

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE ARARAQUARA – FCFAr UNESP

Daniella Sayuri Yamazaki

Caracterização e avaliação do papel da adesina na virulência CSP de
Paracoccidioides **spp.**

Araraquara – SP

2016

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE ARARAQUARA – FCFAr UNESP

Daniella Sayuri Yamazaki

Caracterização e avaliação do papel da adesina na virulência CSP de
Paracoccidioides spp.

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de
Graduação em Farmácia
Bioquímica da Faculdade de
Ciências Farmacêuticas de
Araraquara, da Universidade
Estadual Paulista para obtenção
do grau de Farmacêutica-
Bioquímica.

Orientadora: Profa. Dra. Maria José Soares Mendes Giannini

Co-orientador: Prof. Dr. Haroldo Cesar de Oliveira

Araraquara – SP

2016

Dedicatória

Dedico este trabalho, assim como todos os resultados que pude alcançar e que estão por vir, àqueles que me proporcionaram a oportunidade de sonhar, meus pais: Missao e Akemi.

Agradecimentos

Agradeço a todos os professores que me acompanharam durante a graduação, em especial à Prof. Dra. Maria José Soares Mendes Giannini e à Profa. Dra. Ana Marisa Fusco Almeida, responsáveis pela realização deste trabalho.

Pela valiosa colaboração do Co-orientador Prof. Dr. Haroldo Cesar de Oliveira, por contribuir para o meu desenvolvimento de capacidade científica, crítico-reflexiva e criativa. Por ser um excelente profissional, estar presente e tornar este trabalho possível e prazeroso.

À FAPESP – Fundação de Amparo à pesquisa do Estado de São Paulo (Processo 2014/20229-5), que financiou o desenvolvimento de minha iniciação científica, propiciando experiências em pesquisa universitária, abrindo caminhos para o mundo profissional.

À Equipe do Laboratório de Micologia, que me acolheu em seu espaço e proporcionou um grande crescimento profissional e pessoal, muito obrigada! Foi um prazer cruzar o caminho de cada um de vocês, e ter a oportunidade de aprender e de me desenvolver neste ambiente.

À minha Família que me proporcionou bons caminhos para meu desenvolvimento, assim como a família e amigos que cultivei em Araraquara, que os acasos e vivências, tornaram o ambiente universitário enriquecedor, fizeram parte da minha transformação, e, portanto, fazem parte de mim agora. Em especial, a família Katakara! Que me faz desejar que o mundo experimente um pouco dos prazeres de viver em república, para que se torne mais ameno.

Sumário

Resumo	10
Lista de ilustrações.....	12
Lista de abreviaturas e siglas	15
1. Introdução	19
1.1. Paracoccidioidomicose.....	19
1.2. <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> e <i>Paracoccidioides lutzii</i>	22
1.3. Fatores de virulência	23
2. Desenvolvimento	30
2.1. Materiais e métodos	30
2.1.1. Microrganismo e condições de cultivo.....	30
2.1.2. Produção de soro policlonal anti-CSP de <i>Paracoccidioides</i> spp.	31
2.1.3. Preparo dos extratos protéicos de <i>Paracoccidioides</i> spp.	32
2.1.4. Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS- PAGE)	33
2.1.5. <i>Imunoblot</i> (Avaliação do título dos anti-soros).....	34
2.1.6. Cultura Celular	35
2.1.6.1. Cultivo Contínuo e Tripsinização	35
2.1.7. Citotoxicidade da proteína CSP recombinante em diferentes linhagens celulares	36
2.1.8. Imunofluorescência para avaliação de alterações do citoesqueleto em pneumócitos após o tratamento com a proteína CSP recombinante de <i>Paracoccidioides</i>	36
2.1.8.1. Microfilamentos de actina após tratamento com a CSP recombinante	37

2.1.8.2. Microtúbulos após tratamento com a CSP recombinante.....	37
2.1.9. Avaliação da ocorrência de apoptose em células tratadas com a proteína CSP recombinante pela técnica do TUNEL.....	38
2.1.10. Preparo e padronização do inóculo de <i>Paracoccidioides spp</i>	39
2.1.11. Ensaio de inibição da interação de <i>Paracoccidioides spp.</i> com células epiteliais utilizando o anticorpo policlonal anti-CSP	39
2.1.12. Ensaio de inibição da interação de <i>Paracoccidioides spp.</i> com componentes da matriz extracelular utilizando o anticorpo policlonal anti-CSP	40
2.1.13. Determinação da localização da proteína CSP através da técnica de Imunocitoquímica em nível ultraestrutural (Immunogold) e Microscopia eletrônica durante a interação de <i>Paracoccidioides spp.</i> com células A549 e com componentes da MEC	41
2.1.14. Influência da proteína CSP na virulência de <i>Paracoccidioides spp.</i> em modelo alternativo de <i>Galleria mellonella</i>	42
2.1.15. Análises estatísticas	43
2.2. Resultados	44
2.2.1. Produção de anticorpo anti-CSP e análise por imunoblot	44
2.2.2. Ensaio de Viabilidade Celular.....	46
2.2.3. Ensaio preliminar da capacidade de indução de apoptose pela proteína CSP de <i>Paracoccidioides spp.</i> através do ensaio de TUNEL (Terminal deoxy-transferase mediated X-dUTP Nick End Labeling).....	48
2.2.4. Imunofluorescência para avaliação de alterações do citoesqueleto durante o tratamento de pneumócitos A549 com a proteína recombinante CSP de <i>Paracoccidioides spp.</i>	50
2.2.4.1. Actina	50

2.2.4.2. Microtúbulos	51
2.2.5. Ensaio de inibição da interação de <i>Paracoccidioides</i> spp. com células epiteliais A549 pelo anticorpo anti-CSP	52
2.2.6. Ensaio de inibição da interação de <i>Paracoccidioides</i> spp. com componentes da matriz extracelular utilizando o anticorpo policlonal anti-CSP	54
2.2.7. Determinação da localização da proteína CSP através da técnica de imunocitoquímica em nível ultraestrutural (Immunogold) e Microscopia eletrônica...	56
2.2.8. Influência da proteína CSP na virulência de <i>Paracoccidioides</i> spp. em modelo alternativo <i>Galleria mellonella</i>	63
3. Conclusões.....	65
4. Referências	67

Resumo

A adesão é conferida por uma classe de proteínas presentes na parede celular denominadas de adesinas. O conhecimento da composição da parede celular e dos componentes exocelulares dos fungos contribui para a identificação de ligantes capazes de mediar suas interações com tecidos do hospedeiro durante a infecção. O objetivo deste estudo foi investigar o papel da proteína CSP (*cell surface protein*) de *Paracoccidioides* spp. na interação fungo-hospedeiro. No trabalho foi produzido o anticorpo específico e avaliação da influência da CSP no processo de adesão, além verificada as alterações no citoesqueleto celular causado pelo tratamento com a proteína recombinante. Com o uso do anticorpo anti-CSP, ensaios de inibição de adesão a diferentes componentes da matriz extracelular (MEC) (laminina, fibronectina, fibrinogênio e colágeno tipo I), foram realizados e significativa inibição da adesão à fibronectina foi observado, nos indicando a importância desta proteína na adesão a esse componente da MEC. Também foi realizada a localização celular da proteína durante a interação de *P. brasiliensis* e *P. lutzii* com pneumócitos e com os componentes da MEC. Durante a interação das duas espécies com as estruturas do hospedeiro pudemos observar um aumento da expressão da proteína CSP em suas paredes celulares, o que reforça a ideia de sua participação no processo de adesão do fungo ao hospedeiro. A ação da proteína CSP no citoesqueleto de pneumócitos A549 foi avaliada através do ensaio com dois componentes do citoesqueleto: actina e microtúbulos. Os resultados mostraram alteração na distribuição característica da actina e dos microtúbulos quando tratada com a proteína CSP no tempo de 2 e 5h, além da perda da conformação normal do pneumócito, podendo dessa forma, favorecer a invasão do fungo à célula. Através do ensaio de TUNEL, foi verificado que a proteína CSP recombinante de *Paracoccidioides* spp. foi capaz de induzir a apoptose dos pneumócitos A549. Apesar de preliminar, o resultado apresentado mostra que a proteína CSP pode ser importante para interação do fungo com o hospedeiro e também para a evasão do sistema de defesa do hospedeiro. Complementando os dados, foi realizado ensaio utilizando o modelo alternativo *Galleria mellonella* para avaliar a importância da proteína CSP na virulência de *P. brasiliensis* e *P. lutzii* e os resultados nos mostraram que após o bloqueio desta proteína no fungo através do tratamento com o anticorpo anti-CSP, a sua virulência foi afetada reduzindo sua capacidade de matar as larvas de *G. mellonella*. Os resultados deste estudo

demonstram um grande avanço na caracterização da proteína CSP como um importante fator de virulência nos fungos do gênero *Paracoccidioides*.

Palavras-chave: *Paracoccidioides* spp., adesina, adesão, proteína CSP, virulência.

Lista de ilustrações

Figura 1. Esquema representativo da produção do anticorpo policlonal anti-CSP de <i>Paracoccidioides spp.</i> Esquema adaptado de Silva (2011).	31
Figura 2. Immunoblot para verificação da reatividade do soro policlonal anti-CSP. (1) massa molecular; (2) reatividade na diluição de 1:100 (3) 1:500, (4) 1:1000 e (5) controle de reatividade utilizando soro de coelho não imunizado.	44
Figura 3. A) Immunoblot para verificação da reatividade do soro policlonal anti-CSP com extrato total de proteínas de (2 e 3) <i>P. lutzii</i> (Títulos: 1:500 e 1:1000, respectivamente) e (4 e 5) <i>P. brasiliensis</i> (Títulos: 1:500 e 1:1000, respectivamente); (1) massa molecular; (6) controle de reatividade utilizando soro de coelho não imunizado. B) Immunoblot para verificação da proteína CSP no sobrenadante da cultura de (2) <i>P. brasiliensis</i> e (3) <i>P. lutzii</i>	46
Figura 4. Viabilidade das células A549 após tratamento com a proteína recombinante CSP.	47
Figura 5. Viabilidade das células Hep-G2 após tratamento com a proteína recombinante CSP.	47
Figura 6. Viabilidade das células MRC-5 após tratamento com a proteína recombinante CSP.	48
Figura 7. Indução de apoptose pela proteína recombinante CSP em diferentes concentrações avaliada pelo ensaio TUNEL.	49

Figura 8. Imunofluorescência da actina de pneumócitos A549 não tratados (A) ou tratados (B) com a proteína CSP de *Paracoccidioides spp.* As flechas indicam as modificações no citoesqueleto. 51

Figura 9. Imunofluorescência dos microtúbulos de pneumócitos A549 não tratados (A) ou tratados (B) com a proteína CSP de *Paracoccidioides spp.* As flechas indicam as modificações no citoesqueleto.....52

Figura 10. Inibição da adesão pelo anticorpo anti-CSP de *Paracoccidioides spp.* A) 2 horas de adesão; B) 5 horas de adesão. * $p < 0,05$ 53

Figura 11. Inibição da adesão de *P. lutzii* e *P. brasiliensis* aos componentes da MEC: laminina (Lm), fibronectina (Fn), fibrinogênio (Fb) e colágeno tipo I (Col I) em 2 e 5 horas de interação. * $p < 0,05$ 55

Figura 12. Microscopia eletrônica para observação da localização da proteína CSP de *P. lutzii* durante interação com pneumócitos A549. A, B e C representam os aumentos de 20, 40 e 80 vezes de uma célula de *P. lutzii* antes da interação com pneumócitos A549. D, E e F representam os aumentos de 20, 40 e 80 vezes de uma célula de *P. lutzii* durante o contato com pneumócitos A549. Legenda: F: Célula fúngica; W: Parede celular fúngica; P: pneumócito A549..... 58

Figura 13. Microscopia eletrônica para observação da localização da proteína CSP de *P. brasiliensis* durante interação com pneumócitos A549. A, B e C representam os aumentos de 20, 40 e 80 vezes de uma célula de *P. brasiliensis* antes da interação com pneumócitos A549. D, E e F representam os aumentos de 20, 40 e 80 vezes de uma célula de *P. brasiliensis* durante o contato com pneumócitos A549. Legenda: F: Célula fúngica; W: Parede celular fúngica; P: pneumócito A549..... 59

Figura 14. Microscopia eletrônica para observação da localização da proteína CSP de *P. lutzii* durante interação com lamina (B), fibronectina (C), colágeno tipo I (D) e colágeno tipo IV (E) e antes do contato com os componentes da MEC (A). O aumento das fotos é de 80 vezes. Legenda: C: Citoplasma fúngico; W: Parede celular fúngica; V: vesícula; M: Mitocôndria. 61

Figura 15. Microscopia eletrônica para observação da localização da proteína CSP de *P. brasiliensis* durante interação com lamina (B), fibronectina (C), colágeno tipo I (D) e colágeno tipo IV (E) e antes do contato com os componentes da MEC (A). O aumento das fotos é de 80 vezes. Legenda: FC: Citoplasma fúngico; W: Parede celular fúngica; V: vesícula; M: Mitocôndria. 62

Figura 16. Curva de sobrevivência de larvas de *G. mellonella* desafiadas com *P. lutzii* tratado com anti-CSP. 64

Lista de abreviaturas e siglas

% - Porcentagem

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

APS - persulfato de amônio

ATV - solução de tripsina 0,2% e EDTA 0,02% (Adolfo Lutz)

BHI - Infusão-cérebro-coração

BSA -Soro albumina bovina

cels/poço – células por poço

CSP – Cell surface protein - proteína de superfície celular

DAB – Diaminobenzidina

DAPI - 4', 6-diamidino-2-fenilindol

DMEN - Meio Dulbecco MEM

ELISA - *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*

FAPESP – Fundação de Amparo à pesquisa do Estado de São Paulo

FMRP-USP - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

FM-USP - Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

GAPDH - gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

Gp43 - Glicoproteína de 43 kDa

HAM F12 - *F-12 Nutrient Mixture*

HCl - Ácido clorídrico

Hep-G2 – Células humanas hepáticas

ICB-I - Instituto de Ciências Biomédicas I

kDa – Kilodalton

L – Fase Leveduriforme

M – Fase Miceliana

mA – Miliampère

MEC - matriz extracelular

mL – Mililitro

mM - Milimolar

MRC-5 - Fibroblastos de pulmão humano fetal

nm - Nanômetro

°C - Grau Celsius

Pb18 - *Paracoccidioides brasiliensis* cepa 18

PBS - Tampão fosfato de sódio

PCM - Paracoccidioidomicose

pH - Potencial hidrogeniônico

PMSF - Fenilmetilsulfonilflúor

Rpm - Rotações por minuto

SBF - Soro Fetal Bovino

SDS - Dodecil sulfato de sódio

SDSPAGE - Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS

TBS - Tampão salina tris

TBS-BSA - Tampão salina tris em 0,1% de soro albumina bovina

TdT - transferase terminal

TEMED - Tetra metil etileno diamino

Tris - Tris (hidroximetil) aminometano

UFC - Unidade Formadora de Colônia

ug - Micrograma

uL – Microlitro

um - micrômetro

V- volts

v/v – volume / volume

xg – vezes a força gravitacional

XTT - 2,3-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-5-[carbonilo(fenilamino)]-2H-tetrazólio-hidróxido)

1. Introdução

1.1. Paracoccidioidomicose

Descrita pela primeira vez por Adolfo Lutz em 1908, a paracoccidioidomicose (PCM) constitui uma micose sistêmica granulomatosa, geograficamente restrita à América Latina, sendo prevalente no Brasil. Possui como agentes etiológicos os fungos dimórficos do gênero *Paracoccidioides*: *P. brasiliensis* e *P. lutzii*.

Estima-se que mais de 10 milhões de pessoas estejam infectadas pelo fungo, cuja forma sintomática se desenvolve apenas em 2% desse total (McEwen *et al.*, 1995). O diagnóstico e a real distribuição da PCM são prejudicados devido ao período de latência da doença e ao fato da notificação não ser obrigatória (Brummer *et al.*, 1993).

Quanto ao habitat natural do fungo, alguns autores sustentam a hipótese de se tratar do solo, devido a isolamentos feitos a partir de amostras de solo de diferentes locais como Brasil (Shome *et al.*, 1963; Montenegro *et al.*, 1996; Silva-Vergara *et al.*, 1998), Venezuela (De Albornoz, 1971) e Argentina (Negróni *et al.*, 1976).

Dessa forma, o trabalho com solo e plantações em áreas rurais podem ser considerados fatores de risco predisponentes para a aquisição da PCM, pois a infecção humana ocorre principalmente pela via respiratória, através da inalação de propágulos do micélio, como artroconídios pelo hospedeiro. Além disso, a maioria dos pacientes sintomáticos relata o exercício da atividade agrícola durante certo período da vida (Shikanai-Yasuda *et al.*, 2006), sendo em sua maioria: adultos, trabalhadores de zonas rurais, imunodeprimidos e preferencialmente do sexo masculino (Franco, 1987). Este último, pode ser explicado pelo fato do hormônio feminino, estrógeno, estar relacionado à supressão da conversão para a forma parasitária do fungo (Restrepo *et al.*, 1984; Salazar e Restrepo, 1985; Aristizabal *et al.*, 1998).

Uma vez no organismo, o fungo pode ser completamente destruído ou então

persistir e se multiplicar, produzindo lesão tecidual. Nos alvéolos pulmonares, os conídios presentes na forma miceliar do fungo, sob o estímulo da temperatura corpórea, sofrem transição para a forma leveduriforme parasitária (Mcewen *et al.*, 1987).

O estabelecimento e desenvolvimento da doença vão depender da interação de fatores relacionados ao fungo, como mecanismos de patogenicidade, virulência e composição antigênica, como também características genéticas e de imunidade do hospedeiro, além da relação com o meio ambiente, sendo, portanto, um evento complexo e dinâmico. (Calich *et al.*, 1987; Calich *et al.*, 1998).

Indivíduos expostos a propágulos do fungo, em sua maioria, desenvolvem uma infecção assintomática, com lesões granulomatosas estabelecidas nos pulmões e linfonodos. Porém, o fungo pode também permanecer no estado latente e posteriormente disseminar para outros órgãos e tecidos, por meio das vias hematogênica e linfática (Franco *et al.*, 1989).

Em relação as manifestações clínicas, a PCM afeta o sistema retículo-endotelial e pode se apresentar na forma: aguda, crônica e residual. Essas estão associadas a fatores relacionados com o parasita, como a virulência, sua habilidade em interagir com as estruturas superficiais do hospedeiro e invadi-las, a dimensão do inóculo, e com o estado imunológico e susceptibilidade genética à infecção do hospedeiro. O alcoolismo atua como co-fator juntamente com o tabagismo, agravando o quadro geral do paciente (Dos Santos *et al.*, 2003; Restrepo *et al.*, 2008).

A forma aguda da micose, também chamada de juvenil por acometer principalmente crianças e jovens, e imunocomprometidos, é caracterizada pelo progresso rápido, envolvendo órgãos como fígado, baço, gânglios linfáticos e medula óssea. Constitui a forma mais grave e com pior prognóstico, com alta taxa de

mortalidade.

A forma crônica tem alta frequência de envolvimento pulmonar e/ou mucocutâneo, desenvolvendo-se a partir do complexo primário ou da reativação de um foco quiescente, avançando de forma lenta, podendo se ausentar de manifestações clínicas por décadas. Afeta, em geral, adultos do sexo masculino com mais de 30 anos de idade, em que a maior parte dos casos inicia-se no trato respiratório inferior. Pode permanecer de forma unifocal ou multifocal (Brummer *et al.*, 1993; Felipe *et al.*, 2003; Felipe, Torres, *et al.*, 2005). Esta última, pode causar lesões granulomatosas no sistema nervoso central do paciente. Independente do órgão afetado, a doença evolui para a formação de sequelas com danos permanentes no indivíduo (Londero e Ramos, 1972; Londero e Severo, 1981; Brummer *et al.*, 1993).

A forma residual está relacionada com sequelas de lesões antigas provocadas pela doença, manifestando-se como uma insuficiência pulmonar crônica devido à fibrose, a mais grave (Franco *et al.*, 1993; Abreu E Silva *et al.*, 2013; Marques, 2013).

O diagnóstico padrão constitui exame direto em fluidos biológicos, histopatológicos ou através do isolamento dos fungos de espécimes clínicas, em que se busca elementos fúngicos de *P. brasiliensis*, células como características com múltiplos brotamentos. Os exames imunológicos também são utilizados para diagnóstico quando não se encontra o fungo nos testes microscópicos, e como forma de monitoramento terapêutico. Dentre os exames, podem-se destacar as técnicas de imunodifusão e contraímunoeletroforese devido ao custo-especificidade, comparado ao imunoensaio enzimático (ELISA) de maior custo e reações cruzadas. Como exame comprobatório e de acompanhamento, utiliza-se usualmente *imunoblotting*, tendo como marcadores glicoproteínas de 43kDa e 70kDa (Mendes-Giannini *et al.*, 1990; Puccia *et al.*, 1991; Puccia e Travassos, 1991; Fraser *et al.*, 1999; San-Blas *et al.*,

2002; Ameen *et al.*, 2010).

A terapêutica é determinada por fatores como: severidade da doença, comprometimento do sistema imunológico do paciente e a disponibilidade do medicamento. Entre os medicamentos de escolha estão a combinação de sulfametaxol/trimetoprim, itraconazol, cetoconazol, fluconazol e anfotericina B (Marques Da Silva *et al.*, 2003; Shikanai-Yasuda *et al.*, 2006; Ramos-E-Silva e Saraiva, 2008; Restrepo *et al.*, 2008).

Estágios leves e moderados da PCM tem como fármaco de escolha o itraconazol, e em casos mais agravados da doença, a anfotericina B. Devido ao custo mais acessível e a disponibilidade no sistema de saúde público, tem-se como opção amplamente utilizada a associação sulfametoxazol-trimetropim, embora apresente menor eficácia e exija um período de tratamento mais prolongado.

As alternativas dentre as drogas utilizadas são limitadas, ressaltando-se a alta toxicidade da anfotericina B e a falta de adesão ao tratamento com itraconazol devido ao seu extenso período de tratamento. Além disso, pacientes imunodeprimidos ou com co-infecção, os quais apresentam problemas relacionados a interações medicamentosas e/ou efeitos adversos despertam a necessidade de novas alternativas terapêuticas, como prospecção de substâncias naturais com potencial antifúngico (Ghannoum e Rice, 1999; Krcmery, 2005; Shikanai-Yasuda *et al.*, 2006; Di Santo, 2010; Marques, 2013). O abandono do tratamento acarreta em resistência ao tratamento, com o retorno da doença na forma mais agressiva e fatal.

1.2. *Paracoccidioides brasiliensis* e *Paracoccidioides lutzii*.

Em 1908, Adolpho Lutz relatou a primeira descrição da PCM, apresentando características do agente etiológico, sendo denominada *Zymonema brasiliensis* por

Splendore em 1912 e posteriormente, em 1930, ao ser comparada com *Coccidioides immitis* por Almeida, caracterizou-se o fungo como do gênero *Paracoccidioides* e da espécie *brasiliensis*.

A classificação de *P. brasiliensis* com base nas análises filogenéticas, pertencente ao reino Fungi; divisão Eumycota; ordem Onygenales; família: Ajellomycetaceae; formando um clado monofilético que inclui os gêneros *Blastomyces*, *Emmonsia* e *Histoplasma* (Untereiner *et al.*, 2004).

Atualmente, estudos filogenéticos dividem o gênero *Paracoccidioides* em duas espécies, denominadas: *Paracoccidioides brasiliensis* e *Paracoccidioides lutzii*. A primeira é dividida em quatro espécies filogenéticas S1, PS2, PS3 e PS4 (Teixeira *et al.*, 2014), e a segunda é chamada de Pb01-like. A correta taxonomia molecular deste fungo tem aberto novas possibilidades para o estudo e o entendimento de suas relações ecoepidemiológicas com seus hospedeiros (Bagagli *et al.*, 2006; Bagagli *et al.*, 2008).

Paracoccidioides spp. é considerado um fungo intracelular facultativo, apresenta dimorfismo, crescendo na fase miceliana (M) filamentosa multicelular, sob a forma de colônias cotonosas e esbranquiçadas, saprobiótica, em temperaturas de 25° a 27°C. Seus propágulos, uma vez inalados, na temperatura corpórea, podem sofrer diferenciação celular, assumindo forma leveduriforme (L), unicelular multinucleada, sob forma de células arredondadas, de parede dupla e brotamentos múltiplos característicos, constituindo a forma parasitária do fungo. Tal evento pode ser reproduzido *in vitro*, em meios enriquecidos a 37°C (Lacaz *et al.*, 1999; San-Blas *et al.*, 2002) sendo a transição reversível para os dois estados (Franco, 1987).

1.3. Fatores de virulência

A virulência fúngica, evento altamente complexo resultante da expressão de

múltiplos genes em diferentes estágios da infecção, está relacionado à capacidade de aderência, habilidade do microrganismo em interagir com as estruturas do hospedeiro e invadi-las, e o consequente desenvolvimento de PCM (Kashino *et al.*, 2000; Chiarella *et al.*, 2007; Benard, 2008; Loures *et al.*, 2011).

A endocitose deste fungo ativa os microfilamentos e microtúbulos e induz apoptose (Mendes-Giannini *et al.*, 2004; Del Vecchio *et al.*, 2009; Silva *et al.*, 2015). Fatores como o isolado fúngico e condições do hospedeiro possibilitam ao fungo o desenvolvimento de vários fenótipos (crescimento, invasão e metástase) o possibilitando aderir, extravasar e invadir barreiras impostas pelos tecidos do hospedeiro (Mendes-Giannini *et al.*, 2000; Mendes-Giannini *et al.*, 2004).

Os agentes de micoses sistêmicas possuem alguns fatores que permitem seu crescimento em condições adversas do hospedeiro, os quais podem contribuir para o desenvolvimento da doença (Casadevall e Pirofski, 1999). O sucesso da colonização nos tecidos do hospedeiro pelo fungo é, portanto, um evento complexo, geralmente envolvendo um ligante codificado pelo patógeno e um receptor da célula. O microrganismo tem como opção três tipos de componentes do hospedeiro, com os quais pode interagir: os produtos secretados pela célula, a superfície celular hospedeira ou as proteínas da matriz extracelular (MEC) colágenos tipos I e IV, fibronectina e laminina (Andreotti, 2006). O entendimento e identificação de moléculas envolvidas na adesão de microrganismos a diferentes substratos no hospedeiro é um dos caminhos a serem seguidos na descoberta de tratamentos eficientes para as micoses sistêmicas.

A adesão é conferida por uma classe de proteínas presente na parede celular do fungo, denominadas adesinas. O conhecimento da composição da parede celular e dos componentes exocelulares do fungo contribui para a identificação de ligantes

na superfície celular do patógeno. Estes componentes podem funcionar como adesinas capazes de mediar interações do fungo com tecidos do hospedeiro durante a infecção (Silva, 2008). Além do seu papel na fixação na célula hospedeira e também no acasalamento, as adesinas fúngicas são implicadas em várias outras funções como a agregação social, formação de biofilme sobre os tecidos, em prótese médica e cateteres e nas interações com outros micróbios (Nobile *et al.*, 2008). A formação de biofilme contribui para a resistência às drogas e aumento da persistência da infecção. Diferenças na adesão são responsáveis pela maior virulência/patogenicidade entre isolados (Andreotti *et al.*, 2005; Mendes-Giannini *et al.*, 2006). A variabilidade fenotípica e a plasticidade das adesinas as colocam como um mecanismo de defesa dos fungos, permitindo-lhes alterar suas propriedades de adesão, em resposta a diferentes ambientes (Ramana e Gupta, 2010).

Alguns receptores fúngicos envolvidos na interação com a MEC foram identificados em nível molecular (Klotz *et al.*, 1993; Bromley e Donaldson, 1996; Gil *et al.*, 1996; Gaur e Klotz, 1997; López-Ribot *et al.*, 1999). Moléculas com características de ligantes da matriz extracelular foram descritas para *Candida albicans* (Bouchara *et al.*, 1990; López-Ribot e Chaffin, 1994; Sakata *et al.*, 1999), *Aspergillus fumigatus* (Tronchin *et al.*, 1993), *Histoplasma capsulatum* (McMahon *et al.*, 1995), *P. brasiliensis* (Vicentini *et al.*, 1994; Hanna *et al.*, 2000; Andreotti *et al.*, 2005; González *et al.*, 2005; Barbosa *et al.*, 2006) e *Penicillium marneffe* (Hamilton *et al.*, 1998).

A glicoproteína de 43 kDa, ligante de laminina e fibronectina, tem papel na adesão (Vicentini *et al.*, 1994; Mendes-Giannini *et al.*, 2006). Fato este confirmado desde que o soro anti-gp 43 inibiu o processo de adesão em 85% (Hanna *et al.*, 2000). Mas provavelmente, outros componentes do fungo tenham papel do processo de adesão (Mendes-Giannini *et al.*, 2000). Andreotti (2005) isolou uma adesina de 30 kDa

de *P. brasiliensis*, com capacidade de ligação à laminina, com maior expressão num isolado de *P. brasiliensis* que apresentava alta capacidade de adesão, sendo caracterizada como pertencente à família 14-3-3. *P. brasiliensis* também apresenta em sua superfície celular duas proteínas de 19 e 32-kDa, detectados em ambas formas (M/L) que se ligam à três proteínas da MEC: laminina, fibronectina e fibrinogênio (González *et al.*, 2005). A proteína gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), recombinante de *P. brasiliensis*, foi capaz de se ligar à laminina, colágeno I e fibronectina. O tratamento de formas leveduriformes de *P. brasiliensis* com anti-GAPDH e de pneumócitos com GAPDH recombinante promoveu a inibição da infecção do fungo às células epiteliais (Barbosa *et al.*, 2006). Coltri *et al.* (2006) e Ganiko *et al.* (2007) descreveram a paracoccina, uma lecitina ligante de N-acetilglucosamina de *P. brasiliensis*. Pereira *et al.* (2007) descreveram a triosefosfato isomerase de *P. brasiliensis* que se liga preferencialmente à laminina, determinada por ensaios de inibição. Donofrio *et al.* (2009) descreveram a proteína enolase como uma adesina de *P. brasiliensis* ligante de fibronectina, além disso, Marcos *et al.* (2012) mais uma vez demonstraram que a enolase se liga à diferentes componentes da MEC avaliados no estudo e também verificaram que a enolase é expressa em níveis elevados na parede celular do fungo, contribuindo assim na adesão do patógeno ao hospedeiro. Da Silva Neto *et al.* (2009) demonstraram que a proteína malato sintetase de superfície de *P. brasiliensis*, ligante de fibronectina e colágenos tipo I e IV, contribui para a adesão do fungo, comportando-se como uma adesina. Em outro estudo com esta mesma adesina, De Oliveira *et al.* (2013) demonstraram que a proteína malato sintetase de *Paracoccidioides* interage com proteínas de diferentes categorias moleculares como transporte celular, biossíntese de proteínas, modificação e degradação de proteínas e transdução de sinal sugerindo que esta proteína

desempenha diferentes papéis na célula fúngica.

Os fungos do gênero *Paracoccidioides* possuem uma grande diversidade de moléculas, das mais distintas origens e funções, que atuam como moléculas de vital importância para a sobrevivência do fungo quando em contato com o hospedeiro, permitindo assim que o fungo se proteja e se defenda do ambiente hostil que deve enfrentar para se estabelecer e se disseminar pelo organismo do hospedeiro. Por conta desta grande variedade, distintas moléculas usadas pelo fungo durante essa interação, ainda são pouco conhecidas e esforços na caracterização de novas moléculas devem ser realizados a fim de conhecer todo o arsenal utilizado pelo patógeno e delinear novas terapêuticas e melhorar o diagnóstico. Esta problemática se agrava com as recentes descobertas acerca do gênero *Paracoccidioides* que agora é composto por duas espécies, sendo uma delas divididas em quatro espécies filogenéticas, tal diversidade também se reflete nas estratégias adotadas pelo patógeno para o estabelecimento da infecção.

Muitos genes foram descritos como prováveis envolvidos na sobrevivência de *Paracoccidioides* spp. no hospedeiro. Entre estes, há aqueles que codificam para proteínas essenciais para a vida do fungo, assim como aqueles envolvidos na interação com seu hospedeiro, caracterizando o fenótipo patogênico (Felipe, Andrade, *et al.*, 2005; Bailão *et al.*, 2006; Bastos *et al.*, 2007). Os avanços na caracterização de adesinas de *P. brasiliensis* têm sido obtidos com os estudos de transcriptoma (Felipe *et al.*, 2003; Felipe, Torres, *et al.*, 2005; Oliveira, 2010).

Oliveira (2010) utilizando de técnicas de transcriptoma (*Representational Difference Analysis* - RDA) e de proteômica fez um estudo onde buscou identificar genes e proteínas diferencialmente expressas durante a interação de *P. lutzii* Pb01 com os componentes da matriz extracelular (MEC) laminina, fibronectina, colágeno

tipo I e colágeno tipo IV quando em situação de depleção de metais de ferro e cobre mimetizando as condições de privação destes micronutrientes que o patógeno encontra durante sua interação com o hospedeiro. Os resultados deste estudo demonstraram o grande arsenal utilizado pelo fungo para aderir aos componentes da MEC, sendo identificadas proteínas conhecidamente utilizadas pelo fungo como Enolase, 14-3-3, Malato sintase, Frutose bifosfato aldolase, GAPDH, além de proteínas que ainda não tiveram sua função descrita na interação com *P. brasiliensis*. Dentre estas proteínas com seu papel na interação ainda não identificada está a *Cell surface protein* de *Aspergillus flavus* (CSP) que têm papel importante já descrito na virulência de outros patógenos.

A CSP é uma proteína de superfície celular de *Aspergillus flavus* (CS protein) possui homologia com uma proteína hipotética identificada no genoma de *P. brasiliensis* e *P. lutzii*. Pela sua localização celular julgamos ser uma proteína interessante para o estudo, pois pode estar envolvida na interação de *Paracoccidioides* spp. com o hospedeiro.

Neste sentido, nosso grupo (Oliveira, 2014) produziu a proteína CSP recombinante em sistema heterólogo utilizando a bactéria *Escherichia coli* e após a purificação a utilizou em testes para avaliar o papel desta proteína na adesão de *Paracoccidioides* spp. à cultura celular e a componentes da matriz extracelular. Ao tratar cultura de pneumócitos A549 com a proteína recombinante foi observada que esta inibiu em torno de 15% a adesão, mostrando assim que a proteína CSP recombinante foi capaz de inibir a adesão do fungo aos pneumócitos A549. Este resultado mostra que esta proteína pode ser caracterizada como uma das moléculas utilizadas pelo fungo para aderir ao hospedeiro. Além disso, o tratamento dos diferentes componentes da matriz extracelular com a proteína CSP levou a inibição

da adesão de *P. lutzii* significativa frente a todos os componentes da MEC quando comparada com a inibição da adesão de *P. brasiliensis*. Os resultados mostram uma maior inibição da adesão de *P. lutzii* aos componentes laminina (23%), fibronectina (17%) e colágeno I (aproximadamente 16%). A inibição da adesão desta espécie aos componentes da MEC, laminina e fibronectina já eram esperados, visto que a primeira vez que esta proteína foi descrita por Oliveira *et al.* (2010), foi durante estudo de transcriptoma do fungo *P. lutzii* onde o gene correspondente a essa proteína foi expresso durante o contato do fungo com estes dois componentes da MEC. Para *P. brasiliensis* não foi observada uma inibição da adesão significativa, sendo que a inibição para todas as matrizes estudadas ficou em torno de 5%. Estes resultados nos mostram que a CSP de *P. brasiliensis* pode apresentar alvos diferentes na MEC do hospedeiro, em relação aos componentes avaliados no estudo. Sendo importante também como descrição das adesinas para *P. lutzii*, aumentando assim nosso conhecimento sobre o arsenal molecular utilizado por esta espécie durante sua interação com o hospedeiro. Outro aspecto desenvolvido em nosso laboratório diz respeito à avaliação *in vivo* empregando modelos alternativos que minimizam o uso de animais. Nesse sentido o emprego do modelo *Galleria mellonella* tem dado resultados bastante importantes (Scorzoni *et al.*, 2013; Oliveira, 2014).

Assim, um estudo mais aprofundado se faz necessário e para tanto a produção de anticorpo contra essa proteína e a avaliação da influência desta no processo adesivo de *Paracoccidioides* spp. é de grande importância, sendo esse conhecimento necessário para a caracterização desta proteína como uma adesina.

Neste sentido, este trabalho tem como objetivos a avaliação do papel da CSP de *P. brasiliensis* e *P. lutzii* na interação fungo-hospedeiro e sua contribuição para a virulência, sendo para isso determinados os seguintes objetivos específicos:

- Produção de anticorpo policlonal anti-CSP de *Paracoccidioides* spp.;
- Avaliar a capacidade do anticorpo produzido de inibir a interação do fungo com pneumócitos A549 e com os componentes da matriz extracelular, laminina, fibronectina, fibrinogênio e colágeno tipo I.
- Realizar o teste de imunofluorescência para verificação da localização da CSP durante a interação fungo-célula e alterações no citoesqueleto celular causado pelo tratamento com a proteína recombinante CSP;
- Confirmação da localização celular da CSP através de microscopia eletrônica – Immunogold;
- Avaliar a influência da proteína CSP na virulência de *Paracoccidioides* spp. in vivo utilizando *G. mellonella* como modelo.

2. Desenvolvimento

2.1. Materiais e métodos

2.1.1. Microrganismo e condições de cultivo

Foi utilizado o isolado 18 de *P. brasiliensis* (Pb) e isolado de 01 de *P. lutzii* na fase leveduriforme, procedente da micoteca da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FM-USP). Os isolados de Pb18 e 01 foram mantidos, durante a realização deste trabalho em meio Fava Netto (0,3% proteose peptona; 1% neopeptona; 0,5% extrato de carne; 0,5% extrato de levedura; 0,5% cloreto de sódio; 4% dextrose; 1,8% ágar bacteriológico), a 35°C e repicados a cada 7 dias. Antes dos experimentos os fungos foram transferidos para meio BHI (Brain Heart Infusion medium) líquido e cultivado por 4 dias a 35°C sob agitação (200 rpm).

2.1.2. Produção de soro policlonal anti-CSP de *Paracoccidioides* spp.

Para a produção de soro policlonal anti-CSP de *Paracoccidioides* spp. foram realizadas oito inoculações (1,0 mg/mL) via intradérmica intercaladas a cada 7 dias da proteína CSP recombinante obtida anteriormente por Oliveira (2014) em coelhos machos albinos provenientes do Biotério Central da UNESP-Botucatu, conforme esquema abaixo.

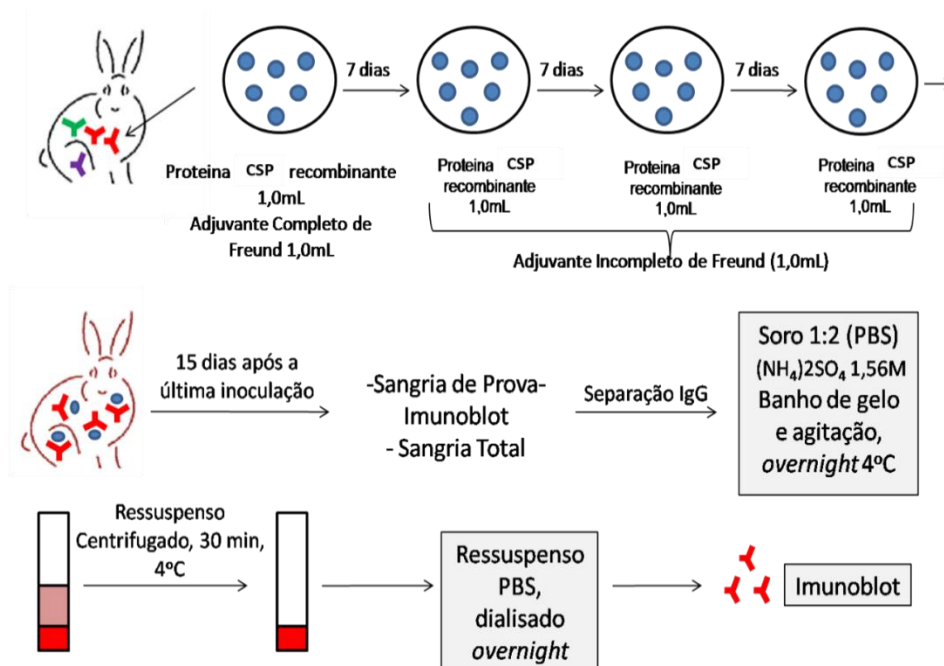


Figura 1. Esquema representativo da produção do anticorpo policlonal anti-CSP de *Paracoccidioides* spp. Esquema adaptado de Silva (2011).

A primeira suspensão foi emulsificada com adjuvante completo de Freund e nas seguintes com o adjuvante incompleto de Freund. Após 15 dias da última inoculação, realizou-se a sangria de prova e a avaliação do título de anticorpos produzidos através da técnica de Imunoblot, e em seguida, a sangria total foi efetuada.

Precipitou-se com sulfato de amônio 1,56 M, pH 6,5, a fração do soro rica em

imunoglobulinas. O soro foi diluído 1:2 em PBS, e colocado em banho de gelo sobre um agitador magnético, adicionando-se o mesmo volume de sulfato de amônio saturado gota a gota. O soro foi incubado overnight a 4°C. O sedimento formado foi ressuspenso e posteriormente centrifugado a 850xg por 30 minutos a 4°C. Armazenou-se o sobrenadante para nova precipitação, e o sedimento formado foi ressuspenso em sulfato de amônio 40%, e centrifugado novamente. Após centrifugação, o sobrenadante formado foi descartado e o sedimento ressuspenso em PBS na metade do volume do soro, e dialisado em PBS overnight a 4°C. O título do soro foi novamente avaliado por Immunoblot, aliquoteado e estocado a -70°C.

2.1.3. Preparo dos extratos protéicos de *Paracoccidioides* spp.

Os cultivos de *P. brasiliensis* e *P. lutzii* foram centrifugados e lavados de 3 a 5 vezes com água gelada para a retirada do meio de cultura. Foram acrescidos aos pellets foi acrescido solução 10 mM Tris – HCl, um mix de inibidores de proteases (1mg/mL de pepstatina, leupeptina, antipain, aprotinina e chymostatin) e 100 mM de PMSF, depois disso, os pellets foram macerados com nitrogênio líquido. Estes macerados foram recolhidos acrescidos de pérolas de vidro e levados ao vórtex por 30 minutos, a seguir foram centrifugados por 45 minutos 13.000 xg e o sobrenadante foi recolhido. A concentração protéica dos extratos foi quantificada pelo método de Bradford (BioRad) e em seguida as amostras foram avaliadas por SDSPAGE, conforme descrito no item 2.1.4..

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

Separou-se por SDS-PAGE, os componentes proteicos dos extratos de *P. brasiliensis* e *P. lutzii*, segundo Laemmli (1970) e Studier (1973). Os componentes foram separados em gel de corrida a 10%, e em gel de empilhamento a 5% de acrilamida, preparados a partir de solução estoque contendo 30% por massa de acrilamida e 0,8% por massa de bis-acrilamida. Para polimerização do gel de separação utilizou-se solução contendo 1,5 M de Tris-ácido clorídrico (HCl), pH 8,8 e 0,4% de SDS, em presença de 0,1% v/v de N,N,N',N'-tetrametil-4,2 etilenodiamina (TEMED) e 0,1% de persulfato de amônio (APS). Quanto ao gel de empilhamento, a polimerização se deu a partir da solução de 0,5 M 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. As amostras foram preparadas empregando 64µL de extrato protéico diluído em tampão de amostra (1:5), constituído de 62,5% de Tris-HCl [tris (hidroxi-metil) aminometano] pH 6,8 2% de SDS, 10% de glicerol, 0,5 M de ditreitol e 0,002% de azul de bromofenol. Posteriormente, foram aquecidas em banho Maria, com água fervente por 3 minutos, para dissociação. Para cada corrida eletroforética, uma mistura de proteínas de peso molecular conhecido foi utilizada para calcular, a partir da análise da migração destes padrões, os pesos moleculares das proteínas. Até que o tampão de amostra penetrasse no gel de separação, a corrida eletroforética foi realizada a 10 mA (80V) e a 20 mA (120V) até o término do gel. O tampão de corrida é constituído de Tris 0,075 M, glicina 0,57 M e SDS 0,1%, pH 8,3. Utilizou-se Comassie Azul Brilhante G-250, para corar os géis, segundo Neuhoﬀ et al. (1988).

2.1.5. *Imunoblot* (Avaliação do título dos anti-soros)

A proteína CSP recombinante purificada foi submetida à SDS-PAGE e transferida eletroforéticamente do gel para membrana de nitrocelulose. Após a eletroforese, colocou-se os géis sobre membranas de nitrocelulose, recobertos com papel de filtro e comprimidos com esponjas de poliuretano, previamente submersos 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 transferência contendo o mesmo tampão. A transferência foi realizada *overnight* à amperagem constante de 0,4mA.

A membrana foi corada por Ponceau S (0,5% w/v em 5% v/v de ácido acético) para a localização das bandas proteicas transferidas e lavadas por 15 minutos.

Cortou-se em tiras as membranas de nitrocelulose contendo os antígenos, sendo posteriormente incubadas com solução bloqueadora (5% de leite desnatado em PBS) por 4 horas. Diluiu-se o soro policlonal anti-CSP em solução de bloqueio (1:100; 1:500; 1:1000) para aplicação sobre a membrana contendo a proteína CSP recombinante. Como controle foi utilizado soro do coelho não imunizado (1:100 em solução de bloqueio). Após a adição do soro policlonal anti-CSP e o controle em suas respectivas diluições sobre as membranas cortadas, estas foram colocadas sob agitação, *overnight* em temperatura ambiente. Após esta incubação, as tiras foram lavadas por 3 vezes com PBS-Tween 0,05%. Após as lavagens, as tiras foram incubadas por 2 horas, com conjugado imunoenzimático soro anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase (SIGMA) no título de 1:2000. Realizou-se então novo ciclo de lavagens para retirada do excesso de conjugado. Para revelação dos complexos antígeno-anticorpo formados com o substrato cromógeno, adicionou-se às tiras solução reveladora contendo 0,012 g de diaminobenzidina (DAB-SIGMA) diluída em

20 mL de PBS acrescido de 200 µL de água oxigenada. Em seguida, a reação foi bloqueada com água destilada.

Como controle de reatividade foi utilizado soro do coelho não imunizado (1:100 em solução de bloqueio).

Além da titulação do anticorpo, o imunoblot também foi utilizado para detectar a proteína CSP em extratos totais proteicos de *P. brasiliensis* e *P. lutzii*, sendo para isso utilizado o anticorpo anti-CSP nos títulos 1:500, 1:1000.

A mesma técnica também foi utilizada para a detecção da proteína CSP no sobrenadante de cultura de *Paracoccidoides* spp. afim de detectar se a proteína é secretada para o meio extracelular. Para tanto, o anticorpo anti-CSP foi utilizado no título de 1:100.

2.1.6. Cultura Celular

Neste estudo foram utilizadas 3 linhagens celulares diferentes: pneumócitos A549, pneumócitos MRC-5 e hepatócitos Hep-G2.

2.1.6.1. Cultivo Contínuo e Tripsinização

O cultivo contínuo da linhagem de células ocorreu em garrafas de plástico estéreis, em meio F-12 Nutrient Mixture (HAM-F12), para A549 e meio DEMEN, para Hep-G2 e MRC-5, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SBF), sendo mantida em estufa a 36,5°C com 5% de CO₂. Decorridos 3-4 dias, as garrafas de células foram tripsinizadas, lavando-se a monocamada celular formada com 1mL de ATV-solução de tripsina 0,2% e EDTA 0,02% (Adolfo Lutz) e, em seguida, esta foi desprezada e acrescentado mais 1mL de ATV. Seguidos 1-2 minutos, homogeneizaram-se as células com volumes variáveis de meio (HAM F12 ou DMEN) acrescido de 10% de

SFB, para neutralização da tripsina (ATV). O volume total da suspensão celular obtido foi diluído em meio (HAM F12 ou DEMEN) acrescido de 10% de SBF e transferido para outras garrafas, de modo a se obter uma concentração de 10^6 células/mL.

2.1.7. Citotoxicidade da proteína CSP recombinante em diferentes linhagens celulares

A citotoxicidade da proteína CSP recombinante foi testada frente a 3 linhagens celulares: A549, Hep-G2 e MRC-5. A citotoxicidade foi testada nas seguintes concentrações da proteína recombinante: 50, 25, 12,5, 6,25, 3,12, 1,53, 0,78, 0,39, 0,19 e 0,09µg/mL, sendo as diluições da proteína realizada em meio de cultura de acordo com o tipo celular (item 2.1.6.1). O ensaio foi feito em placa de cultura de 96 poços sendo que em cada poço foi adicionado 10^5 células das diferentes linhagens testadas. A proteína foi deixada em contato com as células por 24 horas incubadas a 37°C 5% CO₂. Após o tempo de incubação a viabilidade foi verificada utilizando-se o indicador de viabilidade alamarBlue® (Life Technologies), sendo realizada leitura espectrofotométrica a 590nm.

2.1.8. Imunofluorescência para avaliação de alterações do citoesqueleto em pneumócitos após o tratamento com a proteína CSP recombinante de *Paracoccidioides*.

Os pneumócitos foram tratados com 25µg/ml da proteína CSP recombinante por 2 e 5 horas a 37°C. Após o período de tratamento as células foram lavadas 3 vezes com PBS e então seguiu-se para a imunofluorescência conforme descrito abaixo.

2.1.8.1. Microfilamentos de actina após tratamento com a proteína CSP recombinante

A faloidina é uma toxina que se liga à actina polimérica, estabilizando-a e, portanto, interferindo com o retículo endoplasmático e outras estruturas ricas em actina. Para a reação de imunofluorescência, as placas contendo as células epiteliais tratadas com a proteína recombinante em diferentes períodos foram permeabilizadas com solução de Triton X 100, 0,5% por 30 minutos. Em seguida, lavou-se com PBS-Tween e realizou-se o bloqueio (leite 5%/BSA 3%) por 1 hora a 37°C. A actina foi marcada pela adição de faloidina-FITC no título de 1:50 em Azul de Evans, por 50 minutos a 37°C, no escuro, sendo novamente lavadas com PBS-Tween e então incubadas com DAPI 1µg/mL (4', 6 – diamino-2-fenolindol), por 10 minutos a 37°C. Realizou-se novo ciclo de lavagens com PBS-Tween, e as células então foram observadas no InCell Analyzer 2000 (GE healthcare).

2.1.8.2. Microtúbulos após tratamento com a CSP recombinante

Para a verificação dos microtúbulos, as placas contendo os pneumócitos tratados com a proteína CSP recombinante em diferentes períodos de tempo foram processadas para a permeabilização e bloqueio. Adicionou-se para marcação da tubulina, anticorpo monoclonal anti β -tubulina (Sigma) produzido em camundongo diluído 1:100 em solução de bloqueio por 1h a 37°C. Realizou-se lavagem e então adicionou-se o anticorpo secundário anti-mouse IgG conjugado com Alexa Fluor® 488 diluído 1:250 em solução de bloqueio por 1h a 37°C, no escuro. Realizou-se novo ciclo de lavagens com PBS-Tween, em seguida foram incubadas com DAPI 1µg/mL (4', 6

– diamino-2-fenolindol), por 10 minutos a 37°C. As placas foram lavadas novamente com PBS-Tween, então observadas no InCell Analyzer 2000 (GE healthcare).

2.1.9. Avaliação da ocorrência de apoptose em células tratadas com a proteína CSP recombinante pela técnica do TUNEL

A técnica do “TUNEL” (Terminal deoxy-transferase mediated X-dUTP Nick End Labeling) tem como princípio a marcação específica de sequências de DNA oriundas da fragmentação do processo de apoptose celular. Para tanto, em placas de 96 poços, contendo pneumócitos A549, adicionou-se a proteína recombinante CSP (25µg/ml), e como controle negativo, células tratadas com PBS, sendo o tratamento feito por 24 horas. Em seguida, a placa foi lavada 3 vezes com PBS gelado, para que então fosse adicionado paraformaldeído 4%, deixando a temperatura ambiente por 30 minutos. Realizou-se novo ciclo de lavagens com PBS gelado, e adicionou-se aos poços solução de bloqueio (3% BSA, 20% SFB em PBS), incubando a 37°C por 1 hora.

Após lavagem com PBS gelado, os pneumócitos foram incubados 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 1 hora a 37°C. Tal processo, incorporou os nucleotídeos marcados com fluoresceína, catalisados pela transferase terminal à extremidade 3’ dos fragmentos apoptóticos de DNA. Realizou-se a lavagem dos poços com PBS gelado três vezes, fixando com paraformaldeído a 1% e então a análise foi realizada no InCell Analyzer 2000 (GE healthcare).

2.1.10. Preparo e padronização do inóculo de *Paracoccidioides* spp.

Antes dos experimentos, os isolados 18 de *P. brasiliensis* e 01 de *P. lutzii*, na fase leveduriforme (L) foram cultivados em meio BHI acrescido de 1% glicose durante quatro dias sob agitação a 35 °C. A cultura então foi lavada 3 vezes em PBS e então as células foram contadas em câmara de Neubauer e o inóculo acertado para uma quantidade suficiente para ao final utilizarmos 10^5 cels/poço.

2.1.11. Ensaio de inibição da interação de *Paracoccidioides* spp. com células epiteliais utilizando o anticorpo policlonal anti-CSP

Os ensaios de inibição da infecção foram realizados em placas de 96 poços com monocamadas de pneumócitos A549. As células foram infectadas, por período de 2 e 5 horas, com suspensões padronizadas de 10^5 cels/poço previamente marcadas com CFSE (5(6)-Carboxyfluorescein diacetate N-succinimidyl Ester, BioChemika) de *Paracoccidioides* spp. tratadas com o anticorpo anti-CSP (1:100) por 1 hora a 37°C sob agitação. Após o tempo de infecção, as placas foram lavadas com PBS para retirar as células fúngicas não aderidas, e então as placas com as células foram colocadas em gelo e lavadas com PBS gelado, fazendo com que as células aderidas a placa se descolassem da placa. As células foram então recuperadas e a porcentagem de células fúngicas aderidas aos pneumócitos A549 foi avaliada por citometria de fluxo (BD FACS CANTO, BD Biosciences).

2.1.12. Ensaio de inibição da interação de *Paracoccidioides* spp. com componentes da matriz extracelular utilizando o anticorpo policlonal anti-CSP

Este ensaio foi realizado de acordo com o descrito por Oliveira et al. (2015). Para este ensaio utilizou-se placas de 24 poços, as quais foram sensibilizadas com os componentes da matriz extracelular, laminina, fibronetina, fibrinogênio e colágeno tipo I, na concentração de 10 µg/mL, *overnight* a 4°C. As placas foram então incubadas a temperatura ambiente por 1 hora, e depois passaram por um ciclo de lavagem com PBS. Após as lavagens, foram inoculadas às placas suspensões padronizadas (5×10^6 cels/mL) de *P. brasiliensis* e *P. lutzii* em PBS, tratados com o anticorpo anti-CSP no título de 1:100 por 1 hora a 37°C. As placas passaram por tempos de incubação de 2h e 5h e então o sobrenadante foi retirado e a placa passou por novo ciclo de lavagem com PBS para retirar células não aderidas. A cada poço adicionou-se 300 µL de tripsina para desprender o fungo, ligado aos componentes da MEC, aderido a placa, recolhendo as suspensões em Eppendorfs. A tripsina foi neutralizada adicionando-se 300 µL de soro fetal bovino. Após a neutralização o material foi centrifugado a 4000rpm à 4°C por 5 minutos. Após a centrifugação descartou-se os sobrenadantes e a cada eppendorf foi adicionado 500 µL de FACSFlow para posterior contagem de células através de citometria de fluxo (BD FACSCanto), com o auxílio do software BDFACS Diva.

2.1.13. Determinação da localização da proteína CSP através da técnica de Imunocitoquímica em nível ultraestrutural (Immunogold) e Microscopia eletrônica durante a interação de *Paracoccidioides* spp. com células A549 e com componentes da MEC

Suspensões de células epiteliais A549 e dos componentes da MEC laminina, fibronectina e colágenos tipo I e IV infectados com *P. brasiliensis* e *P. lutzii* por 2h foram fixadas (2,5% v/v glutaraldeído em tampão cacodilato de sódio 0,1 M pH 7,2) por 24h a 4 °C e enviadas para o Serviço de Microscopia Eletrônica do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB-I) da USP-SP para o emblocamento e preparo dos cortes ultrafinos.

Os cortes foram então coletados em telas de níquel e submetidos à reação de imunocitoquímica. Realizou-se a lavagem dos cortes com água destilada por 5 minutos, e em seguida lavados com TBS pH 7,24 com glicina 0,02 M a temperatura ambiente por 15 minutos. Posteriormente, fez-se o bloqueio dos sítios antigênicos inespecíficos com 3% BSA em TBS, NaN₃ 0,05% e Tween 20 0,1%, pH 7,2, por 1 hora.

O anticorpo anti-CSP policlonal foi diluído 1:50 em TBS-BSA 0,1%, NaN₃ 0,05%, Tween 20 a 0,1%, pH 7,3 e adicionado aos cortes, incubando em baixa temperatura *overnight* em câmara úmida. Após esta incubação, realizou-se novo ciclo de lavagem durante 25 minutos com TBS-BSA 0,1%, NaN₃ 0,05%, Tween 20 0,1%, pH 7,3; e uma lavagem de 5 minutos com TBS-BSA 1%, NaN₃ 0,05% e Tween 20 0,1%, pH 8,2.

Incubou-se o anticorpo secundário, anti-IgG de coelho marcado com partículas de ouro coloidal de 10nm de diâmetro (SIGMA G-3779), diluídos a 1:10 em 0,05M NaCl, 1% BSA, 0,05% NaN₃, 0,01% Tween 20, pH 8,2; em câmara úmida *overnight*

por 2 horas. Realizou-se a lavagem com TBS-BSA 1%, NaN_3 0,05%, Tween 20 0,1%, pH 8,2 por 5 minutos e utilizou-se um ciclo de lavagens com (1) TBS-BSA 0,1%, NaN_3 0,05%, Tween 20 0,1% durante 15 minutos (3 trocas de 5 minutos) e com (2) TBS-Tween 20 0,1%, pH 7,2 por 5 minutos. Os cortes foram fixados com glutaraldeído a 2,5% em tampão cacodilato 0,1 M, pH 7,2 a temperatura ambiente. Realizaram-se lavagens com água destilada. As telas foram secadas sob papel de filtro e submetidas ao contraste com uranila 4% ultrafiltrada, por 5 minutos e citrato de chumbo por 7 minutos. Após a secagem por temperatura ambiente por 1h o material foi examinado em microscópio de transmissão eletrônica, Jeol 1010 (Jeol, Tokyo, Japan). O contraste das telas e o uso do microscópio foram realizados no Laboratório de Microscopia Eletrônica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – FMRP-USP.

2.1.14. Influência da proteína CSP na virulência de *Paracoccidioides* spp. em modelo alternativo de *Galleria mellonella*

As larvas de *G. mellonella* usadas neste estudo foram procedentes do Núcleo de Proteômica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – FCFAR UNESP, sendo a criação realizada de acordo com Ramarao et al. (2012) alimentadas com cera de abelha e pólen e mantidas a 25°C até atingir o peso necessário para os experimentos.

Para este ensaio o inóculo foi preparado como descrito no item 2.1.10, sendo que será inoculado 5×10^6 células por larva. Este tamanho de inóculo é considerada letal para *Galleria mellonella* após o período de 7 dias de infecção conforme descrito por Scorzoni et al. (2015).

Selecionou-se *G. mellonella* entre o peso de 0,1 - 0,2 g em estágio larvário, separando em diferentes grupos de 16 larvas, sendo que no dia anterior do

experimento as larvas foram incubadas a 37 °C até o momento da inoculação. Antes do início da inoculação, utilizou-se etanol 70% para a assepsia das pró-patas da larva. Com auxílio de seringas Hamilton (Hamilton, EUA), foram inoculados nas pró-patas das larvas 10 µL de suspensão, de acordo com seu respectivo grupo. Após a infecção, as larvas foram incubadas em placas Petri a 37 °C por 7 dias e a mortalidade (ausência de movimento após tocá-las com uma pinça) analisada diariamente (Scorzoni et al., 2015; Thomaz et al., 2013).

Diferentes grupos foram avaliados neste estudo: 1) Grupo tratado: este grupo teve como objetivo avaliar a capacidade do anticorpo em evitar a infecção por *Paracoccidioides* spp., dessa forma, suspensões de *P. brasiliensis* e *P. lutzii* foram incubadas em contato com o anticorpo anti-CSP no título 1:100 por 1 hora a 37°C. Após este período as suspensões foram lavadas em PBS e inoculadas nas larvas; 2) Grupo tratado controle: este grupo teve como objetivo avaliar a influência do soro pré-imune de coelho na virulência de *Paracoccidioides* spp., dessa forma, suspensões de *P. brasiliensis* e *P. lutzii* foram incubadas em contato com o soro pré-imune de coelho no título 1:100 por 1 hora a 37 °C. Após este período as suspensões foram lavadas em PBS e inoculadas nas larvas; 3) Grupo controle – PBS: O grupo inoculado com o PBS, utilizado para o preparo dos inóculos, teve como objetivo verificar os efeitos como injúria física ocasionada pela inoculação, alimentação e temperatura a que as larvas são submetidas.

2.1.15. Análises estatísticas

As análises estatísticas dos experimentos foram realizadas utilizando-se One-Way ANOVA com pós-teste de Tuckey. As análises estatísticas e a confecção dos

gráficos foram realizadas utilizando-se o software GradPad Prism e o valor de p adotado foi $p < 0.05$.

2.2. Resultados

2.2.1. Produção de anticorpo anti-CSP e análise por imunoblot

Com a proteína CSP recombinante, foi produzido o anticorpo policlonal em coelho para o melhor estudo desta proteína durante a interação fungo-hospedeiro. Quando foi obtido um bom título de anticorpos (reatividade superior a 1:100, que foi alcançada após 8 inoculações), foi realizada a sangria total e o soro obtido foi precipitado com sulfato de amônio. Este soro então foi avaliado pela técnica de imunoblot e observou-se reatividade com a proteína recombinante nos títulos de: 1:100, 1:500 e 1:1000 (Figura 2). Estes resultados mostram o sucesso na produção do anticorpo contra a proteína CSP.

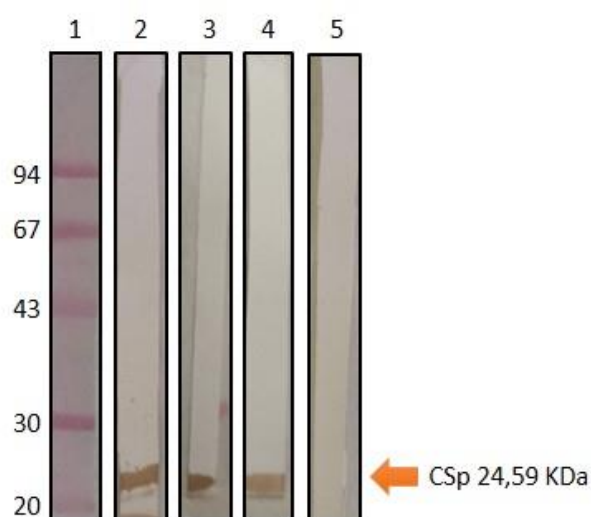


Figura 2. Imunoblot para verificação da reatividade do soro policlonal anti-CSP. (1)

massa molecular; (2) reatividade na diluição de 1:100 (3) 1:500, (4) 1:1000 e (5) controle de reatividade utilizando soro de coelho não imunizado.

Este soro também foi avaliado em relação à sua reatividade com extratos de proteínas obtidas de *P. brasiliensis* e *P. lutzii* além de filtrado de cultura obtidos das duas espécies estudadas. Foi verificada reatividade do anticorpo policlonal frente a todas as condições testadas (Figura 3). Conforme podemos observar na figura, o anticorpo reagiu com as duas espécies, porém para *P. brasiliensis* observamos uma reação mais fraca nos dois títulos, diferente de *P. lutzii* onde foi claramente possível observar a reatividade nos dois títulos testados (1:500 e 1:1000) (Figura 3A). Ao realizarmos o imunoblot usando o extrato total de *Paracoccidioides* spp. podemos observar que o anticorpo está reagindo apenas com a proteína de interesse, não havendo reação inespecífica com outras proteínas do fungo.

Além disso, foi realizado blot com o objetivo de verificar esta proteína no sobrenadante do meio de cultivo do fungo, o que pode nos indicar se o fungo exporta esta proteína para o meio extracelular. Para tanto, o título de reatividade foi de 1:100 e podemos ver a banda correspondente à proteína CSP apenas no sobrenadante de *P. lutzii* (Figura 3B).

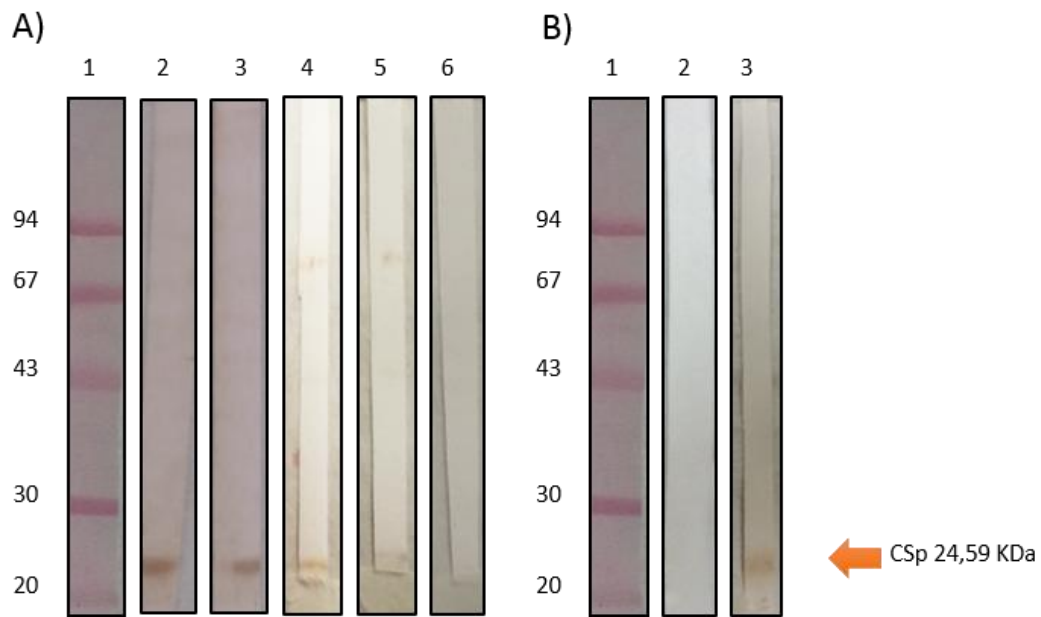


Figura 3. A) Imunoblot para verificação da reatividade do soro policlonal anti-CSP com extrato total de proteínas de (2 e 3) *P. lutzii* (Títulos: 1:500 e 1:1000, respectivamente) e (4 e 5) *P. brasiliensis* (Títulos: 1:500 e 1:1000, respectivamente); (1) massa molecular; (6) controle de reatividade ao extrato total de *P. brasiliensis* utilizando soro de coelho não imunizado. B) Imunoblot para verificação da proteína CSP no sobrenadante da cultura de (2) *P. brasiliensis* e (3) *P. lutzii*.

2.2.2. Ensaio de Viabilidade Celular

A proteína recombinante CSP foi testada quanto a sua toxicidade nas linhagens celulares A549, MRC-5 e Hep-G2. Foram avaliadas as concentrações de 50 a 0,09 µg/mL de proteína recombinante, sendo que as células foram deixadas em contato com a proteína por 24 horas. Podemos observar que após 24 horas de contato, a viabilidade celular se manteve acima de 50% para todas as concentrações.

Até 25 µg/mL a viabilidade se manteve próxima a 100% (Figuras 4, 5 e 6). Estes resultados são importantes pois nos dá segurança para a realização de diferentes ensaios não interferindo na viabilidade celular.

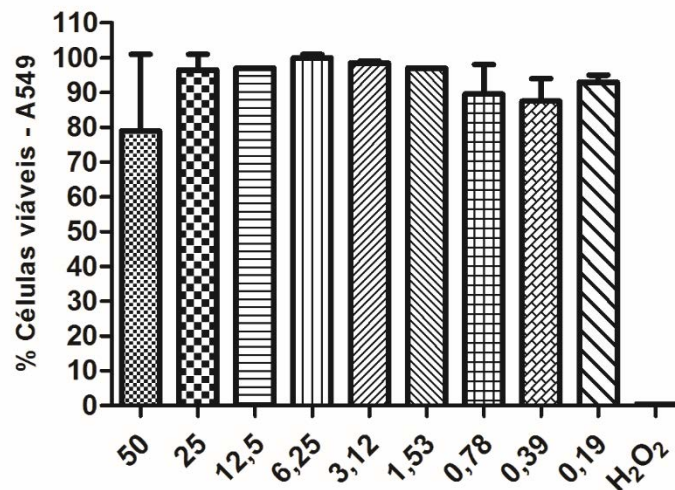


Figura 4. Viabilidade das células A549 após tratamento com a proteína recombinante CSP.

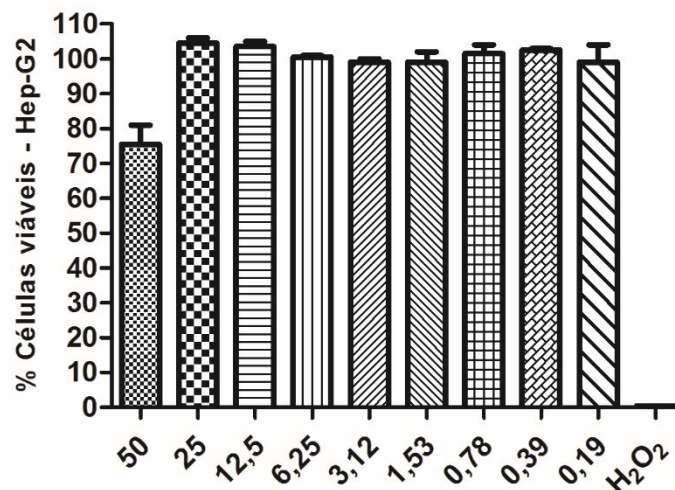


Figura 5. Viabilidade das células Hep-G2 após tratamento com a proteína recombinante CSP.

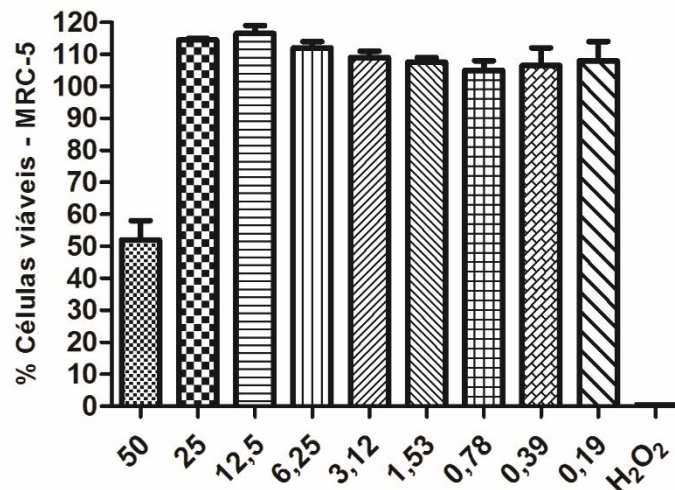


Figura 6. Viabilidade das células MRC-5 após tratamento com a proteína recombinante CSP.

2.2.3. Ensaio preliminar da capacidade de indução de apoptose pela proteína CSP de *Paracoccidioides* spp. através do ensaio de TUNEL (Terminal deoxy-transferase mediated X-dUTP Nick End Labeling)

Em estudos anteriores de nosso grupo, Del Vecchio et al. (2009) observaram que *P. brasiliensis* induz apoptose em células epiteliais, e que essa indução pode variar de acordo com o grau de virulência do isolado e o fungo pode permanecer viável dentro das células, conseguindo se multiplicar. Neste sentido os mecanismos de invasão às células do hospedeiro, persistência dentro delas e a subsequente indução de apoptose podem explicar a capacidade de disseminação de *P. brasiliensis*. Em outro estudo de nosso grupo, Silva et al. (2015) demonstraram que duas adesinas de *Paracoccidioides brasiliensis*, 14-3-3 e gp43 podem induzir a apoptose, e como estas proteínas são importantes para a interação, estas podem ser as responsáveis pela indução deste processo. Por estarmos caracterizando essa proteína como adesina,

realizamos um ensaio inicial onde testamos, em diferentes concentrações por 24 horas de contato, a capacidade de a CSP induzir a apoptose em células A549. A figura 7 demonstra que a proteína CSP de *Paracoccidioides* spp. é capaz de induzir a apoptose.

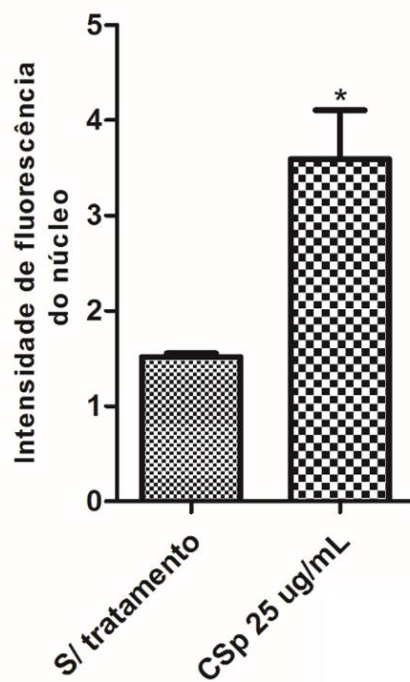


Figura 7. Indução de apoptose pela proteína recombinante CSP (25µg/ml) avaliada pelo ensaio TUNEL.

Apesar de preliminar o resultado apresentado, mostra que a proteína CSP pode ser importante para interação do fungo com o hospedeiro e também para a evasão do sistema de defesa do hospedeiro.

2.2.4. Imunofluorescência para avaliação de alterações do citoesqueleto durante o tratamento de pneumócitos A549 com a proteína recombinante CSP de *Paracoccidioides* spp.

Estudo prévio de nosso grupo com a adesina 14-3-3 (Silva, 2011) demonstrou que esta promove desarranjos no citoesqueleto celular, favorecendo assim a invasão do fungo à célula hospedeira, neste sentido, avaliamos a ação da proteína CSP no citoesqueleto de pneumócitos A549, avaliando dois componentes do citoesqueleto: actina e microtúbulos.

2.2.4.1. Actina

Para avaliar a ação da proteína CSP na actina, foi realizado ensaio de imunofluorescência utilizando faloidina que é uma toxina que se liga à actina polimérica, estabilizando-a, interferindo com o retículo endoplasmático e outras estruturas ricas em actina. Foi possível detectar alteração do padrão de distribuição da actina das células tratadas com a proteína recombinante nos tempos de 2 e 5 horas. Podemos observar uma distribuição característica da actina quando tratada com PBS, apresentando longos filamentos em toda a extensão da célula (Figura 8A), porém ao tratarmos com a proteína CSP podemos ver um rearranjo das fibras de actina se concentrando na periferia das células fazendo com que a célula perca sua conformação normal (Figura 8B). O mesmo padrão foi observado para 2 e 5 horas de tratamento.

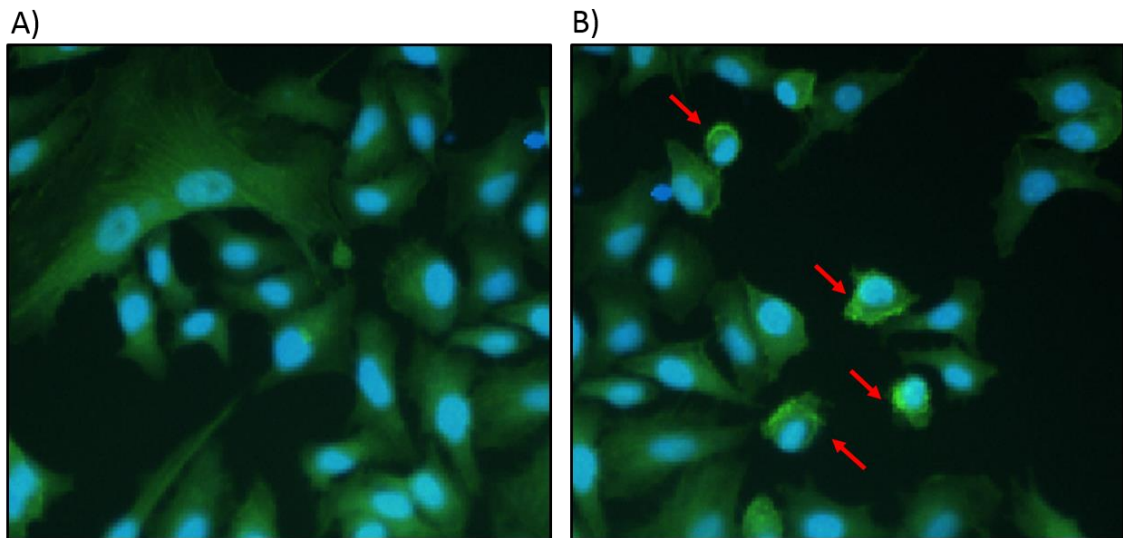


Figura 8. Imunofluorescência da actina de pneumócitos A549 não tratados (A) ou tratados (B) com a proteína CSP de *Paracoccidioides* spp. As flechas indicam as modificações no citoesqueleto.

2.2.4.2. Microtúbulos

Utilizando o anticorpo anti-beta-tubulina os microtúbulos foram observados após o tratamento com a proteína CSP. Podemos observar que a célula apresenta normalmente uma distribuição difusa dos microtúbulos por toda a extensão da célula, sendo que os microtúbulos distribuíram-se por todo o citoplasma (Figura 9 A). Porém, quando as células foram tratadas com a CSP podemos observar que a célula perde sua conformação normal, tornando-se arredondada e os microtúbulos parecem se agrupar mais ao redor do núcleo (Figura 9 B).

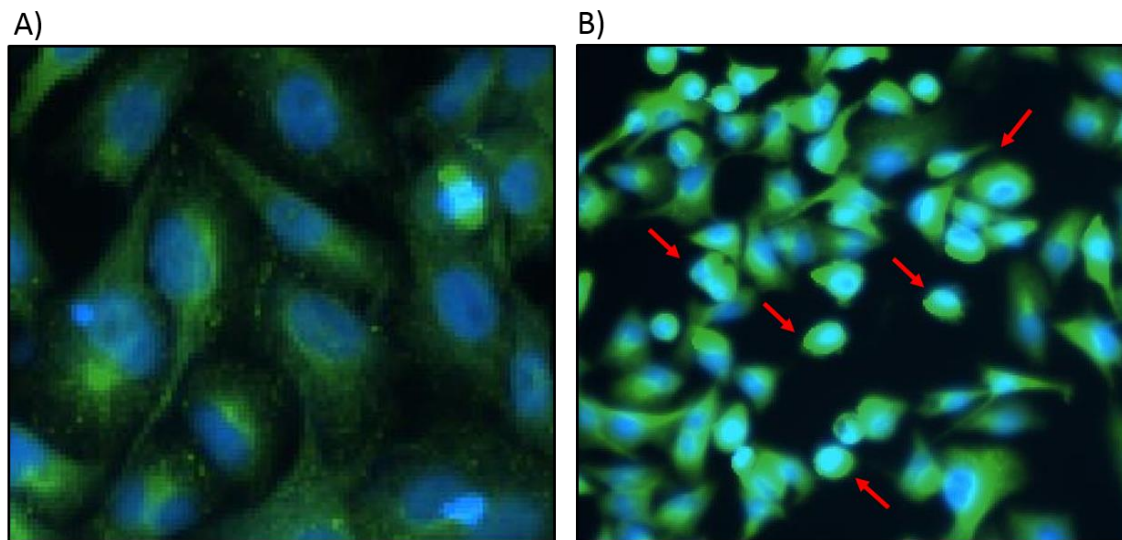


Figura 9. Imunofluorescência dos microtúbulos de pneumócitos A549 não tratados (A) ou tratados (B) com a proteína CSP de *Paracoccidioides* spp. As flechas indicam as modificações no citoesqueleto.

2.2.5. Ensaio de inibição da interação de *Paracoccidioides* spp. com células epiteliais A549 pelo anticorpo anti-CSP

O ensaio de inibição da adesão nos mostra o envolvimento da proteína em estudo no processo de adesão das espécies do gênero *Paracoccidioides*. Ao tratarmos o fungo com o anticorpo anti-CSP esperamos que este se ligue à proteína expressa na parede do fungo, sendo que assim o fungo não poderá utilizar esta proteína durante a interação com os pneumócitos A549. A adesão é uma etapa de grande importância na interação *Paracoccidioides*-hospedeiro. Recentemente, Oliveira et al., (2015) demonstraram que a inibição da adesão através do uso de anticorpos que bloqueiam as adesinas 14-3-3 e enolase, levou à diminuição da virulência de *P. brasiliensis* e *P. lutzii*.

Para este ensaio, os fungos foram tratados com o anticorpo anti-CSP por 1 hora a 37°C em um título de 1:100 e então o fungo tratado foi colocado em contato com os pneumócitos por 2 e 5 horas, sendo os resultados representados na figura 10.

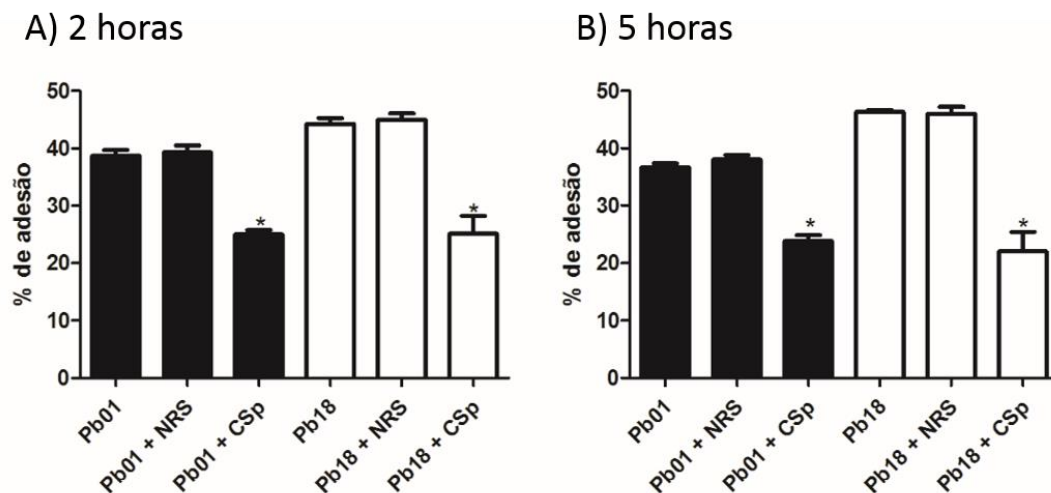


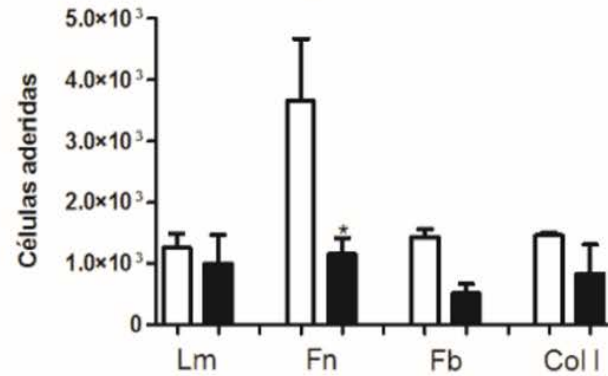
Figura 10. Inibição da adesão pelo anticorpo anti-CSP de *Paracoccidioides* spp. A) 2 horas de adesão; B) 5 horas de adesão. * $p < 0,05$.

Após 2 horas de interação, pudemos observar que o anticorpo anti-CSP inibiu a adesão em torno de 13% e 16% a adesão de *P. lutzii* e *P. brasiliensis*, respectivamente. Já para 5 horas de adesão observamos uma inibição de 12% e 19% para *P. lutzii* e *P. brasiliensis*, respectivamente. Isso nos mostra que a proteína CSP recombinante foi capaz de inibir a adesão das duas espécies aos pneumócitos A549. Este resultado mostra que esta proteína pode ser caracterizada como uma das moléculas utilizadas pelo fungo para aderir ao hospedeiro.

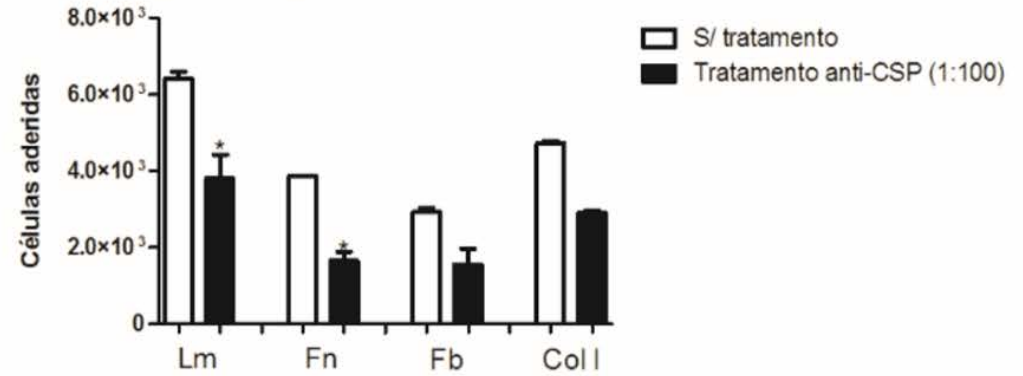
2.2.6. Ensaio de inibição da interação de *Paracoccidioides* spp. com componentes da matriz extracelular utilizando o anticorpo policlonal anti-CSP

A interação de *Paracoccidioides* spp. e os componentes da MEC é de extrema importância para o sucesso na colonização do hospedeiro pelo fungo. Neste ensaio de inibição pudemos observar que a proteína CSP influencia de forma mais efetiva a interação de *P. brasiliensis* e *P. lutzii* à fibronectina nos dois tempos de interação avaliados, conforme figura 11.

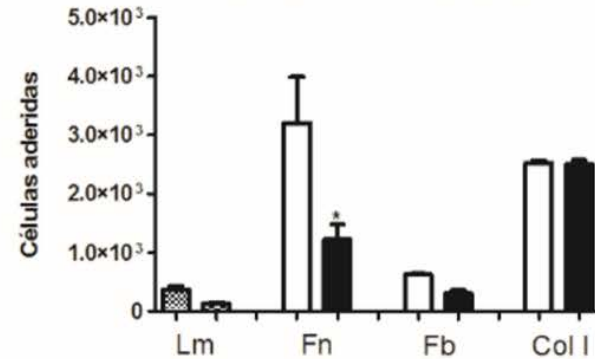
Inibição da adesão de *P. lutzii* aos componentes da MEC pela anticorpo anti-CSP - 2 horas



Inibição da adesão de *P. lutzii* aos componentes da MEC pela anticorpo anti-CSP - 5 horas



Inibição da adesão de *P. brasiliensis* aos componentes da MEC pela anticorpo anti-CSP - 2 horas



Inibição da adesão de *P. brasiliensis* aos componentes da MEC pela anticorpo anti-CSP - 5 horas

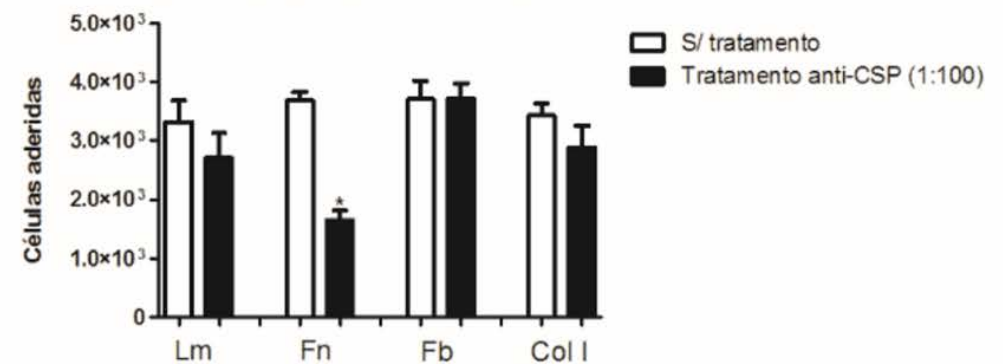


Figura 11. Inibição da adesão de *P. lutzii* e *P. brasiliensis* aos componentes da MEC: laminina (Lm), fibronectina (Fn), fibrinogênio (Fb) e colágeno tipo I (Col I) em 2 e 5 horas de interação. * $p < 0,05$.

Estes resultados nos sugerem que a proteína CSP tem maior afinidade à fibronectina e pode ser fator determinante para a adesão do fungo a este componente da MEC. Além disso, os resultados obtidos indicam que após 5 horas de contato, com *P. lutzii*, o tratamento com o anticorpo mostra uma maior influência na adesão deste fungo, apresentando diferença estatística também para laminina, além disso, apesar de não ter tido diferença estatística, podemos observar uma diminuição na adesão também a fibrinogênio e colágeno tipo I. Para *P. brasiliensis* observamos que tanto em 2 como em 5 horas, a inibição da adesão ocorre apenas para a fibronectina.

2.2.7. Determinação da localização da proteína CSP através da técnica de imunocitoquímica em nível ultraestrutural (Immunogold) e Microscopia eletrônica.

Para a caracterização de uma proteína, faz-se necessário determinar a sua localização na célula, pois a localização nos dá ideia de sua funcionalidade. Com esse objetivo, a proteína CSP de *P. brasiliensis* e *P. lutzii* foi marcada com partículas de ouro e observadas através de microscopia eletrônica, nos permitindo observar sua localização e expressão na célula fúngica durante a interação (2 horas) com pneumócitos A549 e com os componentes da MEC, laminina, fibronectina, colágeno tipo I e colágeno tipo IV.

A figura 12 representa um painel onde mostramos a interação de *P. lutzii* com pneumócitos A549. Em A, B e C observamos o fungo antes do contato com a célula em 3 diferentes aumentos, 20, 40 e 80 vezes e podemos observar a expressão da proteína CSP na parede do fungo. Em D, E e F observamos o fungo durante o contato com pneumócitos A549 e podemos ver claramente que houve um significativo aumento da expressão da proteína CSP na parede celular do fungo.

A figura 13 demonstra a interação de *P. brasiliensis* com pneumócitos A549 onde também observamos que após o contato com os pneumócitos, o fungo passa a expressar mais a proteína CSP em sua parede. Um detalhe importante desta imagem é que podemos verificar a presença de vesículas (figura 13F) que carregam a proteína para a parede celular mostrando que durante a interação, a célula produz esta proteína e ela é direcionada para a parede celular.

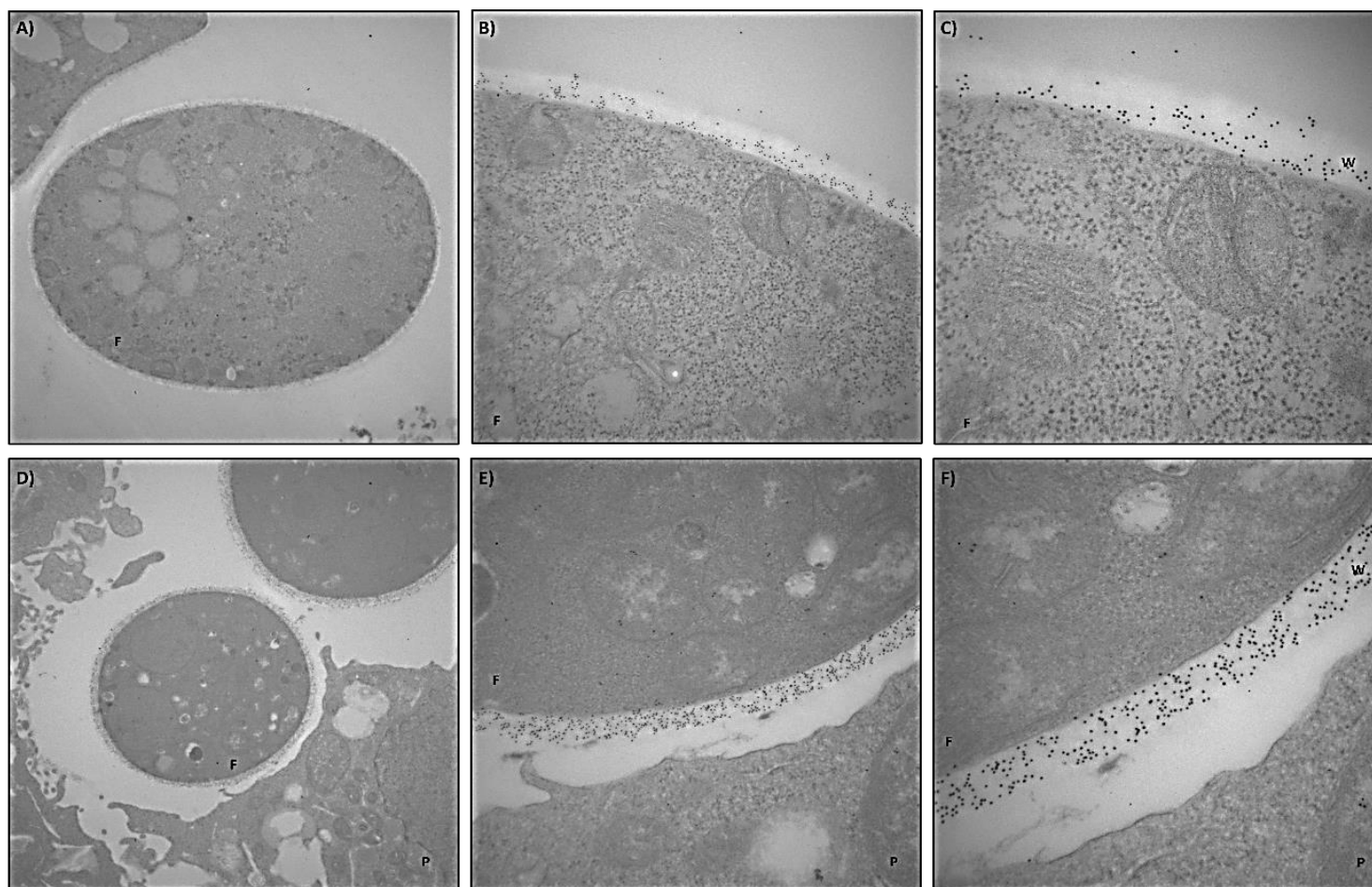


Figura 12. Microscopia eletrônica para observação da localização da proteína CSP de *P. lutzii* durante interação com pneumócitos A549. A, B e C representam os aumentos de 20, 40 e 80 vezes de uma célula de *P. lutzii* antes da interação com pneumócitos A549. D, E e F representam os aumentos de 20, 40 e 80 vezes de uma célula de *P. lutzii* durante o contato com pneumócitos A549. Legenda: F: Célula fúngica; W: Parede celular fúngica; P: pneumócito A549.

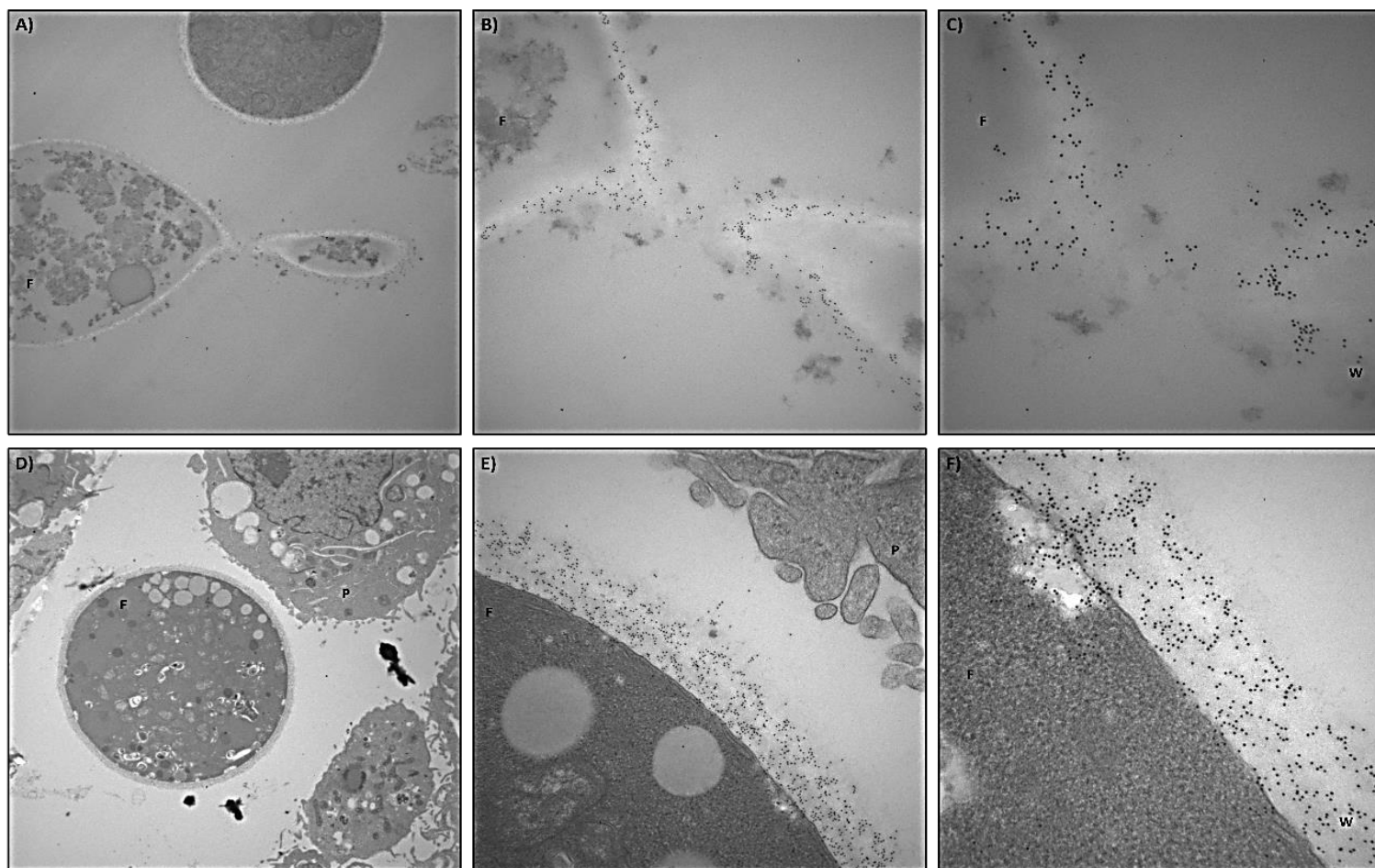


Figura 9. Microscopia eletrônica para observação da localização da proteína CSP de *P. brasiliensis* durante interação com pneumócitos A549. A, B e C representam os aumentos de 20, 40 e 80 vezes de uma célula de *P. brasiliensis* antes da interação com pneumócitos A549. D, E e F representam os aumentos de 20, 40 e 80 vezes de uma célula de *P. brasiliensis* durante o contato com pneumócitos A549. Legenda: F: Célula fúngica; W: Parede celular fúngica; P: pneumócito A549.

O aumento da expressão da proteína CSP também foi observada durante o contato de *P. lutzii* e *P. brasiliensis* com os componentes da MEC. Na figura 14 podemos observar que a expressão da proteína é inferior em *P. lutzii* antes de entrar em contato com os componentes da MEC (figura 14A). Após 2 horas de contato com laminina (B), fibronectina (C), colágeno tipo I (D) e colágeno tipo IV (E) podemos observar o aumento da expressão da proteína CSP na parede celular, além disso podemos observar vesículas contendo a proteína CSP que provavelmente está sendo exportada para a parede do fungo.

Em *P. brasiliensis* (Figura 15) podemos ver que também há um aumento na expressão da proteína CSP durante o contato com os componentes da MEC (laminina (B), fibronectina (C), colágeno tipo I (D) e colágeno tipo IV (E) quando comparadas com o fungo antes do contato (A). Em *P. brasiliensis* também pudemos observar vesículas que continham a proteína CSP (Figura 15B, D e E).

Os resultados de microscopia evidenciam a proteína CSP sendo localizada na parede celular, condição essencial para uma adesina. Nas imagens podemos ver as partículas de ouro apenas na parede do fungo ou no interior de vesículas e podemos observar que após o contato com pneumócitos e com os componentes da MEC a expressão da proteína é aumentada o que reforça o papel desta proteína na interação do fungo agindo como adesina para *Paracoccidioides* spp.

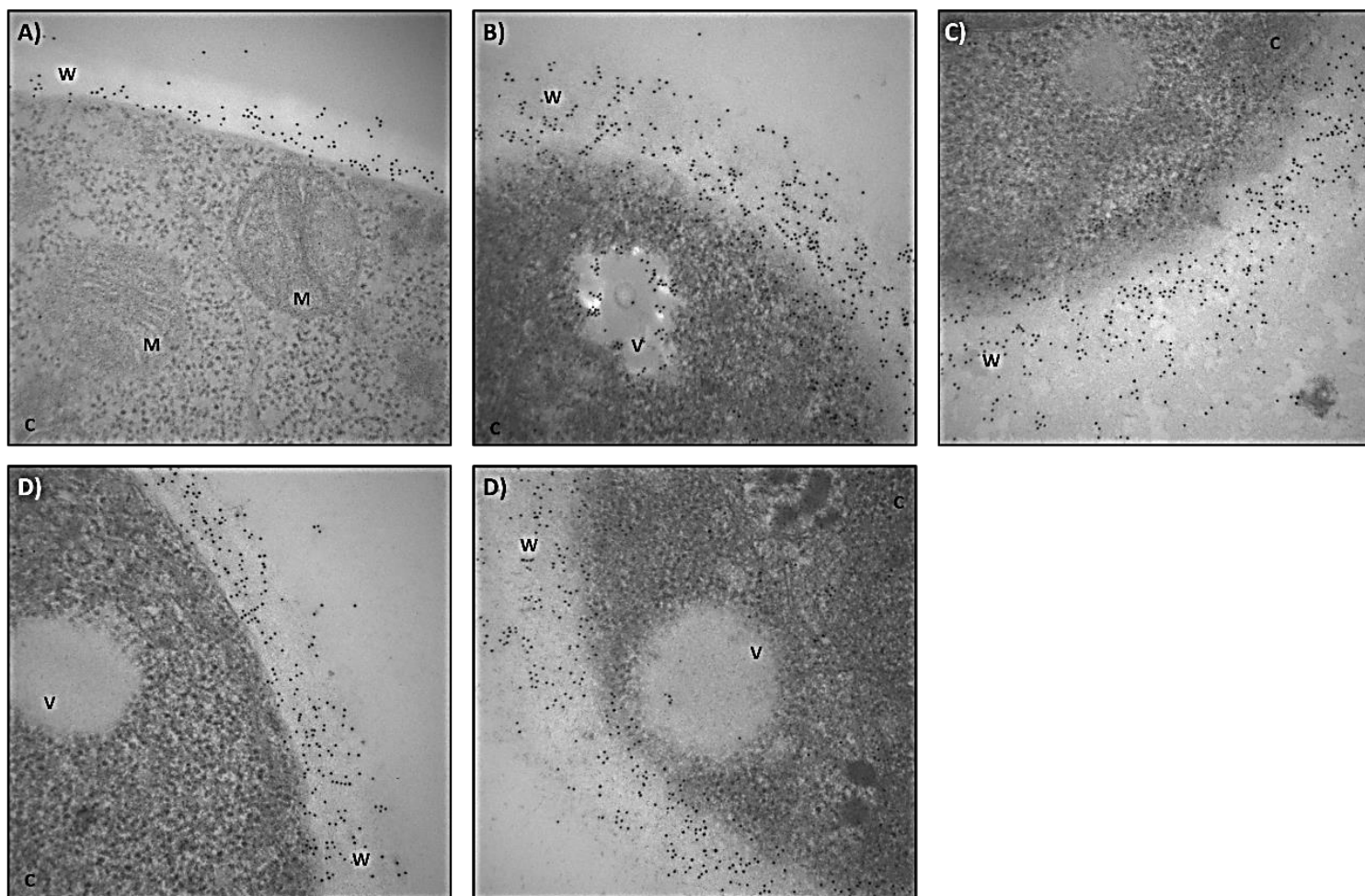


Figura 10. Microscopia eletrônica para observação da localização da proteína CSP de *P. lutzii* durante interação com lamina (B), fibronectina (C), colágeno tipo I (D) e colágeno tipo IV (E) e antes do contato com os componentes da MEC (A). O aumento das fotos é de 80 vezes. Legenda: C: Citoplasma fúngico; W: Parede celular fúngica; V: vesícula; M: Mitocôndria.

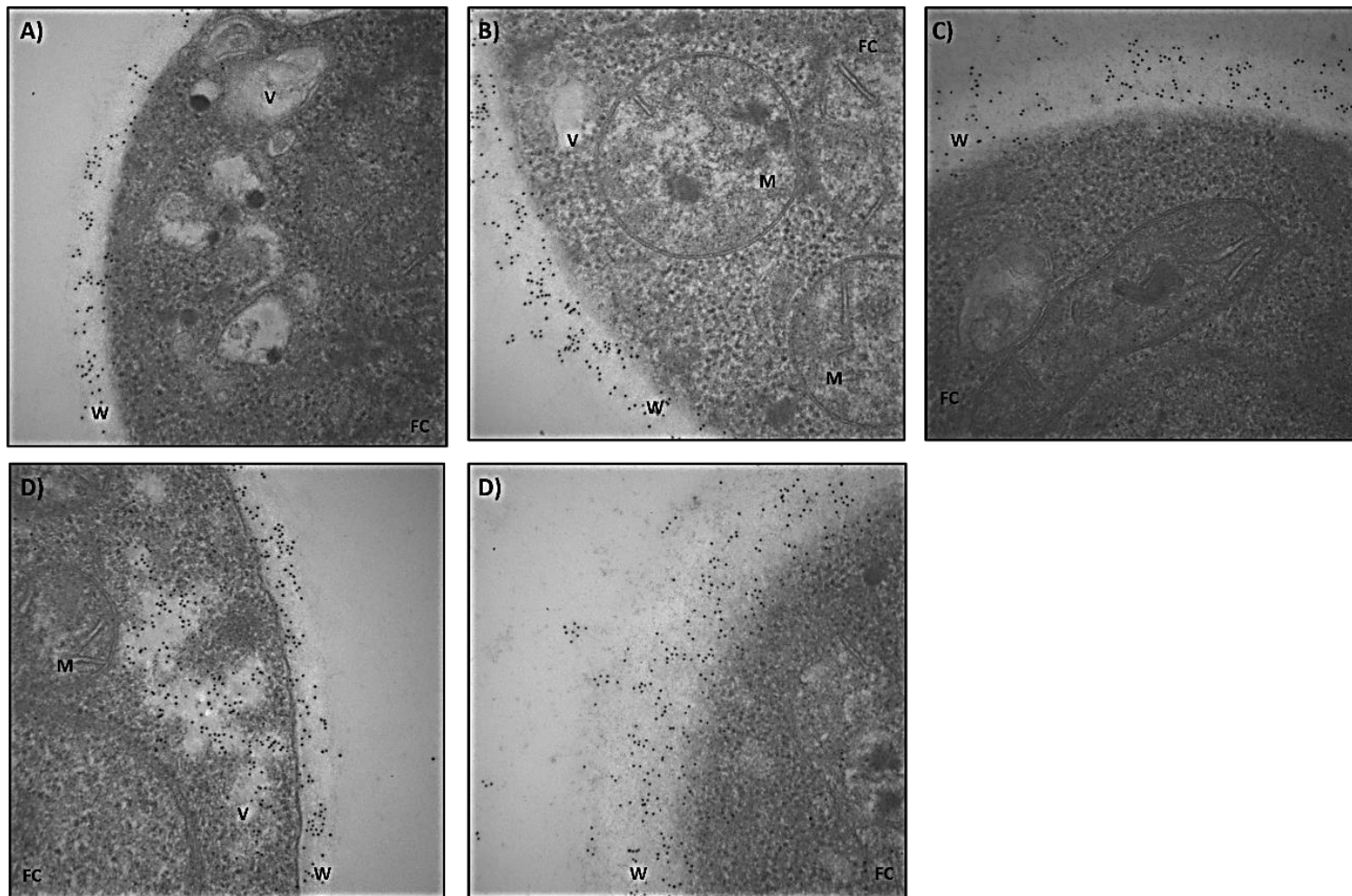


Figura 11. Microscopia eletrônica para observação da localização da proteína CSP de *P. brasiliensis* durante interação com lamina (B), fibronectina (C), colágeno tipo I (D) e colágeno tipo IV (E) e antes do contato com os componentes da MEC (A). O aumento das fotos é de 80 vezes. Legenda: FC: Citoplasma fúngico; W: Parede celular fúngica; V: vesícula; M: Mitocôndria.

2.2.8. Influência da proteína CSP na virulência de *Paracoccidioides* spp. em modelo alternativo *Galleria mellonella*

Recentemente, Oliveira et al. (2015) demonstraram que a capacidade de *Paracoccidioides* spp. em expressar adesinas influencia na virulência do fungo, confirmando então a importância destas proteínas na colonização do hospedeiro pelo fungo causando a paracoccidioidomicose. Neste sentido, realizamos ensaio para verificar a influência da proteína CSP na virulência de *P. lutzii* e *P. brasiliensis*. Este ensaio foi realizado no modelo alternativo *G. mellonella*. Nos últimos anos, a crescente preocupação com questões éticas envolvidas no uso de animais na pesquisa científica levou ao desenvolvimento de métodos alternativos ao uso de mamíferos na pesquisa. Dentre os modelos alternativos propostos, o modelo de *G. mellonella* surge como uma interessante alternativa para o estudo de virulência em fungos, sendo recentemente utilizado para o estudo da virulência de *P. brasiliensis* e *P. lutzii* (Thomaz et al., 2013; De Oliveira, 2015; Scorzoni et al., 2015). Por essas características utilizamos o modelo para o estudo da influência da CSP na virulência de *Paracoccidioides* spp.

Os ensaios foram realizados como proposto por Oliveira et al. (2015), e para isso, antes de infectarem as larvas, os fungos foram tratados com o anticorpo anti-CSP no título de 1:100 por 1 hora a 37 °C e a sobrevivência das larvas foi observada e comparada com os controles onde os fungos não foram tratados ou foram tratados com o soro pré-imune de coelho.

A figura 16 mostra a curva de sobrevivência das larvas infectadas com *P. lutzii* e *P. brasiliensis*. Pudemos observar que após o tratamento de *P. lutzii* com o anticorpo anti-CSP, 41% das larvas sobreviveram após o término do experimento e após o tratamento de *P. brasiliensis* com o anticorpo anti-CSP, 38% das larvas sobreviveram, indicando que ao bloquear a proteína com o anticorpo, a virulência de *P. lutzii* e *P.*

brasiliensis foi afetada revelando a importância desta proteína para a virulência dos fungos. Ao final do experimento, nenhuma larva tratada apenas com PBS morreu e todas as larvas infectadas com fungo tratado com o soro de coelho não imunizado com a proteína CSP (SNC) e as larvas infectadas com o fungo não tratado morreram ao final do experimento. A análise estatística mostrou diferença na sobrevivência de larvas infectadas com fungo tratado com o anti-CSP comparadas com as larvas do controle com valor de $p < 0.05$.

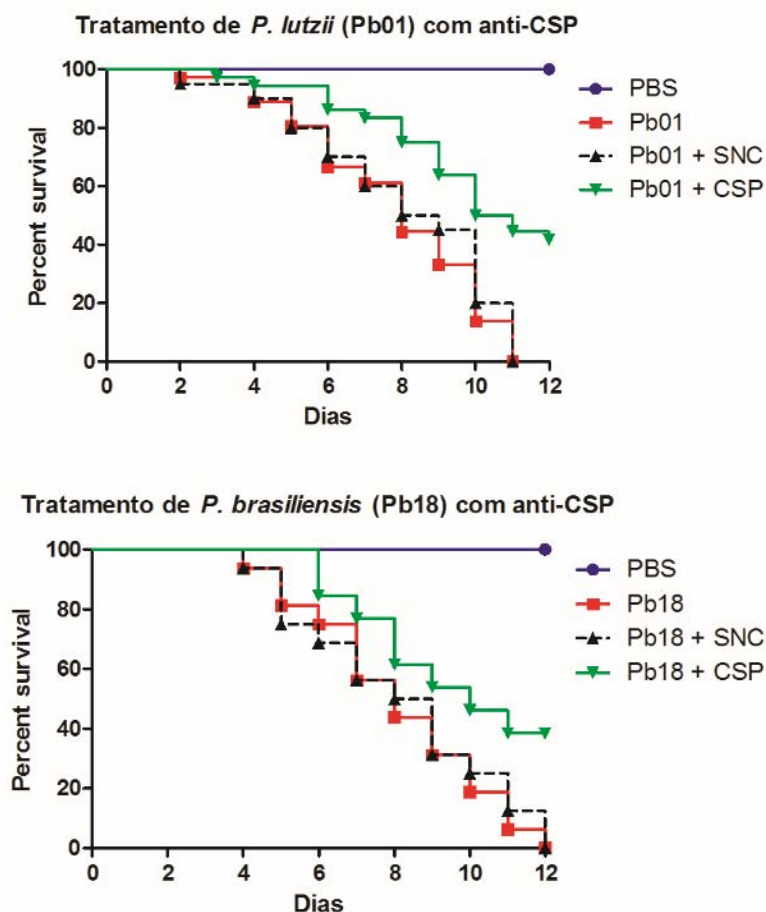


Figura 16. Curva de sobrevivência de larvas de *G. mellonella* desafiadas com *P. lutzii* e *P. brasiliensis* tratados com anti-CSP.

3. Conclusões

O estudo realizado foi de grande importância para a caracterização da proteína CSP de *Paracoccidioides* spp. como uma adesina que influencia na virulência do fungo. Os resultados apresentados complementam estudos realizados pelo nosso grupo e abrem novas perspectivas no conhecimento do arsenal molecular utilizado pelo fungo durante a interação com o hospedeiro. Com os resultados obtidos podemos chegar nas seguintes conclusões:

- Foi possível produzir o anticorpo policlonal anti-CSP de *Paracoccidioides* spp., sendo que por imunoblot foi verificado a detecção da proteína pelo anticorpo nos títulos de 1:100, 1:500 e 1:1000;
- Ao reagirmos o anticorpo com extratos totais de proteínas de *P. lutzii* e *P. brasiliensis* pudemos verificar a especificidade do anticorpo produzido, já que este apenas reagiu com a proteína de interesse, sendo que esta foi reconhecida nos títulos de 1:500 e 1:1000 em *P. lutzii* e *P. brasiliensis*, porém com menor reatividade com *P. brasiliensis*;
- Ao analisarmos o sobrenadante da cultura de *P. lutzii* e *P. brasiliensis* pudemos identificar a proteína apenas no sobrenadante de *P. lutzii*, mostrando que o fungo secreta essa proteína para o meio extracelular;
- Antes do início dos ensaios com a proteína CSP recombinante, a citotoxicidade desta contra 3 linhagens celulares, A549, Hep-G2 e MRC-5, foi testada e os resultados demonstram que na concentração de 25 ug/mL, concentração máxima utilizada nos experimentos, a viabilidade das células tratadas com a proteína recombinante foi próxima de 100%, mostrando não ser tóxica para as 3 linhagens testadas;

- Através do ensaio de TUNEL, foi verificado que a proteína CSP recombinante de *Paracoccidioides* spp. foi capaz de induzir a apoptose dos pneumócitos A549;
- A proteína CSP recombinante de *Paracoccidioides* spp. é capaz de induzir mudanças conformacionais no citoesqueleto dos pneumócitos A549, evidenciando a possível participação desta no processo infeccioso de *Paracoccidioides* spp.;
- Ao tratarmos *P. lutzii* e *P. brasiliensis* com o anticorpo anti-CSP, a adesão do fungo aos pneumócitos A549 foi inibida, revelando também a importância desta na adesão de *Paracoccidioides* spp.;
- Ao colocar em contato *P. brasiliensis* e *P. lutzii*, tratados com o anticorpo anti-CSP, com componentes da matriz extracelular, obteve-se inibição significativa da interação entre *Paracoccidioides* spp. com fibronectina e laminina, indicando a importância da CSP no processo de adesão a esses componentes;
- Através da técnica de Immunogold, pode-se confirmar a localização da proteína CSP na parede celular, além de evidenciar o aumento da expressão de tal proteína quando em contato com pneumócitos A549 e componentes da matriz extracelular, relacionados ao processo de adesão do fungo as células do hospedeiro;
- Os ensaios utilizando *Galleria mellonella*, verificaram a capacidade do soro anti-CSP de evitar a infecção por *Paracoccidioides* spp., diminuindo a porcentagem de mortes em cerca 40% do grupo tratado em relação ao não tratado tanto para *P. lutzii* como para *P. brasiliensis*.

4. Referências

- ABREU E SILVA, M. et al. Important aspects of oral paracoccidioidomycosis--a literature review. **Mycoses**, v. 56, n. 3, p. 189-99, May 2013. ISSN 1439-0507. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23088400> >.
- AMEEN, M.; TALHARI, C.; TALHARI, S. Advances in paracoccidioidomycosis. **Clin Exp Dermatol**, v. 35, n. 6, p. 576-80, Aug 2010. ISSN 1365-2230. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19874328> >.
- ANDREOTTI, P. F. **INTERAÇÃO DE *Paracoccidioides brasiliensis* COM CÉLULAS EPITELIAIS. CARACTERIZAÇÃO DE PROVÁVEIS FATORES DE VIRULÊNCIA.** INTERAÇÃO DE *Paracoccidioides brasiliensis* COM CÉLULAS EPITELIAIS. CARACTERIZAÇÃO DE PROVÁVEIS FATORES DE VIRULÊNCIA. 2006. 124 (Doctoral). Department of Clinical Analysis, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara FCFAr - UNESP, Araraquara, SP, Brazil.
- ANDREOTTI, P. F. et al. Isolation and partial characterization of a 30 kDa adhesin from *Paracoccidioides brasiliensis*. **Microbes Infect**, v. 7, n. 5-6, p. 875-81, May 2005. ISSN 1286-4579. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15862780> >.
- ARISTIZABAL, B. H. et al. Morphological transition of *Paracoccidioides brasiliensis* conidia to yeast cells: in vivo inhibition in females. **Infect Immun**, v. 66, n. 11, p. 5587-91, Nov 1998. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9784579> >.
- BAGAGLI, E. et al. Phylogenetic and evolutionary aspects of *Paracoccidioides brasiliensis* reveal a long coexistence with animal hosts that explain several biological features of the pathogen. **Infect Genet Evol**, v. 6, n. 5, p. 344-51, Sep 2006. ISSN 1567-1348. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16473563> >.
- _____. *Paracoccidioides brasiliensis*: phylogenetic and ecological aspects. **Mycopathologia**, v. 165, n. 4-5, p. 197-207, 2008 Apr-May 2008. ISSN 0301-486X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18777629> >.
- BAILÃO, A. M. et al. Differential gene expression by *Paracoccidioides brasiliensis* in host interaction conditions: representational difference analysis identifies candidate genes associated with fungal pathogenesis. **Microbes Infect**, v. 8, n. 12-13, p. 2686-97, Oct 2006. ISSN 1286-4579. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16962356> >.
- BARBOSA, M. S. et al. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Paracoccidioides brasiliensis* is a cell surface protein involved in fungal adhesion to extracellular matrix proteins and interaction with cells. **Infect Immun**, v. 74, n. 1, p. 382-9, Jan 2006. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16368993> >.
- BASTOS, K. P. et al. The transcriptome analysis of early morphogenesis in *Paracoccidioides brasiliensis* mycelium reveals novel and induced genes potentially

associated to the dimorphic process. **BMC Microbiol**, v. 7, p. 29, 2007. ISSN 1471-2180. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17425801> >.

BENARD, G. An overview of the immunopathology of human paracoccidioidomycosis. **Mycopathologia**, v. 165, n. 4-5, p. 209-21, 2008 Apr-May 2008. ISSN 0301-486X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18777630> >.

BOUCHARA, J. P. et al. Laminin receptors on *Candida albicans* germ tubes. **Infect Immun**, v. 58, n. 1, p. 48-54, Jan 1990. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2136734> >.

BROMLEY, I. M.; DONALDSON, K. Binding of *Aspergillus fumigatus* spores to lung epithelial cells and basement membrane proteins: relevance to the asthmatic lung. **Thorax**, v. 51, n. 12, p. 1203-9, Dec 1996. ISSN 0040-6376. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8994516> >.

BRUMMER, E.; CASTANEDA, E.; RESTREPO, A. Paracoccidioidomycosis: an update. **Clin Microbiol Rev**, v. 6, n. 2, p. 89-117, Apr 1993. ISSN 0893-8512. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8472249> >.

CALICH, V. L. et al. Resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* in mice is controlled by a single dominant autosomal gene. **Infect Immun**, v. 55, n. 8, p. 1919-23, Aug 1987. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3610318> >.

CALICH, V. L.; VAZ, C. A.; BURGER, E. Immunity to *Paracoccidioides brasiliensis* infection. **Res Immunol**, v. 149, n. 4-5, p. 407-17; discussion 499-500, 1998 May-Jun 1998. ISSN 0923-2494. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9720958> >.

CASADEVALL, A.; PIROFSKI, L. A. Host-pathogen interactions: redefining the basic concepts of virulence and pathogenicity. **Infect Immun**, v. 67, n. 8, p. 3703-13, Aug 1999. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10417127> >.

CHIARELLA, A. P. et al. The relative importance of CD4+ and CD8+T cells in immunity to pulmonary paracoccidioidomycosis. **Microbes Infect**, v. 9, n. 9, p. 1078-88, Jul 2007. ISSN 1286-4579. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17692551> >.

COLTRI, K. C. et al. Paracoccin, a GlcNAc-binding lectin from *Paracoccidioides brasiliensis*, binds to laminin and induces TNF-alpha production by macrophages. **Microbes Infect**, v. 8, n. 3, p. 704-13, Mar 2006. ISSN 1286-4579. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16476564> >.

DA SILVA NETO, B. R. et al. The malate synthase of *Paracoccidioides brasiliensis* is a linked surface protein that behaves as an anchorless adhesin. **BMC Microbiol**, v. 9, p. 272, 2009. ISSN 1471-2180. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20034376> >.

DE ALBORNOZ, M. B. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from rural soil in Venezuela. **Sabouraudia**, v. 9, n. 3, p. 248-53, Nov 1971. ISSN 0036-2174. Disponível

em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4944202> >.

DE OLIVEIRA, H. C. Importance of adhesins in virulence of *Paracoccidioides* spp. (vol 6, pg 303, 2015). **Frontiers in Microbiology**, v. 6, MAY 5 2015 2015. ISSN 1664-302X.

DE OLIVEIRA, K. M. et al. Intermolecular interactions of the malate synthase of *Paracoccidioides* spp. **BMC Microbiol**, v. 13, p. 107, 2013. ISSN 1471-2180. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23672539> >.

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

DI SANTO, R. Natural products as antifungal agents against clinically relevant pathogens. **Nat Prod Rep**, v. 27, n. 7, p. 1084-98, Jul 2010. ISSN 1460-4752. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20485730> >.

DONOFRIO, F. C. et al. Enolase from *Paracoccidioides brasiliensis*: isolation and identification as a fibronectin-binding protein. **J Med Microbiol**, v. 58, n. Pt 6, p. 706-13, Jun 2009. ISSN 0022-2615. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19429745> >.

DOS SANTOS, W. A. et al. [Association between smoking and paracoccidioidomycosis: a case-control study in the State of Espírito Santo, Brazil]. **Cad Saude Publica**, v. 19, n. 1, p. 245-53, 2003 Jan-Feb 2003. ISSN 0102-311X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12700804> >.

FELIPE, M. S. et al. Transcriptional profiles of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* in mycelium and yeast cells. **J Biol Chem**, v. 280, n. 26, p. 24706-14, Jul 2005. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15849188> >.

_____. Transcriptome characterization of the dimorphic and pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* by EST analysis. **Yeast**, v. 20, n. 3, p. 263-71, Feb 2003. ISSN 0749-503X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12557278> >.

_____. Functional genome of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 45, n. 3, p. 369-81, Sep 2005. ISSN 0928-8244. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16061364> >.

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

FRANCO, M. et al. Host-parasite relationship in paracoccidioidomycosis. **Curr Top Med Mycol**, v. 5, p. 115-49, 1993. ISSN 0177-4204. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8242798> >.

_____. Chlamydospore formation by *Paracoccidioides brasiliensis* mycelial form. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 31, n. 3, p. 151-7, 1989 May-Jun 1989. ISSN 0036-4665. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2617011> >.

FRASER, R. et al. South American blastomycosis. In: SAUNDERS (Ed.). **Fraser & Paré Diagnosis of diseases of the chest**. 4 Philadelphia, 1999. p.902–904

GANIKO, L. et al. Paracoccin, an N-acetyl-glucosamine-binding lectin of *Paracoccidioides brasiliensis*, is involved in fungal growth. **Microbes Infect**, v. 9, n. 6, p. 695-703, May 2007. ISSN 1286-4579. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17400504> >.

GAUR, N. K.; KLOTZ, S. A. Expression, cloning, and characterization of a *Candida albicans* gene, *ALA1*, that confers adherence properties upon *Saccharomyces cerevisiae* for extracellular matrix proteins. **Infect Immun**, v. 65, n. 12, p. 5289-94, Dec 1997. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9393828> >.

GHANNOUM, M. A.; RICE, L. B. Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. **Clin Microbiol Rev**, v. 12, n. 4, p. 501-17, Oct 1999. ISSN 0893-8512. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10515900> >.

GIL, M. L. et al. Binding of extracellular matrix proteins to *Aspergillus fumigatus* conidia. **Infect Immun**, v. 64, n. 12, p. 5239-47, Dec 1996. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8945572> >.

GONZÁLEZ, A. et al. Purification and partial characterization of a *Paracoccidioides brasiliensis* protein with capacity to bind to extracellular matrix proteins. **Infect Immun**, v. 73, n. 4, p. 2486-95, Apr 2005. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15784595> >.

HAMILTON, A. J. et al. Sialic acid-dependent recognition of laminin by *Penicillium marneffei* conidia. **Infect Immun**, v. 66, n. 12, p. 6024-6, Dec 1998. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9826390> >.

HANNA, S. A.; MONTEIRO DA SILVA, J. L.; GIANNINI, M. J. Adherence and intracellular parasitism of *Paracoccidioides brasiliensis* in Vero cells. **Microbes Infect**, v. 2, n. 8, p. 877-84, Jul 2000. ISSN 1286-4579. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10962270> >.

KASHINO, S. S. et al. Resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* infection is linked to a preferential Th1 immune response, whereas susceptibility is associated with absence of IFN-gamma production. **J Interferon Cytokine Res**, v. 20, n. 1, p. 89-97, Jan 2000. ISSN 1079-9907. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10670655> >.

KLOTZ, S. A. et al. Adherence of *Candida albicans* to immobilized extracellular matrix proteins is mediated by calcium-dependent surface glycoproteins. **Microb Pathog**, v. 14, n. 2, p. 133-47, Feb 1993. ISSN 0882-4010. Disponível em: <

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8502162> >.

KRCMERY, V. C. Antifungal chemotherapeutics. **Med Princ Pract**, v. 14, n. 3, p. 125-35, 2005 May-Jun 2005. ISSN 1011-7571. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15863983> >.

LACAZ, C. A. S. et al. Paracoccidioides brasiliensis. A mycologic and immunochemical study of two strains. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 41, n. 2, p. 79-86, 1999 Mar-Apr 1999. ISSN 0036-4665. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10413954> >.

LONDERO, A. T.; RAMOS, C. D. Paracoccidioidomycosis. A clinical and mycologic study of forty-one cases observed in Santa Maria, RS, Brazil. **Am J Med**, v. 52, n. 6, p. 771-5, Jun 1972. ISSN 0002-9343. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5030174> >.

LONDERO, A. T.; SEVERO, L. C. The gamut of progressive pulmonary paracoccidioidomycosis. **Mycopathologia**, v. 75, n. 2, p. 65-74, Aug 1981. ISSN 0301-486X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7278938> >.

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

LÓPEZ-RIBOT, J. L. et al. Interactions between Candida albicans and the human extracellular matrix component tenascin-C. **Mol Cell Biol Res Commun**, v. 2, n. 1, p. 58-63, Jul 1999. ISSN 1522-4724. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10527893> >.

LÓPEZ-RIBOT, J. L.; CHAFFIN, W. L. Binding of the extracellular matrix component entactin to Candida albicans. **Infect Immun**, v. 62, n. 10, p. 4564-71, Oct 1994. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7927722> >.

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

MARQUES DA SILVA, S. H. et al. Detection of circulating gp43 antigen in serum, cerebrospinal fluid, and bronchoalveolar lavage fluid of patients with paracoccidioidomycosis. **J Clin Microbiol**, v. 41, n. 8, p. 3675-80, Aug 2003. ISSN 0095-1137. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12904374> >.

MARQUES, S. A. Paracoccidioidomycosis: epidemiological, clinical, diagnostic and treatment up-dating. **An Bras Dermatol**, v. 88, n. 5, p. 700-11, 2013 Sep-Oct 2013. ISSN 1806-4841. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24173174> >.

MCEWEN, J. G. et al. Experimental murine paracoccidioidomycosis induced by the inhalation of conidia. **J Med Vet Mycol**, v. 25, n. 3, p. 165-75, Jun 1987. ISSN 0268-

1218. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3612432> >.

_____. In search of the natural habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Arch Med Res**, v. 26, n. 3, p. 305-6, 1995. ISSN 0188-4409. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8580685> >.

MCMAHON, J. P. et al. Murine laminin binds to *Histoplasma capsulatum*. A possible mechanism of dissemination. **J Clin Invest**, v. 96, n. 2, p. 1010-7, Aug 1995. ISSN 0021-9738. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7635937> >.

MENDES-GIANNINI, M. J. et al. Binding of extracellular matrix proteins to *Paracoccidioides brasiliensis*. **Microbes Infect**, v. 8, n. 6, p. 1550-9, May 2006. ISSN 1286-4579. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16698299> >.

_____. Invasion of epithelial mammalian cells by *Paracoccidioides brasiliensis* leads to cytoskeletal rearrangement and apoptosis of the host cell. **Microbes Infect**, v. 6, n. 10, p. 882-91, Aug 2004. ISSN 1286-4579. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15310464> >.

MENDES-GIANNINI, M. J.; MORAES, R. A.; RICCI, T. A. Proteolytic activity of the 43,000 molecular weight antigen secreted by *Paracoccidioides brasiliensis*. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 32, n. 5, p. 384-5, 1990 Sep-Oct 1990. ISSN 0036-4665. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2135482> >.

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

MONTENEGRO, M. R. et al. Isolation of fungi from nature in the region of Botucatu, state of São Paulo, Brazil, an endemic area of paracoccidioidomycosis. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 91, n. 6, p. 665-70, 1996 Nov-Dec 1996. ISSN 0074-0276. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9283642> >.

NEGRONI, R. et al. [Preparation and study of a *Paracoccidioides* antigen needed for skin tests]. **Sabouraudia**, v. 14, n. 3, p. 265-73, Nov 1976. ISSN 0036-2174. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/996691> >.

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

NOBILE, C. J. et al. Complementary adhesin function in *C. albicans* biofilm formation. **Curr Biol**, v. 18, n. 14, p. 1017-24, Jul 2008. ISSN 0960-9822. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18635358> >.

OLIVEIRA, H. **Caracterização e identificação de adesinas nas diferentes espécies filogenéticas de *Paracoccidioides brasiliensis* por Phage Display** Caracterização e identificação de moléculas de superfície presentes em *Paracoccidioides* spp.

2014. (PhD). Análises Clínicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara - FCFAR UNESP, Araraquara, SP, Brasil.

OLIVEIRA, H. et al. Importance of adhesins in virulence of *Paracoccidioides* spp. Importance of adhesins in virulence of *Paracoccidioides* spp. **Front. Microbiol. Front. Microbiol.**, v. 6, n. 303, p. 14, 2015. Disponível em: < <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2015.00303/abstract> >.

OLIVEIRA, H. C. **Influência do cobre no padrão de expressão de genes envolvidos na interação de *Paracoccidioides brasiliensis* com a matriz extracelular** Influência do cobre no padrão de expressão de genes envolvidos na interação de *Paracoccidioides brasiliensis* com a matriz extracelular 2010. 70 (Master). Departamento de Análises Clínicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara - FCFAR UNESP, Araraquara, SP, Brazil.

PEREIRA, L. A. et al. Analysis of the *Paracoccidioides brasiliensis* triosephosphate isomerase suggests the potential for adhesin function. **FEMS Yeast Res**, v. 7, n. 8, p. 1381-8, Dec 2007. ISSN 1567-1356. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17714474> >.

PUCCIA, R.; TAKAOKA, D. T.; TRAVASSOS, L. R. Purification of the 43 kDa glycoprotein from exocellular components excreted by *Paracoccidioides brasiliensis* in liquid culture (TOM medium). **J Med Vet Mycol**, v. 29, n. 1, p. 57-60, 1991. ISSN 0268-1218. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2061796> >.

PUCCIA, R.; TRAVASSOS, L. R. The 43-kDa glycoprotein from the human pathogen *Paracoccidioides brasiliensis* and its deglycosylated form: excretion and susceptibility to proteolysis. **Arch Biochem Biophys**, v. 289, n. 2, p. 298-302, Sep 1991. ISSN 0003-9861. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1898073> >.

RAMANA, J.; GUPTA, D. FaaPred: a SVM-based prediction method for fungal adhesins and adhesin-like proteins. **PLoS One**, v. 5, n. 3, p. e9695, 2010. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20300572> >.

RAMOS-E-SILVA, M.; SARAIVA, L. O. E. *Paracoccidioidomycosis*. **Dermatol Clin**, v. 26, n. 2, p. 257-69, vii, Apr 2008. ISSN 0733-8635. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18346557> >.

RESTREPO, A. et al. Pulmonary paracoccidioidomycosis. **Semin Respir Crit Care Med**, v. 29, n. 2, p. 182-97, Apr 2008. ISSN 1069-3424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18366000> >.

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

SAKATA, N.; YAMAZAKI, K.; KOGURE, T. Identification of a 21 kDa laminin-binding component of *Candida albicans*. **Zentralbl Bakteriell**, v. 289, n. 2, p. 217-25, Apr 1999. ISSN 0934-8840. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10360322> >.

SALAZAR, M. E.; RESTREPO, A. Morphogenesis of the mycelium-to-yeast transformation in *Paracoccidioides brasiliensis*. **Sabouraudia**, v. 23, n. 1, p. 7-11, Feb 1985. ISSN 0036-2174. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3992430> >.

SAN-BLAS, G.; NIÑO-VEGA, G.; ITURRIAGA, T. *Paracoccidioides brasiliensis* and paracoccidioidomycosis: molecular approaches to morphogenesis, diagnosis, epidemiology, taxonomy and genetics. **Med Mycol**, v. 40, n. 3, p. 225-42, Jun 2002. ISSN 1369-3786. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12146752> >.

SCORZONI, L. et al. Antifungal efficacy during *Candida krusei* infection in non-conventional models correlates with the yeast in vitro susceptibility profile. **PLoS One**, v. 8, n. 3, p. e60047, 2013. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23555877> >.

_____. Comparison of virulence between *Paracoccidioides brasiliensis* and *Paracoccidioides lutzii* using *Galleria mellonella* as a host model. **Virulence**, p. in press, 2015.

SHIKANAI-YASUDA, M. A. et al. [Guidelines in paracoccidioidomycosis]. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 39, n. 3, p. 297-310, 2006 May-Jun 2006. ISSN 0037-8682. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16906260> >.

SHOME; S.K.; BATISTA, A. C. Occurrence of *Paracoccidioides brasiliensis* in the soil in Recife, Brazil. **Rev. Fac. Med. Univ. Federal Ceará**, v. 3, p. 4, 1963.

SILVA, J. D. F. **Clonagem e caracterização da proteína 14-3-3 de *Paracoccidioides brasiliensis* durante interação em células epiteliais**. 2011. 132 (PhD). Análises Clínicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara FCFAr UNESP, Araraquara, São Paulo, Brasil.

SILVA, J. D. F. D. **Estudo de diferentes isolados de *Paracoccidioides brasiliensis* quanto ao padrão de adesão e expressão de ligantes da matriz extracelular**. 2008. 72 (Master). Department of Clinical Analysis, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara FCFAr - UNESP, Araraquara, São Paulo, Brazil.

SILVA, J. F. et al. Influence of the *Paracoccidioides brasiliensis* 14-3-3 and gp43 proteins on the induction of apoptosis in A549 epithelial cells. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 4, p. 476-484, 2015 02/06 2015. ISSN 1678-8060. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26038961> >.

SILVA-VERGARA, M. L. et al. Isolation of a *Paracoccidioides brasiliensis* strain from the soil of a coffee plantation in Ibiá, State of Minas Gerais, Brazil. **Med Mycol**, v. 36, n. 1, p. 37-42, Feb 1998. ISSN 1369-3786. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9776810> >.

THOMAZ, L. et al. *Galleria mellonella* as a model host to study *Paracoccidioides lutzii* and *Histoplasma capsulatum*. **Virulence**, v. 4, n. 2, p. 139-46, Feb 2013. ISSN 2150-5608. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23302787> >.

TRONCHIN, G. et al. Interaction between *Aspergillus fumigatus* and basement membrane laminin: binding and substrate degradation. **Biol Cell**, v. 77, n. 2, p. 201-8, 1993. ISSN 0248-4900. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8364400> >.

UNTEREINER, W. A. et al. The *Ajellomycetaceae*, a new family of vertebrate-associated Onygenales. **Mycologia**, v. 96, n. 4, p. 812-21, 2004 Jul-Aug 2004. ISSN 0027-5514. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21148901> >.

VICENTINI, A. P. et al. Binding of *Paracoccidioides brasiliensis* to laminin through surface glycoprotein gp43 leads to enhancement of fungal pathogenesis. **Infect Immun**, v. 62, n. 4, p. 1465-9, Apr 1994. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8132354> >.

Araraquara, 09 de Janeiro de 2017

Daniella Sayuri Yamazaki

De acordo,

Profa. Dra. Maria José Soares Mendes Giannini (Orientadora)

Prof. Dr. Haroldo Cesar de Oliveira (Co-orientador)