensis* is recognized by a monoclonal antibody raised against *Staphylococcus aureus* laminin receptor. *J.Med.Vet.Mycol.* 1997; **35**(1): 37-43.
- 203 Uemura, M.A. Evidências da participação dos mecanismos de adesão e invasão celular na patogenicidade do *Paracoccidioides brasiliensis*.

- Dissertação (Mestrado). Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas. Campinas 1996, 99p.
- 204 Swanson, J.A. & Watts, C. Macropinocytosis. *Trends Cell Biol.* 1995; **5**:424-428.
- 205 Swanson, J.A. & Baer, S.C. Phagocytosis by zippers and triggers. *Trends Cell Biol.* 1995; **5**:89-93.
- 206 Salyers, A., Whitt, D. Bacterial pathogenesis: a molecular approach. Washington, D.C: ASM Press 1994, p.418.
- 207 Isberg, R. Discrimination between intracellular uptake and surface adhesion of bacterial pathogens. *Science* 1991; **252**:934-938.
- 208 Isberg, R., Leong, J.M. Multiple β_1 chain integrins are receptor for invasion, a protein that promotes bacterial penetration into mammalian cells. *Cell* 1990; **60**:861-871.
- 209 Tran Van Mhieu, G. & Sansonetti, P.J. Mechanisms of *Shigella* entry into epithelial cells. *Curr.Opin.Microbiol.* 1999; **2**:51-55.
- 210 Sansonetti, P.J. Genetic and molecular basis of epithelial cell invasion by *Shigella* species. *Rev. Infect. Dis.* 1991; **13**(Suppl. 4): 5285-5292.
- 211 Watari, M., Funato, S., Sasakawa, C. Interaction of Ipa proteins of *Shigella flexneri* with $\alpha_5\beta_1$ integrin promotes entry of the bacteria into mammalian cells. *J.Exp.Med.* 1996; **183**: 991-999.
- 212 Wells, C.L., Vande Westerlo, E.M.A. , Jechorek, R.P., Haines, H.M., Erlandsen, S.L. Cytochalasin- Induced actin disruption of polarized enterocytes can augment internalization of bacteria. *Infect. Immun.* 1998; **66**: 2410-2419.
- 213 Knutton, S., Lloyd, D.R., Mc Neish, A.S. Adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to human intestinal enterocytes and cultured human intestinal mucosa. *Infect. Immun.* 1987; **55**:69-77.
- 214 Mortara, A.R. *Trypanosoma cruzi*: Amastigotas and trypomastigotas interact with different structures on the surface of HeLa cells. *Exp. Parasitol.* 1991; **73**:1-14.

- 215 Schenckman, S., Mortara, A.R. HeLa cells extend and internalize pseudopodia during active invasion by *Trypanosoma cruzi* amastigotes. *Cell Sci.* 1992; **101**:895-905.
- 216 Schenckman, S., Robbins, E., S., Nussenzweig, V. Attachment of *Trypanosoma cruzi* to mammalian cells requires parasite energy and invasion can be independent of the target cell cytoskeleton. *Infect. Immun.* 1991; **59**:645-654.
- 217 Dobrowolski, J.M. & Sibley, L.D. Toxoplasma invasion of mammalian cells is powered by the actin cytoskeleton of the parasite. *Cell* 1996; **84**:933-939.
- 218 Marewicz, E., Michalik, M., Macura, A.B. Changes in actin cytoskeleton are involved in the cytopathic action of *Candida albicans* upon human skin fibroblasts. *Folia Histochem. Et Cytobiol.* 1995; **33**(3):157-162.
- 219 Dziewanowska, K., Patti, J.M., Deobald, C.F., Bayles, K.W., Trumble, W.R., Bohach, G.A. Fibronectin binding protein and host cell tyrosine kinase are required for internalization of *Staphylococcus aureus* by epithelial cells. *Infect.Immun.* 1999; **67**:4673-4678.
- 220 Tamura, G.S. & Nittayajarn, A. Group B streptococci and other gram-positive cocci bind to cytokeratin 8. *Infect.Immun.* 2000; **68**(4): 2129-2134.
- 221 Jones, J.C. & Green, K.J. Intermediate filament-plasma membrane interactions. *Curr. Opin. Cell Biol.* 1991; **3**:127-132.
- 222 Sajjan, U.S., Sylvester, F.A., Forstner, J.F. Cable-pilited *Burkholderia cepacia* binds to cytokeratin 13 of epithelial cells. *Infect.Immun.* 2000; **68**(4):1787-1795.
- 223 Jacobson, M.D., Weil, M., Ralf, M.C. Programmed cell death in animal development. *Cell* 1997; **88**:347-354.
- 224 Vaux, D.L. & Korsmeyer, S.J. Cell death in development. *Cell* 1999; **96**:245-254.
- 225 Thompson, C.B. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 1995; **267**:1456-1462.

- 226 Gueirard, P., Druilhe, A., Pretolani, M., Guiso, N. Role of adenylate cyclase-hemolysin in alveolar macrophage apoptosis during *Bordetella pertussis* infection *in vivo*. *Infect.Immun.* 1998; **66**:1718-1725.
- 227 Mc Orist, S., Roberts, L., Jasni, S., Rowland, A.C., Lawson, G.H., Gebhart, C.L., Bosworth, B. Developed and reolving lesions in porcine proliferative enteropathy: possible pathogenetic mechanisms. *J.Comp.Pathol.* 1996; **115**:35-45.
- 228 Monack, D.M., Mecsas, J., Bouley, D., Falkow, S. *Yersinia*-induced apoptosis *in vivo* aids in the establishment of a systemic infection of mice. *J.Exp.Med.* 1998; **188**:2127-237.
- 229 Khan, I.A., Matura, T., Kasper, L.H. Activation-mediated D4+ T cell unresponsiveness during acute *Toxoplasma gondii* infection in mice. *Int. Immunol.* 1996; **8**:887-896.
- 230 Muller, A., Hacker, J., Brand, B.C. Evidence for apoptosis of human macrophages-like HL-60 cells by *Legionella pneumophila* infection. *Infect.Immun.* 1996; **64**:4900-6.
- 231 Zychlinsky, A., Thirumalai, K., Arondel, J., Cantey, R.J., Aliprantis, A.O., Sansonetti, P.J. *In vitro* apoptosis in *Shigella flexneri* infections. *Infect.Immun.* 1996; **64**(12): 5357-5365.
- 232 Moulding, D.A., Walter, C., Hart, A., Edwards, S.W., Effects of staphylococcal enterotoxins on human neutrophil functions and apoptosis. *Infect.Immun.* 1999; **67**(5):2312-2318.
- 233 Menzies, B.E. & Kourteva, I. Internalization of *Staphylococcus aureus* by endothelial cells induces apoptosis. *Infect.Immun.* 1998; **66**(12):5994-5998.
- 234 Lowry, D.H., Rosebrough, N.J., Fan, L., Randall, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J.Biol.Chem.* 1951; **193**:265-275.
- 235 Siqueira, A.M. Avaliação da sensibilidade e especificidade de algumas provas sorológicas no diagnóstico, prognóstico e controle de cura da paracoccidiodomicose. Caracterização imunoquímica do antígeno E2 do

- Paracoccidioides brasiliensis*. Tese (Doutorado). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo. São Paulo, 1982. 256p.
- 236 Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; **227**:680-685.
- 237 Studier, F.W. Analysis of bacteriophage T7 early RNAs and proteins on slab gels. *J. Mol. Biol.* 1973; **79**: 237-248.
- 238 Nielsen, B.L. & Brown, L.R. The bases for colored silver protein complex formation in stained polyacrilamide gels. *Anal. Biochem.* 1984; **141**: 311-315.
- 239 Towbin, H., Stachelin, T., Gordon, J. Eletrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. Procedure and some applications. *Proc.Natl.Acad. Sci.* 1979; **76**: 4350-4352.
- 240 Cooper, J.A. Effects of cytochalasin and phalloidin on actin. *J.Cell.Biol.* 1987; **105**:173-178.
- 241 Heesemann, J. & Laufs, R. Double imunofluorescence microscopic technique for accurate differentiation of extracellularly and intracellularly located bacteria in cell culture. *J.Clin.Microbiol.* 1985; **22**:168-175.
- 242 Castaneda, E., Brummer, E., Perlman, A.M., Mcewen, J.G., Stevens, D.A. A culture medium for *Paracoccidioides brasiliensis* with high plating efficiency and the effect of siderophores. *J.Med.Ver.Mycol.* 1988; **26**(6):351-358.
- 243 Lenzi, H.L., Pelajo-Machado, M., Vale, B.S., Panasco, M.S. Microscopia de Varredura Laser Confocal: I- Princípios e Aplicações Biomédicas. *Newslab* 1996; **16**: 62-66.
- 244 Zychlinsky, A. & Sansonetti, P.J. Apoptosis in bacterial pathogenesis. *J.Clin. Invest.* 1997; **100**: 63-65.
- 245 Read, A.F. The evolution of virulence. *Trends Micribiol.* 1994; **2**:73-81.
- 246 Mendes, R.P., Franco, M.F. Paracoccidioidomicose pulmonar. In *Pneumologia - Atualização e Reciclagem*. Sociedade Paulista de Pneumologia e Tisiologia, v.II. Atheneu: São Paulo. 1998, p. 271-284.

- Good state of the art information about paracoccidioidomycosis, particularly covering the clinical management of this disease.
- 247 Uemura, M.A., Hanna, S.A., Ricci, L.C., Sandoval, M., Mendes-Giannini, M.J.S. An electron microscopy study of *Paracoccidioides brasiliensis* adherence and invasion of culture cells. In: Encontro Internacional Sobre Paracoccidioidomycosis, 6, Porto Alegre RS 1996.
- 248 Calderone, R., Diamond, R., Senet, J.M., Warmington, J., Filler, S., Edwards, J.E. Host cell-fungal interactions. *J.Med.Vet.Mycol.* 1994; **32**:151-168.
- 249 Bouchara, J.P., Sanches, M., Chevailler, A. Marot-Leblond, Lissitzky, J.C., Tronchin, G., Chabasse, D. Sialic acid-dependent recognition of laminin and fibrinogen by *Aspergillus fumigatus*. *Infect.Immun.* 1997; **65**: 2717-2724.
- 250 Aumailley, M. & Krieg, T. Laminins: a family of diverse multifunctional molecules of basement membranes. *J.Invest.Dermat.* 1996; **106**:209-214.
- 251 Chaffin, W.L., Lopez-Ribot, J.L., Casanova, M., Gozalbo, D., Martinez, J.P. *Microbiol. Mol. Biol.* 1998; **62**:130-180.
- 252 Glee, P.M., Masuoka, J., Ozier, W.T., Hazen, K.C. Presence of multiple laminin and fibronectin-binding protein in cell wall extract of *Candida albicans*: influence of dialysis. *J.Med.Vet. Mycol.* 1996; **34**:57-61.
- 253 Hostetter, M.K. Adhesins and ligands involved in the interaction of *Candida spp.* with epithelial and endothelial surfaces. *Clin. Microbiol. Rev.* 1994; **7**:29-42.
- 254 Dunsmore, S.E. & Rannels, D.E. Extracellular matrix biology in the lung. *Am. J. Physiol.* 1996; **270**:L3-L27.
- 255 Fujita, H., Mohri, H., Kanamori, H., Iwamatsu, A., Okubo, T. Binding site in human plasma fibronectin to HI-60 cells localizes in the C-terminal heparin-binding region independently of RGD and CS1. *Exp.Cell.Res.* 1995; **217**:484-489.

- 256 Jakab, E., Paulsson, M., Ascencio, F., Ljungh, A. Expression of vitronectin and fibronectin binding by *Candida albicans* yeast cells. *APMIS* 1993; **101**(3):187-193.
- 257 Talamás-Rohana, P. & Meza, I. Interaction between pathogenic amebas and fibronectin: substrate degradation and changes in cytoskeleton organization. *J.Cell Biol.* 1988; **106**:1787-1794.
- 258 Kubo, M., Ohno, S., Kato, M., Isemura, M., Tagami, H., Saida, T. Immunoelectron microscopic localization of fibronectin in cultured human keratinocytes. *Arch. Dermatol.Res.* 1994; **286**:448-454.
- 259 Yan, S., Rodrigues, R.G. Roberts, D.D. Hemoglobin-induced binding of *Candida albicans* to the cell-binding domain of fibronectin is independent of the Arg-Gly-Asp sequence. *Infect.Immun.* 1998; **66**:1904-1909.
- 260 Roman, J. Extracellular matrix and lung inflammation. *Immunol.Res.* 1996; **15**:163-178.
- 261 Lopes, J.D., Reis, M.D., Bretani, R.R. Presence of laminin receptors in *Staphylococcus aureus*. *Science* 1985; **229**:275-277.
- 262 Giordano, R., Chammas, R., Veiga, S.S., Colli, W., Alves, M.J. *Trypanosoma cruzi* binds to laminin in a carbohydrate-independent way. *Braz. J.Med.Biol.Res.* 1994; **27**:2315-2318.
- 263 Mc Carthy, J.B., Chelberg, M.K., Mickelson, D.J. Localization and chemical synthesis of fibronectin peptides with melanoma adhesion and heparin binding activities. *Biochemistry* 1988; **27**:1380-1388.
- 264 Bethlem, E.P., Capone, D., Maranhão, B., Carvalho, C.R.R., Wanke, B. Paracoccidioidomycosis. *Curr.Opin.Pulm.Med.* 1999; **5**:319-325.
- 265 Fukuda, Y., Ferrans, V.J., Schoenberger, C.I., Rennard, S.I., Crystal, R.G. Patterns of pulmonary structural remodeling after experimental paraquat toxicity. The morphogenesis of intraalveolar fibrosis. *Amer.J.Pathol.* 1985; **118**:452-475.
- 266 Franco, L., Najvar, L., Gomez, B.L., Restrepo, S., Graybill, J.R., Restrepo, A. Experimental pulmonary fibrosis induced by *Paracoccidioides*

- brasiliensis* conidia: measurement of local host responses. *Am.J.Trop.Med.Hyg.* 1998; **58**:424-430.
- 267 Cock, A.M., Cano, L.E., Vélez, D., Aristizábal, B.H., Trujillo, J., Restrepo, A. Fibrotic sequelae in pulmonary paracoccidioidomycosis: histopathological aspects in Balb/c mice infected with viable and non-viable *Paracoccidioides brasiliensis* propagules. *Rev.Inst.Med.Trop. S.Paulo* 2000; **42**(2):59-66.
- 268 Burger, E., Miyaji, M., Sano, A., Calich, V.L., Nishimura, K., Lenzi, H.L. Histopathology of paracoccidioidomycosis infection in athymic and euthymic mice: a sequential study. *Amer.J.Trop.Med.Hyg.* 1996; **55**:235-242.
- 269 Kerr, I.B., Araripe, J.R., Oliveira, P.C., Lenzi, H.L. Paracoccidioidomycosis: a sequential histopathologic study of lesions in experimentally-infected rats. *Revista Inst.Med.Trop. São Paulo* 1998; **5**:336-350.
- 270 Lenzi, H.L., Calich, V.L.G., Miyaji, M., Miyaji, M., Sano, A., Nishimura, K., Burger, E. Fibrosis patterns of lesions developed by athymic and euthymic mice infected with *Paracoccidioides brasiliensis*. *Braz.J.Med.Biol.Res.* 1994; **27**:2301-2308.
- 271 Tuder, R.M., El Ibrahim, R., Godoy, C.E., De Brito, T. Pathology of the human pulmonary paracoccidioidomycosis. *Mycopathologia (Den Haag)* 1985; **92**:179-188.
- 272 Teixeira, H.C., Calich, V.L., Singer-Vermes, L.M., Imperio-Lima, M.R., Russo, M. Experimental paracoccidioidomycosis: early immunosuppression occurs in susceptible mice after infection with pathogenic fungi. *Braz.J.Med.Biol.Res.* 1987; **20**(5): 587-589.
- 273 Robinson, M.S. The role of clathrin, adaptors, and dynamin in endocytosis. *Curr.Opin.Cell Biol.* 1994; **6**:538-544.
- 274 Kuhn, M. The microtubule depolymerizing drugs nocodazole and colchicine inhibit the uptake of *Listeria monocytogenes* by P388D1 macrophages. *FEMS Microbiol. Lett.* 1998; **160**(1):87-90.

- 275 Oelschlager, T.A. Guerry, P., Kopecko, D.J. Unusual microtubule-dependent endocytosis mechanisms triggered by *Campylobacter jejuni* and *Citrobacter freundii*. *Proc.Natl.Acad.Sci.* 1993; **90**:6884-6888.
- 276 Edwards, J.L., Shao, J.Q., Ault, K.A., Apicella, M.A. *Neisseria gonorrhoeae* elicits membrane ruffling and cytoskeletal rearrangements upon infection of primary human endocervical and ectocervical cells. *Infect.Immun.* 2000; **68**(9):5354-5363.
- 277 Grassmé, H.U.C., Ireland, R.M., Putten J.P.M. Gonococcal opacity protein promotes bacterial entry-associated rearrangements of the epithelial cell actin cytoskeleton. *Infec.Immun.* 1996; **64**:1621-1630.
- 278 Mukherjee, S., Ghosh, R.N., Maxfield, F.R. Endocytosis. *Physiol.Rev.* 1997; **77**:759-803.
- 279 Rabinovitch, M. Professional and non-professional phagocytes: an introduction. *Trends Cell Biol.* 1995; **5**:85-88.
- 280 Skoud, A., Tran Van Mhieu, G., Mantis, N., Arpin, M., Mounier, J., Gounon, P.J. Sansonetti, P. A functional role for ezrin during *Shigella flexneri* entry into epithelial cells. *J.Cell.Sci.* 1999; **112**:2059-2068.
- 281 Goldberg, M.B. & Sansonetti, P.J. *Shigella* subversion of the cellular cytoskeleton a strategy of epithelial colonization. *Infect.Immun.* 1993; **61**(12):4941-4946.
- 282 Luna, E.J. & Hitt, A.L. Cytoskeleton-plasma membrane intractions. *Science* 1992; **258**:955-963.
- 283 Mendes-Giannini, M.J.S., Taylor, M.L., Bouchara, J.B., Calich, V.L.G., Escalante, E.D., Hanna, S.A., Lenzi, H.L., Machado, M.P., Miyaji, M., Monteiro da Silva, J.L., Mota, E.M., Restrepo, A., Restrepo, S., Tronchin, G., Vincenzi, L.R., Xidieh, C.F., Zenteno, E. Pathogenesis II: Fungal responses to host responses: interaction of host cells with fungi. *Med.Mycol.(ISHAM)* 2000; **38**(1): 113-123.
- 284 Rosenshine, I., Ruschkowski, S., Finlay, B.B. Inhibitors of cytoskeletal function and signal transduction to study bacterial invasion. *Methods Enzymol.* 1994; **263**: 467-476.

- 285 Ma, T.Y., Hollander, D., Tran, L.T., Nguyen, D., Hoa, N., Bhalla, D. Cytoskeletal regulation of Caco-2 intestinal monolayer paracellular permeability. *J.Cell. Physiol.* 1995; **164**:533-545.
- 286 Goihman-Yahr, M., Isturiz, G., Rothenberg, A. Los fagocitos y la patogenia de la paracoccididomycosis. *Interciencia* 1990; **15**:200-205.
- 287 Doorbar, J., Ely, S., Sterling, J., Mclean, C., Crawford, L. Specific interaction between HPV-16 E1-E4 and cytokeratins result in collapse of epithelial cell intermediate filament network. *Nature* 1991; **352**:824-827.
- 288 Lewis, K. Programmed death in bacteria. *Microbiol.Mol.Biol.Rev.* 2000; 64(3):503-514.
- 289 Chih-Fng, K., Jiunn-Jong, W., Pei-Jane, T., Fu-Jen, K., Huan-Yao, L., Ming, T.L., Yee-Shin, L. Streptococcal pyrogenic exotoxin B induces apoptosis and reduces phagocytic activity in U937 cells. *Infect. Immun.* 1999; **67**(1):126-130.
- 290 Perfettini, J.L., Darville, T., Gachelin, G., Souque, P., Dautry-Varsat, A., Ojcius, D.M. Effect of *Chlamydia trachomatis* infection and subsequent tumor necrosis factor alpha secretion on apoptosis in the murine genital tract. *Infect. Immun.* 2000; **68**(4):2237-2244.
- 291 Schoppet, M., Bubert, A., Huppertz, H.I. Dendritic cell function is perturbed by *Yersinia enterocolitica* infection *in vitro*. *Clin Exp Immunol.* 2000, 122(3):316-323.
- 292 Bayles, K.W., Wesson, C.A., Liou, L.E., Fox, L.K., Bohach, A. Trumble, W.R. Intracellular *Staphylococcus aureus* escapes the endosome and induces apoptosis in epithelial cells. *Infect.Immun.* 1998; **66**(1):336-342.
- 293 Jesenberger, V., Procyk, K.J., Yuan, J., Reipert, S., Baccharini, M. Salmonella-induced caspase-2 activation in macrophages. A novel mechanism in pathogen-mediated apoptosis. *J.Exp.Med.* 2000; **192**(7):1035-1046.
- 294 Daly, P., Verhaegen, S., Clynes, M., Kavanagh, K. Culture filtrates of *Aspergillus fumigatus* induce different modes of cell death in human cancer cell lines. *Curr.Genet.* 2000; **37**(2):125-135.

- 295 Kuo, C.F., Wu, J.J., Tsai, P.J., Kao, F.F., Lei, H.Y., Lin, M.T., Lin, Y.S. Streptococcal pyrogenic exotoxin B induces apoptosis and reduces phagocytic activity in U937 cells. *Infect.Immun.* 1999; **67**(1):126-130.
- 296 Chapman, H.A. A FAS pathway to pulmonary fibrosis. *J.Clin.Invest.* 1999; **104**(1): 1-2.

9. Resumo

A virulência microbiana é considerada uma propriedade complexa propiciando ao agente infeccioso condições para penetrar as barreiras protetoras do hospedeiro, sobreviver aos mecanismos de defesa, multiplicar-se e produzir a doença.

A paracoccidioidomicose apresenta um amplo espectro de manifestações clínicas, onde o fungo, *Paracoccidioides brasiliensis*, pode atingir vários tecidos com ênfase ao pulmão. Os mecanismos de disseminação são baseados em evidências indiretas, porém observando-se os aspectos clínicos polimórficos pode-se sugerir que diferentes mecanismos de virulência estão envolvidos.

A propriedade do patógeno de interagir com as estruturas superficiais do hospedeiro é essencial para sua virulência e poucas informações são disponíveis no que se refere aos prováveis mecanismos de interação de *P.brasiliensis* às células. Assim, foram avaliadas a interação de *P.brasiliensis* e células epiteliais das linhagens Vero e A₅₄₉, dando ênfase a interação com componentes da matriz extracelular e o envolvimento do citoesqueleto durante a cinética de interação fungo-célula.

A cinética da interação mostrou que a adesão do fungo ocorreu a partir de 30 minutos de contato nas duas linhagens celulares levando a um acréscimo no número de leveduras aderidas nos tempos subseqüentes. A presença dos fungos no interior das células ocorreu a partir de duas horas de contato com as células Vero e uma hora com as células A₅₄₉.

A interação de *P.brasiliensis* com as células epiteliais e componentes da matriz extracelular (MEC) foi avaliada por imunoperoxidase *in situ* e imunofluorescência indireta. O padrão de reconhecimento nas células epiteliais frente aos soros anti-fibronectina, anti-laminina e anti-colágeno tipo I foi de maneira diferenciada nas células infectadas. A distribuição característica da marcação com os soros anti-laminina e anti-fibronectina na superfície das leveduras foi evidenciada, indicando a presença de sítios específicos de ligação para estes componentes da matriz extracelular.

Citocalasina D, uma droga que inibe a polimerização da actina e colchicina, que destrói microtúbulos, reduziram substancialmente a invasão, indicando a participação dos microfilamentos de actina e dos microtúbulos neste mecanismo.

Verificou-se que a adesão do fungo às células não envolve os filamentos de citoqueratina, porém, em tempos maiores de contato com o fungo ocorreu o desarranjo e a destruição da estrutura destes.

A atividade da gp 43, em concentrações variando entre 25 e 3,125 μ g/mL, alterou o arranjo do citoesqueleto de actina de maneira nítida e em concentrações variando entre 12,5 e 32,5 μ g/mL destruiu a integridade dos rígidos filamentos de citoqueratina.

A elaboração de componentes antigênicos pelo fungo, foi observada, durante a interação com a célula. Constituintes do sobrenadante de culturas infectadas foram reconhecidos por soro anti-actina, apresentando as bandas de 43, 94 kDa e uma de elevada massa molecular, e bandas de 40, 43, 67, 94 kDa e uma de elevada massa molecular frente ao soro anti-citoqueratina, por imunoblot, sugerindo sua participação na invasão.

Componentes de *P.brasiliensis* que interagem com constituintes do citoesqueleto foram também avaliados por imunoblot. Uma banda de 43 kDa, presente no antígeno “cell-free”, foi reconhecida pelos soros anti-actina e anti-citoqueratina, podendo ser considerada candidata a invasina.

A indução da apoptose por *P.brasiliensis* durante a interação com as células foi estudada empregando-se a técnica “TUNEL” com sonda fluorescente. A fragmentação do DNA nas células foi evidenciada após uma hora de exposição ao fungo e após duas horas de contato observou-se células apoptóticas características. Após cinco horas foram evidentes os corpos apoptóticos e raras leveduras nestas células.

A adesão e a invasão de *P.brasiliensis* às células epiteliais pode representar uma das estratégias deste fungo para escapar da resposta imune do hospedeiro, auxiliando a disseminação do patógeno.

10. Summary

Microbial virulence is a set of mechanisms that enable the infectious agent to penetrate the host protection barriers and then survive against the defense mechanisms, multiply and cause disease.

Paracoccidioidomycosis presents a variety of clinical manifestations, and the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* can reach many tissues, most importantly the lungs. Understanding of the mechanisms of dissemination is based on indirect evidence, and the polymorphic aspects of disease suggest that several virulence mechanisms are involved.

The ability of the pathogen to interact with the host superficial structures is essential to its virulence, but little is known about interactions between cells and *P.brasiliensis*. For this reason, interactions between *P.brasiliensis* and epithelial Vero and A₅₄₉ cells were evaluated, with the emphasis on interactions with extracellular matrix and the induction of cytoskeletal alterations during the interaction process fungus-cells.

The kinetics of interaction showed that adhesion occurred after 30 minutes of contact between the two cell lines and the yeast, and the number of adhesion points increased on the cells after that. The fungus were inside the Vero cells after two hours and inside A₅₄₉ after one hour.

The interaction between *P.brasiliensis* and epithelial cells and the components of the extracellular matrix (MEC) were evaluated through immunoperoxidase *in situ* and indirect immunofluorescence. The recognition patterns of the infected cells against anti-fibronectin, anti-laminin and anti-collagen type I sera were different from those of the uninfected cells. Characteristic distributions of bound anti-fibronectin and anti-laminin on the surface of yeast cells were detected, indicating the presence of specific binding sites for each one.

Cytochalasin D, an inhibitor of actin polymerization and colchicine, which disrupts microtubules, substantially reduced invasion, indicating the participation of microfilaments and microtubules in this mechanism.

Cytokeratin filaments were not involved in fungus adhesion. However, disarrangement and disruption of the filaments were observed after longer times of fungus-cell contact.

The gp 43 activity, in concentrations ranging from 25 to 3.125 μ g/mL, changed the actin cytoskeletal arrangement, and in concentrations ranging from 32.5 to 12.5 μ g/mL, the integrity of cytokeratin filaments were destroyed.

The reactivity of the infected culture supernatant against anti-actin serum showed 43, 94 kDa bands and against anti-cytokeratin serum showed 40, 43, 67 and 94 kDa bands, suggesting that some components are produced during fungus-cell interaction which bind to cytoskeleton components.

Through an immunoblot assay, gp43 was also recognized by anti-actin and anti-cytokeratin sera, but not by anti-tubulin serum. Thus, it seems that this antigen could be a ligand for some cytoskeleton components and may be a candidate invasin.

Using the TUNEL with fluorescent probe technique to label cells undergoing DNA fragmentation, it was shown that *P.brasiliensis* induces apoptosis in infected cells. Nuclear fragmentation appeared after one hour and characteristic apoptotic cells were observed after two hours of contact between fungus and cells. After five hours the apoptotic bodies and rare yeast were found.

The adhesion and invasion of epithelial cells by *P.brasiliensis* may represent strategies employed to thwart the host immune response, and may help in the dissemination of the pathogen.