

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE ARARAQUARA
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS

Caroline Maria Marcos

**“CARACTERIZAÇÃO DA ENOLASE DE *Paracoccidioides brasiliensis* E
IDENTIFICAÇÃO PROTEÔMICA DE NOVAS MOLÉCULAS”**

Araraquara

2011

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE ARARAQUARA
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS

Caroline Maria Marcos

**“CARACTERIZAÇÃO DA ENOLASE DE *Paracoccidioides brasiliensis* E
IDENTIFICAÇÃO PROTEÔMICA DE NOVAS MOLÉCULAS”**

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

ORIENTADORA: Profa. Dra. Ana Marisa Fusco Almeida

CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. Maria José Soares Mendes Giannini

ARARAQUARA

2011

Ficha Catalográfica

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

M321c Marcos, Caroline Maria
Caracterização da enolase de paracoccidioides brasiliensis e identificação proteômica de novas moléculas / Caroline Maria Marcos. – Araraquara, 2011
133 f.

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

1. Paracoccidioides brasiliensis. 2. Enolase. 3. Adesina. 4. Proteômica. I. Almeida, Ana Marisa Fusco, orient. II. Giannini, Maria José Soares Mendes, co-orient.. III. Título.

CAPES: 40300005

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Micologia Clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara/SP –UNESP. Recebeu auxílio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES e Programa de Apoio ao Desenvolvimento Científico da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP – PADC.

Desafios

A vida só é possível através dos desafios.

A vida só é possível quando você tem
tanto o bom tempo quanto o mau tempo,
quando tem prazer e dor;
quando tem inverno e verão, dia e noite;
quando tem tristeza tanto quanto felicidade,
desconforto tanto quanto conforto.

A vida passa entre essas duas polaridades.

Movendo-se entre essas duas polaridades,
você aprende a se equilibrar.

Entre essas duas asas,
você aprende a voar até a estrela mais brilhante

(Oho)

Agradecimentos especiais

Aos meus pais Lourenço e Isabel e irmãos Lourenço e Isabelle meus maiores incentivadores. Obrigada por cada bronca dada com razão ou não, por tornarem cada passo traçado por mim mais fácil e esperançoso, por contribuírem para a realização de meus sonhos, desde o começo e mesmo de tão longe vocês sempre estarão presentes em cada decisão tomada por mim! Obrigada pela dedicação, pelo amor e por todos os ensinamentos que me fizeram ser a pessoa que hoje sou! Dedico estes anos de trabalho principalmente a vocês! Agradeço também a você sobrinha linda, Maria Isabel, que veio a esse mundo só pra trazer união e coisas muito boas para nossa família! Amo muito vocês.

Dedico este trabalho também ao meu namorado Pedro e toda sua família, pelo apoio tão fundamental para a concretização deste trabalho, pela paciência, incentivo e amor. Seu bom humor e companheirismo tornam meu dia-a-dia mais feliz. Amo você!

Aos meus avós Olga, Lourenço e Teresa pelo amor recebido de vocês em cada reencontro... e a cada oração! Amo vocês! Obrigada por tudo.

Dedico também a minha orientadora Profa. Dra. Ana Marisa Fusco Almeida e minha co-orientadora Profa. Dra. Maria José Soares Mendes Gianinni pela valiosa orientação. Neste tempo pude amadurecer profissionalmente e vocês fizeram parte deste aprendizado. Obrigada pela oportunidade e dedicação a mim confiadas.

Agradeço também aos meus amigos Julhiany de Fátima da Silva, Marcelo Teruyuki Matsumoto e Haroldo César de Oliveira pela imensa ajuda dispensada e por fazerem do meu aprendizado um contentamento.

Agradecimentos

Agradeço a banca de qualificação e defesa: **Prof. Dr. Eduardo Bagagli**, **Prof. Dr. Iguatemy Lourenço Brunetti**, **Profa. Dra. Márcia Aparecida da Silva Graminha** pelas considerações e sugestões da presente tese.

À CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior que financiou meus estudos durante o curso de mestrado.

À grande família que é o **Laboratório de Micologia**, não só por toda a ajuda de cada um de vocês, mas também por tornarem essa jornada mais fácil e prazerosa. Vocês se tornaram grandes amigos, a cada dia aprendo mais e mais com cada um de vocês. Quantas angústias e dúvidas já foram compartilhadas com vocês! Quantas alegrias já foram multiplicadas através de vocês! Quantos problemas resolvidos pela ajuda de vocês!

Quanto tempo desperdiçado felizmente à vocês! Em tempos em que quase ninguém se olha nos olhos, em que a maioria das pessoas pouco se interessa pelo que não lhe diz respeito, só mesmo agradecendo àqueles que percebem nossas descrenças, indecisões, suspeitas, tudo o que nos paralisa, e gastam um pouco da sua energia conosco, insistindo! Á vocês irmãos micológicos todo o meu agradecimento e carinho incondicional!

Vocês são especiais!

Obrigada a mãezona de todos nós ***Rosangela (Rô)*** não só pela ordem essencial ao bom funcionamento do nosso laboratório, mas também pelas

longas conversas, risadas (e como tem risada!), conselhos, broncas, enfim
você é uma pessoa muito especial!

Agradeço à minha “dinda” *Julhiany* pela amizade e pelas cobranças que resultaram neste trabalho; ao *Marcelo* que mesmo de longe ainda continua a nos ajudar; ao *Haroldo*, pela paciência e dedicação, você se tornou um grande amigo!; à dupla querida *Carol* e *Lili*, pelo companheirismo e energia boa que vocês transmitem, já não consigo mais imaginar ficar muito tempo longe de vocês; à *Suélen* por todas as conversas, opiniões e ajuda; à *Fer Sangali* pelas cantorias e por ser um grande exemplo de pessoa do bem; à *Lucita (Lú)* pela amizade, você foi uma das primeiras com quem tive uma aproximação no laboratório, facilitando a minha integração a este grupo; à *Dani* pelo carinho; à *Fer Gullo*, grande exemplo profissional; à *Nayla* por sua espontaneidade e alegria, você é uma pessoa muitooooo divertida, fica tranqüila que eu já sei que não combino com botas de cano longo e bico fino!!! À futura mamãe *Thais* que por várias vezes escutou meus desabafos, sempre tentando aliviá-los com seu jeito doce; à *Jana* pela companhia quando estávamos em São-Paulo e por agüentar as minhas azucrinações!! À amiga de república e agora companheira de trabalho *Djanja*, por toda a ajuda, e por continuar por perto, o que torna a falta de outras pessoas de nosso grupo menor, você sabe que te adoro né! Também agradeço aos demais integrantes desta família, *Tati, Jaque, Aline, Natália, Valter, Torres e Warley* pela ajuda dedicada quando esta foi solicitada, muito obrigada!

À *Rosemira* pela ótima companhia e pelos almoços deliciosos.

Aos integrantes da pós-graduação: *Cláudia, Sônia, Laura, Ângela, Márcia e Joyce* pelo auxílio ao bom progresso deste trabalho.

Às amigas de longa data que mesmo não estando constantemente presente, fazem parte de minha vida, sempre incentivando os meus objetivos, vocês também merecem um agradecimento especial! Obrigada pelo carinho, pelas conversas, pela cumplicidade. *Lila, Ester, Isa, Djanja, Cindy, Karol, Má, Cris, Pascutti, Ana*, e a todas as “KTKs”. Amo vocês.

MUITO OBRIGADA!

*“Bom mesmo é ter problema na cabeça, sorriso na boca e paz no
coração!”*

*Aliás, entregue os problemas nas mãos de Deus e que tal um cafezinho
gostoso agora?*

*A vida é uma peça de teatro que não permite ensaios. Por isso cante,
chore, dance e viva intensamente antes que a cortina se feche!”*

(Arnaldo Jabor)

SUMÁRIO

Lista de siglas, abreviaturas e símbolos	12
Lista de figuras e gráficos	16
Lista de tabelas	20
Resumo	21
Abstract	22
1. Introdução	23
2. Justificativa	39
3. Objetivos	40
3.1. Objetivos Gerais	40
3.2. Objetivos Específicos	40
4. Metodologia	42
4.1. Microrganismo e condições de crescimento	42
4.2. Preparo dos antígenos de <i>P. brasiliensis</i>	42
4.2.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)	42
4.3. Purificação da proteína de 54 kDa por eletroeluição	43
4.4. Preparo dos soros policlonais	44
4.4.1. Soro policlonal anti-cell-free de <i>P. brasiliensis</i>	44
4.4.2. Soro policlonal anti-enolase de <i>P. brasiliensis</i>	44
4.5. Avaliação do título dos soros (<i>Immunoblot</i>)	45
4.6. Screening de ligação aos componentes da matriz extracelular por ELISA	46

4.7. Cultura de células e Teste de Infecção	46
4.7.1. Cultivo Contínuo e Tripsinização	46
4.7.2. Monocamada de células epiteliais	47
4.7.3. Preparo e padronização do inóculo de <i>P. brasiliensis</i>	47
4.7.4. Infecção de células epiteliais com leveduras de <i>P. brasiliensis</i>	48
4.8. Imunofluorescência com marcação tripla para localização da enolase e avaliação de alterações do citoesqueleto na interação de <i>P. brasiliensis</i> com pneumócitos	48
4.8.1. Microfilamentos de actina	48
4.8.2. Microtúbulos	49
4.8.3. Citoqueratina	49
4.9. Ensaio de inibição com RGD	50
4.10. Imunocitoquímica em nível ultra estrutural – <i>Immunogold</i>	50
4.11. Análise proteômica descritiva de novas moléculas de <i>P. brasiliensis</i>	51
4.11.1. Preparo do extrato total de proteínas de <i>P. brasiliensis</i>	51
4.11.2. Análise protéica por eletroforese bidimensional	52
4.11.3. Digestão <i>in situ</i> de proteínas	52
4.11.4. Purificação de mistura peptídica utilizando Zip-Tips	53
4.11.5. Análise protéica por espectrometria de massas	53
5. Resultados	54
5.1. Perfil eletroforético dos extratos <i>cell-free</i> e total de <i>P. brasiliensis</i>	54
5.2. Purificação da proteína de 54 kDa por eletroeluição	55

5.3. Titulação dos soros policlonais	56
5.3.1. <i>Immunoblot</i> do soro anti- <i>cell-free</i> de <i>P. brasiliensis</i>	56
5.3.2. <i>Immunoblot</i> do soro anti-enolase de <i>P. brasiliensis</i>	57
5.4. Triagem dos ligantes da matriz extracelular à enolase por ELISA	58
5.5. Imunofluorescência	59
5.5.1. Actina	59
5.5.2. Microtúbulos	62
5.5.3. Citoqueratina	64
5.5.4. Enolase	66
5.6. Influência da sequência Arg-Gly-Asp na ligação da enolase a pneumócitos	66
5.7. Distribuição da enolase de <i>P. brasiliensis</i> em nível ultraestrutural	67
5.8. Identificação proteômica de novas moléculas de <i>P. brasiliensis</i>	72
6. Discussão	80
7. Conclusões	97
8. Referências Bibliográficas	98

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

%	Porcentagem
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µm	Micrometro
°C	Graus Celsius
ACN	Acetonitrila
ADH	Álcool desidrogenase
APS	Persulfato de amônio
AIDS	Síndrome de Imunodeficiência Adquirida
ATP	Adenosina trifosfato
ATV	Solução de tripsina-EDTA-versene (Adolfo Lutz)
2-PG	2-fosfo-D-glicerato
BHI	Infusão-cérebro-coração
BSA	Soro albumina bovina
C	Citoplasma
CN	Célula normal (sem infecção)
CO	Monóxido de carbono
CO₂	Dióxido de carbono
DAB	Diaminobenzidina
DAPI	4', 6-diamidino-2-fenilindol
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
D.O.	Densidade óptica
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra acético
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
ENO-1	Isoforma alfa da enolase

ENO-2	Isoforma beta da enolase
ENO-3	Isoforma gama da enolase
ESI-MS/MS	Espectrometria de massa com ionização por <i>eletrospray</i>
Fase L	Fase leveduriforme de <i>P. brasiliensis</i>
FITC	Fluoresceína
G	Grama
GAPDH	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase</i>
Gp43	Glicoproteína de 43 kDa
H₂O₂	Peróxido de hidrogênio
HAM-F12	<i>F-12 Nutrient Mixture</i>
HCl	Ácido clorídrico
HRP	<i>Horse radish peroxidase</i>
Hsp	<i>Heat shock protein</i>
HIV	Vírus da imunodeficiências humana
HXM	Heme-oxigenase
IgG	Imunoglobulina G
iNOS	Óxido sintase induzível
ITS	Sequência intragênica
kDa	Kilodalton
M	Molariade
mA	Miliampère
MM	Massa molecular
MEC	Matriz extracelular
MG	Miligrama
MS	Espectrometria de massas
NADH	Nicotinamida-Adenina-Dinucleótídeo
NDP	Nucleosídeo difosfato
NDK	Nucleosídeo difosfato quinase

NTP	Nucleosídeo trifosfato
NADPH	Nicotinamida-Adenina-Dinucleotídeo-Fosfato
Nm	Nanômetros
NO	Óxido nítrico
O2	Oxigênio
OPD	Orto-fenilenediamina diclorido
Pb	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
PBS	Tampão salina fosfato
PBS-T	Tampão salina fosfato com 0,05% de tween-20
PCM	Paracoccidioidomicose
PEP	Fosfoenolpiruvato
PLAAC	Pepstatina, leupeptina, aprotinina, antipaina, chymostatiina
Plg	Plasminogênio
pH	Potencial hidrogeniônico
PI	Ponto isoelétrico
PMSF	Fenilmetilsulfonilflúor
QR	Quinona redutase
RGD	Arg-Gly-Asp
RNA_m	ácido ribonucléico mensageiro
SBF	Soro bovino fetal
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS
TBS	Tampão salina tris
TBS-BSA	Tampão salina tris em 0,1% de soro albumina bovina
TFA	Ácido trifluoroacético
TEMED	Tetra metil etileno diamino
tPA	Ativador do sistema plasminogênio do tipo tecidual
TPI	Triose fosfato isomerase

Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
uPA	Ativador do sistema plasminogênio do tipo uroquinase
V	Volts
X	Vezes
YIGRS	Sequência de aminoácidos da laminina
W	Parede celular
WrbA	Quinona oxidoredutase

LISTA DE FIGURAS E GRÁFICOS

Figura 1. Perfil eletroforético dos extratos e protéicos de *P. brasiliensis*. (1) 55

Extrato total de Pb18 cultivado em meio Fava Netto, (2) Extrato total de Pb18 cultivado em meio BHI acrescido de sangue de carneiro; (3) *Cell-free* Pb 18 cultivado em meio BHI acrescido de sangue de carneiro, (4) *Cell-free* de Pb 18 cultivado em meio Fava Netto.

Figura 2. Identificação proteômica da enolase de *P. brasiliensis* de gel de 56

eletroforese bidimensional. A) Eletroforese bidimensional da proteína de 54 kDa obtida por eletroeluição, gel corado por Comassie Azul Brilhante; B) Score de distribuição dos peptídeos desta proteína de 54 kDa identificados por espectrometria de massas (ESI-MS/MS), o score é de $-10\log(P)$, onde P é a probabilidade de se observar um evento aleatório, score de íons individuais >36 indicam grande identidade ou homologia ($p<0,05$); C) Identidade (99%) entre a sequência da proteína purificada de *P. brasiliensis* (EEH47975.1) e a sequência referente a enolase de *A. fumigatus* (AAK49451.1).

Figura 3. Immunoblot do soro anti-cell free de *P. brasiliensis*. Soro anti-cell 57
free frente aos antígenos do controle positivo (1); *cell-free* de Pb 18 cultivado em meio BHI com sangue de carneiro (2) e controle negativo (3).

Figura 4. Immunoblot do soro anti-enolase de *P. brasiliensis*. A) Immunoblot 58
do soro policlonal anti-enolase de *P. brasiliensis*. Titulação do anticorpo anti-enolase. B) Immunoblot do soro policlonal anti-enolase de *P. brasiliensis* (diluição 1:20) frente ao *cell-free* da amostra cultivada em meio acrescido de sangue (1) e a proteína enolase purificada (2).

Gráfico 1. Ligação da enolase (10 µg/mL) aos componentes da MEC: 59
laminina, fibronectina, colágenos I e IV, plasminogênio e fibrinogênio (10 µg/mL) isoladamente. A interação foi revelada por ELISA, com a leitura da absorbância em 490nm. O controle negativo foi feito com anticorpos primários, secundários, BSA 0,5% matriz extracelular. Os valores do controle já estão plotados nos resultados ($p<0,05$).

Figura 6. Imunofluorescência dupla mostrando o padrão de marcação dos 61
filamentos de actina das células epiteliais A549 normais e infectadas com
P. brasiliensis após 2, 5 e 8 horas, utilizando faloidina - FITC (verde) e
anticorpo anti-enolase - Alexa 594 (vermelho). (CN) padrão dos filamentos
actínicos em células epiteliais não infectadas; (Cél+Pb) Desorganização da
actina de células epiteliais durante sua interação com *P. brasiliensis*. As setas
indicam a presença de *P. brasiliensis* interagindo com a célula A549. Os
núcleos encontram-se corados com DAPI (azul). Aumento de 1000X, (50 µm).

Figura 7. Imunofluorescência dupla mostrando o padrão de marcação dos 63
microtúbulos das células epiteliais A549 normais e infectadas com *P.*
brasiliensis após 2, 5 e 8 horas, utilizando anticorpo anti-tubulina – Alexa
488 (verde) e anticorpo anti-enolase – Alexa 594 (vermelho). (CN) padrão
dos microtúbulos em células epiteliais não infectadas; (Cél+Pb)
Desorganização dos microtúbulos de células epiteliais durante sua interação
com *P. brasiliensis*. As setas indicam a presença de *P. brasiliensis* interagindo
com a célula A549. Os núcleos encontram-se corados com DAPI (azul).
Aumento de 1000X, (50 µm).

Figura 8. Imunofluorescência dupla mostrando o padrão de marcação dos 64
microtúbulos das células epiteliais A549 infectada com *P. brasiliensis* após
8 horas, utilizando anticorpo anti-tubulina – Alexa 488 (verde) e anticorpo
anti-enolase – Alexa 594 (vermelho). As setas indicam os vacúolos, local
onde o fungo provavelmente se encontrava na célula. O núcleo encontra-se
corado com DAPI (azul). Aumento de 1000X, (50 µm).

Figura 9. Imunofluorescência dupla mostrando o padrão de marcação da 65
citoqueratina das células epiteliais A549 normais e infectadas com *P.*
brasiliensis após 2, 5 e 8 horas, utilizando anticorpo anti-citoqueratina –
Alexa 488 (verde) e anticorpo anti-enolase – Alexa 594 (vermelho). (CN)
padrão da citoqueratina em células epiteliais não infectadas; (Cél+Pb)
Desorganização da citoqueratina de células epiteliais durante sua interação com
P. brasiliensis. As setas indicam a presença de *P. brasiliensis* interagindo com
a célula A549. Os núcleos encontram-se corados com DAPI (azul). Aumento de
1000X, (50 µm).

Gráfico 2. Influência do RGD na ligação da enolase de *P. brasiliensis* às células epiteliais pulmonares. O ensaio foi realizado através de ELISA (leitura realizada a 490 nm). A densidade óptica foi relacionada a maior ou menor capacidade de ligação da enolase ao RGD. O RGD estimulou em 10% a ligação da enolase às células epiteliais pulmonares. 67

Figura 10. Imunolocalização da enolase de *P. brasiliensis* cultivado em meio Fava-Netto, durante a infecção às células epiteliais pulmonares. a1) *P. brasiliensis* sem infecção; a2) Aumento da imagem a1); a3) Controle negativo utilizando soro pré-imune de coelho; b1) Período de 2h de infecção; b2) Aumento de b1; b3) Controle 2h; c1) Período de 5h de infecção; c2) Aumento de c1; c3) Controle 5h. d1) Período de 8h de infecção; d2) Aumento de d1; d3) Controle 8h. As setas indicam às partículas de ouro na parede celular (w) e as pontas das setas às partículas presentes no citoplasma celular (c). Barras: 0,125 μm (a1, b1, c1, d1), 0,07 μm (a2, a3, b2, b3, c2, c3, d2, d3). 69

Figura 11. Imunolocalização da enolase de *P. brasiliensis* cultivado em meio BHI com sangue de carneiro durante a infecção às células epiteliais pulmonares. f1) *P. brasiliensis* sem infecção; f2) Aumento de f1; f3) Controle negativo utilizando soro pré-imune de coelho; g1) Período de 2h de infecção; g2) Aumento de g1; g3) Controle 2h; h1) Período de 5h de infecção; h2) Aumento de h1; h3) Controle de 5h. i1) Período de 8h de infecção; i2) Aumento de i1; i3) Controle de 8h. As setas indicam às partículas de ouro na parede celular (w) e as pontas das setas às partículas presentes no citoplasma celular (c). Barras: 0,125 μm (f1, g1, h1, i1), 0,07 μm (f2, f3, g2, g3, h2, h3, i2, i3). 71

Figura 12. Análise proteômica. Eletroforese bidimensional do extrato *cell-free* de *P. brasiliensis* na fase leveduriforme cultivado em meio BHI acrescido de 5% de sangue de carneiro. Em maior aumento está o *spot* que foi selecionado (1) deste gel e submetido ao sequenciamento por espectrometria de massa 72

Figura 13. Análise proteômica. Eletroforese bidimensional do extrato total de *P. brasiliensis* na fase leveduriforme cultivado em meio BHI acrescido de 5% de sangue de carneiro. Em maior aumento estão os *spots* que foram selecionados (2, 3, 4, 5 e 6) deste gel e submetidos ao sequenciamento por 73

espectrometria de massa.

Figura 14. Análise proteômica. Eletroforese bidimensional do extrato *cell-free* de *P. brasiliensis* na fase leveduriforme cultivado em meio Fava-Netto. Em maior aumento estão os *spots* que foram selecionados (7, 8, 9 e 10) deste gel e submetidos ao sequenciamento por espectrometria de massa. 73

Figura 15. Análise proteômica. Eletroforese bidimensional do extrato *cell-free* de *P. brasiliensis* na fase leveduriforme cultivado em meio Fava-Netto. Em maior aumento estão os *spots* que foram selecionados (7, 10, 11 e 12) deste gel e submetidos ao sequenciamento por espectrometria de massa. 74

Figura 16. Análise proteômica. Eletroforese bidimensional do extrato total de *P. brasiliensis* na fase leveduriforme cultivado em meio Fava-Netto. Em maior aumento estão os *spots* que foram selecionados (7 e 10) deste gel e submetidos ao sequenciamento por espectrometria de massa. 75

Figura 17. Análise proteômica. Eletroforese bidimensional do extrato total de *P. brasiliensis* na fase leveduriforme cultivado em meio Fava-Netto. Em maior aumento estão os *spots* que foram selecionados (3, 13, 14, 15) deste gel e submetido ao sequenciamento por espectrometria de massa. 75

Figura 18. Análise proteômica. Eletroforese bidimensional do extrato total de *P. brasiliensis* na fase leveduriforme cultivado em meio BHI acrescido de 5% de sangue de carneiro. Em maior aumento está o *spot* que foi selecionado (16) deste gel e submetido ao sequenciamento por espectrometria de massa. 76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Análise das proteínas seqüenciadas através de espectrometria de massas (ESI-MS/MS), após a aplicação de técnica de eletroforese bidimensional obtidos de *P. brasiliensis* cultivados em diferentes condições. Sendo situação 1) Fava-Netto e 2) BHI com sangue de carneiro. Utilizando para a identificação o programa Matrix Science (MASCOT). 77

RESUMO

Paracoccidioides brasiliensis é um importante patógeno humano que causa a paracoccidioidomicose (PCM), uma micose sistêmica com ampla distribuição na América Latina. A adesão e invasão de células são eventos cruciais envolvidos na infecção e disseminação do patógeno. Além disso, patógenos utilizam suas moléculas de superfície para se ligar aos componentes da matriz extracelular para estabelecer a infecção. Uma proteína antigênica de *P. brasiliensis* foi isolada de géis de eletroforese bidimensional do *cell-free* do fungo e caracterizada. Peptídeos foram obtidos da proteína de 54 kDa e pI 5,6 e mostraram homologia com enolase de *Paracoccidioides brasiliensis* e outros fungos. A proteína foi purificada através de eletroeluição e utilizada para a produção de anticorpo policlonal em coelho. Por microscopia de fluorescência não foi possível observar a localização exata desta proteína, apenas que se encontra aparentemente distribuída por todo o fungo, foi possível verificar alterações no citoesqueleto de pneumócitos durante a infecção por *P. brasiliensis*. A localização foi confirmada por microscopia imunoeletrônica a presença de enolase foi detectada principalmente na parede celular de leveduras de *P. brasiliensis* e também no citoplasma, ela se demonstrou mais expressa quando este fungo foi cultivado em meio onde houve acréscimo de sangue de carneiro e durante a situação de infecção a pneumócitos. A enolase purificada foi capaz de se ligar a fibronectina, fibrinogênio, laminina, plasminogênio, colágenos tipo I e IV. Foi confirmado que a ligação desta proteína à pneumócitos é influenciada pela sequência de aminoácidos Arg-Gly-Asp contida provavelmente nos receptores da matriz extracelular presentes na célula do hospedeiro. Essas informações indicam que a enolase possivelmente contribui para a adesão do microrganismo aos tecidos do hospedeiro e para a disseminação da infecção. Pela análise proteômica foi possível a identificação de moléculas descritas como envolvidas na virulência, porém em outros modelos de microrganismos, sendo posteriormente interessante o seu estudo para *P. brasiliensis*.

Palavras-chaves: *Paracoccidioides brasiliensis*, enolase, proteômica, adesina.

ABSTRACT

Paracoccidioides brasiliensis is an important human pathogen that causes paracoccidioidomycosis (PCM), a systemic mycosis with a wide distribution in Latin America. The ability of *P. brasiliensis* to cause not only human diseases but also mycoses with a variety of clinical manifestations from localized forms to the disseminated disease progressing to lethality, probably depends on the relationship between the virulence of the fungus, its ability to interact with and to invade the surface structures of the host and the immune response of the host. The adhesion of the pathogen leads to the recognition of carbohydrate and protein ligands on the surface of the host cell or proteins of the extracellular matrix (ECM). The large number of tissue types that fungi can colonize and infect suggests that they use a variety of surface molecules for adhesion. Understanding the interactions between *P. brasiliensis* and the host tissue depends on the study of the different steps of the process of colonization, especially adhesion, in which the pathogen recognizes ligands on the surface of host cells. This study aimed to verify the role of enolase in the host cell-fungus interaction and the ability of enolase to bind to extracellular matrix components, to determine its subcellular localization. The data revealed that fibronectin is the major ligand of enolase. Evaluation of the location of enolase at an ultrastructural level revealed that it is distributed in various cellular compartments, but at a high level in the cell wall. This suggests that enolase performs additional functions related to the glycolytic pathway and also plays a role of adhesion in *P. brasiliensis*. Therefore, this study increases the knowledge about the characteristics of enolase and its influence on the binding process of *P. brasiliensis*.

Keywords: *Paracoccidioides brasiliensis*, enolase, proteomics, adhesin.

1. INTRODUÇÃO

As infecções fúngicas vêm despertando atenção crescente da comunidade científica, devido à grande ineficiência no tratamento das micoses sistêmicas, a forma mais grave destas infecções. No Brasil, as mortes causadas por micoses sistêmicas como paracoccidioidomicose (PCM), criptococose, histoplasmose, candidíase, aspergilose, coccidioidomicose e zigomicose atingiram um número de 3.583 entre 1996-2006, sendo a PCM responsável por 51,2% dos casos (Prado *et al.*, 2009).

A PCM é uma doença granulomatosa sistêmica, causada pelo fungo *Paracoccidioides brasiliensis* (revisado por Lacaz, 1994) que se manifesta endemicamente na maioria dos países da América Latina, especialmente Brasil, Argentina, Colômbia e Venezuela. Estima-se que mais de 10 milhões de pessoas estejam infectadas com o fungo, embora apenas 2% desse total desenvolvam a forma sintomática (Mc Ewen *et al.*, 1995). O Brasil é o país que apresenta o maior número de pacientes notificados (80% dos casos) (Coutinho *et al.*, 2002) sendo as áreas mais afetadas observadas em São Paulo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, Paraná e Rio Grande do Sul (Prado *et al.*, 2009). No entanto, a determinação do local de aquisição da PCM, sua real distribuição e diagnóstico são comprometidos devido ao fato de ser uma infecção de longo período de latência (média de 15,3 anos) e de notificação não obrigatória (Brummer *et al.*, 2003).

A PCM tem alta taxa de morbidade, diminuindo a qualidade e o tempo de vida de indivíduos em idade produtiva. Por este motivo, torna-se um problema com importância econômica e social (Shikanai-Yasuda *et al.*, 2006), o que impulsiona pesquisas que buscam elucidar a biologia do fungo e da doença, e que apontem alternativas terapêuticas.

Em 1908, Adolfo Lutz descreveu pela primeira vez o isolamento do agente etiológico da “hifoblastomicose pseudococcídica”. O termo “pseudococcídica” foi usado para reforçar as diferenças existentes entre o fungo recém-isolado e o agente causador da coccidioidomicose, também uma “hifoblastomicose”, que designava todas as doenças causadas por fungo dimórfico. Porém, só em 1930, Floriano de Almeida caracterizou este fungo emergente e o denominou de *P. brasiliensis*. Sendo a doença por ele causada oficialmente denominada de PCM em 1971, durante o primeiro simpósio sobre este tema, sediada na cidade de Medelín, na Colômbia (Lacaz, 1994). Posteriormente comparações filogenéticas de dermatófitos e fungos dimórficos baseadas

na subunidade ribossomal 28S classificaram *P. brasiliensis* como pertencente ao reino Fungi, filo Ascomycota, classe Plectomyceto, ordem Onygenales, família Onygenaceae, juntamente com *B. dermatitidis* e *H. capsulatum* (Leclerc, *et al.*, 1994; San-Blas & Niño-Veja, 2008).

Matute *et al.* (2006), utilizando 65 isolados de *P. brasiliensis*, classificou os tipos moleculares do fungo em três diferentes espécies filogenéticas, S1, PS2 e PS3 sendo a espécie S1, um grupo parafilético encontrado no Brasil, Argentina, Paraguai, Peru e Venezuela e a espécie PS3, um grupo monofilético encontrado apenas na Colômbia. Carrero *et al.* (2008) com base na comparação de seqüências codantes e não codantes de diferentes genes, além de regiões ITS (sequências intragênicas), de 21 isolados de *P. brasiliensis*, sendo estes, 7 novos isolados, pôde classificá-los dentro de duas espécies filogenéticas, S1 e PS2, anteriormente descritas por Matute *et al.* (2006) além de classificar o isolado Pb01 separado dos demais, propondo a classificação deste isolado como uma nova espécie filogenética. Teixeira *et al.*, (2009) através da análise de 88 isolados identificou 17 como pertencentes do grupo Pb01-like, e estimaram que as espécies filogenéticas S1/PS2/PS3 e Pb01-Like tiveram um ancestral comum a cerca de 32 milhões de anos atrás, e através de análises de recombinação sugeriram a existência de isolamento reprodutivo e portanto propõem os isolados Pb01-like como uma nova espécie, *Paracoccidioides lutzii*. Através da análise de transposons da família Tc1/mariner (Trem) foi descoberta uma ocorrência desigual no genoma dos diferentes isolados e diferentes famílias de TREM são compartilhados entre os isolados (Trem C e H) enquanto outros são exclusivos para Pb01-like (Trem E) ou S1/PS2 (Trem A, B, D e F) que foram perdidos ou adquiridos no processo de especiação (Marini *et al.*, 2010)

Os fungos dimórficos são caracterizados pela mudança de uma fase filamentosa multicelular para uma unicelular, quando infectam os tecidos do hospedeiro. Essa é uma propriedade intrínseca de fungos como *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis*, *P. brasiliensis*, *Coccidioides immitis*, *Coccidioides posadassi*, *Sporothrix schenckii* e *Penicillium marneffei* (Rappleye & Goldman, 2006). A patogenicidade dos mesmos parece estar relacionada ao dimorfismo, pelo fato de linhagens incapazes de transitar morfológicamente não serem virulentas (Maresca & Kobayashi, 2000). Em *P. brasiliensis* esse dimorfismo está fortemente associado a mudança de temperatura sofrida pelo fungo ao penetrar no hospedeiro (San-Blas *et al.*, 2002). Dessa maneira, as duas fases deste fungo podem ser cultivadas *in vitro* apenas variando-se a temperatura

de 36 °C, quando o fungo tem um aspecto de levedura, para temperaturas inferiores a 28 °C, quando se tem a fase miceliana (Bagagli *et al.*, 2006).

O habitat de *P. brasiliensis* continua até hoje desconhecido, apesar de grandes esforços para desvendá-lo. Poucos isolamentos feitos a partir de amostras de solo de diferentes locais como Brasil (Shome & Batista, 1963; Montenegro, *et al.*, 1996; Silva-Vergara, *et al.*, 1998), Venezuela (Albornoz, 1971) e Argentina (Negroni, 1976), sustentam a hipótese do solo ser o habitat natural do fungo. Existem registros de isolamentos a partir de outros materiais, como ração para cachorros, provavelmente contaminada com solo (Ferreira *et al.*, 1990), vísceras de morcego *Artibeus lituratus* (Grose e Tamsitt, 1965), fezes de pingüins (Gezuele, 1989) e vísceras de tatus *Dasypus novemcinctus* (Bagagli, 1998; Silva-Vergara, *et al.*, 2000). Contudo a grande dificuldade de reproduzir os resultados encontrados em amostras de solo ainda impossibilita apontar o verdadeiro habitat de *P. brasiliensis*.

A forma mais aceitável de infecção por *P. brasiliensis* é através da via respiratória pela inalação de propágulos (conídeos) que alcançam o parênquima pulmonar e se transformam em parasitas leveduriformes no tecido do hospedeiro adaptadas a temperatura corporal (Franco, 1987; Restrepo, 1986; Medoff *et al.*, 1987; Kimberlin *et al.*, 1981; Newman, *et al.*, 1990). Pressupondo que o habitat do fungo é o solo e que essa contaminação ocorra pela via inalatória, atividades ligadas ao solo como, agricultura, jardinagem, corte de árvores e outras, estão estritamente relacionadas com a doença e podem ser consideradas como fatores de risco, devido ao fato de a maioria dos pacientes relatar ter exercido alguma atividade agrícola durante certo período da vida (Shikanai-Yasuda, 2006). O perfil majoritário de pacientes manifestando PCM no estágio sintomático é adulto do sexo masculino, trabalhador de zonas rurais e imunodeprimidos (Franco, 1987).

Uma vez no organismo o fungo pode ser completamente destruído ou então persistir e multiplicar produzindo lesão tecidual. A evolução e as conseqüências da infecção vão depender da interação de fatores relacionados ao fungo, como virulência e composição antigênica; e do hospedeiro, como características genéticas e imunidade e ao meio ambiente (Calich *et al.*, 1985 e 1987). O desenvolvimento de PCM está associado, principalmente, à virulência do fungo e à resistência do hospedeiro (Kashino *et al.*, 2000).

A PCM afeta o sistema retículo-endotelial e é classificada de acordo com sua história natural e condição clínica do paciente, nas formas aguda e crônica.

A forma aguda da micose afeta principalmente crianças e jovens e é a forma mais grave e com pior prognóstico. Seu quadro caracteriza-se por um desenvolvimento rápido e por envolvimento de órgãos como fígado, baço, gânglios linfáticos e medula óssea.

A forma crônica tem alta frequência de envolvimento pulmonar e/ou mucocutâneo, e se desenvolve a partir do complexo primário ou da reativação de um foco quiescente. Progredie lentamente, afeta em geral indivíduos do sexo masculino com mais de 30 anos de idade e a maior parte dos casos tem início nos pulmões. Pode permanecer localizada (forma unifocal) ou sofrer disseminação para outros órgãos ou tecidos (forma multifocal). (Brummer, *et al.*, 1993; Felipe *et al.*, 2003, Felipe *et al.*, 2005). A forma crônica severa multifocal pode causar também lesões granulomatosas no sistema nervoso central do paciente. Independente do órgão afetado, a doença evolui para a formação de seqüelas com danos permanentes no indivíduo (Brummer *et al.*, 1993; Londero *et al.*, 1986).

A incidência da PCM predomina em indivíduos do sexo masculino (80 a 90% dos casos) chegando a relação homem : mulher de 15:1 casos, porém esses dados não apresentam relação com o grau de exposição dos mesmos, uma vez que estudos indicam que ambos os sexos apresentam contato similar com o patógeno. Essa discrepância pode ser justificada através de estudos que demonstram que a presença do estrógeno, hormônio feminino, afeta a interação inicial parasita-hospedeiro suprimindo a conversão para a forma parasitária do fungo (Restrepo *et al.*, 1984; Salazar *et al.*, 1988; Aristizabal *et al.*, 1998 e 2002).

O padrão do granuloma formado em resposta aos diferentes isolados de *P. brasiliensis* em modelos experimentais de infecção exemplifica o fator relacionado à virulência do patógeno (Zaccharias *et al.*, 1986; Singer-Vermes *et al.*, 1989). Já a resistência do hospedeiro à infecção por *P. brasiliensis* está relacionada à formação de um granuloma epitelióide compacto e à capacidade de desenvolver uma resposta imunológica celular efetiva (Franco, 1987; Franco *et al.*, 1993). As diferenças entre as formas clínicas da doença e a ocorrência da infecção assintomática estão associadas com vários fatores como sexo, padrão genético, idade, situação imunológica, assim como a quantidade de conídeos inalados ((Franco, 1987). Outro provável fator de risco, intimamente relacionado com a doença, é o tabagismo, existindo alta frequência de

fumantes, aproximadamente 93%, entre os pacientes. O alcoolismo muito relatado entre os acometidos pela doença atua como co-fator com o tabagismo para o agravamento do quadro geral do paciente (Santos, *et al.*, 2003; Restrepo, *et al.*, 2008).

No Brasil a PCM não figura entre as micoses que mais são reportadas em pacientes com HIV, ficando atrás das classicamente relacionadas com a AIDS como criptococose, candidíase, histoplasmose e aspergilose. Muitas são as razões para tentar explicar porque, mesmo em áreas endêmicas, o número de pacientes apresentando a associação HIV/PCM é extremamente baixo. Dentre esses fatores estão: erros de diagnóstico, fatores epidemiológicos (sendo a AIDS considerada uma doença mais urbana e a PCM mais do meio rural) e a utilização como profilaxia contra pneumocistose de sulfametaxol/trimetoprim, droga a qual o *P. brasiliensis* também é susceptível. Apesar de pouco relatada, a possibilidade de portadores de HIV apresentarem a PCM deve ser sempre considerada (Goldani & Sugar, 1995; Restrepo *et al.*, 2008; Prado *et al.*, 2009).

A manifestação da doença em portadores de HIV provavelmente ocorre devido a reativação de um foco latente devido ao quadro de deficiência imunitária apresentada por indivíduos portadores de HIV. Os sintomas apresentados por este grupo de pacientes são muito parecidos com aqueles apresentados por pacientes sofrendo a forma aguda/subaguda da doença como febre prolongada, lesões de pele e pode ocorrer algum comprometimento neurológico. A mortalidade neste grupo é alta podendo chegar a 30% (Marques, 2003; Ramos-e-Silva e Saraiva, 2008).

Existem diversas metodologias para o diagnóstico da PCM, mas o método considerado padrão-ouro é a identificação de elementos fúngicos de *P. brasiliensis* em exame a fresco de espécimes clínicos, como escarro ou biópsia de tecido. Testes sorológicos como a imunodifusão em duplo gel de ágar podem ser utilizados quando não se encontra o fungo nos testes microscópicos. Este teste é amplamente utilizado para verificar se a resposta do paciente, diante do tratamento, é positiva ou se e está ocorrendo recidiva da doença, sendo a sensibilidade e a especificidade do teste superior a 80% e 90%, respectivamente (Shikanai-Yasuda *et al.*, 2006; Wanke e Aide, 2009).

O tratamento da PCM é extremamente longo perdurando por anos. Muitos são os casos de pacientes que abandonam o tratamento e a doença retorna de forma muito mais agressiva e fatal. As alternativas dentre as drogas utilizadas são limitadas, devido a toxicidade da maioria delas e não existe um consenso sobre a melhor droga a ser

utilizada, variando de acordo com a experiência do centro de saúde em questão. Entre as drogas de escolha estão a clássica combinação de sulfametaxol/trimetoprim, itraconazol, cetoconazol, fluconazol e anfotericina B (Marques, 2003; Ramos-e-Silva e Saraiva, 2008; Restrepo *et al.*, 2008).

A virulência fúngica é descrita como um evento altamente complexo, resultante da expressão de múltiplos genes em diferentes estágios da infecção e cuja consequência poderia estar fortemente associada ao estabelecimento da patogênese. As etapas de adesão e a sobrevivência do patógeno no interior do hospedeiro mostram-se essenciais no estabelecimento da patogênese. Neste contexto, fatores importantes para o estabelecimento da infecção por fungos patogênicos vêm sendo descritos (Kwon-Chung, 1998; Odds *et al.*, 2001; Yang, 2003).

Na PCM, os mecanismos envolvidos, desde o primeiro contato com o agente até os estágios subseqüentes da doença são pouco conhecidos. Sabe-se, no entanto, que um amplo espectro de apresentações clínicas pode ocorrer variando desde formas cutâneas e sistêmicas, podendo atingir vários tecidos, com ênfase no pulmão (Franco *et al.*, 1994). A doença pode afetar diretamente os órgãos e, portanto, *P. brasiliensis* deve ter desenvolvido mecanismos que o capacitam aderir, invadir e extravasar barreiras impostas pelos tecidos do hospedeiro (Lenzi *et al.*, 2000), sintetizando várias substâncias que participam direta ou indiretamente da relação parasito-hospedeiro.

P. brasiliensis é considerado um fungo intracelular facultativo, podendo aderir e invadir células epiteliais *in vivo* e *in vitro* (MENDES-GIANNINI *et al.*, 2000). Foi demonstrado que a capacidade de aderência e invasão do fungo é dependente da virulência do isolado (Hanna *et al.*, 2000). A endocitose deste fungo ativa os microfilamentos e microtubulos, além de induzir apoptose (MENDES-GIANNINI *et al.*, 2004). Embora a invasão de células não fagocíticas seja de extrema importância na patogênese da doença, a descrição de algumas adesinas, o conhecimento de genes e moléculas relacionados à adesão e invasão durante o processo infeccioso ainda é restrito.

A habilidade das células em interagir uma com as outras de maneira ordenada, depende de múltiplas interações adesivas, entre as células adjacentes e seu ambiente extracelular, mediada pelas moléculas de adesão celular (TROYANOVSKY, 1999). Tais moléculas funcionam como receptores de superfície celular, os quais não apenas mantêm as células unidas, mas disparam sinais físicos e bioquímicos que regulam uma

variedade de funções, tais como proliferação celular, expressão gênica, diferenciação, apoptose e migração celular. Também, como muitas outras moléculas de superfície celular, elas são utilizadas como porta de entrada para alguns patógenos. Assim, os microrganismos patogênicos utilizam essas moléculas de adesão do hospedeiro para entrar e disseminar-se nas células hospedeiras, a fim de promover sua sobrevivência (BUCKLEY *et al.*, 1999).

A adesão de microrganismos a tecidos o hospedeiro é um evento crucial no desenvolvimento da infecção e é relacionado como o primeiro passo na colonização por microrganismos patogênicos. A adesão implica que o patógeno reconheça ligantes na superfície do hospedeiro ou um constituinte de membrana basal, tais como fibrinogênio, laminina, colágeno ou fibronectina (Furtado *et al.*, 1992; Vicentini *et al.*, 1994; Mc Mahon *et al.*, 1995; Mendes-Gianinni *et al.*, 2000; Sullivan *et al.*, 2004; Mendes-Gianinni *et al.*, 2006), além do envolvimento de componentes do citoesqueleto (Finlay e Falkow, 1989).

Grande número de microrganismos patogênicos pode invadir células eucarióticas e utilizar este ambiente para se multiplicar ou escapar da resposta imune do hospedeiro. Fagócitos profissionais e células normalmente não-fagocíticas, como epiteliais e endoteliais, podem ser invadidas (Finlay & Falkow, 1997). A invasão celular pode ocorrer, uma vez que muitos microrganismos patogênicos têm a capacidade de induzir a sua internalização em células epiteliais, ativando mecanismos de fagocitose forçada, onde sinais extracelulares específicos podem estimular o rearranjo do seu citoesqueleto (actina, microtúbulos e citoqueratina), no sítio de contato com o microrganismo (Swanson e Watts, 1995; Swason e Baer, 1995).

Estudos caracterizaram componentes da matriz extracelular envolvidos na interação de *P. brasiliensis* com o hospedeiro. A MEC consiste de uma rede tridimensional de proteínas como colágeno, glicoproteínas não-colágenas principalmente fibronectina e laminina, e proteoglicanas que parece refletir à capacidade proliferativa do fungo. A capacidade do fungo em aderir à MEC pode ser explicada pela expressão de moléculas pelo fungo que se ligam à MEC (MENDES-GIANNINI *et al.*, 2000). Em geral, os genes envolvidos em adesão não são constitutivamente expressos, mas sim ativados quando influenciados no sítio de infecção no hospedeiro (CHENG *et al.*, 2005). O entendimento e identificação de moléculas envolvidas na adesão de microrganismos aos diferentes substratos no

hospedeiro são caminhos a serem seguidos na descoberta de tratamentos eficientes para as micoses sistêmicas.

A composição da MEC varia em diferentes tecidos e durante as fases de injúria, inflamação e reparo tecidual (Kotton *et al.*, 2003).

A fibronectina é uma proteína multifuncional, sintetizada por células epiteliais e endoteliais, encontrada nos fluidos corporais, tecido conjuntivo, membrana basal, sangue entre outros, que desempenha um importante papel tanto na adesão, quanto na migração celular (Pankov & Yamada, 2002). A fibronectina provavelmente atua como molécula de adesão em células de mamíferos, um processo que envolve a ligação de receptores específicos da superfície celular do patógeno com domínios presentes na molécula de fibronectina (Mohri *et al.*, 1996). Como a fibronectina desempenha um papel vital numa variedade de processos biológicos normais alguns microrganismos fazem dela um alvo estratégico no estabelecimento, manutenção e disseminação da infecção no hospedeiro (Schwarz-Linek *et al.*, 2006). Portanto, proteínas ligantes da fibronectina podem contribuir para a patogênese da infecção por mediar adesão aos ligantes do hospedeiro e retenção do fungo nos tecidos.

Laminina é uma glicoproteína de 900 kDa presente na membrana basal e nos pulmões, tem importância no desenvolvimento e manutenção da organização celular, esta glicoproteína pode ser exposta quando o tecido sofre um dano, que pode ser provocado por toxinas bacterianas, drogas ou processos inflamatórios. A interação com laminina é crucial para vários processos biológicos, os quais requerem adesão celular tais como, diapedese, coesão celular dentro do tecido, metástase de células cancerosas e infecções (Beck *et al.*, 1990). Estão envolvidas no processo de adesão em fungos, parasitas e bactérias como moléculas-alvo. Ela também está implicada na ligação de uma variedade de patógenos intra e extracelulares às células do hospedeiro, podendo aumentar adesão dos taquizoítos de *T. gondii* às células J774 (Furtado *et al.*, 1992) e de *H. capsulatum* aos componentes da membrana basal (Mc Mahon *et al.*, 1995).

Colágeno é o principal constituinte da MEC, vários tipos de colágenos foram caracterizados, colágeno tipo IV é encontrado principalmente na membrana basal e o colágeno tipo I é abundante na matriz intersticial (Gil *et al.*, 1996). Tradicionalmente o papel atribuído a essas proteínas era apenas estrutural, mas eles estão também envolvidos na adesão e diferenciação celular. Como constituintes das matrizes extracelulares, os colágenos já foram descritos como alvos para a adesão de células

tumorais (Kazarian *et al.*, 2003) e de proteínas de microrganismos como *Leptospira interrogans* (Atzingen *et al.*, 2008), *Bartonella henselae* (Dabo *et al.*, 2006) e *P. brasiliensis* (Barbosa *et al.*, 2006). Portanto os colágenos têm um papel importante no aumento da capacidade de invasão de células tumorais e microrganismos. .

O fibrinogênio é uma das principais glicoproteínas solúveis do plasma, possui alto peso molecular, 350 kDa, é produzida por hepatócitos, e atua como potencial precursor do produto final da coagulação, a fibrina (Scheraga & Laskowski, 1957; Doolittle, 1981). Foi demonstrado em *Streptococcus* dos grupos A, B, C e G que a ligação de proteínas desses patógenos ao fibrinogênio resulta na inibição da fixação do sistema complemento (C3) do hospedeiro à superfície do microrganismo, e, portanto a eliminação do invasor é dificultada (Chhatwal *et al.*, 1985). A ligação às proteínas do hospedeiro, particularmente fibrinogênio (Skerl *et al.*, 1984) à blastósporos de *C. albicans* desempenha um papel na adesão deste fungo às células de mamíferos. A ligação do fibrinogênio às formas filamentosas deste fungo, geralmente ocorre em tecidos infectados (Odds, 1979) e está implicada no processo de aderência (Kimura & Pearsall, 1980). A ligação de proteínas ao fibrinogênio pode acarretar na sua transformação a fibrina que se deposita sobre a bactéria e a protege contra fagócitos como demonstrado em *Staphylococcus aureus* (Espersen, 1984).

Os avanços na caracterização de *P. brasiliensis* têm redundado também em maior conhecimento das adesinas deste fungo, pois muitas das proteínas que participam de vias metabólicas importantes para o fungo podem estar associadas à requisição de ligantes do fungo às células hospedeiras.

Como o primeiro passo para o estabelecimento de processos infectivos nos tecidos dos hospedeiros seria a adesão de microrganismos às proteínas da MEC, torna-se necessário o estudo das moléculas que se comportam como adesinas em fungos patogênicos.

Algumas moléculas de *P. brasiliensis* já foram identificadas como ligantes de componentes da matriz extracelular. A gp43 foi a primeira a ser identificada como ligante de laminina (HANNA, 1995; VICENTINI *et al.*, 1994; ANDRÉ *et al.*, 2004). A glicoproteína de 43 kDa tem papel na aderência desde que soro anti-gp 43 inibiu o processo de adesão em 85% (HANNA *et al.*, 2000). Estudos adicionais mostraram que em ensaios de afinidade de ligação, a gp43 foi capaz de se ligar tanto a fibronectina quanto a laminina. Esta ligação foi inibida quando células Vero foram tratadas com

peptídeo 1 da gp43, peptídeos sintéticos derivados da laminina (YIGRS) e fragmentos de ambos componentes de matriz (seqüência RGD, presente em várias matrizes extracelulares), indicando que a gp 43 (particularmente o peptídeo 1), participaria mais efetivamente do processo de adesão (MENDES-GIANNINI *et al.*, 2006).

Outras moléculas de adesão em *P. brasiliensis* também foram descritas. Uma adesina de 30 kDa, mais expressa em isolados de *P. brasiliensis* com alta capacidade de adesão, possui a capacidade de ligação à laminina. A adesão de *P. brasiliensis* foi intensamente inibida pelo pré-tratamento das células epiteliais com a molécula de 30 kDa (Andreotti *et al.*, 2005). *P. brasiliensis* também apresentou em sua superfície celular, duas proteínas com massas moleculares de 19 e 32 kDa que interagem com diferentes proteínas da MEC, tais como laminina, fibrinogênio e fibronectina. Ensaio utilizando conídeos de *P. brasiliensis*, pré-incubados com anticorpo monoclonal anti-32 kDa inibiram, de maneira dose-dependente, a aderência do fungo às proteínas da MEC (González *et al.*, 2005). Recentemente esta proteína foi caracterizada como uma hidrolase por análise de sua seqüência, isolados *knockdown* para esta proteína apresentaram alterações na morfologia das células leveduriformes, a redução da capacidade de aderência às células epiteliais humanas *in vitro* e diminuição da virulência em modelos de infecção em camundongos foi evidenciada (Hernández *et al.*, 2010).

Outros compostos de *P. brasiliensis* também foram estudados quanto a sua capacidade de produzir resposta imunológica em hospedeiros, entre estas proteínas foram descritas as de 57, 48 e 45 kDa (CASOTTO, 1990; FERREIRA-DA-CRUZ *et al.*, 1992), uma proteína recombinante de 27 kDa (ORTIZ *et al.* 1996; ORTIZ *et al.*, 2000) e um antígeno circulante de 87kDa (GÓMEZ *et al.*, 1998) que revelou homologia com proteínas de choque térmico (Hsp) de vários organismos (DIEZ *et al.*, 2002). Seis componentes protéicos sintetizados preferencialmente na fase leveduriforme de *P. brasiliensis* foram identificados sendo altamente homólogos à catalase, frutose-1,6-bifosfato, aldolase, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, malato desidrogenase e trifosfato isomerase de várias origens (FONSECA *et al.*, 2001). Outra proteína caracterizada foi a Hsp60 de *P. brasiliensis* e sua proteína recombinante foi reconhecida por soros de pacientes com paracoccidiodomicose (CUNHA *et al.* 2002; IZACC *et al.*, 2001). COSTA *et al.*, 2002 estudaram as proteínas de 39 e 78 kDa presentes na fase

leveduriforme de *P. brasiliensis* em que o seqüenciamento de aminoácidos revelou identidade à manosil e glicosiltransferase de várias origens.

Além dessas adesinas, também foram caracterizadas enzimas de *P. brasiliensis* que interagem com moléculas do hospedeiro, sendo consideradas então adesinas, como a GAPDH (glicose-6-fosfato desidrogenase) ligantes de laminina, fibronectina e colágeno tipo I (BARBOSA *et al.*, 2006) e TPI (triose fosfato isomerase) que também se liga a componentes da matriz, como laminina e fibronectina (PEREIRA *et al.*, 2007). Posteriormente, foi isolada e caracterizada uma proteína de 70 KDa, denominada paracoccina, capaz de se ligar a N-acetil-glucosamina (COLTRI *et al.*, 2006, GANIKO *et al.*, 2007). Ainda, Pereira *et al.* (2007) identificaram a triose fosfato isomerase de *P. brasiliensis* que, através de ensaios de inibição com seus peptídeos, foi capaz de se ligar preferencialmente a laminina.

Castro *et al.* (2008) descreveram outra molécula presente na superfície do fungo que apresenta capacidade de aderir às proteínas da MEC, denominada *PbDfg5p*. Esta proteína foi caracterizada como pertencente à família das glicosil hidrolases e estaria relacionada com a formação e manutenção da parede celular de fungos. Em *P. brasiliensis* sua presença na parede celular foi evidenciada através de imunoeletromicroscopia, bem como em extratos protéicos de parede celular, obtidos a partir do tratamento de leveduras com β -1,3 endo glucanase. A *PbDfg5p* recombinante apresentou capacidade de se ligar a laminina, fibronectina, colágeno tipo I e IV, além de apresentar um “motif” RGD (Arg-Gly-Asp, grupo residual ligante de fibronectina) em sua sequência predita, característica comum de algumas adesinas.

Da Silva Neto *et al.* (2009) demonstraram que a malato sintase possui capacidade de ligação à fibronectina, colágenos I e IV, está localizada na parede celular e anticorpos anti-*PbMLS* (malato sintase de *P. brasiliensis*) foram capazes de inibir a interação de *P. brasiliensis* às células epiteliais *in vitro*, sugerindo que a *PbMLS* contribua para a adesão do fungo aos tecidos do hospedeiro.

Em estudos anteriores realizados por nosso grupo, Donofrio *et al.* 2009, caracterizaram parcialmente uma proteína de 54 kDa, ligante de fibronectina em isolado 18 de *P. brasiliensis*, que se demonstrou mais expressa após o cultivo em meios enriquecidos com sangue de carneiro. Foi observado anteriormente (Yang *et al.*, 1998; Pendrak *et al.*, 2004) que, a adição de hemoglobina ao meio de cultura aumenta a expressão de receptores de superfícies ligantes de fibronectina em *C. albicans* e também

aos seus fragmentos proteolíticos contendo a região de 120 kDa (domínio de ligação celular, que inclui uma sequência RGD) e 40 kDa (domínio de ligação a heparina) (Yang *et al.*, 1998). Pendrak *et al.* (2004) demonstraram que *C. albicans* se liga à hemoglobina sendo esta interação suficiente para induzir a expressão de receptor para fibronectina.

Tripeptídeos desta enolase de 54 kDa revelaram similaridade com as enolases de vários fungos, especialmente com *P. brasiliensis* (número de acesso: ABQ45367.1), *Coccidioides posadasii*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus oryzae*, *Penicilium chrisogenum* e *Aspergillus fumigatus*.

Recentemente, Nogueira *et al.* (2010) demonstrou a atuação da enolase de *P. brasiliensis* isolado 01, como receptor de plasminogênio. Através desta ligação o fungo seria capaz de adquirir atividade proteolítica, pois a plasmina gerada é uma enzima chave do sistema plasminogênio e contribui para a degradação dos constituintes da matriz. A ligação ao plasminogênio e a sua conversão à plasmina (uma serina protease) pode contribuir para a patogenicidade de *P. brasiliensis* por facilitar a invasão tecidual no hospedeiro.

A enzima enolase (2-fosfo-D-glicerato) catalisa a desidratação de 2-fosfo-D-glicerato (2-PG) à fosfoenolpiruvato (PEP) na segunda metade da via glicolítica. A enolase é uma das enzimas citoplasmáticas mais abundantemente expressas em muitos microrganismos (Pancholli, 2001). Assim, por muitos anos, a enolase foi vista como uma enzima glicolítica solúvel, presente exclusivamente no citoplasma. Contudo vários estudos têm mostrado que esta enzima metabólica possui atividades funcionais adicionais (Pancholli & Fischetti, 1998; Sriram *et al.*, 2005; López-Villar *et al.*, 2006).

Em células de mamíferos, já foram identificadas três isoformas de enolase, alfa (ENO1), beta (ENO3) e gama (ENO2). ENO1 é vastamente distribuída em uma variedade de tecidos, enquanto ENO2 e ENO3 são encontradas exclusivamente nos tecidos neuroendócrino e no tecido muscular, respectivamente (Chang *et al.*, 2006). Além de sua função glicolítica, ENO1 já foi encontrada na superfície de monócitos e neutrófilos atuando como um receptor de plasminogênio, sugerindo um possível papel na invasão tecidual (Redlitz *et al.*, 1995). Em situações de hipóxia, a enolase também atua como uma proteína de estresse que poderia proteger as células aumentando o metabolismo anaeróbico (Jiang *et al.*, 1997).

Em fungos, a levedura *Saccharomyces cerevisiae* (EC 4.2.1.11) que apresenta 75% de identidade com a enolase de *P. brasiliensis*, quando submetida a condições de alta temperatura, expressa uma proteína heat-shock, Hsp48, identificada como uma enolase, produto do gene ENO1, e se demonstrou estar envolvida na tolerância térmica e controle do crescimento do microrganismo (Iida & Yahara, 1984; Iida & Yahara, 1985).

Em *S. cerevisiae*, os vacúolos são organelas importantes que participam em diversos processos tais como resposta ao estresse osmótico, acúmulo de aminoácidos, polifosfatos ou componentes tóxicos, além do tráfego de proteínas, ainda nesta levedura, foi demonstrado que durante a fusão desses vacúolos há o envolvimento de um componente citosólico que apresentou identidade com uma enolase (Xu & Wickner, 1996). Em estudos adicionais, a adição da enolase recombinante de *S. cerevisiae* em um ensaio de fusão vacuolar *in vitro*, estimulou a fusão vacuolar de maneira dose-dependente. A mutação pontual desta enolase levou a anulação de sua atividade enzimática, porém a fusão vacuolar permanecia ativa neste ensaio, sugerindo atividade estimulatória da enolase neste processo (Decker & Wickner, 2006).

O sistema plasminogênio (Plg) desempenha duas funções gerais na defesa do hospedeiro. Em primeiro lugar, ele participa da via central para a dissolução de coágulos de fibrina, que é essencial para a manutenção da hemostasia. Em segundo lugar, o sistema Plg facilita a migração celular por ajudar na penetração através de barreiras protéicas. Sob condições fisiológicas, essa ativação é finamente regulada. Os ativadores do Plg são serina-proteases que catalisam a conversão do Plg à plasmina e foram classificados como sendo de dois tipos: ativador do Plg tipo tecidual (tPA) e ativador do Plg tipo uroquinase (uPA). A permeação através das membranas basais é um passo importante na patogênese de muitos microrganismos. Sendo assim, alguns patógenos podem adquirir a atividade proteolítica pela ligação do plasminogênio a sua superfície celular onde ele é ativado por um fator tecidual (tPA) ou do tipo uroquinase. Uma vez gerada o potencial proteolítico, através da plasmina, ela pode ser capaz de promover a disseminação de alguns microrganismos através da degradação de componentes da matriz celular do hospedeiro (Plow et al., 1995; Coleman & Benach, 1999). Alguns patógenos podem adquirir atividade proteolítica pela ligação do plasminogênio a sua superfície celular onde ele é ativado pelo tPA do hospedeiro.

Eberhard e colaboradores (1999) demonstraram que a plasmina do hospedeiro ligada à superfície celular é capaz de promover a disseminação de *Streptococcus pneumoniae* através da membrana basal, e também em *S. pyogenes* (Pancholli *et al.*, 1998). Esta enolase também foi identificada em *S. suis*, através de análises imunoproteômicas, como um importante antígeno, com capacidade de ligação tanto ao plasminogênio como a fibronectina (Esgleas & Li *et al.* 2008), mediando assim a sua adesão e invasão às células do hospedeiro (Oehmcke *et al.*, 2004). Devido ao seu papel crítico na ativação do plasminogênio, estudos sugerem que anticorpos anti-enolase poderiam ser importantes como adjuvantes em vacinas (FENG *et al.*, 2009).

A ligação do plasminogênio às superfícies celulares é mediada por cinco domínios, que possuem afinidade por resíduos de lisina. Mundodi e colaboradores (2008) demonstraram que a proteína enolase, presente na superfície de *Trichomonas vaginalis*, se liga ao plasminogênio através de resíduos de lisina, uma vez que houve diminuição dessa ligação na presença do ácido aminocapróico, um análogo da lisina.

Esta capacidade de ligação ao plasminogênio pela enolase também foi descrita em inúmeros patógenos, entre eles: *Aeromonas hydrophila* (CHOPRA *et al.*, 2009) e *Neisseria meningitidis* (KNAUST *et al.*, 2007) ; no protozoário *Leishmania mexicana* (VANEGAS *et al.*, 2007) ; nos trematódeos *Schistosoma bovis* (de La TORRE-ESCUADERO *et al.*, 2010) e *Fasciola hepática* (BERNAL *et al.*, 2004).

Pal-Bhowmick e colaboradores (2007) demonstraram que, em *Plasmodium yoelii*, a enolase está associada às membranas celulares e às frações nucleares e do citoesqueleto onde poderia desempenhar funções diversas. Em *Toxoplasma gondii*, sua localização além do citoplasma também foi confirmada, estando principalmente presente no núcleo das fases iniciais de proliferação intracelular do parasito, sugerindo sua participação na atividade nuclear, possivelmente controlando a transcrição de genes em estágio específicos (FERGUSON *et al.*, 2002).

Em um estudo recente de avaliação da expressão gênica na interação célula-hospedeiro em *Giardia lamblia*, a enolase apresentou uma super expressão durante esta interação, sugerindo um possível papel no estabelecimento da infecção e indução da giardíase (Ringqvist *et al.*, 2010).

A análise proteômica despertou considerável atenção e importância desde a revelação que o genoma humano se constitui de menos genes que originalmente estimado (VENTER *et al.* 2001). Assim, a informação genética sozinha é insuficiente

para explicar eventos biológicos e padrões de expressão do RNAm e nem sempre se correlacionam com o nível de expressão protéica (ANDERSON *et al.*, 1997). Os produtos gênicos finais, representados pelas proteínas, precisam ser estudados para o completo entendimento e determinação do padrão de expressão nos tecidos.

Proteínas envolvidas em processos biológicos são detectadas por mudanças quantitativas, forma de regulação e modificações pós-traducionais. O primeiro passo para a análise da expressão proteômica implica na separação e detecção de proteínas por eletroforese bidimensional de alta resolução, seguida pela identificação e caracterização de peptídios e proteínas de interesse por espectrometria de massa (MS). O passo final é definir as funções de todas as proteínas e complexos sistemas metabólicos envolvidos para o entendimento das vias biológicas. Então, a análise proteômica pode ser aplicada para a análise de interações protéicas, na observação de modificações pós-traducionais, na identificação e posteriormente da sua real função. Com esse intuito a realização do proteoma de *P. brasiliensis* cultivado em diferentes condições de cultivo pode resultar na consequente identificação de alvos para a descoberta de novos protótipos antifúngicos e na identificação de marcadores na pesquisa clínica (WESTERMEIER *et al.*, 2002).

Os mecanismos e fatores de virulência dos microrganismos são objetos de estudo de muitos pesquisadores. Neste contexto, moléculas de superfície celular constituem-se em alvos interessantes para a interrupção das interações fungo-hospedeiro, através da inibição ou bloqueio de possíveis fatores de virulência, o que pode levar ao impedimento da colonização no hospedeiro e ao progresso do processo infeccioso. Portanto o estudo desta enolase através de sua influência na adesão deste fungo e a sua localização durante a interação fungo-célula hospedeira pode servir para a melhor compreensão dos mecanismos de patogenicidade e futuramente no desenvolvimento de novas estratégias para controlar esta infecção fúngica.

2. JUSTIFICATIVA

Na célula, as proteínas participam de uma extensa rede de interações intermoleculares. Essas interações são dinâmicas e dependentes de uma série de sinais intra e extracelulares. Um passo inicial para se entender a estrutura e a função de uma proteína é determinar com quais outras proteínas elas interagem. Dessa forma o estudo da proteína enolase de 54 kDa e o rastreamento de suas interações intermoleculares em relação aos componentes da matriz extracelular permitem avaliar o papel de adesina desta proteína na interação fungo-célula, explorando assim novas funções para esta enzima. Devido ao fato desta proteína estar envolvida em múltiplas funções biológicas, invariavelmente há o seu recrutamento em diferentes compartimentos celulares, por isto a sua localização em nível subcelular pode fornecer informações para outras funções que ela possa ter durante a interação de *P. brasiliensis* com as células do hospedeiro, contribuindo desta maneira para o entendimento do processo infectivo deste patógeno, além de fornecer as bases para o desenvolvimento de novas estratégias no tratamento desta micose.

A aderência às células do hospedeiro é, para muitos patógenos, o passo inicial no estabelecimento de uma infecção. Uma vez que mecanismos de adesão e infecção de *P. brasiliensis* ainda são pouco conhecidas, faz-se relevante a utilização da abordagem proteômica para a identificação de proteínas potencialmente envolvidas na interação de *P. brasiliensis* a componentes da matriz extracelular do hospedeiro. Possibilitando a melhor compreensão sobre a interação deste fungo com o hospedeiro.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVOS GERAIS

Neste estudo pretendeu-se caracterizar a enolase do isolado 18 de *Paracoccidioides brasiliensis*, através da avaliação do seu papel no parasitismo celular em cultura de pneumócitos de linhagem contínua e sua localização subcelular durante as mesmas condições de interação bem como a identificação de novas proteínas deste fungo diferencialmente expressas de acordo com o meio de cultivo.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obtenção da proteína enolase purificada;
- Produção de anticorpos policlonais anti-enolase;
- Verificar a interação da enolase com os seguintes componentes da MEC: fibronectina, laminina, plasminogênio, fibrinogênio, colágenos tipo I e IV através de ELISA;
- Avaliar a influência da sequência peptídica Arg-Gly-Asp na ligação da enolase às células epiteliais pulmonares por ensaios de inibição;
- Imunofluorescência para verificação da localização da enolase durante a interação fungo-célula e alterações no citoesqueleto celular;
- Confirmação da localização ultracelular da enolase através de microscopia eletrônica – *Immunogold*;

- Identificação de novas proteínas de *P. brasiliensis* expressas em diferentes condições de cultivo.

4. METODOLOGIA

4.1. Microrganismo e condições de cultivo

Foi utilizado o isolado 18 de *P. brasiliensis* (Pb) na fase leveduriforme, procedente da micoteca da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FM-USP). Durante a realização deste trabalho o isolado de Pb18 foi mantido em meio de 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) e meio BHI (infusão-cérebro-coração-DIFCO) acrescido de 5% de sangue de carneiro, a 35°C e repicados a cada 7 dias.

4.2. Preparo dos antígenos de *P. brasiliensis*

Os extratos *cell-free* foram obtidos do isolado Pb18, na fase leveduriforme, cultivado em meio de Fava Netto e BHI acrescido de 5% de sangue de carneiro. Cerca de 300 mg de crescimento de cada isolado foi retirado do meio e adicionado em 1 mL de PBS 0,01 M, pH 7,4, estéril. Esta mistura foi agitada em “vortex” por 30 segundos e, em seguida, centrifugada a 550xg por 1 minuto. O sobrenadante (extrato *cell-free*) foi retirado, aliquotado e armazenado a -20°C.

A concentração protéica dos antígenos foi quantificada pelo método de Lowry *et al.* (1951), e em seguida, foram avaliados por eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio, SDS-PAGE, sob condições redutoras, usando sistema tampão descontínuo de Laemmli (1970) e Studier (1973). Os géis foram corados utilizando Azul de Comassie Brilhante G250 segundo Neuhoff *et al.* (1988).

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

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

A separação dos componentes foi efetuada em gel de corrida a 10%, e em gel de empilhamento a 5% de acrilamida. O gel foi preparado a partir de solução estoque contendo 30% por massa de acrilamida e 0,8% por massa de bis-acrilamida. No gel de separação a polimerização foi feita em 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-

etilenodiamina (TEMED) e 0,1% de persulfato de amônio (APS). O gel de empilhamento foi polimerizado em presença 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. Para o preparo das amostras foram usados 64 µL de extrato protéico diluído em tampão de amostra (1:5), consistindo 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. As proteínas foram dissociadas pelo aquecimento das amostras em banho-maria com água fervente por 3 minutos.

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

A corrida eletroforética foi realizado a 10 mA (80V) até que o tampão de amostra penetrasse no gel de separação e a 20 mA (120V) até que atingisse o fim do gel. O tampão de corrida é constituído de Tris 0,075 M, glicina 0,57 M e SDS 0,1%, pH8,3. Os géis foram corados com Comassie Azul Brilhante G-250 segundo Neuhoff *et al.* (1988).

4.3. Purificação da proteína de 54 kDa por eletroeluição

A técnica foi realizada segundo Neophytou *et al.* (1996) e Sá-Pereira *et al.* (2000), com os extratos *cell-free* do isolado cultivado em meio BHI sólido acrescido de 5% de sangue de carneiro.

Para tanto, os extratos *cell free* foram submetidos à eletroforese com gel de poliacrilamida a 10%. Após corrida, os géis foram corados com Comassie Azul Brilhante, e massa molecular de 54 kDa foi removida e eletroeluída em tampão glicina (192 mM Glicina; 25 mM Tris base, 0,1% SDS) em membrana de diálise a 10mA, por 4h a 4°C. Para a verificação da fração de 54 kDa eletroeluída, a mesma foi submetida à focalização isoeétrica, para a separação da proteína de acordo com seu pI, e assim foi confirmada a purificação da proteína de interesse.

4.4. Preparo de soros policlonais

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

Soro anti-*cell-free* de Pb18 foi produzido a partir dos extratos *cell-free* do isolado cultivado em meio BHI contendo 5% de sangue de carneiro. Cerca de 0,3, 0,6, 0,9 e 1,0 mL do antígeno foi inoculado por via intra dérmica em coelhos machos albino provenientes do Biotério Central da UNESP-Botucatu, intercalando as inoculações a cada 4 dias, sendo que na primeira a suspensão foi emulsificada com adjuvante completo de Freund e nas seguintes com o adjuvante incompleto de Freund. Decorridos 15 dias da última inoculação foi realizada uma sangria de prova e a avaliação do título de anticorpos produzidos foi feita através da técnica de *Immunoblot*, e em seguida, foi realizada a sangria total.

Para a separação da fração do soro, rica em imunoglobulinas, foi realizada a precipitação com sulfato de amônio 1,56 M, pH 6,5. O soro foi diluído 1:2 em PBS, e colocado em banho de gelo sobre um agitador magnético, adicionando-se o mesmo volume de sulfato de amônio saturado gota a gota. Esse soro foi incubado a 4°C overnight. Após esse tempo, o sedimento formado foi ressuspenso e posteriormente centrifugado a 850xg por 30 minutos a 4°C. Em seguida, o sobrenadante foi guardado para nova precipitação, e o sedimento formado foi ressuspenso em sulfato de amônio 40%, e novamente centrifugado. Após centrifugação, o sobrenadante formado foi descartado e o sedimento foi 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*, aliquotado e estocado a -70°C.

4.4.2. Soro policlonal anti-enolase de *P. brasiliensis*

Para a produção de soro policlonal anti-enolase de Pb18, foram realizadas oito inoculações por via intra dérmica intercaladas a cada 4 dias em coelhos machos albino provenientes do Biotério Central da UNESP-Botucatu com a banda de 54 kDa recortada dos géis de SDS-PAGE de Pb18 provenientes dos extratos *cell-free* do isolado cultivado em meio BHI contendo 5% de sangue de carneiro. A primeira suspensão foi emulsificada com adjuvante completo de Freund e nas seguintes com o adjuvante incompleto de Freund. Decorridos 15 dias da última inoculação foi realizada uma sangria de prova e a avaliação do título de anticorpos produzidos foi feita através da técnica de *Immunoblot*, e em seguida, foi realizada a sangria total. A separação da fração do soro rica em imunoglobulinas foi realizada como descrito no item anterior.

4.5. Immunoblot (Avaliação do título dos anti-soros)

O antígeno *cell-free* do isolado Pb 18 (cultivado em BHI com 5% sangue de carneiro) e a enolase purificada foram submetidos à SDS-PAGE e transferidos eletroforéticamente do gel para membranas de nitrocelulose conforme descrito por Towbin *et al.* (1979). Após a eletroforese, os géis foram apostos sobre membranas de nitrocelulose, recobertos com papel de filtro e comprimidos com esponjas de poliuretano. Todos os materiais foram previamente embebidos em tampão de transferência bicarbonato de sódio e metanol, pH 9.9, e em seguida, encaixados em placas acrílicas perfuradas e mergulhados na câmara de transferência contendo o mesmo tampão. A transferência foi feita overnight à amperagem constante de 0,4 mA. A membrana então foi corada por Ponceau S (0,5% w/v em 5% v/v de ácido acético) para a localização das bandas protéicas transferidas. Após lavagem de 15 minutos, as membranas de nitrocelulose contendo os antígenos foram cortadas em tiras, incubadas com solução bloqueadora (5% de leite desnatado em PBS) por 4 horas. Os soros adequados foram diluídos, colocados sobre as tiras e deixados em contato, sob agitação, overnight em temperatura ambiente. Como controles positivos foram utilizados soro anti-*cell-free* produzido em coelho e soro de paciente com paracoccidiodomicose diluídos 1:20, e como controle negativo soro normal de coelho e soro de indivíduo aparentemente normal também na diluição 1:20.

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

4.6. Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) para screening de adesão aos componentes da matriz extracelular

Foi feito o “screening” da adesão utilizando-se a técnica de ELISA. Para tanto, as placas de 96 orifícios foram sensibilizadas com 10 µg/ml dos componentes da matriz

extracelular: laminina, fibronectina, fibrinogênio, plasminogênio, colágenos tipo I e tipo IV isoladamente em tampão carbonato pH 9,6 a temperatura ambiente por 1 hora. Após este período, as placas foram lavadas com PBS-Tween 20, 0,05% (PBS-T) e bloqueadas com Soro Albumina Bovino 1% (BSA) por 2 horas a 37°C. Mais um ciclo de lavagens foi realizado e então se adicionou a proteína enolase em diferentes concentrações (50, 25, 10 e 5 µg/ml) por 15 horas a 37°C.

Após a incubação as placas foram lavadas novamente com PBS-T, e então se adicionou o anticorpo anti-enolase no título de 1:100 em PBS-T e BSA 0,5% por 1 hora a 37°C. Mais um ciclo de lavagens foi realizado e então foi adicionado o anticorpo secundário (Anti-rabbit IgG-HRP) 1:2000 em PBS-T e BSA 0,5% por 1 hora a 37°C. Novamente, lavaram-se as placas com PBS-T. A reação foi revelada com a solução reveladora (fosfato de sódio/ácido cítrico/ortofenilenodiamino/água oxigenada). A leitura foi realizada a 490nm.

4.7. Cultura de Células e Teste de Infecção

Neste estudo, foi selecionada a linhagem de pneumócitos A549, células epiteliais de pulmão (Banco de Células do Rio de Janeiro-RJ).

4.7.1. Cultivo Contínuo e Tripsinização

A linhagem celular foi mantida em cultivo contínuo em garrafas de plástico estéreis, em meio F-12 *Nutrient Mixture* (HAM-F12) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB). A cultura foi mantida em estufa a 36,5°C com 5% de CO₂. Decorridos 3-4 dias, as garrafas de células foram submetidas à tripsinização. Para isto a monocamada celular formada foi lavada com 1 mL de ATV-solução de tripsina 0,2% e EDTA 0,02% (Adolfo Lutz) e, após a lavagem, esta foi desprezada e acrescentado mais 1mL de ATV. Seguidos 1-2 minutos, as células foram homogeneizadas com volumes variáveis de meio HAM F12 acrescido de 10% de SFB. Nesta etapa a tripsina (ATV) foi neutralizada pelo SFB presente no meio de cultura. O volume total da suspensão celular obtida foi diluído em meio HAM F12 acrescido de 10% de SFB e transferido para outras garrafas, de modo a se obter uma concentração de 10⁶ células/mL.

4.7.2. Monocamada de células epiteliais

O ensaio de infecção foi realizado em placas de 24 orifícios contendo no interior uma lamínula redonda (*deckglaser*), para a imunofluorescência; em garrafas de cultura celular para a realização da microscopia eletrônica por Immunogold e em placa de 96 orifícios para o ensaio com RGD.

Após a tripsinização e homogeneização da suspensão celular, 0,2 mL desta foi retirada da garrafa, e diluída em 1,8 mL de meio HAM F12 e foi feita a contagem de células em hemocitômetro, para que, através de diluições adequadas fosse ajustada a concentração desejada (10^4 células/mL). Ao término desta etapa, 0,5 mL dessa suspensão de células foi dispensado em cada orifício das placas e estas foram incubadas a 36,5°C por 24 horas, para que a monocamada celular se formasse sobre a lamínula, sendo a partir daí utilizada para o ensaio de infecção, e posteriormente nas imunofluorescências.

Para o ensaio de inibição com RGD sintético, após a formação da monocamada celular, realizou-se a lavagem com PBS (0,05 M, pH 7,2), adicionou-se paraformaldeído 4% por 30 min a temperatura ambiente. Para o *Immunogold*, 10^4 céls/mL cultivadas em 3 garrafas de 75 cm² para a formação monocamada de células através da incubação a 36 °C por 24 horas.

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

O isolado 18 de *P. brasiliensis*, na fase leveduriforme (L) foi cultivado em meio de Fava-Netto e meio BHI acrescido de 5% de sangue de carneiro durante três dias a 35°C. A suspensão foi feita em tampão salina fosfato (PBS) estéril. Foi adicionada a um volume de 10 mL de PBS estéril, quantidade suficiente o fungo para a obtenção de uma suspensão turva e homogênea, correspondente a 10^6 células/mL, de acordo com a escala 0,5 de Mc Farland e ajustada também através de leitura em espectrofotômetro (D.O.= 550nm).

4.7.4. Infecção de células epiteliais com as leveduras de *P. brasiliensis*

Após a formação do tapete celular sobre as lamínulas e sobre o fundo das garrafas de cultura celular por aproximadamente 24 horas, o sobrenadante da cultura foi desprezado e as células foram lavadas por três vezes com PBS 0,05 M, pH 7,2 estéril. Em seguida, cada poço da placa de 24 orifícios foi inoculado com 300 µL de meio HAM F12 desprovido de SFB e 300 µL da suspensão de *P. brasiliensis* padronizada. E para o

Immunogold cada garrafa foi inoculada com 5 mL de meio HAM F12 e 5 mL da suspensão de *P. brasiliensis*. A seguir as células infectadas foram incubadas a 36,5°C em diferentes períodos de tempo 2h, 5h e 8h.

Após o período de infecção, as lamínulas foram lavadas três vezes com PBS 0,05 M pH 7,2, eliminando-se, desta forma, células fúngicas não aderentes às culturas celulares e também os restos celulares. As células infectadas foram fixadas com paraformaldeído 4% por 30 min a temperatura ambiente. Após a fixação, estas lamínulas foram então lavadas com PBS por 5 vezes para dar início a reação de imunofluorescência. Para o controle negativo foram utilizadas lamínulas contendo apenas células A549 não infectadas.

Para o *Immunogold*, após o período de infecção as células foram tripsinizadas e então centrifugadas em tubos Falcon a 5.000 *xg* por 10 minutos. O pellet formado foi removido e lavados três vezes com PBS (0,05 M, pH 7,2), centrifugando a 10.000 *xg* por 5 minutos entre cada lavagem, e então utilizadas para a microscopia eletrônica.

4.8. Imunofluorescência com marcação tripla para localização da enolase e avaliação de alterações do citoesqueleto na interação de *P. brasiliensis* com pneumócitos

4.8.1. Microfilamentos de actina

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 lamínulas contendo as células epiteliais infectadas com *P. brasiliensis* em diferentes períodos de infecção foram permeabilizadas com solução de Triton X 100, 0,5% por 30 minutos. Em seguida, lavou-se com PBS-T e realizou-se o bloqueio (leite 5%/BSA 3%) por 1 hora a 37°C. Em seguida, adicionou-se o anticorpo anti-enolase, 1:50 em solução de bloqueio por 1 hora a temperatura ambiente. Mais um ciclo de lavagens foi realizado e adicionou-se o anticorpo secundário *anti-rabbit IgG* (anticorpo anti IgG de coelho) conjugado com Alexa Fluor® 549 1:250 em solução de bloqueio por 1 hora a temperatura ambiente. Nova lavagem com PBS-T foi realizada.

Para a marcação da actina, adicionou-se faloidina-FITC no título de 1:50 em Azul de Evans, por 50 minutos a 37°C, no escuro. As lamínulas foram novamente lavadas com

PBS-T e então incubadas com DAPI 1µg/mL (4', 6 – diamino-2-fenolindol), por 10 minutos a 37°C. As lamínulas foram lavadas novamente com PBS-T, montadas com p-fenilenodiamina (*anti-fading*) e então observadas em microscópio de fluorescência (Modelo DFC 300 FX Marca Leica).

4.8.2. Microtúbulos

Para a verificação dos microtubulos, as lamínulas contendo as células epiteliais infectadas com *P. brasiliensis* em diferentes períodos de tempo foram processadas como descrito no item 4.8.1 para a marcação da enolase. Após as devidas lavagens, para a marcação da tubulina, adicionou-se anticorpo monoclonal anti β -tubulina (Sigma) produzida em camundongo diluído 1:100 em solução de bloqueio por 1h a 37°C. Mais um ciclo de lavagens foi realizado e adicionou-se o anticorpo secundário *anti-mouse IgG* (anti IgG de camundongo) conjugado com Alexa Fluor® 488 diluído 1:250 em solução de bloqueio por 1h a temperatura ambiente, no escuro. As lamínulas foram novamente lavadas com PBS-T e então incubadas com DAPI 1µg/mL (4', 6 – diamino-2-fenolindol), por 10 minutos a 37°C. As lamínulas foram lavadas novamente com PBS-T, montadas com *anti-fading* e então observadas em microscópio de fluorescência (Modelo DFC 300 FX Marca Leica).

4.8.3. Filamentos intermediários: Citoqueratina

Para a verificação dos filamentos de citoquertina, as lamínulas contendo as células epiteliais infectadas com *P. brasiliensis* em diferentes períodos de tempo foram processadas como descrito no item 4.8.1 para a marcação da enolase. Após as devidas lavagens, para a marcação da citoqueratina, adicionou-se anticorpo monoclonal anti pan-citoqueratina (Sigma) 1:100 produzida em camundongo diluído em solução de bloqueio por 1h a 37°C. Mais um ciclo de lavagens foi realizado e adicionou-se o anticorpo secundário *anti- mouse IgG* conjugado com Alexa Fluor® 488 1:250 em solução de bloqueio por 1h a temperatura ambiente, no escuro. As lamínulas foram novamente lavadas com PBS-T e então incubadas com DAPI 1µg/mL (4', 6 – diamino-2-fenolindol), por 10 minutos a 37°C. As lamínulas foram lavadas novamente com PBS-T, montadas com *anti-fading* e então observadas em microscópio de fluorescência (Modelo DFC 300 FX Marca Leica).

4.9. Ensaio de inibição utilizando RGD sintético

Para verificar a importância da sequência peptídica Arg-Gly-Asp na ligação da enolase de *P. brasiliensis* à pneumócitos, foi realizado o ensaio de competição desta ligação utilizando RGD sintético (Sigma). Após a formação da monocamada de células epiteliais pulmonares em placas de polipropileno, foi realizado o ensaio de ELISA como descrito anteriormente no item 4.6, realizando-se o bloqueio com PBS-T e SFB 10% por 1h a temperatura ambiente, realizou-se a lavagem com PBS-T e então se incubou o RGD sintético (200 µg/mL) na presença e na ausência de 25 µg/mL e 50 µg/mL de enolase, e também a incubação das células epiteliais A549 apenas com a enolase, diluídos em solução de bloqueio, por 1h a 37 °C. Realizou-se a lavagem com PBS-T, e então se incubou as placas com anticorpo anti-enolase, diluído 1:100 em solução de bloqueio, por 1h a 37 °C, nova lavagem foi realizada e adicionou-se então o anticorpo anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase (1:3000), por 1h a 37 °C, a reação foi revelada como descrito no item 4.6.

4.10. Imunocitoquímica em nível ultraestrutural (*Immunogold*) para localização da enolase

Suspensões de células epiteliais A549 infectadas com *P. brasiliensis* em diferentes períodos de tempo 2h, 5h e 8h 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. Uma vez preparados os cortes, estes foram coletados em telas de níquel e submetidos à reação de imunocitoquímica. Para tanto, os cortes ultrafinos foram lavados 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. Em seguida foi realizado o bloqueio dos sítios antigênicos inespecíficos com 3% BSA em TBS, NaN₃ 0,05% e Tween 20 0,1%, pH7,2, por 1 hora. O anticorpo primário (anti-enolase policlonal) foi diluído 1:50 em TBS-BSA 0,1%, NaN₃ 0,05%, Tween 20 a 0,1%, pH 7,3 e adicionou-se aos cortes, incubando em baixa temperatura *overnight* em câmara úmida. Como controle foi utilizado soro pré-imune de coelho na mesma diluição. Após esta incubação, realizou-se a lavagem durante 25 minutos (5 trocas de 5 minutos cada) 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. Em seguida realizou-se a incubação com 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%, NaN₃ 0,05%, Tween 20 0,1%, pH8,2 por 5 minutos e utilizou-se um ciclo de lavagens com (1) TBS-BSA 0,1%, NaN₃ 0,05%, Tween 20 0,1% durante 15 minutos (3 trocas de 5 minutos) e com (2) TBS-Tween 20 0,1%, pH7,2 por 5 minutos.

Para a melhor estabilização da reação de imunocitoquímica, os cortes foram fixados com glutaraldeído a 2,5% em tampão cacodilato 0,1 M, pH 7,2 a temperatura ambiente. Realizaram-se então três lavagens de 5 minutos cada 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) do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB-I) da USP-SP

4.11. Identificação proteômica de novas moléculas de *P. brasiliensis*

4.11.1. Preparo do extrato proteico total

Os cultivos de *P. brasiliensis*, em meio Fava-Netto e BHI acrescido de 5% de sangue de carneiro foram centrifugados e lavados de 3 a 5 vezes com água gelada para a retirada do meio de cultura. O pellet foi acrescido de 5 mL de solução 10 mM Tris-HCl, pH 8,8 com os inibidores de proteases, PLAAC (Pepstatina, Leupeptina, Aprotinina, Antipaina, Chymostatina a 1 mg/mL diluídos em DMSO) e PMSF 100 mM (fenilmetilsulfonilflúor diluído em etanol) e então foi macerado com nitrogênio líquido, estes macerados foram recolhidos e acrescidos de pérolas de vidro e levados ao “vortex” 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 Lowry *et al.* (1951) e em seguida as amostras foram avaliadas por SDS-PAGE como descrito no item 4.2.1.

4.11.2. Análise protéica por eletroforese bidimensional.

Os componentes protéicos (extrato total e *cell-free*) do isolado 18 de *P. brasiliensis* foram primeiramente submetidos à focalização isoeletrica, utilizando o sistema Ettan IPGphor 3 (GE Healthcare). A segunda dimensão, realizada para a separação das proteínas de acordo com a massa molecular, foi realizada em gel de poliacrilamida 12.5% de acordo com Laemmli, 1970. Os géis foram corados utilizando Azul de Comassie Brilhante G250 segundo Neuhoff *et al.* (1988).

4.11.3. Digestão *in situ* das proteínas

Os spots selecionados foram retirados dos géis e cortados em segmentos de aproximadamente 1 mm³, em placas de vidro limpas com metanol. Realizou-se a descoloração dos fragmentos em eppendorf, com solução descorante contendo 50% acetronitrila em 25 mM bicarbonato de amônio, agitando em vórtex por 10 minutos entre cada lavagem até a retirada total do corante. Removeu-se a solução descorante e então desidratou-se o gel com 100% acetonitrila por 10 min, descartou-se a acetonitrila e o processo foi repetido até a completa desidratação do gel. Os fragmentos foram reidratados com DTT (20 mM DTT em 50 mM bicarbonato de amônio) por 40 min a 56 °C. A solução de DTT foi removida e então se realizou a alquilação com solução de iodoacetamida (55 mM iodoacetamida em 50 mM bicarbonato de amônio), por 30 min a temperatura ambiente e ao abrigo de luz. Descartou-se o sobrenadante, e nova desidratação foi realizada com 100% acetonitrila. Adicionou-se 15 µL solução de tripsina em ácido acético (100 ng/µL) aos fragmentos de gel secos, e então os reidratamos em gelo. Adicionou-se 25 mM de bicarbonato de amônio até a cobertura dos fragmentos, e incubou-se a 37 °C por 14h. Interrompeu-se a reação com solução bloqueadora (50% acetonitrila e 5% ácido fórmico). Três eluições foram realizadas repetindo-se duas vezes cada uma delas e os sobrenadantes foram recolhidos no mesmo eppendorf após todas as eluições, a primeira eluição foi feita com 60% metanol e 1% ácido fórmico, sonicação por 15 minutos a 40 °C. Para a segunda eluição foi adicionada 50% acetonitrila e 1% ácido fórmico, sonicação por 15 minutos a 40 °C. Na terceira eluição adicionou-se volume suficiente de acetonitrila 100% para desidratar os fragmentos do gel, sonicação por 15 minutos.

Os peptídeos eluídos do gel foram submetidos à concentração em recipiente contendo sílica, até a completa secagem dos fragmentos. Após a concentração, a amostra

foi ressuspensa em ácido fórmico 0,1% e submetidas à purificação antes da análise por espectrometria de massas.

4.11.4. Purificação de mistura de peptídeos para utilizando ZipTips

A purificação foi realizada utilizando Reverse-Phase Zip-Tip Pippete (Millipore) seguindo as instruções do fabricante, com modificações por Salvato.

As amostras de peptídicas foram ressuspensas em solução 0,1% de ácido trifluoroacético (TFA). As ponteiros ZipTips foram equilibradas aspirando 10 µL de uma solução de acetonitrila (ACN) e 0,1% TFA e descartando, este procedimento foi realizado três vezes. Em seguida foram aspirados 10 µL de uma solução de água e 0,1% TFA, descartou-se por três vezes. Para a ligação da amostra nas colunas contidas nas ponteiros, foram aspirados 5 µL da amostra de peptídeos de 7 a 10 vezes para aumentar a fixação em misturas complexas. Após a ligação dos peptídeos às colunas, foram realizadas duas lavagens, primeiramente aspirando 10 µL de solução de água e 0,1% de TFA, repetindo o processo 3 vezes e em seguida aspirando 10 µL de solução 5% de metanol e 0,1% de TFA, repetindo 3 vezes. Para finalizar foi realizada a eluição dos peptídeos aspirando e dispensando várias vezes em um eppendorf limpo 5 µL de solução ACN e 0,1% TFA (Salvato *et al.*, 2010).

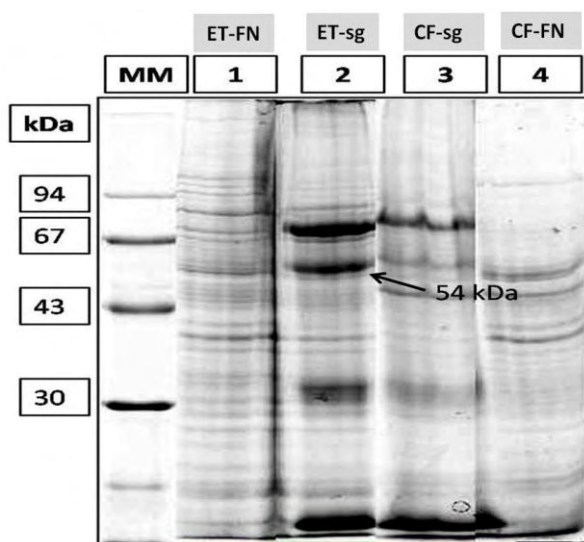
4.11.5. Análise por espectrometria de massas

Após a digestão com tripsina e purificação, os peptídeos foram analisados por espectrometria de massas. Os peptídeos foram seqüenciados por espectrometria de massas através de ionização por *eletrospray* (ESI-MS/MS), os espectros de fragmentação obtidos (MS/MS) contendo as massas moleculares dos peptídeos foram avaliados pelo *software* MASCOT (Matrix Science) e os peptídeos foram identificados confrontando os resultados dos cálculos da relação m/z (massa/carga dos íons gerados) dos fragmentos experimentais e fragmentos teoricamente preditos contidos no banco de dados MSDB (Realizado na Universidade de São Paulo, USP – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – Departamento de Genética).

5. RESULTADOS

5.1. Perfil eletroforético dos extratos *cell-free* e total de *P. brasiliensis*

Os *cell-free* e total isolados de *P.* cultivados em BHI acrescido de carneiro. O destes extratos variaram de 106 Apresentando relação ao



extratos protéicos foram obtidos dos *brasiliensis* 18 meia Fava Netto e de 5% de sangue de perfil eletroforético mostrou bandas que a 12 kDa. semelhanças em número de bandas

majoritárias, porém diferenças em relação à intensidade dessas bandas. As massas moleculares mais evidentes foram 76, 67, 54 e 30 kDa. A adição de sangue de carneiro ao meio de cultivo proporcionou uma maior expressão de algumas proteínas.

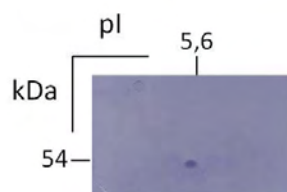
Estes extratos contendo os componentes protéicos foram submetidos à eletroforese bidimensional como descrito no item 4.10.4.

Figura 1. Perfil eletroforético dos extratos e protéicos de *P. brasiliensis*. (1) Extrato total de Pb18 cultivado em meio Fava Netto, (2) Extrato total de Pb18 cultivado em meio BHI acrescido de sangue de carneiro; (3) *Cell-free* Pb 18 cultivado em meio BHI acrescido de sangue de carneiro, (4) *Cell-free* de Pb 18 cultivado em meio Fava Netto.

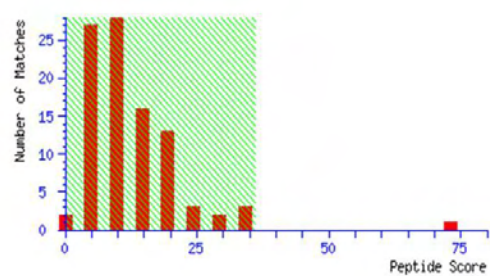
5.2. Purificação da proteína de 54 kDa por eletroeluição

A banda de 54 kDa obtida por eletroforese em gel de SDS-PAGE foi eletroeluída e submetida a eletroforese bidimensional, na figura 2A a banda referente a esta proteína purificada é demonstrada.

A)



B)



C)

Enolase	Sequence
<i>P. brasiliensis</i>	346 KVNQIGTLTESIQAAKDSYAAGWGVMSHRSGETEDVTIADVVGRLRAGQIKTGAPARSE 416
<i>A. fumigatus</i>	346 KVNQIGTLTESIQAAKDSYADNWGVMSHRSGETEDVTIADVGLRSGQIKTGAPCRSE 416

Figura 2. Identificação proteômica da enolase de *P. brasiliensis* de gel de eletroforese bidimensional. A) Eletroforese bidimensional da proteína de 54 kDa obtida por eletroeluição, gel corado por Comassie Azul Brilhante; B) Score de distribuição dos peptídeos desta proteína de 54 kDa identificados por espectrometria de massas (ESI-MS/MS), o score é de $-10\log(P)$, onde P é a probabilidade de se observar um evento aleatório, score de íons individuais >36 indicam grande identidade ou homologia ($p < 0,05$); C) Identidade (99%) entre a sequência da proteína purificada de *P. brasiliensis* (EEH47975.1) e a sequência referente a enolase de *A. fumigatus* (AAK49451.1).

5.3. Titulação dos soros policlonais (*Immunoblot*)

5.3.1. *Immunoblot* do soro anti-cell free de *P. brasiliensis*

O soro anti-cell free obtido da inoculação da amostra do isolado de Pb18 cultivado em meio BHI acrescido de 5% de sangue de carneiro, apresentou título de 1:1800, sendo capaz de reconhecer 11 frações antigênicas que variam de 86 a 16 kDa, e destas, oito frações antigênicas foram mais intensas com massas moleculares de 64, 54, 43, 34, 28, 22 e 16 kDa. O controle positivo foi feito com soro de paciente com paracoccidiodomicose (1:20) e o controle negativo com soro de coelho normal (1:20). O resultado da reatividade do soro anti-cell-free de *P. brasiliensis* frente ao extrato cell-free do isolado 18 cultivado em BHI acrescido de 5% de sangue de carneiro está demonstrado na figura 3.

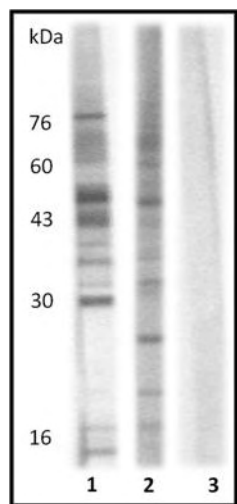


Figura 3. Immunoblot do soro anti-cell free de *P. brasiliensis*. Soro anti-cell free frente aos antígenos do controle positivo (1); *cell-free* de Pb 18 cultivado em meio BHI com sangue de carneiro (2) e controle negativo (3).

5.3.2. Immunoblot do soro anti-enolase de *P. brasiliensis*

O soro policlonal anti-enolase, isolada da amostra de Pb18 cultivado em meio BHI acrescido de 5% sangue de carneiro apresentou reatividade até a diluição de 1:500 (Figura 4)

O resultado da reatividade do soro policlonal anti-enolase de *P. brasiliensis* na diluição 1:20 frente sua proteína purificada e ao extrato *cell-free* da amostra cultivada em meio BHI acrescido de sangue de carneiro está demonstrado na figura 4.

Como pode ser observado, este soro anti-enolase reagiu contra a fração de 54 kDa independente da amostra avaliada.

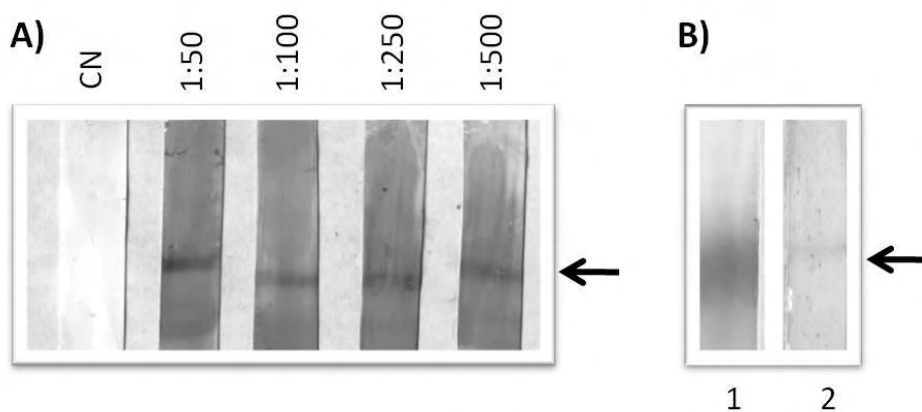


Figura 4. Immunoblot do soro anti-enolase de *P. brasiliensis*. A) Immunoblot do soro policlonal anti-enolase de *P. brasiliensis*. Titulação do anticorpo anti-enolase. B) Immunoblot do soro policlonal anti-enolase de *P. brasiliensis* (diluição 1:20) frente ao *cell-free* da amostra cultivada em meio acrescido de sangue (1) e a proteína enolase purificada (2).

5.4. Triagem dos ligantes da matriz extracelular à enolase por ELISA

Os resultados mostram que a enolase foi capaz de se ligar a todos os constituintes da MEC avaliados, porém a fibronectina foi reconhecida fortemente pela enolase de *P. brasiliensis* (Gráfico 1), como demonstrado anteriormente por Donofrio (2009), onde esta proteína foi caracterizada como uma adesina ligante de fibronectina.

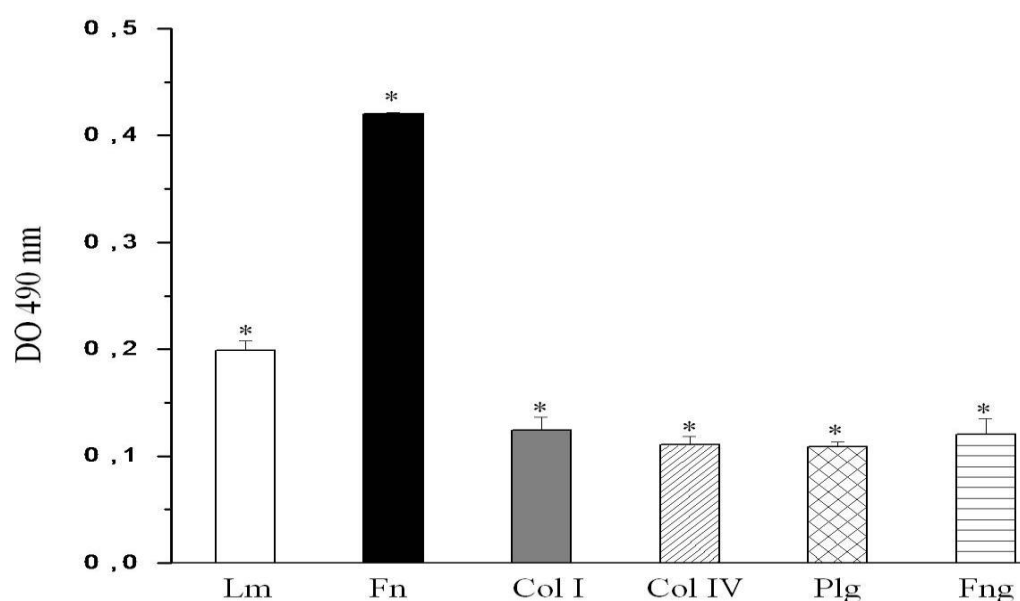


Gráfico 1. Ligação da enolase (10 µg/mL) aos componentes da MEC: laminina, fibronectina, colágenos I e IV, plasminogênio e fibrinogênio (10 µg/mL) isoladamente. A interação foi revelada por ELISA, com a leitura da absorbância em 490nm. O controle negativo foi feito com anticorpos primários, secundários, BSA 0,5% matriz extracelular. Os valores do controle já estão plotados nos resultados ($p < 0,05$).

5.5. Imunofluorescência

5.5.1. Actina

Células epiteliais não infectadas apresentaram marcação fluorescente intensa dos filamentos actínicos. O recrutamento de filamentos de actina foi observado após a interação de *P. brasiliensis* com as células epiteliais. Quando comparado às células normais (CN), durante a infecção o padrão de distribuição da actina foi discretamente alterado, ocorrendo o recrutamento ao redor ou próximo ao sítio de interação da célula epitelial com o fungo. Nos períodos iniciais de infecção a actina se mantém temporariamente associada com o fungo (Figura 6 – 2h de infecção – Cél+Pb), e posteriormente (Figura 6 – 5h de infecção – Cél+Pb) o acúmulo de actina é aparentemente reduzido na área de contato da célula com o fungo. Quando a internalização fúngica foi finalizada (Figura 6 – 8h de infecção – Cél+Pb) o citoesqueleto aparentemente ainda permaneceu alterado. Após a interação entre o fungo e as células o arranjo do citoesqueleto actínico ficou alterado, exibindo fibras mais curtas, quando comparado com o arranjo das células controle.

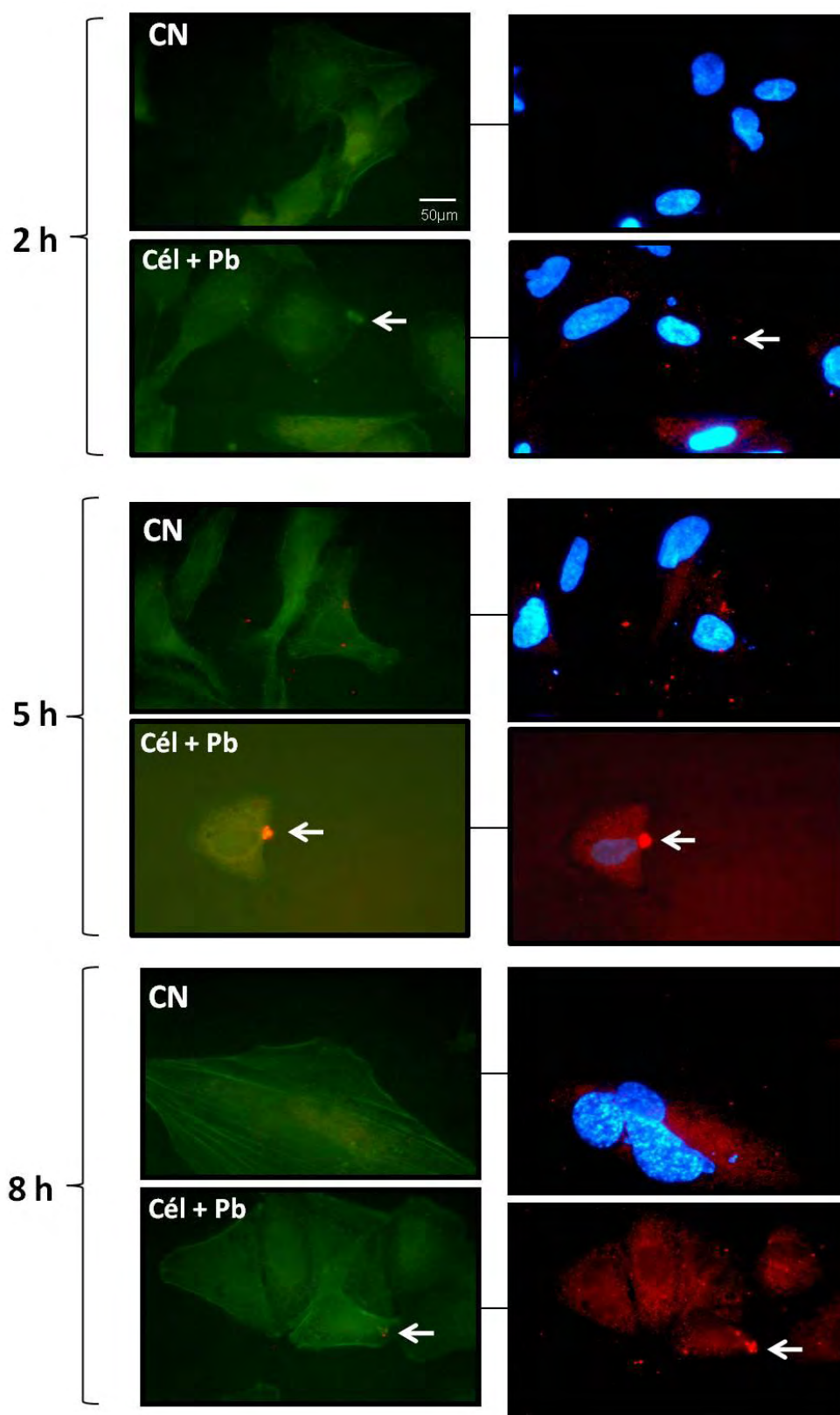


Figura 6. Imunofluorescência dupla mostrando o padrão de marcação dos filamentos de actina das células epiteliais A549 normais e infectadas com *P. brasiliensis* após 2, 5 e 8 horas, utilizando faloidina - FITC (verde) e anticorpo anti-

enolase - Alexa 594 (vermelho). (CN) padrão dos filamentos actínicos em células epiteliais não infectadas; (Cél+Pb) Desorganização da actina de células epiteliais durante sua interação com *P. brasiliensis*. As setas indicam a presença de *P. brasiliensis* interagindo com a célula A549. Os núcleos encontram-se corados com DAPI (azul). Aumento de 1000X, (50 µm).

5.5.2. Microtúbulos

Os controles negativos (CN) mostraram a organização padrão dos microtúbulos a partir do centróssomo. No período inicial da infecção não foi observado o fungo na célula, portanto não podemos afirmar se as alterações ocorridas foram decorrentes da infecção (Figura 7 – 2h de infecção – Cél+Pb).

Aparentemente ocorreu um rearranjo e acúmulo de tubulina na posição oposta ao sítio de contato na célula após 5h de infecção como mostrado na figura 7 (5h – Cél+Pb), sugerindo que o início da invasão envolve a reorganização de citoesqueleto celular em resposta a um sinal do fungo. Após a internalização do fungo, houve uma redistribuição dos microtúbulos, saindo do núcleo, padrão observado na célula não infectada e se difundindo homogeneamente pela célula depois da invasão (figura 7 – 8h de infecção – Cél+Pb). *P. brasiliensis* após a internalização parece deixar vacúolos, que apontam para o local onde o fungo estava na célula epitelial (Figura 8).

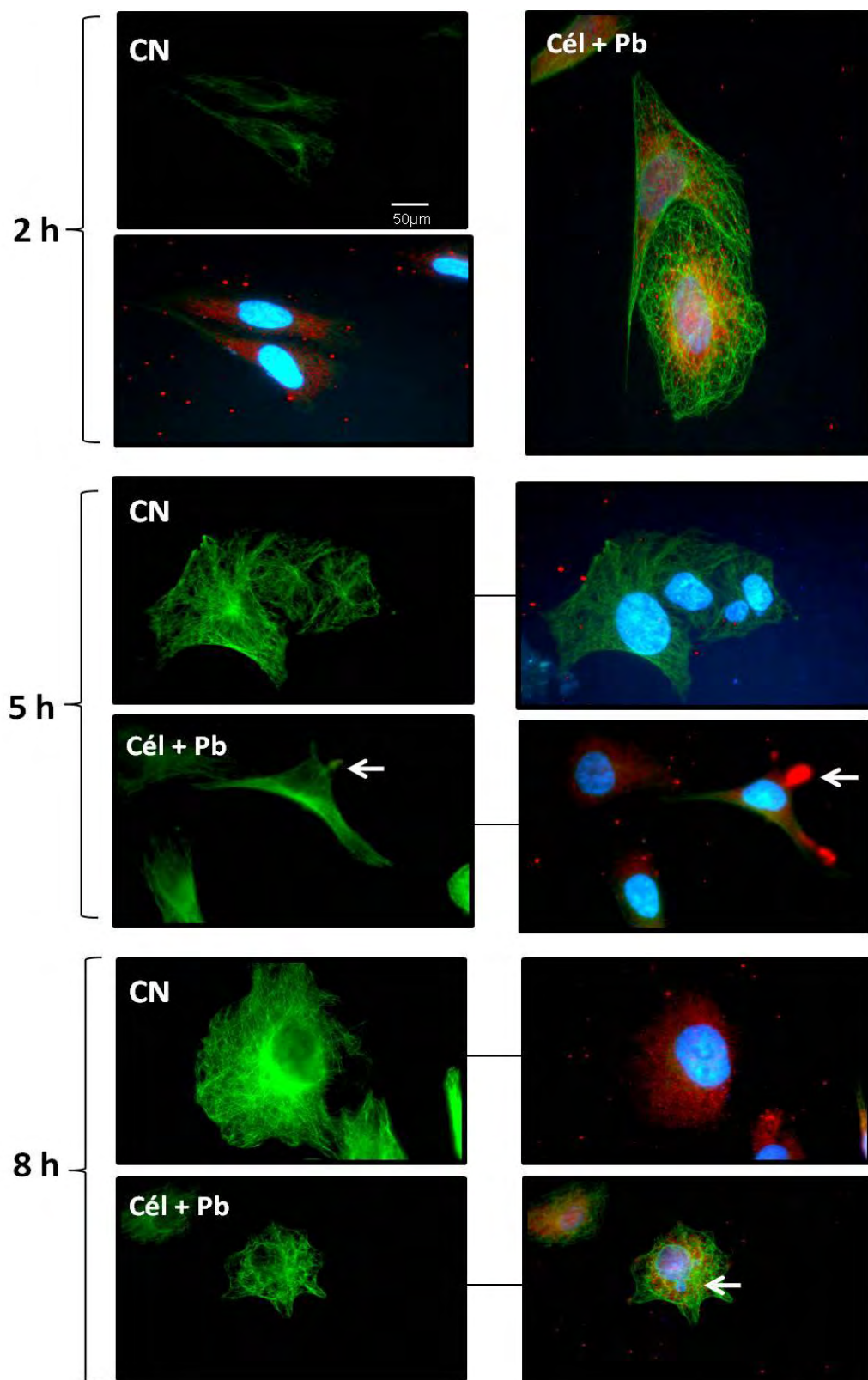


Figura 7. Imunofluorescência dupla mostrando o padrão de marcação dos microtúbulos das células epiteliais A549 normais e infectadas com *P. brasiliensis* após 2, 5 e 8 horas, utilizando anticorpo anti-tubulina – Alexa 488 (verde) e anticorpo anti-enolase – Alexa 594 (vermelho). (CN) padrão dos microtúbulos em

células epiteliais não infectadas; (Cél+Pb) Desorganização dos microtúbulos de células epiteliais durante sua interação com *P. brasiliensis*. As setas indicam a presença de *P. brasiliensis* interagindo com a célula A549. Os núcleos encontram-se corados com DAPI (azul). Aumento de 1000X, (50 μ m).

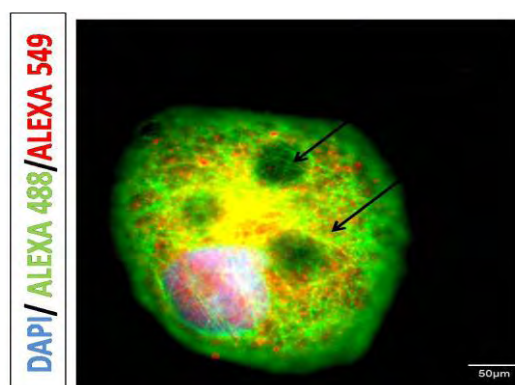


Figura 8. Imunofluorescência dupla mostrando o padrão de marcação dos microtúbulos das células epiteliais A549 infectada com *P. brasiliensis* após 8 horas, utilizando anticorpo anti-tubulina – Alexa 488 (verde) e anticorpo anti-enolase – Alexa 594 (vermelho). As setas indicam os vacúolos, local onde o fungo provavelmente se encontrava na célula. O núcleo encontra-se corado com DAPI (azul). Aumento de 1000X, (50 μ m).

5.5.3. Citoqueratina

As células epiteliais quando marcadas com soro anti-citoqueratina, apresentaram uma rede de filamentos curtos se estendendo próximo do núcleo até a membrana citoplasmática das células. Com o tempo de infecção, houve uma mudança na disposição de citoqueratina ocorrendo um considerável acúmulo próximo ao sítio de interação da célula com o fungo. Isso pode ser observado pelo desarranjo e destruição disposição de citoqueratina ocorrendo um considerável acúmulo próximo ao sítio de interação da célula com o fungo.

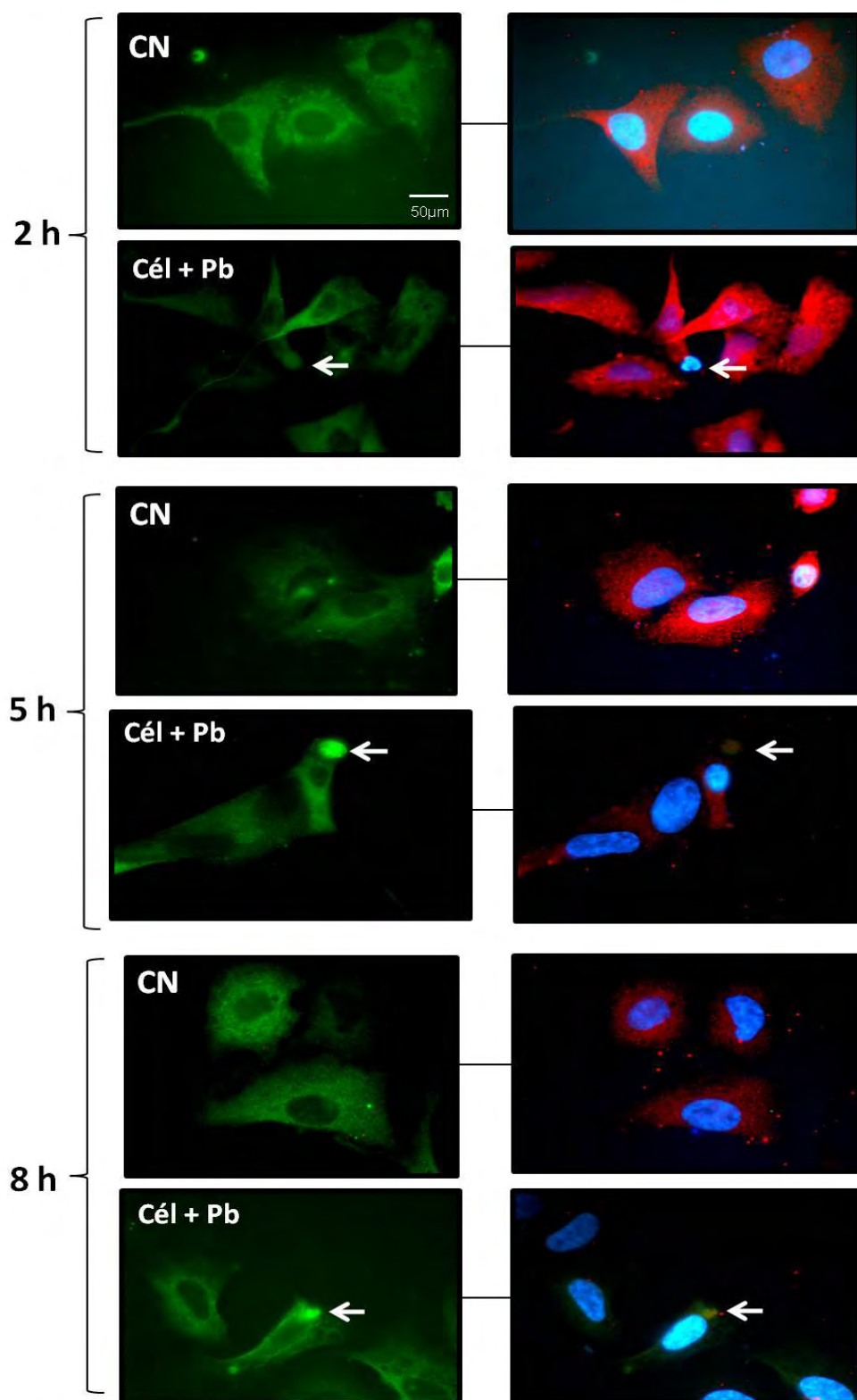


Figura 9. Imunofluorescência dupla mostrando o padrão de marcação da citoqueratina das células epiteliais A549 normais e infectadas com *P. brasiliensis* após 2, 5 e 8 horas, utilizando anticorpo anti-citoqueratina – Alexa 488 (verde) e anticorpo anti-enolase – Alexa 594 (vermelho). (CN) padrão da citoqueratina em células epiteliais não infectadas; (Cél+Pb) Desorganização da citoqueratina de células

epiteliais durante sua interação com *P. brasiliensis*. As setas indicam a presença de *P. brasiliensis* interagindo com a célula A549. Os núcleos encontram-se corados com DAPI (azul). Aumento de 1000X, (50 µm).

5.5.4. Enolase

Em relação à localização da enolase neste estudo, foi possível avaliar que se trata de uma proteína ubíqua em toda a célula fúngica. Houve a ligação do anticorpo anti-enolase à enolase das células epiteliais, justificável provavelmente pelo fato de que a enolase é uma enzima altamente conservada em diferentes organismos, como leveduras, humanos, entre outros (VAN DER STRAETEN, 1991). Além disso, o anticorpo utilizado foi policlonal podendo por isso ocorrer ligações inespecíficas. Portanto as marcações na fluorescência impossibilitaram que quantitativamente a relação enolase com modificações do citoesqueleto pudesse ser avaliada.

5.6. Influência da sequência Arg-Gly-Asp na ligação da enolase a pneumócitos

Para determinar a importância da sequência de peptídeos, RGD na participação da enolase na aderência do fungo às células epiteliais pulmonares, o peptídeo sintético RGD foi adicionado como facilitador em um ensaio de ligação da enolase às células A549. Como demonstrado no gráfico 2, a ligação da enolase a estas células foi reduzida em 10% pela adição de RGD, confirmando a importância da sequência RGD que é encontrada em muitas proteínas da matriz extracelular. Possivelmente esta sequência peptídica participa da ligação da enolase a alguns componentes da matriz extracelular tais como fibronectina, fibrinogênio, laminina e colágeno.

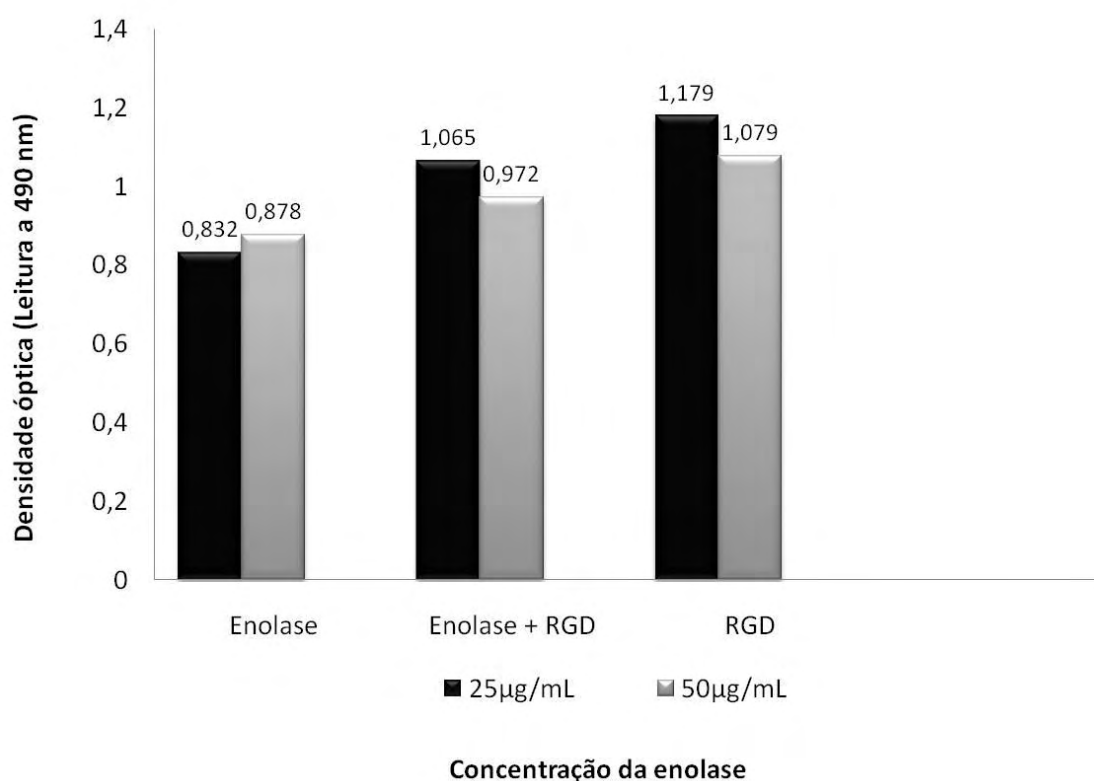


Gráfico 2. Influência do RGD na ligação da enolase de *P. brasiliensis* às células epiteliais pulmonares. O ensaio foi realizado através de ELISA (leitura realizada a 490 nm). A densidade óptica foi relacionada a maior ou menor capacidade de ligação da enolase ao RGD. O RGD estimulou em 10% a ligação da enolase às células epiteliais pulmonares.

5.7. Distribuição da enolase de *P. brasiliensis* em nível ultraestrutural

O padrão imunocitoquímico com a técnica de *Immunogold*, utilizando-se o anticorpo policlonal anti-enolase, mostrou a distribuição das partículas de ouro (correspondentes a localização da enolase) em vários compartimentos celulares (Figura 10 a1-2 até d1-2 e Figura 11 – f1-2 até i1-2). No citoplasma da forma leveduriforme de *P. brasiliensis*, foram vistas poucas partículas de ouro sobre o citoplasma do fungo, em locais visualmente não identificáveis (ribossomos, retículo endoplasmático ou mitocôndria), após comparação com o controle (Figura 10 a3, b3, c3 e d3 e Figura 11 f3, g3, h3 e i3) ao qual não foi adicionado o anticorpo primário. As partículas de ouro ficaram homogeneamente distribuídas por toda a espessura da parede celular do fungo, e em uma quantidade muito acima daquela encontrada no citoplasma.

Avaliando-se a quantidade de enolase encontrada nas diferentes condições de cultivo de *P. brasiliensis*, concluímos novamente que a adição de sangue ao meio de

cultivo (Figura 11) proporcionou uma maior expressão da enolase, em ambas as situações, fungo isolado e infectando células epiteliais, quando comparado as mesmas situações, porém com o fungo cultivado em meio Fava-Netto (Figura 10). Devido a sua localização na parede celular de *P. brasiliensis*, sugere-se que esta proteína desempenha funções adicionais e não somente à de sua atuação na via glicolítica. Neste local ela poderia estar desempenhando papel importante na adesão do fungo como mostrado em estudo anterior por Donofrio *et al.*, 2009 que a designou como uma adesina ligante de fibronectina.

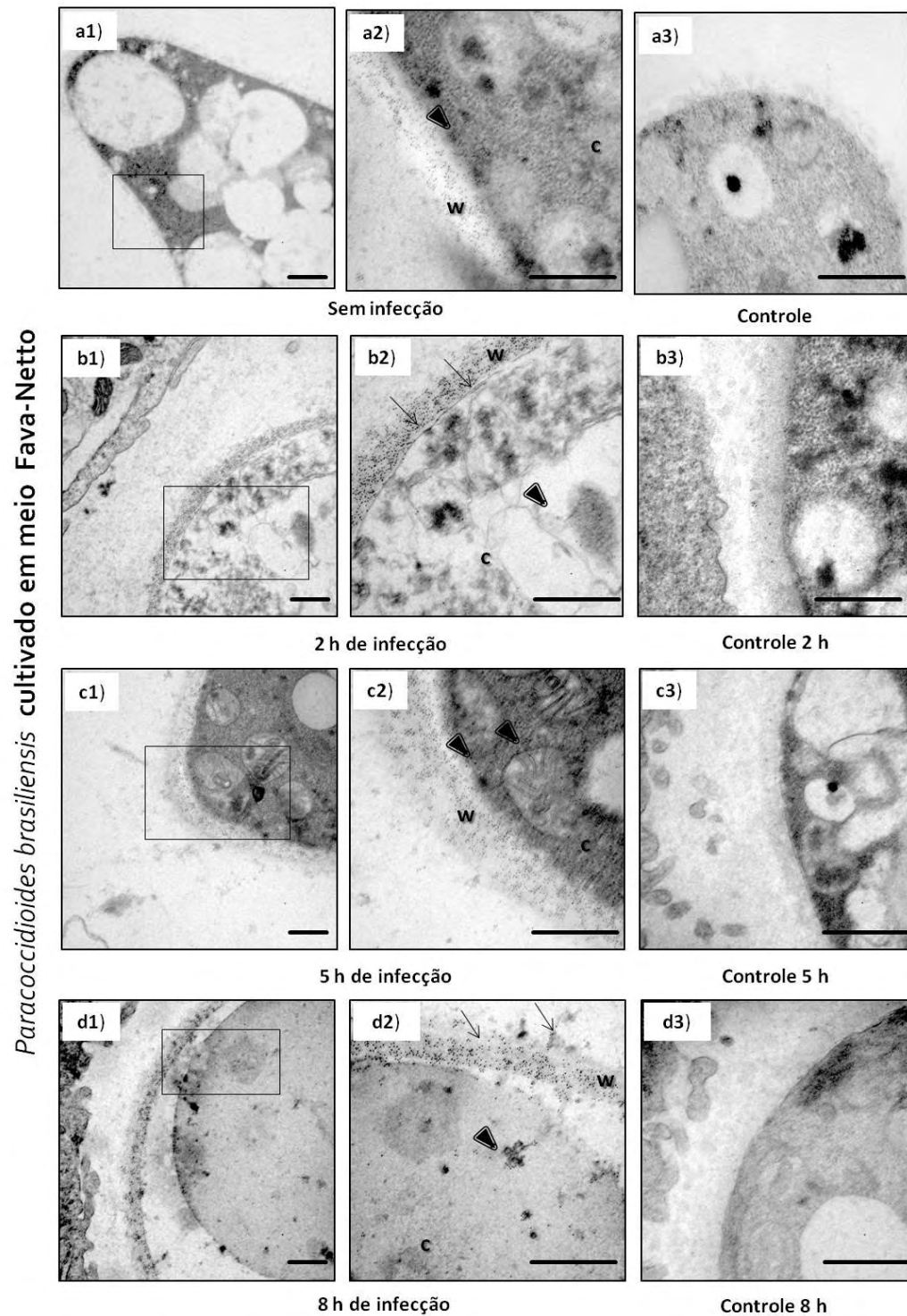


Figura 10. Imunolocalização da enolase de *P. brasiliensis* cultivado em meio Fava-Netto, durante a infecção às células epiteliais pulmonares. a1) *P. brasiliensis* sem infecção; a2) Aumento da imagem a1); a3) Controle negativo utilizando soro pré-imune de coelho; b1) Período de 2h de infecção; b2) Aumento de b1; b3) Controle 2h; c1) Período de 5h de infecção; c2) Aumento de c1; c3) Controle 5h. d1) Período de 8h de

infecção; d2) Aumento de d1; d3) Controle 8h . As setas indicam às partículas de ouro na parede celular (w) e as pontas das setas às partículas presentes no citoplasma celular (c). Barras: 0,125 μm (a1, b1, c1, d1), 0,07 μm (a2, a3, b2, b3, c2, c3, d2, d3).

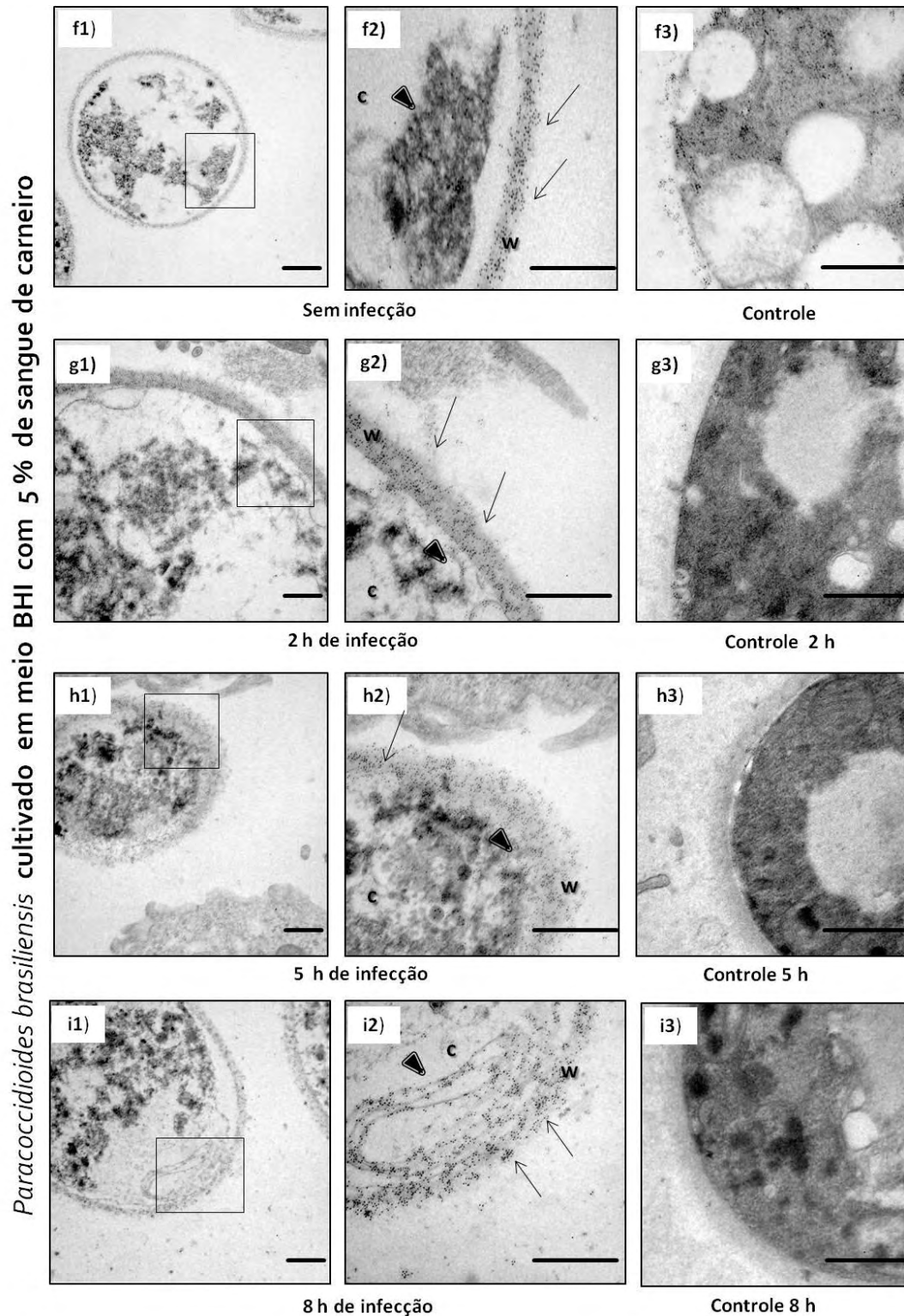


Figura 11. Imunolocalização da enolase de *P. brasiliensis* cultivado em meio BHI com sangue de carneiro durante a infecção às células epiteliais pulmonares. f1) *P. brasiliensis* sem infecção; f2) Aumento de f1; f3) Controle negativo utilizando soro pré-imune de coelho; g1) Período de 2h de infecção; g2) Aumento de g1; g3) Controle 2h;

h1) Período de 5h de infecção; h2) Aumento de h1; h3) Controle de 5h. i1) Período de 8h de infecção; i2) Aumento de i1; i3) Controle de 8h. As setas indicam às partículas de ouro na parede celular (w) e as pontas das setas às partículas presentes no citoplasma celular (c). Barras: 0,125 μm (f1, g1, h1, i1), 0,07 μm (f2, f3, g2, g3, h2, h3, i2, i3).

5.8. Análise proteômica descritiva de novas moléculas *P. brasiliensis*

A seleção dos spots decorreu separadamente de cada situação (meio Fava Netto e meio BHI acrescido de 5% de sangue de carneiro), optando pela escolha daqueles que se demonstraram mais expressos, para então verificar diferencial total da expressão de proteínas. Abaixo estão enumerados os spots escolhidos para o sequenciamento e na tabela 1 as respectivas proteínas identificadas de acordo com o meio de cultivo utilizado para o crescimento de *P. brasiliensis*. Os números que se repetem no mesmo aumento correspondem a isoformas da mesma proteína.

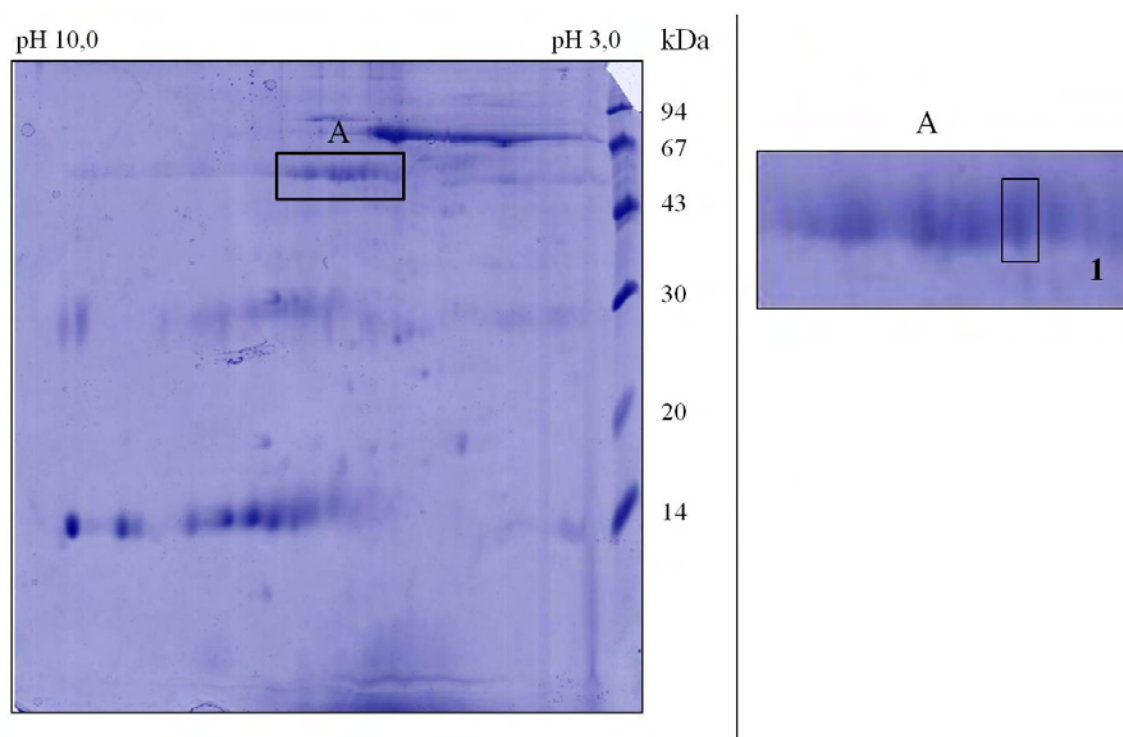


Figura 12. Análise proteômica. Eletroforese bidimensional do extrato *cell-free* de *P. brasiliensis* na fase leveduriforme cultivado em meio BHI acrescido de 5% de sangue de carneiro. Em maior aumento está o spot que foi selecionado (1) deste gel e submetido ao sequenciamento por espectrometria de massa.

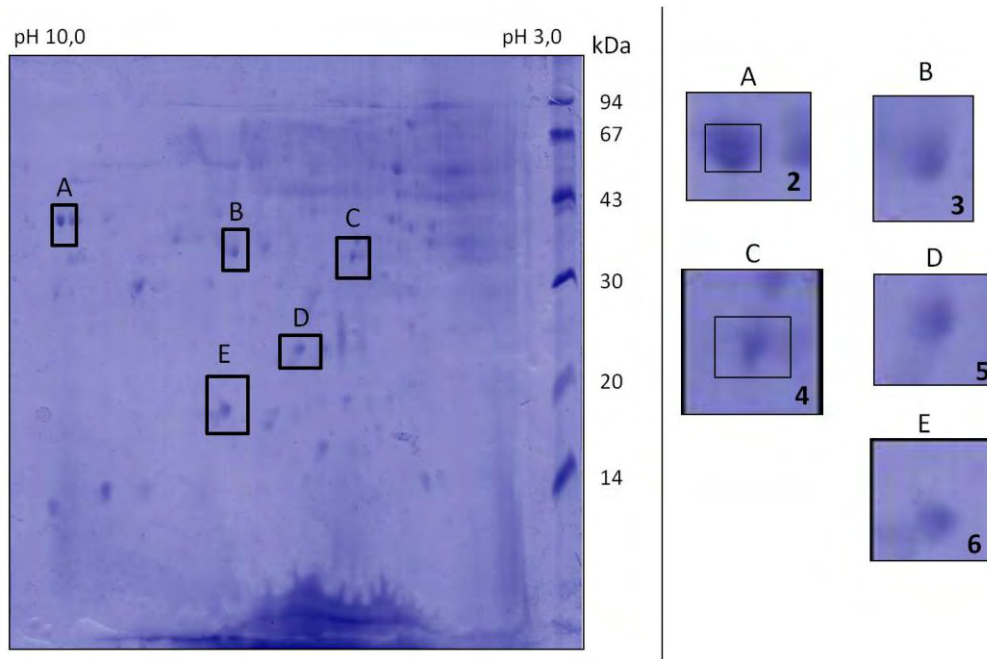


Figura 13. Análise proteômica. Eletroforese bidimensional do extrato total de *P. brasiliensis* na fase leveduriforme cultivado em meio BHI acrescido de 5% de sangue de carneiro. Em maior aumento estão os *spots* que foram selecionados (2, 3, 4, 5 e 6) deste gel e submetidos ao sequenciamento por espectrometria de massa.

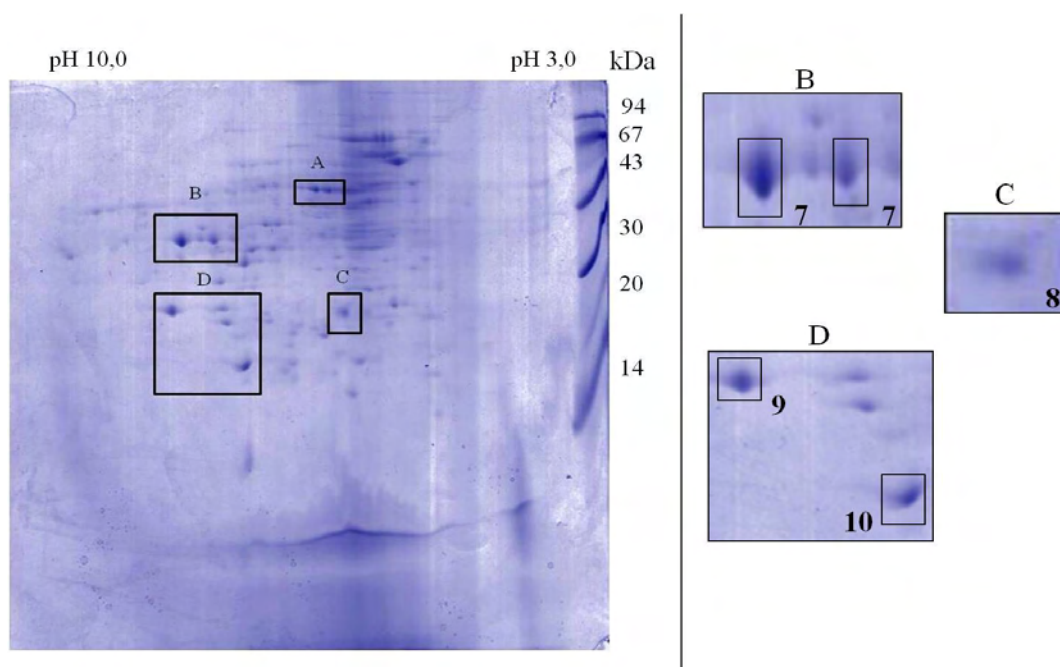


Figura 14. Análise proteômica. Eletroforese bidimensional do extrato *cell-free* de *P. brasiliensis* na fase leveduriforme cultivado em meio Fava-Netto. Em maior aumento

estão os *spots* que foram selecionados (7, 8, 9 e 10) deste gel e submetidos ao sequenciamento por espectrometria de massa.

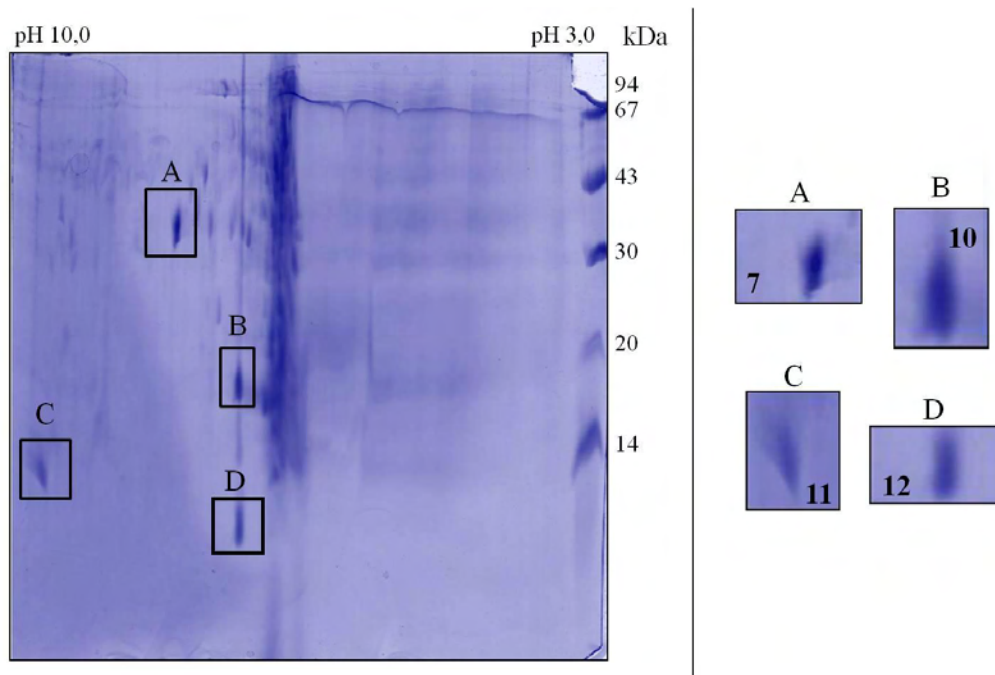


Figura 15. Análise proteômica. Eletroforese bidimensional do extrato *cell-free* de *P. brasiliensis* na fase leveduriforme cultivado em meio Fava-Netto. Em maior aumento estão os *spots* que foram selecionados (7, 10, 11 e 12) deste gel e submetidos ao sequenciamento por espectrometria de massa.

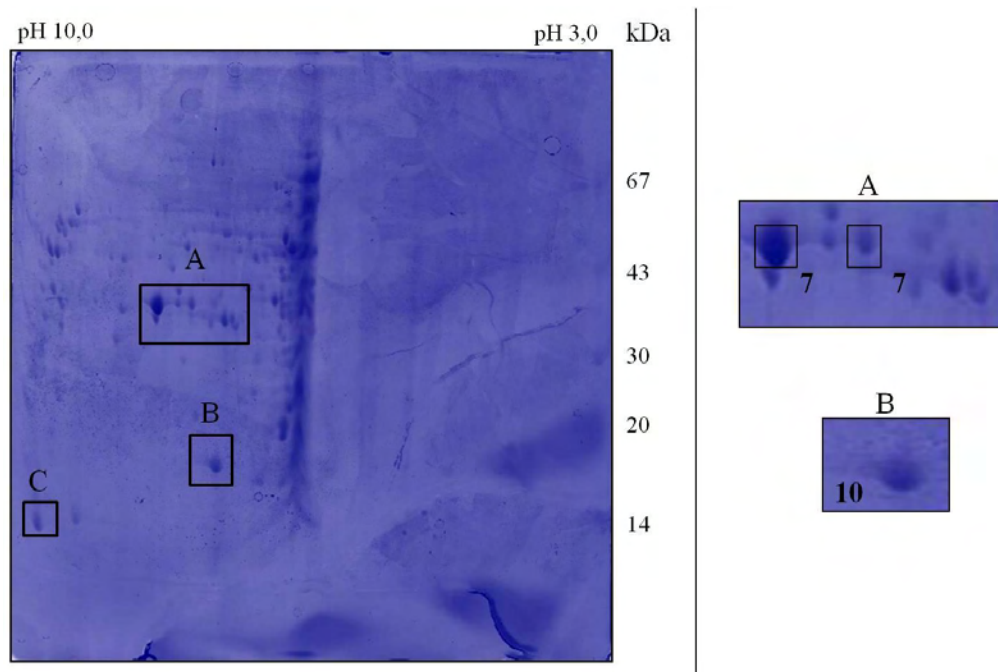


Figura 16. Análise proteômica. Eletroforese bidimensional do extrato total de *P. brasiliensis* na fase leveduriforme cultivado em meio Fava-Netto. Em maior aumento estão os *spots* que foram selecionados (7 e 10) deste gel e submetidos ao sequenciamento por espectrometria de massa.

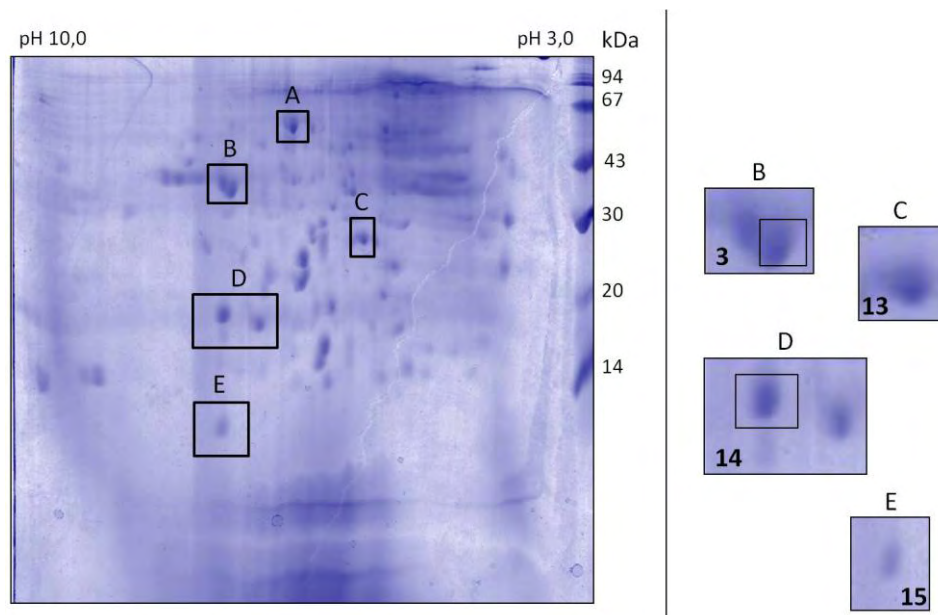


Figura 17. Análise proteômica. Eletroforese bidimensional do extrato total de *P. brasiliensis* na fase leveduriforme cultivado em meio Fava-Netto. Em maior aumento estão os *spots* que foram selecionados (3, 13, 14, 15) deste gel e submetido ao sequenciamento por espectrometria de massa.

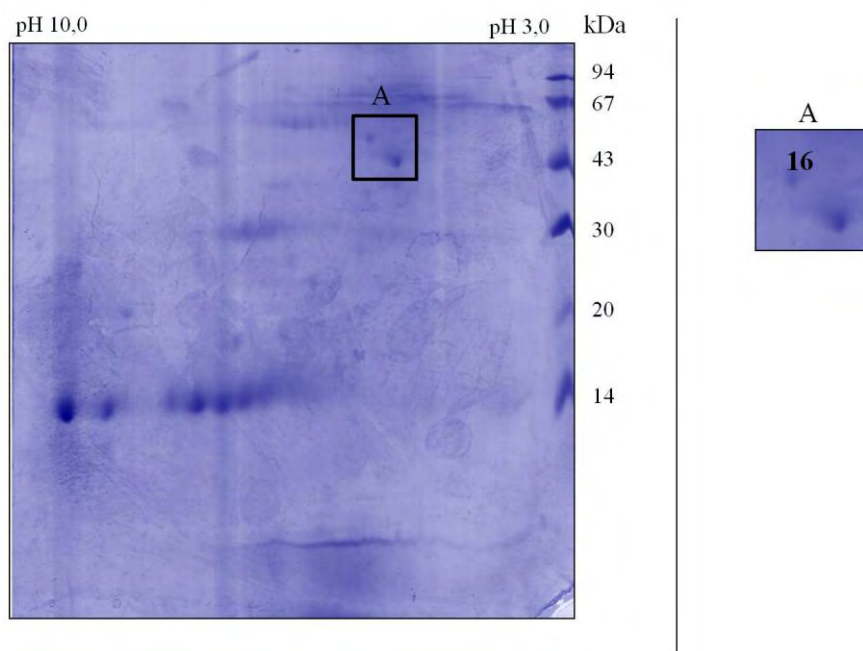


Figura 18. Análise proteômica. Eletroforese bidimensional do extrato total de *P. brasiliensis* na fase leveduriforme cultivado em meio BHI acrescido de 5% de sangue de carneiro. Em maior aumento está o *spot* que foi selecionado (16) deste gel e submetido ao sequenciamento por espectrometria de massa.

Tabela 1. Análise das proteínas sequenciadas através de espectrometria de massas (ESI-MS/MS), após a aplicação de técnica de eletroforese bidimensional obtidos de

P. brasiliensis cultivados em diferentes condições. Situação 1) Fava-Netto e 2) BHI com sangue de carneiro. Utilizando para a identificação o programa Matrix Science (MASCOT).

Spot/Proteína	E-value	Nº acesso	Situação	Processo biológico
1.Enolase [<i>Paracoccidioides brasiliensis</i> 18]	0.0	gi 226292555 EEH47975.1	2	Energia Virulência
2.Alcohol dehydrogenase [<i>Paracoccidioides brasiliensis</i> 01]	3e-135	gi 295674635 XP_002797863.	2	Energia
3.Malate dehydrogenase [<i>Paracoccidioides brasiliensis</i> 18]	2e-158	gi 226286877 EEH42390.1	2	Metabolismo ciclo glioalato Virulência
4.ATP-synthase subunit beta [<i>Paracoccidioides brasiliensis</i> 18]	0.0	gi 226287911 EEH43424.1	2	Energia
5.Spermidine synthase [<i>Paracoccidioides brasiliensis</i> 18]	7e-142	gi 226293104 EEH48524.1	2	Metabolismo aminoácidos ciclo da uréia
6.Y20 protein [<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>]	9e-105	gi 17980998 AAL50803.1	2	Sem definição
7.Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [<i>Paracoccidioides brasiliensis</i> Pb18]	6e-146	gi 295658119 XP_002789622.1	1	Energia Virulência

8-14-3-3- like protein [<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>]	3e-110	gi 38569374 AAR24348.1	1	Sinalização celular Virulência
9-Antigen 27 kDa (Fragment) [<i>Paracoccidioides brasiliensis</i> 18]	2e-120	gi 1778408 AAC49615.1	1	Sem definição
10-Nucleoside-diphosphate kinase [<i>Paracoccidioides brasiliensis</i> 18]	8e-71	gi 225683570 EEH21854.1	1	Energia
11-Heat shock protein 10 kDa [<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>]	2e-40	gi 295664909 XP002793006.1	1	Resposta a stress
12-Ubiquitin [<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>]	2e-34	gi 226287558 EEH43071.1	1	Regulação de proteínas (degradadas)
13-Peroxiredoxin [<i>Paracoccidioides brasiliensis</i> 18]	4e-95	gi 226291569 EEH46997.1	2	Antioxidante
14-Deoxyhypusine synthase [<i>Paracoccidioides brasiliensis</i> 18]	2e-123	gi 226288288 EEH43800.1	2	Síntese pós-traducional
15-Heme-oxygenase [<i>Candida albicans</i>]	5e-135	gi 68474073 ref XP_718933.1 	2	Conversão do grupo heme
16-Elongation factor Tuf [<i>Micromonospora</i> sp ATCC 39149]	4e-130	gi 57547705 AAW52544.1	2	Síntese nucleotídica

6. DISCUSSÃO

Um dos determinantes da patogênese de diversos organismos, como bactérias, fungos e protozoários, é a sua capacidade de ligação às moléculas do hospedeiro, presentes na superfície das células e tecidos. As moléculas dos patógenos responsáveis por esta função são denominadas adesinas (Soto & Hultgren, 1999). Através de

eletroforese em gel de SDS-PAGE e técnicas de proteômica, Donofrio *et al.*, (2009) identificaram em nosso laboratório determinantes antigênicos, utilizando extratos *cell-free* de *Paracoccidioides brasiliensis*, dentre esses antígenos, identificou-se no proteoma de *P. brasiliensis*, uma molécula de 54 kDa, pI 5,6 que foi parcialmente caracterizada como enolase ligante de fibronectina.

Neste trabalho demos sequência à caracterização da enolase como adesina potencialmente envolvida nos mecanismos de adesão e invasão, requeridos durante o processo infectivo de *P. brasiliensis* e a prospeção de novas proteínas que possam estar envolvidas de alguma maneira na patogênese desta micose. A proteína purificada exibiu uma massa molecular de 54 kDa, condizente com o tamanho da enolase deduzida e nativa de *P. brasiliensis* (Donofrio *et al.*, 2009). A proteína purificada isolada do gel de eletroforese bidimensional foi digerida com tripsina e submetida ao sequenciamento. Análises dos peptídeos evidenciaram 100% de homologia com a enolase de *P. brasiliensis*. Com a proteína purificada foi possível a obtenção do anticorpo policlonal que reconhece especificamente a enolase nativa do fungo.

Com o intuito de se definir a localização celular da enolase de *P. brasiliensis* durante a sua interação com pneumócitos realizamos inicialmente microscopia de imunofluorescência. Além da marcação da enolase, componentes do citoesqueleto da célula hospedeira também foram marcados para a avaliação de alterações ocorridas durante esta interação. Os resultados sugerem que a enolase encontra-se distribuída por toda a célula fúngica e desarranjos na conformação de actina, tubulina e citoqueratina foram observadas em todos os períodos de infecção avaliados, principalmente a partir de 5h de infecção. Sugere-se que estas alterações estejam associadas ao mecanismo de adesão e invasão do patógeno à célula do hospedeiro (da Silva Monteiro, 2004). Posteriormente, a localização da enolase foi confirmada através da realização de experimentos de microscopia eletrônica, *Immunogold*, mostrando que esta proteína encontra-se tanto na parede celular como no citoplasma de *P. brasiliensis*, porém é mais abundante na parede celular, principalmente na situação de infecção aos pneumócitos e também quando *P. brasiliensis* foi cultivado em meio com acréscimo de sangue. Estes dados confirmam que a hemoglobina favorece a expressão de algumas proteínas (Yang, 2003; Pendrak *et al.*, 2000).

Através de ensaios por *ELISA* foi mostrado que a enolase foi capaz de se ligar à fibronectina, laminina, colágenos tipo I e IV, fibrinogênio e plasminogênio.

Os avanços na compreensão das bases moleculares da interação da adesina de um patógeno com a matriz extracelular da célula hospedeira e o processo de migração celular têm convergido para a concepção de que muitas interações celulares são dependentes do reconhecimento específico de sequências adesivas. Certas sequências peptídicas curtas em proteínas de adesão servem como locais de reconhecimento e ligação de proteínas superficiais específicas. Esta adesina pode conter diferentes sequências capazes de serem reconhecidas por distintos componentes da matriz extracelular. A existência de diversas combinações possíveis de ligação entre diferentes sequências de adesinas e moléculas da MEC fornecem um complexo repertório de interações possíveis. Nossos dados corroboram para estas possibilidades. (Yamada, 1991; Yamada *et al.*, 2003).

Proteínas transmembranas reconhecem diferentes ligantes por sua sequência RGD, que é comum a uma grande variedade de proteínas, incluindo laminina, fibrinogênio, fibronectina e colágeno, no entanto outras sequências peptídicas podem estar envolvidas nessa ligação. Os mecanismos de aderência envolvendo a sequência RGD têm sido relacionados ao receptor tipo três do complemento (CR₃, CD₁₁ e CD₁₈) e também a aderência de células endoteliais e às proteínas da matriz extracelular como a fibronectina, colágeno e laminina (Calderone & Fonzi, 2001). De acordo com os resultados obtidos com o peptídeo RGD no ensaio de inibição competitiva da ligação da enolase às células epiteliais pulmonares, onde houve uma diminuição da ligação desta enolase a estas células, confirmando a importância desta sequência peptídica na interação de várias moléculas da matriz extracelular com a proteína de *P. brasiliensis* requisitada para a adesão às células do hospedeiro.

A enolase é uma enzima que está envolvida na desidratação reversível de 2-fosfo-D-glicerato à fosfoenolpiruvato nas vias glicolítica e gliconeogênese (Pal-Bhowmick *et al.*, 2004). Esta participa do metabolismo energético e a reação é dependente de Mg²⁺. Entretanto, numerosas propriedades não-glicolíticas foram descritas para esta proteína, como a capacidade de interagir com actina e tubulina humana (Bhowmick *et al.*, 2009). Possui alta afinidade pela fibronectina e laminina (Jolodar *et al.*, 2003), ligação esta que facilita a adesão de alguns microrganismos às células do hospedeiro, e também se liga ao plasminogênio facilitando a invasão e disseminação de alguns patógenos.

Em *Candida albicans* a associação da enolase com o plasminogênio, constitui um fator de virulência para este fungo, causando danos diretos à matriz extracelular do hospedeiro, possivelmente pela degradação das proteínas constituintes da mesma. Tal lesão permite que as hifas fúngicas atravessem o endotélio vascular mais eficientemente, acelerando a colonização e disseminação de tais microrganismos (JONG *et al.*, 2003).

A proteína enolase tem sido identificada na superfície celular de várias células eucarióticas e procarióticas (Pancholi, 2001; Jolodar *et al.*, 2003; Edwards *et al.*, 1999). A sua localização na membrana plasmática de *Saccharomyces cerevisiae* foi realizada através de uma extração diferencial de proteínas e análise por espectrometria de massas das frações celulares (López-Villar *et al.*, 2006). Foi evidenciada a sua localização em múltiplos compartimentos subcelulares, em *Plasmodium falciparum* (Bhowmick, *et al.*, 2009) e *Streptococcus suis* (Esgleas *et al.*, 2008). Análises por imunoblotting e microscopia de imunofluorescência localizaram a enolase na superfície celular de *Leishmania mexicana* (Quiñones *et al.*, 2007). O mecanismo pelo qual esta proteína é translocada para a superfície celular ainda é desconhecido. Porém em *Cryptococcus neoformans* foi encontrada nas vesículas e na parede deste fungo (Steen *et al.*, 2003; Missal *et al.*, 2006; Rodrigues *et al.*, 2008).

As enzimas glicolíticas já foram extensivamente reportadas na superfície de microrganismos, inclusive de *P. brasiliensis* (Pereira *et al.*, 2007; Barbosa *et al.*, 2006; Pardo *et al.*, 2000). Neste local, essas proteínas podem atuar como receptores de moléculas da matriz extracelular (Pereira *et al.*, 2007; Barbosa *et al.*, 2006; Jong *et al.*, 2003), antígenos (Pitarch *et al.*, 1999; Martinez *et al.*, 1998), proteínas constitutivas da parede celular (Fernandes *et al.*, 1992) ou enzimas ativas (Motshwene *et al.*, 2003; Gil-Navarro *et al.*, 1997).

Determinar as funções de uma proteína é um dos grandes desafios da era pós-genômica. A disponibilidade de todas as sequências do genoma de *P. brasiliensis* e de várias estratégias para o rastreamento de interações proteína-proteína permite sugerir funções de uma proteína a partir da identificação de seus ligantes. O estudo de interações proteína-proteína, associando as abordagens proteômica e genômica, possibilita a obtenção de dados complexos, que compõem uma rede virtual de interações dentro de uma célula.

O genoma compreende milhares de genes com inúmeras funções bioquímicas diferentes. Um dos recursos utilizados para a realização de muitos processos, economizando o máximo possível de genes são as proteínas “moonlighting”. Atualmente numerosas proteínas descritas com múltiplas funções já foram descritas (Rosin, 2005). O termo *moonlighting* se refere a uma única cadeia polipeptídica capaz de desempenhar diferentes funções, o que não inclui proteínas com a mesma função em localizações múltiplas. Quando uma proteína interage com múltiplas proteínas envolvidas em diferentes vias celulares, sugere-se que essa macromolécula é uma *moonlighting* (Jeffery, 1999).

As proteínas *moonlighting* diferenciam-se de outras proteínas multifuncionais, pois consistem de um mesmo produto gênico que desempenham duas ou mais funções distintas em diversos ambientes (Tompa, 2005), descartando fusão gênica e modificações pós-traducionais. As funções relacionadas às proteínas *moonlighting* são independentes entre elas, e podem variar de acordo com a sua localização celular, estado oligomérico, ligação à diferentes cofatores, formação de complexos e presença de múltiplos sítios de ligação (Jeffery, 1999).

A enolase é um exemplo clássico de proteína *moonlighting*, tendo em vista que já foi identificada no proteoma celular e possui função bem definida no citoplasma da célula.

P. brasiliensis apresenta um padrão de adesão alterado em função das condições de crescimento (Andreotti *et al.*, 2005), esta alteração foi confirmada por Donofrio (2009), através da adição de sangue de carneiro ao meio de cultivo que proporcionou uma maior capacidade de adesão e invasão quando comparadas ao fungo cultivado em meio livre de sangue. Estudos na literatura indicam que meios com hemoglobina induzem uma maior expressão de adesinas com características de ligação à fibronectina (Yang, *et al.*, 1998; Pendrak, *et al.*, 2000; Pendrak, *et al.*, 2004).

Como resultado da análise proteômica muitas proteínas estão sendo descritas e disponibilizadas para serem estudadas como novos alvos potenciais para pesquisas terapêuticas em buscas de novas drogas que impedirão o processo infectivo. Em vista disso, as técnicas de eletroforese bidimensional seguida do sequenciamento por espectrometria de massas foram empregadas, buscando a identificação de novas proteínas de *P. brasiliensis* que possam estar envolvidas na patogênese por ele ocasionada.

A caracterização de algumas proteínas que influenciam na interação com o hospedeiro, conferindo um fenótipo mais patogênico, por permitir ao fungo aderir com maior facilidade aos tecidos do hospedeiro, invadir novos compartimentos, evadir-se da resposta imune, bem como outras interações hospedeiro-específicas, vem colaborando para o entendimento da instalação do fungo e o desenvolvimento da PCM. A seguir, serão discutidas características e funções das proteínas selecionadas nas situações das quais foi encontrada a enolase.

- **Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase**

Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, foi a proteína encontrada com maior abundância e apresentando isoformas, trata-se de uma enzima que participa da via glicolítica e da gliconeogênese, desempenhando papel no catabolismo e anabolismo de carboidratos (Baynes & Dominiczak, 2000). GAPDH é consituente da família de proteínas, que desempenha um papel multifuncional, em diferentes localizações celulares, além do seu bem caracterizado papel na glicólise (Sirover, 1999). Além do seu papel no metabolismo de carboidratos, esta enzima já foi descrita como molécula de adesão em vários microrganismos patogênicos. Em *C. albicans* se liga às proteínas da matriz extracelular e, conseqüentemente está associada ao estabelecimento da infecção (Gozalbo *et al.*, 1998). Assim como já relatado para *C. albicans*, em *Streptococcus pyogenes* se liga a várias proteínas de mamíferos como lisozima, fibronectina, actina, miosina e plasmina (Pancholi & Fischetti, 1997). Em *P. brasiliensis* foi demonstrado que a GAPDH está associada à parede celular onde é capaz de se ligar a componentes da MEC, como laminina, fibronectina e colágeno tipo I, além de ser capaz de mediar à aderência e internalização de *P. brasiliensis* às células cultivadas *in vitro*, o que sugere o seu papel potencial no estabelecimento da doença (Barbosa *et al.*, 2007).

- **Malato sintase**

O ciclo do glioxalato possui como enzimas chaves a isocitrato liase e malato sintase, que possuem papel na patogenicidade e virulência de vários fungos, tais como *Aspergillus fumigatus* (Olivas *et al.*, 2007), *Cryptococcus neoformans* (Rude *et al.*, 2002) e *C. albicans* (Lorenz & Flink, 2001 e 2002), para a bactéria *Mycobacterium tuberculosis* (McKinney *et al.*, 2000; Muñoz-Elias *et al.*, 2005; Gould, 2006) e fungos fitopatogênicos como *Magnaporthea grisea* (Wang *et al.*, 2002). Além do seu papel no

ciclo do glioxalato, também foi atribuído a malato sintase papel na viabilidade e crescimento de fungos no interior de macrófagos consequentemente no desenvolvimento da infecção fúngica disseminada (Olivas *et al.*, 2007). Em *P. brasiliensis* esta enzima participa da via do glioxalato, assimilando duas moléculas de carbono através do ciclo do ácido tricarboxílico, e na degradação de alantoína através da via de degradação de purinas permitindo com que o fungo utilize compostos nitrogenados (Zambuzzi-Carvalho *et al.*, 2009). Possui a capacidade de se ligar a fibronectina e colágenos tipo I e IV, bem como células epiteliais pulmonares. Estes eventos aliado a sua localização superficial indicam que a malato sintase atua na interação de *P. brasiliensis* com componentes do hospedeiro (da Silva Neto *et al.*, 2009).

- **Álcool desidrogenase**

As interconversões de alcoóis, aldeídos, e cetonas são processos essenciais em procariotos e eucariotos. As oxidoredutases são enzimas responsáveis por essas reações, sendo a enzima álcool desidrogenase (ADH) pertencente ao grupo de enzimas que catalizam a oxidação reversível de etanol a acetaldeído, com conseqüente redução de NAD (Reid *et al.*, 1994). Essas reações resultam na produção principalmente de alcoóis e cofatores oxidados como NAD^+ . Esse processo ocorre durante a fermentação de bactérias e leveduras, onde a regeneração de NAD^+ é essencial para o metabolismo e crescimento desses organismos. Alguns autores demonstraram que quando o gene da ADH foi deletado do genoma de parasitos, as células não cresceram e apresentaram defeitos na divisão celular. Em *Trypanossoma cruzi* está envolvida na detoxificação do parasito (Arauzo *et al.*, 1989). Em *Candida albicans* foi demonstrado que esta proteína (ADH) contribui para a habilidade de formação de biofilmes *in vitro* e *in vivo* (Mukherjee *et al.*, 2006); assim como ocorre na formação de biofilmes para *Staphylococcus aureus*, onde há uma superexpressão desta proteína durante a formação de biofilmes (Becker *et al.*, 2003). Em *C. albicans* ADH ela foi localizada na superfície celular e atua como uma integrina capaz de se ligar a vitronectina, fibronectina (Klotz *et al.*, 2001) e plasminogênio ocasionado a formação de plasmina, que possui atividade proteolítica, alguns autores sugerem então que ADH contribue para a invasão de tecidos em fungos (Crowe *et al.*, 2003).

Em *P. brasiliensis* esta proteína ainda não foi caracterizada embora sua sequência já tenha sido depositada no banco de dados. Porém há estudos que relatam a

indução de sua expressão na fase leveduriforme, sugerindo a sua importância na produção de ATP via fermentação alcoólica (Nunes *et al.*, 2005).

- **Peroxiredoxina**

No estabelecimento da infecção por *Trypanosoma cruzi*, este patógeno precisa invadir macrófagos e sobreviver às altas condições oxidativas geradas no fagossomo. Várias enzimas antioxidantes incluindo peroxiredoxinas são capazes de realizar a detoxificação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio geradas pelos macrófagos durante a interação de *T. cruzi* com células do hospedeiro (Atwood *et al.*, 2005). Durante a fagocitose de parasitos, a NADPH oxidase associada a membrana de macrófagos é ativada resultando na geração de O_2^- , que é convertido a H_2O_2 nos fagossomos (Wolcott *et al.*, 1994). NO produzido pela indução de NO sintase se difunde rapidamente reagindo com O_2^- para a formação de peroxinitrito, molécula esta altamente oxidante e com efeitos citotóxicos contra *T. cruzi* (Alvarez *et al.*, 2004). H_2O_2 e peróxidos gerados são os substratos biológicos preferenciais para a peroxiredoxina, que reage cataliticamente decompondo esses compostos oxidativos (Wilkinson *et al.*, 2002; Finzi *et al.*, 2004). Portanto, a peroxiredoxina promove uma maior resistência à morte ocasionada por macrófagos sendo, portanto relacionada com o aumento da virulência neste patógeno (Piacenza *et al.*, 2008). Em *Leishmania chagasi* a superexpressão desta proteína também foi relacionada com a maior capacidade de sobrevivência no interior de macrófagos (Barr *et al.*, 2003). Gene que codifica para a peroxiredoxina já foi relatado no transcriptoma de *P. brasiliensis* (de Andrade, 2006), porém nenhum estudo sobre a função atribuída a este fungo foi realizada.

- **Heme-oxigenase**

A heme-oxigenase (HXM) converte o grupo heme a ferro livre, CO e biliverdina na presença de O_2 e doadores de elétrons. HMX tem sido encontrada em vários organismos incluindo bactérias, plantas e mamíferos (Colas *et al.*, 2003). Em *C. albicans* tem sido demonstrado que a HMX permite a utilização do grupo heme extracelular ou hemoglobina como fonte de ferro conferindo vantagens nutricionais para o crescimento no hospedeiro (Pendrak *et al.*, 2004; Santos *et al.*, 2003), possuindo importante papel na patogênese demonstrado através de modelos de candidíase disseminada (Ashman *et al.*, 2008). A sua deleção levou a uma redução da virulência de

C. albicans (Navarathna *et al.*, 2010). Sua expressão pode ser induzida na presença de hemoglobina (Pendrak *et al.*, 2004). Foi demonstrado que o CO gerado pela degradação do grupo heme é capaz de modular o balanço imune pela alteração da expressão de citocinas e quimiocinas sistêmicas (Navarathna *et al.*, 2007), confirmado através da deleção de HMX que resultou em alterações na resposta imune de maneira consistente com a supressão de CO na resposta inflamatória aguda (Navarathna *et al.*, 2010). Não há relatos na literatura sobre estudos com esta proteína em *P. brasiliensis*.

- **Nucleosídeo difosfato quinase**

A nucleosídeo difosfato quinase (NDK) é uma enzima ubíqua que cataliza a transferência de fosfato a partir de NTP (nucleosídeos trifosfato) para NDP (nucleosídeo difosfato) para a manutenção dos níveis de NTP nas células. Funções adicionais têm sido descritas para NDK em diferentes organismos, como regulação da expressão gênica em células de mamíferos (Postel, 2003), participação na via de recuperação de purinas em tripanossomatídeos (Landfear *et al.*, 2004) e patogênese bacteriana (Chakrabarty, 1998). *Leishmania amazonensis* secreta NDK, que utiliza ATP como principal substrato, diminuindo os níveis de ATP extracelular (Kolli *et al.*, 2008), conhecido por induzir a citólise de macrófagos através de apoptose e/ou necrose (Chang *et al.*, 2003) e suprimir a expressão de iNOS pelos mesmos (reduzindo a atividade microbicida dos macrófagos) (Hu *et al.*, 1998). As formas promastigota de *Leishmania* secreta progressivamente NDK, levando a uma acumulação substancial na fase estacionária, quando então este patógeno se torna mais infectivo, “estágio metacíclico”. Então a NDK de *Leishmania* potencialmente utiliza ATP para produzir NTPs diferentes. Estes nucleotídeos, como GTP e UTP são conhecidos por modular a expressão gênica em vias de sinalização podendo ainda alterar os macrófagos tornando-os favoráveis para a *Leishmania* estabelecer o parasitismo intracelular (Kolli *et al.*, 2008).

A habilidade de *Mycobacterium tuberculosis* em sobreviver e replicar dentro de macrófagos é um dos fatores centrais para o desenvolvimento da tuberculose (Cooper *et al.*, 2009). A sobrevivência intracelular de *M. tuberculosis* é auxiliada por uma combinação de fatores, incluindo a parede celular que protege fisicamente a bactéria da ação de enzimas bactericidas e hidrolíticas (Jozefowski *et al.*, 2008) e a secreção de enzimas que combatem as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (Lee *et al.*, 2009; Colangeli *et al.*, 2009). Apesar de todos esses fatores contribuírem para a persistência da

M. tuberculosis no interior de macrófagos, uma característica importante deste patógeno é a sua capacidade de inibir o processo de maturação do fagossomo, impedindo a fusão do fagossomo com o lisossomo, protegendo desta maneira essa bactéria do ambiente bactericida (Clemens *et al.*, 1995; Rohde *et al.*, 2007; Philips, 2008). Rab GTPases desempenham um papel central na biogênese do fagossomo. Estudos *in vitro* mostram que Rab-5-GTP e Rab-7-GTP são substratos potências para a NDK, que é secretada pela micobactéria, sugerindo que a ação de NDK sobre esses substratos poderia impedir a maturação dos fagossomos contendo a micobactéria, contribuindo para a sobrevivência intracelular deste patógeno e consequentemente o estabelecimento da infecção (Sun *et al.*, 2010).

Não há relatos na literatura sobre esta proteína associada a *P. brasiliensis*.

- **Proteína Y20 de *P. brasiliensis***

Análises da sequência de aminoácidos permitiram caracterizá-la como uma proteína pertencente a família WrbA. Enzimas dessa família impedem a redução de um elétron e transformação da quinona em semiquinona que pode reagir com o oxigênio gerando espécies reativas de oxigênio altamente destrutivas (Jensen *et al.*, 2002). Análises por *Northern* e *Western blot* de células na fase miceliar e leveduriforme de *P. brasiliensis* mostraram um aumento significativo da expressão de RNA mensageiro de PbY20 durante a diferenciação para a fase leveduriforme. Esses dados sugerem que a transcrição desta proteína durante a diferenciação celular *in vitro* é termo-regulada e provavelmente isto ocorre durante o processo de infecção de *P. brasiliensis* a humanos. A expressão diferencial da proteína Y20 na forma leveduriforme deste fungo também sugere que ela poderia estar envolvida na sobrevivência de *P. brasiliensis* nas condições térmicas do hospedeiro e/ou que possa desempenhar um papel na interação fungo-hospedeiro. Esta proteína está localizada no citoplasma, parede celular e núcleo (Daher *et al.*, 2005). Além disso, os macrófagos, neutrófilos e outros fagócitos são componentes-chave na resposta imune a antimicrobianos e são capazes de gerar intermediários reativos de oxigênio, que são moléculas tóxicas que contribuem para o controle de agentes microbianos (Bogdan *et al.*, 2000). Em *P. brasiliensis*, os macrófagos constituem um dos principais mecanismos que previnem a invasão aos tecidos do hospedeiro. De fato efeitos tóxicos e antimicrobianos de espécies reativas de oxigênio têm sido descritos para *P. brasiliensis* (Brummer *et al.*, 1988). Neste contexto,

a atividade QR (quinona redutase) está intimamente relacionada com o estresse oxidativo gerado pelo sistema imune, esta função é atribuída à proteína Y20, que pode estar envolvida na proteção de *P. brasiliensis* contra macrófagos. Entretanto a função *in vivo* desta proteína na proteção contra o estresse oxidativo ainda permanece aberto a questões, essas características apontam para um estudo aprofundado sobre o papel da proteína Y20 nos processos de detoxificação intracelular, na infecção de *P. brasiliensis* e sua sobrevivência no hospedeiro (Daher *et al.*, 2005).

• 14-3-3

As proteínas 14-3-3 são um grupo de proteínas ácidas e pequenas, altamente conservadas, que têm sido implicadas numa grande variedade de processos celulares em eucariotos. Contudo, apesar de já observado a função dessas proteínas em apoptose, transdução de sinais, regulação de ciclo celular e transcrição seu exato papel nesses processos permanece desconhecido (Fu *et al.*, 2000). Estas proteínas também participam da regulação e organização do citoesqueleto celular através da ativação de RhoGTPases (Jin *et al.*, 2004), como mediadora nas mudanças do citoesqueleto celular via integrinas, com importante papel na ativação de Rac e CDC42 (Bialkowska *et al.*, 2003).

Em *P. brasiliensis* a proteína 14-3-3 foi descrita primeiramente como uma adesina de 30 kDa com capacidade de ligação à laminina e que apresentou-se mais expressa em isolados que apresentavam alta capacidade de adesão (Andreotti, 2002; Andreotti *et al.*, 2005).

A invasão de *P. brasiliensis* afeta a estrutura do citoesqueleto das células epiteliais, interferindo em aspectos morfológicos da actina, tubulina e citoqueratina (Mendes-Giannini *et al.*, 2004). Também foi verificado que a proteína de 30 kDa de *P. brasiliensis* (proteína 14-3-3) causa modificação estrutural de microfilamentos polimerizados de actina e citoqueratina, além de induzir apoptose durante o processo de interação às células epiteliais, mas o exato mecanismo de como esse processo acontece permanece desconhecido.

• Fator de alongação Tuf

Pseudomonas aeruginosa causa infecções em humanos, incluindo pneumonia e infecções sanguíneas. Os isolados de *P. aeruginosa* diferem na resistência que apresentam a lise mediada pelo sistema complemento (Schiller *et al.*, 1986). O sistema complemento humano tem importante papel na eliminação de *P. aeruginosa* no início

da infecção pulmonar (Gross *et al.*, 1987). A deposição do complemento C3 na superfície de bactérias é importante para a indução de respostas do hospedeiro e eliminação do patógeno (Younger *et al.*, 2003). O patógeno explora múltiplas estratégias para a evasão do sistema imune, por exemplo, secretando proteases e elastases que degradam o produto da ativação do sistema complemento, C3b, depositados na parede da bactéria (Hong *et al.*, 1992; Schmidtchen *et al.*, 2003). A evasão do sistema complemento é particularmente importante durante a fase inicial da infecção, quando a bactéria está em contato com os fluidos corporais do hospedeiro. Nesta fase a via alternativa de ativação do sistema complemento é fundamental para o reconhecimento do patógeno pelo sistema imune (Mueller-Ortiz *et al.*, 2004). O fator H é o principal fluído corporal do hospedeiro que atua controlando a ativação da via alternativa e amplificação da reação ao nível de C3 (Zipfel *et al.*, 2003). Fator H promove a clivagem de C3b ligado a superfície do patógeno através da ativação de cofatores para serinas proteases plasmáticas. Quando C3b encontra-se ligado a superfície da célula hospedeira, o hospedeiro mantém a regulação da ativação desse sistema para evitar a sobrevivência do patógeno (Würzner *et al.*, 1999). Esse tipo de evasão do sistema imune já foi demonstrado em bactérias Gram-negativas como *Borrelia burgdorferi* (Kraiczy *et al.*, 2001; Kurtenbach *et al.*, 2002), *Neisseria gonorrhoeae* (Ram *et al.*, 1998), bactérias Gram-positivas, como *Streptococcus pneumoniae* (Dave *et al.*, 2001; Janulczyk *et al.*, 2000) e *S. pyogenes* (Johnsson *et al.*, 1998) e também em *Candida albicans* (Meri *et al.*, 2002). *P. aeruginosa* requer atividade proteolítica para a invasão tecidual, o qual é fornecida através de proteases endógenas ou adquiridas do hospedeiro. *P. aeruginosa* se liga ao plasminogênio convertendo-o a plasmina que causa a degradação de fibrina auxiliando na invasão (da Silva *et al.*, 2004; Ullberg *et al.*, 1990).

O fator de alongação Tuf foi identificado como uma proteína de superfície em *P. aeruginosa* capaz de se ligar a moléculas do plasma do hospedeiro como Fator H e plasminogênio, que mantém as suas funções mesmo após a ligação. Através da ligação do fator de alongação Tuf ao plasminogênio e a sua conversão a plasmina possibilitam uma maior interação de *P. aeruginosa* com a matriz extracelular e sua degradação auxiliando a invasão tecidual. Resumindo, o patógeno *P. aeruginosa* adquire proteínas plasmáticas do hospedeiro, como Fator H e plasminogênio, através da proteína Tuf e as

utiliza na interação com o tecido do hospedeiro e evasão do sistema imune (Kunert *et al.*, 2007).

Em *Mycoplasma pneumoniae* a proteína Tuf foi capaz de se ligar a fibronectina (Balasubramanian *et al.*, 2008). Não há relatos sobre estudo desta proteína em fungos visando a sua função na patogênese de micoses.

- **Antígeno de 27 kDa de *P. brasiliensis***

O gene que codifica uma proteína de 27 kDa de *P. brasiliensis* foi clonado, sequenciado e caracterizado como codificador de uma cadeia polipeptídica de 259 aminoácidos e uma massa molecular de 28,6 kDa (McEwen *et al.*, 1996). Foi produzida a proteína recombinante através da clonagem deste fragmento de DNA e expressão em *E. coli* para a utilização em um teste imunoenzimático (ELISA) indireto para o diagnóstico da PCM. Este teste proporcionou alta sensibilidade, porém houve reatividade cruzada com soro de pacientes com histoplasmose e aspergilose (Ortiz *et al.*, 1998). Esta proteína recombinante também foi utilizada em um ensaio *dot blot*, e as amostras de soros de pacientes com PCM reconheceram a proteína recombinante demonstrando uma sensibilidade de 100% e especificidade de 98% (Correa *et al.*, 2007). Aparentemente, não há nenhum estudo na literatura discutindo a participação ou o papel desta proteína nos processo de interação proteína-hospedeiro.

- **Deoxihipusina sintase**

É uma enzima dependente de NAD^+ , cataliza o primeiro passo na síntese pós-traducional de um aminoácido não convencional, a hypusine, que ocorre em uma única proteína, eIF5A, precursora do fator 5A de iniciação eucariótica (Park *et al.*, 1993), através da transferência da butilamina da espermidine poliamina para resíduos de lisina específicos de eIF5A (Park *et al.*, 1982; Abbruzzese *et al.*, 1986). Hypusine e eIF5A atuam na proliferação celular (Park *et al.*, 1993).

Em *Saccharomyces cerevisiae* a mutação do gene codificante da deoxihypusine syntase levou a perda de sua viabilidade, demonstrando que esta proteína é vital para o crescimento desta levedura (Park *et al.*, 1998). Não há nada descrito em outros fungos sobre o papel desta proteína.

- **ATP sintase**

Fazendo parte da fosforilação oxidativa, o complexo ATP sintase é o responsável pela transdução de energia do gradiente eletroquímico gerado pelo bombeamento de prótons para fora da membrana interna da mitocôndria com energia

derivada de transporte eletrônico (Saraste, 1999), sendo esta energia transformada em energia química da ligação ADP + fosfato inorgânico gerando ATP. ATP sintase é formado por dois componentes, cada um constituído por várias cadeias polipeptídicas. Uma porção esférica, hidrofílica (que interage bem com a água) chamada de fator de acoplamento 1, contém os sítios de síntese de ATP. A segunda porção F₀, que confere sensibilidade a oligomicina, fica embebida na membrana interna e é constituída por subunidades hidrofóbicas formando um canal através do qual os prótons retornam à matriz mitocondrial. Para esta enzima ser funcional, esses dois componentes (F₁ e F₀) devem estar adequadamente associados e intactos (Arselin *et al.*, 1996).

Estudos em alguns microrganismos, *Escherichia coli* (Laughlin *et al.*, 2010), *Mycobacterium tuberculosis* (Rao *et al.*, 2008) focam esta proteína como potencial alvo para a ação de antimicrobianos, uma vez que inibindo a atividade da ATP sintase, ocorre um decréscimo nos níveis de ATP, molécula esta que além de desempenhar papel no metabolismo energético, possui propriedades imunoestimulantes que podem auxiliar na montagem de uma resposta protetora contra o parasito, favorecendo a sobrevivência do patógeno.

O gene codificante para a subunidade beta da ATP sintase em *P. brasiliensis* foi clonado e expresso em bactérias para a identificação de sua sequência completa (Pereira, 2006), porém a funcionalidade desta proteína neste fungo ainda não foi descrita.

- **Proteína de choque térmico de 10 kDa**

As proteínas de choque térmico são encontradas em todos os organismos, e sua produção é aumentada durante estresse químico ou térmico. Essas proteínas são conhecidas como chaperonas moleculares: pois possuem estrutura altamente conservada e desempenham um papel importante na dobradura e transporte de proteínas sintetizadas dentro da célula (Lindquist *et al.*, 1988). Altas quantidades dessa proteína são produzidas principalmente na fase leveduriforme e durante a transição de micélio para levedura em *P. brasiliensis* (Goldman *et al.*, 2003; Marques *et al.*, 2004). As HSPs também apresentam papel imunológico, provocando respostas humoral e imune celular contra vários patógenos, incluindo fungos (Zügel & Kaufmann, 1999) e têm sido estudadas como alvo para o desenvolvimento de vacinas em *P. brasiliensis* (Bisio *et al.*, 2005). Dimorfismo e tolerância térmica são considerados fatores de virulência

importantes na adaptação do patógeno ao às condições do hospedeiro, tais como temperatura, influência hormonal e resposta imune (Kurokama *et al.*, 1998).

Essas proteínas são classificadas com base em suas massas moleculares, em famílias variando de 10 a 150 kDa. Em *P. brasiliensis* já foram descritas famílias de HSPs de 40, 60, 70, 90 e 100 (Nicola *et al.*, 2005). HSP12, uma chaperonina da membrana celular envolvida na resposta a diferentes estresses e na adesão celular, é a menor chaperonina de *P. brasiliensis* descrita (Zara *et al.*, 2002). Em *Saccharomyces cerevisiae* HSP10 é um componente essencial da mitocôndria e a sua interação com HSP 60 é fundamental para o dobramento e montagem de proteínas para serem exportadas (Höhfeld & Hartl, 1994) e é considerada essencial para o crescimento da levedura (Rospert *et al.*, 1993).

- **Espermidina sintase**

Poliaminas são componentes celulares ubíquos e essenciais (Gerner *et al.*, 2004). Sua síntese é realizada por enzimas aminopropiltransferases (Wallace *et al.*, 2003) e que possuem importância crítica no crescimento e viabilidade de células eucarióticas uma vez que estudos demonstram que a espermina é essencial (Park *et al.*, 1997; Chattopadhyay *et al.*, 2003). *Escherichia coli* pode sobreviver sem espermidina, mas a perda da espermidina sintase reduz os níveis de crescimento e tornam as células mais sensíveis aos danos oxidativos (Chattopadhyay *et al.*, 2003; Xie *et al.*, 1993). Outros microrganismos que são capazes de crescer em ambientes extremos de temperatura e pH possuem uma grande variedade e altos níveis de poliaminas, os quais são necessários para permitir a sobrevivência nestas condições (Terui *et al.*, 2005). A espermidina sintase é uma aminopropiltransferase (Ikeguchi *et al.*, 2006) e utiliza putrescina como substrato (Ohnuma *et al.*, 2005). Esta enzima é essencial para o crescimento de todos eucariotos. A deleção do gene que a codifica, em *Saccharomyces cerevisiae* (Guo *et al.*, 1999), *Leishmania donovani* (Roberts *et al.*, 2001), *Aspergillus nidulans* (Jin *et al.*, 2002) e *Cryptococcus neoformans* (Kingsbury *et al.*, 2004) resulta em cepas que requerem espermidina para o seu crescimento. Em *Cryptococcus neoformans* mutantes para o gene codificante de spermidine synthase tiveram reduzidos a produção de outros fatores de virulência, entre esses a cápsula (Bulmer *et al.*, 1967; Chang *et al.*, 2004; Fromtling *et al.*, 1982; Kwon-Chung *et al.*, 1986) e melanina (Torres-Guererro *et al.*, 1994; Williamson *et al.*, 1997), contribuindo portanto para a virulência deste fungo (Kingsbury *et al.*, 2004).

- **Ubiquitina**

Modificações pós-traducionais desempenham importantes papéis na adaptação celular de todos os organismos, bem como crescimento, divisão, diferenciação e desenvolvimento celular. Essas modificações fornecem mecanismos essenciais através dos quais funções, atividades e estabilidade de proteínas pré-existentes podem ser rapidamente e precisamente moduladas por meio do controle dinâmico de processos celulares. Modificações por proteínas regulatórias incluem fosforilação, sumoilação, acetilação e ubiquitinação (Leach *et al.*, 2011). Ubiquitina é uma proteína altamente conservada, formada por uma cadeia polipeptídica de aproximadamente 76 aminoácidos encontrada em todas as células eucarióticas (Ozkaynak *et al.*, 1987). Dentro da célula, ela pode estar livre ou ligada covalentemente a proteínas do núcleo e citoplasma (Finley & Chau, 1991). A ubiquitinação é importante para uma variedade de processos biológicos, por exemplo, direcionamento de proteínas específicas para a degradação citoplasmática (Ciechanover, 1998; Ciechanover *et al.*, 2000) incluindo proteínas desnaturadas por estresse ambiental (Finley *et al.*, 1987; Amerik *et al.*, 2005). Há evidências de que a ubiquitinação contribua para a regulação de alguns fatores de virulência em *Candida albicans* (Leng *et al.*, 2000; Roig & Gozalbo, 2003). A ubiquitinação em *C. albicans* parece contribuir para a progressão de seu ciclo celular e atua na morfogênese, a depleção de ubiquitina inibe a divisão nuclear de células filamentosas. Também está envolvida na adaptação deste fungo a estresse de temperatura. Portanto a ubiquitinação influencia o crescimento e a morfogênese de *C. albicans*, que é fundamentalmente importante para a sua virulência (Lo *et al.*, 1997; Gow *et al.*, 2002; Saville *et al.*, 2003; Leach *et al.*, 2011), além da adaptação ao estresse que é crítico para a sua patogenicidade (Alonso-Monge *et al.*, 1999; Hwang *et al.*, 2002; Smith *et al.*, 2004; Hromatka *et al.*, 2005; Leach *et al.*, 2011). Não há estudos sobre a função desta proteína em *P. brasiliensis*.

As proteínas encontradas na análise proteômica estão envolvidas na patogênese de outras doenças, seja no auxílio ao escape do sistema imune, favorecendo o crescimento ou se ligando aos componentes da matriz extracelular e ainda não há relatos sobre as suas funções em *P. brasiliensis*, sendo, portanto alvos interessantes para o estudo.

A complexidade biológica de *P. brasiliensis* inclui eventos moleculares sua sobrevivência ao interagir com o hospedeiro humano. A proteína enolase, inicialmente

relacionada apenas ao metabolismo energético tanto em procariotos como eucariotos, tem sido descrita como uma molécula multifuncional também envolvida nos mecanismos relacionados com a adesão e invasão de inúmeros patógenos.

O estudo dos eventos que ocorrem durante a interação de *P. brasiliensis* com as células ou matriz extracelular do hospedeiro é interessante uma vez que bloqueando esta interação estaremos inibindo a habilidade do patógeno em colonizar e estabelecer a infecção no hospedeiro.

7. CONCLUSÕES

- A fibronectina foi reconhecida fortemente pela enolase de 54 kDa, caracterizando-se como principal ligante, seguida de laminina, colágeno I, fibrinogênio, colágeno IV e plasminogênio.

- Aparentemente a enolase de 54 kDa contribui para o desarranjo do citoesqueleto, principalmente a partir de 5h de infecção, podendo ser observadas alterações de todos os componentes avaliados (actina, tubulina e citoqueratina), porém por esta técnica não foi possível localizar e quantificar a enolase nas interações.
- A ligação da enolase às células epiteliais de pulmão foi reduzida em 10% pela adição do peptídeo RGD, confirmando a importância da sequência Arginina-Glicina-Ácido aspártico, o qual é encontrada em várias proteínas da MEC. Possivelmente esta sequência peptídica participa da ligação da enolase à alguns componentes da MEC tais como fibronectina, fibrinogênio, laminina e colágeno.
- Foi possível verificar a localização em nível ultra estrutural da enolase de 54 kDa de *P. brasiliensis*, a qual foi encontrada distribuída em menor quantidade no citoplasma do fungo, porém em uma quantidade elevada e homogênea principalmente em sua parede celular. Assim esta proteína provavelmente desempenha funções adicionais àquela relacionada na via glicolítica, sugerindo, pela sua posição no fungo, estar desempenhando papel também na adesão durante a interação com a célula hospedeira.
- A análise proteômica do isolado 18 de *P. brasiliensis* dos *spots* mais expressos em cada situação de cultivo (meio Fava-Netto e BHI com 5% de sangue de carneiro) identificou proteínas associadas à virulência.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBRUZZESE, A.; PARK, M.H.; FOLK, J.E. Deoxyhypusine hydroxylase from rat testis. Partial purification and characterization. **J Biol Chem**, v. 261(7), p. 3085-3089, 1968

ALBORNOZ, M.B. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from rural soil in Venezuela. **Sabouraudia**, v. 9(3), p. 248-253, 1971.

ALONSO-MONGE, R.; NAVARRO-GARCIA, F.; MOLERO, G.; DIEZ-OREJAS, R.; GUSTIN, M.; PLA, J. Role of the mitogen-activated protein kinase Hog1p in morphogenesis and virulence of *Candida albicans*. **J Bacteriol**, v. 181, p.3058–3068, 1999.

ALVAREZ, M.N.; PIACENZA, L.; IRIGOÍN, F.; PELUFFO, G.; RADI, R. Macrophage-derived peroxynitrite diffusion and toxicity to *Trypanosoma cruzi*. **Arch Biochem Biophys**, v. 432(2), p. 222-232, 2004.

AMEVRIK, A.Y.; LI, S.J.; HOCHSTRASSER, M. Analysis of the deubiquitinating enzymes of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Biol Chem**, v. 381, p.981–992, 2005.

ANDERSON, L.; SEILHAMER, J. A comparison of selected mRNA and protein abundances in human liver. **Electrophoresis**, v. 18, p. 533-537, 1997.

ANDRE, D.C.; LOPES, J.D.; FRANCO, M.F.; VAZ, C.A.C.; CALICH, V.L.G. Binding of laminin to *Paracoccidioides brasiliensis* induces a less severe pulmonary paracoccidioidomycosis caused by virulent and low-virulence isolates. **Micr. Infect**, v. 6, p. 549-558, 2004.

ANDREOTTI, P.F. “**Isolamento e caracterização de adesina envolvida na interação de *Paracoccidioides brasiliensis* com células epiteliais**” 2002. Dissertação (Mestrado em Análises Clínicas) Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP - Araraquara, 2002.

ANDREOTTI, P.F.; MONTEIRO DA SILVA, J.L.; BAILÃO, A.M.; SOARES, C.M.; BERNARD, G.; SOARES, C.P.; MENDES-GIANINNI, M.J. Isolation and partial characterization of a 30 kDa adhesin from *Paracoccidioides brasiliensis*. **Microbes Infect**, v. 5, p. 875-881, 2005.

ARAUZO, S.; CAZZULO, J.J. The NADP-linked aldehyde reductase from *Trypanosoma cruzi*: subcellular localization and some properties. **FEMS Microbiol Lett**, v. 49(2-3), p. 283-286, 1989.

ARISTIZÁBAL, B.H.; CLEMONS, K.V.; STEVENS, D.A.; RESTREPO, A. Morphological transition of *Paracoccidioides brasiliensis* conidia to yeast cells: in vivo inhibition in females. **Infect Immun**, v. 66(11), p. 5587-5591, 1998.

ARISTIZÁBAL, B.H.; CLEMONS, K.V.; COCK, A.M.; RESTREPO, A.; STEVENS, D.A. Experimental *Paracoccidioides brasiliensis* infection in mice: influence of the hormonal status of the host on tissue responses. **Med Mycol**, v. 40(2), p. 169-178, 2002.

ARSELIN, G.; VAILLIER, J.; GRAVES, P.V.; VELOURS, J. ATP synthase of yeast mitochondria. Isolation of the subunit h and disruption of the ATP14 gene. **J Biol Chem**, v. 271(34), p. 20284-20290, 1996.

ASHMAN, R.B. Protective and pathologic immune responses against *Candida albicans* infection. **Front Biosci**, v. 13, p. 3334-3351, 2008.

ATWOOD, J.A.; WEATHERLY, D.B.; MINNING, T.A.; BUNDY, B.; CAVOLA, C.; OPPERDOES, F.R.; ORLANDO, R.; TARLETON, R.L. The *Trypanosoma cruzi* proteome. **Science**, v. 309(5733), p. 473-476, 2005.

ATZINGEN, M.V.; BARBOSA, A.S.; DE BRITO, T.; VASCONCELLOS, S.A.; DE MORAIS, Z.M.; LIMA, D.M.; ABREU, P.A.; NASCIMENTO, A.L. Lsa21, a novel leptospiral protein binding adhesive matrix molecules and present during human infection. **BMC Microbiol**, v. 8, p. 70, 2008.

BAGAGLI, E.; SANO, A.; COELHO, K.I.; ALQUATI, S.; MIYAJI, M.; DE CAMARGO, Z.P.; GOMES, G.M.; FRANCO, M.; MONTENEGRO, M.R. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillos (*Dasypus noveminctus*) captured in an endemic area of paracoccidioidomycosis. **Am J Trop Med Hyg**, v. 58(4), p. 505-512, 1998.

BAGAGLI, E.; BOSCO, S.M.; THEODORO, R.C.; FRANCO, M. Phylogenetic and evolutionary aspects of *Paracoccidioides brasiliensis* reveal a long coexistence with animal hosts that explain several biological features of the pathogen. **Infect Genet Evol**, v. 6(5), p. 344-351, 2006.

BALASUBRAMANIAN, S.; KANNAN, T.R.; BASEMAN, J.B. The surface-exposed carboxyl region of *Mycoplasma pneumoniae* elongation factor Tu interacts with fibronectin. **Infect Immun**, v. 76(7), p. 3116-3123, 2008.

BARBOSA, M.S.; BAO, S.N.; ANDREOTTI, P.F.; DE FARIA, F.P.; FELIPE, M.S.; DOS SANTOS FEITOSA, L.; MENDES-GIANNINI, M.J.; SOARES, C.M.

Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Paracoccidioides brasiliensis* is a cell surface protein involved in fungal adhesion to extracellular matrix proteins and interaction with cells. **Infect. Immun.**, v. 74, p. 382-389, 2006.

BARR, S.D.; GEDAMU, L. Role of peroxidoxins in *Leishmania chagasi* survival. Evidence of an enzymatic defense against nitrosative stress. **J Biol Chem**, v. 278(12), p. 10816-10823, 2003.

BAYNES, J.; DOMINICZAK, M.H., 2000. “Bioquímica médica” – 2ª Edição., Editora Manole LTDA.

BECKER, P.; HUFNAGLE, W.; PETERS, G.; HERRMANN, M. Detection of differential gene expression in biofilm-forming versus planktonic populations of *Staphylococcus aureus* using micro-representational-difference analysis. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 67, p. 2958–2965, 2001.

BECK, K.; HUNTER, I. Structure and function of laminin: anatomy of a multidomain glycoprotein. **Engel J. FASEB J.**, v. 4(2), p. 148-160, 1990.

BERNAL, D.; DE LA RUBIA, J.E.; CARRASCO-ABAD, A.M.; TOLEDO, R.; MASCOMA, S.; MARCILLA, A. Identification of enolase as a plasminogen-binding protein in excretory-secretory products of *Fasciola hepatica*. **FEBS Lett**, v. 563, p. 203-206, 2004.

BHOWMICK, I.P.; KUMAR, N.; SHARMA, S.; COPPENS, I.; JARORI, G.K. *Plasmodium falciparum* enolase: stage-specific expression and sub-cellular localization. **Malar J**, v. 8, p. 179, 2009.

BIALKOWSKA, K.; ZAFFRA, Y.; MEYER, S.C.; FOX, J.E. 14-3-3 zeta mediates integrin-induced activation of Cdc42 and Rac. Platelet glycoprotein Ib-IX regulates integrin-induced signaling by sequestering 14-3-3 zeta. **J. Biol. Chem**, v. 278, p. 33342-33350, 2003.

BISIO, L.C.; SILVA, S.P.; PEREIRA, I.S.; XAVIER, M.A.; VENÂNCIO, E.J.; PUCCIA, R.; SOARES, C.M.; FELIPE, M.S. A new *Paracoccidioides brasiliensis* 70-kDa heat shock protein reacts with sera from paracoccidioidomycosis patients. **Med Mycol**, v. 43(6), p. 495-503, 2005.

- BOGDAN, C.; RÖLLINGHOV, M.; DIEFENBACH, A. Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. **Curr. Opin. Immunol**, v. 12, p. 64–76, 2000.
- BRUMMER, E.; HANSON, L.H.; RESTREPO, A.; STEVENS, D.A. In vivo and in vitro activation of pulmonary macrophages by interferon-gamma for enhanced killing of *Paracoccidioides brasiliensis* or *Blastomyces dermatitidis*. **J. Immunol**, v. 140, p. 2786–2789, 1988.
- BRUMMER, E.; CASTAÑEDA, E.; RESTREPO, A. Paracoccidioidomycosis: An Update. **Clin. Microbiol**, v. 6, p. 87-117, 1993.
- BUCLEY, C.D.; RAINGER, G.E.; BRADFIELD, P.F.; NASH, G.B.; SIMMONS, D.L. CELL adhesion: more than just glue. **Mol Membr Biol**, v. 4, p. 167-176, 1998.
- BULMER, G.S.; SANS, M.D.; GUNN, C.M. *Cryptococcus neoformans*. I. Nonencapsulated mutants. **J Bacteriol**, v. 94(5), p. 1475-1479, 1967.
- CALDERONE, R.A.; FONZI, W.A. Virulence factors of *Candida albicans*. **Trends Microbiol**, v. 9, p. 327-335, 2001.
- CALICH, V.L.; SINGER-VERMES, L.M.; SIQUEIRA, A.M.; BURGER, E. Susceptibility and resistance of inbred mice to *Paracoccidioides brasiliensis*. **Br J Exp Pathol**, v. 66(5), p. 585-594, 1985.
- CALICH, V.L.; BURGER, E.; KASHINO, S.S.; FAZIOLI, R.A.; SINGER-VERMES, L.M. Resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* in mice is controlled by a single dominant autosomal gene. **Infect Immun**, v. 55(8), p. 1919-1923, 1987.
- CASOTTO, M. Characterization of the cellular antigens of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast form. **J. Clin. Microbiol**, v. 28, p. 1188-1193, 1990.
- CASTRO, N.S. “**Proteínas de superfície de *Paracoccidioides brasiliensis***” 2008. Dissertação (Doutorado) – Universidade de Brasília – UnB , 2008.
- CHAKRABARTY, A.M. Nucleoside diphosphate kinase: role in bacterial growth, virulence, cell signaling and polysaccharide synthesis. **Mol Microbiol**, v. 28, p. 875–882, 1998.

CHANG, Y.C.; KWON-CHUNG, K.J. Complementation of a capsule-deficient mutation of *Cryptococcus neoformans* restores its virulence. **Mol Cell Biol**, v. 14(7), p. 4912-4919, 1994.

CHANG, K.P.; REED, S.G.; MCGWIRE, B.S.; SOONG, L. *Leishmania* model for microbial virulence: the relevance of parasite multiplication and pathoantigenicity. **Acta Tropica**, v. 85, p. 375–390, 2003.

CHANG, G.C.; LIU, K.J.; HSIEH, C.L.; HU, T.S.; CHAROENFUPRASERT, S.; LIU, H.K.; LUH, K.T.; WENWU, C.; TING, C.C.; CHEN, C.Y.; CHEN, K.C.; YANG, T.Y.; CHOU, T.Y.; HUAWANG, W.; WHANG-PENG, J.; SHIH, N.Y. Identification of alfa-enolase as an autoantigen in lung cancer : its overexpression is associated with clinical outcomes. **Clin. Cancer. Res.**, v. 12, p. 5746-5754, 2006.

CHATTOPADHYAY, M.K.; TABOR, C.W.; TABOR, H. Spermidine but not spermine is essential for hypusine biosynthesis and growth in *Saccharomyces cerevisiae*: spermine is converted to spermidine in vivo by the FMS1-amine oxidase. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 100(24), p.13869-13874, 2003.

CHENG, S.; CLANCY, C.J.; CHECKLEY, M.A.; ZHANH, Z.; WOZNIAK, K.L.; SESHAN, K.R.; JIA, H.Y.; FIDEL, P.J.R.; COLE, G.; NGUYEN, M.H. The role of *Candida albicans* NOT5 in virulence depends upon diverse host factors in vivo. **Infect Immun**, v. 73, p. 7190-7197, 2005.

CHHATWAL, G.S.; LÄMMLER, C.; BLOBEL, H. Interactions of plasma proteins with group A, B, C and G streptococci. **Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg A**, v. 259(2), p. 219-227, 1985.

CHOPRA, A.K.; SHA, J.; TATIANA, E.; EROVA, T. E.; REBECCA, A.; ALYEA, R. A.; WANG, S.; OLANO, J. P.; PANCHOLI, V. Surface-Expressed Enolase Contributes to the Pathogenesis of Clinical Isolate SSU of *Aeromonas hydrophila*. **JOURNAL OF BACTERIOLOGY.**, v. 191, p. 3095–3107, 2009.

CIECHANOVER, A. The ubiquitin-proteasome pathway on protein death and cell life. **EMBO J**, v. 17, p. 7151–7160, 1998.

CIECHANOVER, A.; ORIAN, A.; SCHWARTZ, A.L. Ubiquitin-mediated proteolysis: biological regulation via destruction. **Bioessays**, v. 22, p. 442–451, 2000.

CIECHANOVER, A.; ORIAN, A.; SCHWARTZ, A.L. The ubiquitin-mediated proteolytic pathway: mode of action and clinical implications. **J Cell Biochem Suppl**, v. 34, p. 40–51, 2000.

CLEMENS, D.L.; HORWITZ, M.A. Characterization of the *Mycobacterium tuberculosis* phagosome and evidence that phagosomal maturation is inhibited. **J Exp Med**, v. 181(1), p. 257–270, 1995.

COLANGELI, R.; HAQ, A.; ARCUS, V.L.; SUMMERS, E.; MAGLIOZZO, R.S. The multifunctional histone-like protein Lsr2 protects mycobacteria against reactive oxygen intermediates. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 106(11), p. 4414–4418, 2009.

COLAS, C.; ORTIZ DE MONTELLANO, P.R. Autocatalytic radical reactions in physiological prosthetic heme modification. **Chem Rev**, v. 103(6), p. 2305–2332, 2003.

COLEMAN, D.C. Comparison of the epidemiology, drug resistance mechanisms, and virulence of *Candida dubliniensis* and *Candida albicans*. **FEMS Yeast Res**, v. 4, p. 369–376, 2004.

COLTRI, K.C.; CASABONA-FORTUNATO, A.S.; GENNARI-CARDOS, M.L.; PINZAN, C.F.; RUAS, L.P.; MARIANO, V.S.; MARTINE, R.; ROSA, J.C.; PANUNTO-CASTELO, A.; ROQUE-BARREIRA, M.C. Paracoccin, a GlcNAc-binding lectin from *Paracoccidioides brasiliensis*, binds to laminin and induces TNF- α production by macrophages. **Microbes Infect**, v. 3, p. 704–713, 2006.

COOPER, A.M. Cell-mediated immune responses in tuberculosis. **Annu Rev Immunol**, v. 27, p. 393–422, 2009.

CORREA, M.M.; BEDOYA, A.M.; GUERRERO, M.P.; MÉNDEZ, J.; RESTREPO, A.; MCEWEN, J.G. Diagnosis of paracoccidioidomycosis by a dot blot assay using a recombinant *Paracoccidioides brasiliensis* p27 protein. **Mycoses**, v. 50(1), p. 41–47, 2007.

COSTA, A.; GOMÉZ, F.; PEREIRA, M.; FELIPE, M.; JESUÍNO, R.; DEEPE, G.; SOARES, C.M.A. Characterization of a gene which encodes a mannosyltransferase homolog of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Microb. Infect**, v. 4, p. 1027, 2002.

Coutinho, Z.F.; Silva, D.; Lazéra, M.S.; Petri, V.; Oliveira, R.M.; Sabroza, P.C.; Wanke, B. Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980-1995). **Cad Saúde Pública**, v. 18 (5), p. 1441-1454, 2002.

CROWE, J.D.; SIEVWRIGHT, I.K.; AULD, G.C.; MOORE, N.R.; GOW, N.A.; BOOTH, N.A. *Candida albicans* binds human plasminogen: identification of eight plasminogen-binding proteins. **Mol Microbiol**, v. 47(6), p. 1637-1651, 2003.

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

DABO, S.M.; CONFER, A.W.; SALIKI, J.T.; ANDERSON, B.E. Binding of *Bartonella henselae* to extracellular molecules: identification of potential adhesins. **Microb Pathog**, v. 41(1), p. 10-20, 2006.

DA SILVA, C. M.; DE ABREU VIDIPO, L.; NISHI, R.; CRISTINA PLOTKOWSKI, M. Binding of plasminogen to *Pseudomonas aeruginosa* results in formation of surface-associated plasmin and enhanced bacterial invasiveness. **Microb. Pathog**, v. 36, p. 59–66, 2004.

DA SILVA MONTEIRO, J.L. “Adesão e invasão de *Paracoccidioides brasiliensis* em cultura de células: envolvimento do citoesqueleto, evento de sinalização e ocorrência de apoptose” 2004. Dissertação de Doutorado (Análises Clínicas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP-Araraquara, 2004.

DA SILVA NETO, B.R.; DE FÁTIMA DA SILVA, J.; MENDES-GIANNINI, M.J.; LENZI, H.L.; DE ALMEIDA SOARES, C.M.; PEREIRA, M. The malate synthase of *Paracoccidioides brasiliensis* is a linked surface protein that behaves as an anchorless adhesin. **BMC Microbiol**, v. 9, p. 272, 2009.

DAHER, B.S.; VENANCIO, E.J.; DE FREITAS, S.M.; BÁO, S.N.; VIANNEY, P.V.; ANDRADE, R.V.; DANTAS, A.S.; SOARES, C.M.; SILVA-PEREIRA, I.; FELIPE, M.S. The highly expressed yeast gene pby20 from *Paracoccidioides brasiliensis* encodes a flavodoxin-like protein. **Fungal Genet Biol.**, v. 42(5), p. 434-443, 2005.

DAVE, S.; A. BROOKS-WALTER, A.; PANGBURN, M.K.; MCDANIEL, L.S. PspC, a pneumococcal surface protein, binds human factor H. **Infect. Immun.**, v. 69, p. 3435–3447, 2001.

DE ANDRADE, R.V. “**Análise do transcriptoma e da expressão diferencial de genes de micélio e levedura de *Paracoccidioides brasiliensis***” 2006. Dissertação (Doutorado) – Universidade de Brasília – UnB , 2006.

DECKER, B.L.; WICKNER, W.T. Enolase activates homotypic vacuole fusion and protein transport to the vacuole in yeast. **J. Biol. Chem.**, v. 281, p. 14523–14528, 2006.

DE LA TORRE-ESCUADERO, E.; MANZANO-ROMÁN, R.; PÉREZ-SÁNCHEZ, R.; SILES-LUCAS, M.; OLEAGA, A. Cloning and characterization of a plasminogen-binding surface-associated enolase from *Shistosoma bovis*. **Vet Parasitol.**, v. 173, p. 76-84, 2010.

DIEZ, S.; GOMEZ, B.L.; RESTREPO, A.; HAY, R.J.; HAMILTON, A.J. *Paracoccidioides brasiliensis* 87-kilodalton antigen, a heat shock protein useful in diagnosis: characterization, purification, and detection in biopsy material via immunohistochemistry. **J Clin Microbiol.**, v. 2, p. 359-365, 2002.

DONOFRIO, F.C.; CALIL, A.C.; MIRANDA, E.T.; ALMEIDA, A.M.; BENARD, G.; SOARES, C.P.; VELOSO, S.N.; SOARES, C.M.; MENDES GIANNINI, M.J. Enolase from *Paracoccidioides brasiliensis*: isolation and identification as a fibronectin-binding protein. **J Med Microbiol.**, v. 58(Pt 6), p. 706-713, 2009.

DOOLITTLE, R.F. Fibrinogen and fibrin. **Sci Am.**, v. 245(6), p. 126-135, 1981.

EBERHARD, T.; KRONVALL, G.; ULLBERG, M. Surface bound plasmin promotes migration of *Streptococcus pneumoniae* through reconstituted basement membranes. **Microb Pathog.**, v. 26, p. 175-181, 1999.

EDWARDS, S.R.; BRALEY, R.; CHAYN, W.L. Enolase is present in the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiology Letter**, v. 177, p. 211–216, 1999.

ESGLEAS, M.; LI, Y.; HANCOCK, M.A.; HAREL, J.; DUBREUIL, J.D.; GOTTSCHALK, M. Isolation and characterization of alfa-enolase, a novel fibronectin-binding protein from *Streptococcus suis*. **Microbiology**, v. 154, p. 2668-2679, 2008.

ESPERSEN, F.; CLEMMENSEN, I.; FRIMODT-MØLLER, N.; JENSEN, K. Effect of human IgG and fibrinogen on *Staphylococcus aureus* intraperitoneal infection in mice. **Acta Pathol Microbiol Immunol Scand B**, v. 92(6), p. 311-317, 1984.

FELIPE, M.S.S.; ANDRADE, R.V.; ARRAES, F.B.; NICOLA, A.M.; MARANHÃO, A.Q.; TORRES, F.A.; SILVA-PEREIRA, I.; POCAS-FONSECA, M.J.; CAMPOS, E.G.; MORAES, L.M.; ANDRADE, P.A.; TAVARES, A.H.; SILVA, S.S.; KYAW, C.M.; SOUZA, D.P.; PEREIRA, M.; JESUINO, R.S.; ANDRADE, E.V.; PARENTE, J.A.; OLIVEIRA, G.S.; BARBOSA, M.S.; MARTINS, N.F.; FACHIN, A.L.; CARDOSO, R.S.; PASSOS, G.A.; ALMEIDA, N.F.; WALTER, M.E.; SOARES, C.M.A.; CARVALHO, M.J.; BRIGIDO, M.M. Transcriptome characterization of the dimorphic and pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* by EST analysis. **Yeasts**, v. 20, p. 263-271, 2003.

FELIPE, M.S.S.; ANDRADE, R.V.; ARRAES, F.B.; NICOLA, A.M.; MARANHÃO, A.Q.; TORRES, F.A.; SILVA-PEREIRA, I.; POCAS-FONSECA, M. J.; CAMPOS, E.G.; MORAES, L.M.; ANDRADE, P.A.; TAVARES, A.H.; SILVA, S.S.; KYAW, C.M.; SOUZA, D.P.; PEREIRA, M.; JESUINO, R.S.; ANDRADE, E.V.; PARENTE, J.A.; OLIVEIRA, G.S.; BARBOSA, M.S.; MARTINS, N.F.; FACHIN, A.L.; CARDOSO, R.S.; PASSOS, G.A.; ALMEIDA, N.F.; WALTER, M.E.; SOARES, C.M.A.; CARVALHO, M.J.; BRIGIDO, M.M. Pbgene Network. Transcriptional Profiles Of The Human Pathogenic Fungus *Paracoccidioides brasiliensis* In Mycelium And Yeast Cells. **J Biol Chem**, v. 280, p. 24706-24714, 2005.

FENG, Y.; PAN, X.; SUN, W.; WANG, C.; ZHANG, H.; LI, X.; MA, Y.; SHAO, Z.; GE, J.; ZHENG, F.; GAO, G. F.; TANG, J. *Streptococcus suis* Enolase Functions as a Protective Antigen Displayed on the Bacterial Cell Surface. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 200, p. 1583–1592, 2009.

FERGUSON, D.J.; PARMLEY, S.F.; TOMAVO, S. Evidence for nuclear localization of two stage-specific isoenzymes of enolase in *Toxoplasma gondii* correlates with active parasite replication. **Int J Parasitol**, v. 32, p. 1399-1410, 2002.

FERNANDES, P.A.; KEEN, J.N.; FINDLAY, J.B.; MORADAS-FERREIRA, P. A protein homologous to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is induced in the cell wall of a flocculent *Kluyveromyces marxianus*. **Biochim Biophys Acta**, v. 1159(1), p. 67-73, 1992.

FERREIRA-DA-CRUZ, M.F.; GALVÃO-CASTRO, B.; DANIEL-RIBEIRO, C. Isolation and antigenicity of the 43 kilodalton *Paracoccidioides brasiliensis* immunodominant antigen. **Infect. Immun**, v. 60, p. 2667-2671, 1992.

FINLAY, B.B.; FALKOW, S. Common themes in microbial pathogenicity. **Microbiol. Rev.**, v. 53, p. 210-230, 1989.

FINLEY, D.; ÖZKAYNAK, E.; VARSHAVSKY, A. The yeast polyubiquitin gene is essential for resistance to high temperatures, starvation, and other stresses. **Cell**, v. 48, p. 1035-1046, 1987.

FINLEY, D.; CHAU, V. Ubiquitination. **Ann Rev Cell Biol**, v. 7, p. 25-69, 1991.

FINLAY, B.B.; FALKOW, S. Common themes in microbial pathogenicity revisited. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 6, p. 136-69, 1997.

FINZI, J.K.; CHIAVEGATTO, C.W.; CORAT, K.F.; LOPEZ, J.A.; CABRERA, O.G.; MIELNICZKI-PEREIRA, A.A.; COLLI, W.; ALVES, M.J.; GADELHA, F.R. *Trypanosoma cruzi* response to the oxidative stress generated by hydrogen peroxide. **Mol Biochem Parasitol**, v. 133(1), p. 37-43, 2004.

FONSECA, C.A.; JESUÍNO, R.S.A.; FELIPE, M.S.S.; CUNHA, D.A.; BRITO, W.A.; SOARES, C.M.A. Two-Dimensional Electrophoresis And Characterization Of Antigens From *Paracoccidioides brasiliensis*. **Microb. Infect.** v.3, p. 535-542, 2001.

FRANCO, M. Host-parasite relationships in paracoccidioidomycosis. **J Med Vet Mycol**, v. 25, p. 5-18, 1987.

FRANCO, M.; PERACOLI, M.T.; SOARES, A.; MONTENEGRO, R.; MENDES, R.P.; MEIRA, D.A. Host-parasite relationship in paracoccidioidomycosis. **Curr Top Med Mycol**, v. 5, p. 115-149, 1993.

FRANCO, M. Pathobiology. In: FRANCO, M. **Paracoccidioidomycosis**, USA, CRC Press. 1994 p. 142-146.

FROMTLING, R.A.; SHADOMY, H.J.; JACOBSON, E.S. Decreased virulence in stable, acapsular mutants of *Cryptococcus neoformans*. **Mycopathologia**, v. 79(1), p. 23-29, 1982.

FU, H.; SUBRAMANIAN, R.R.; MASTERS, S.C. 14-3-3 proteins: structure, function, and regulation. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol**, v. 40, p. 617-647, 2000.

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

GANIKO, L.; PUCCIA, R.; MARIANO, V.S.; SANT'ANNA, O.A.; FREYMULLER, E.; ROQUE-BARREIRA, M.C.; TRAVASSOS, L.R. Paracoccin, An N-Acetyl-Glucosamine-Binding Lectin Of *Paracoccidioides brasiliensis*, Is Involved In Fungal Growth. **Microbes Infect**, v. 9, p. 695-703, 2007.

GERNER, E.W.; MEYSKENS, F.L. JR. Polyamines and cancer: old molecules, new understanding. **Nat Rev Cancer.**, v. 4(10), p. 781-792, 2004.

GEZUELE, E. Aislamiento de *Paracoccidioides sp.* de heces de pinguino de La Antártida. In: Proceedings IV International Symposium on Paracoccidioidomycosis, 4, 1989, Caracas, Venezuela. **Resumos**. Caracas, Venezuela: Insituto Venezoelano de Investigaciones Cientificas (IVIC), 1989. P. B-2.

GIL, M.L.; PEÑALVER, M.C.; LOPEZ-RIBOT, J.L.; O'CONNOR, J.E.; MARTINEZ, J.P. Binding of extracellular matrix proteins to *Aspergillus fumigatus* conidia. **Infect Immun.**, v. 64(12), p. 5239-5247, 1996.

GIL-NAVARRO, I.; GIL, M.L.; CASANOVA, M.; O'CONNOR, J.E.; MARTÍNEZ, J.P.; GOZALBO, D. The glycolytic enzyme glyceraldehyde-3-phosphate

dehydrogenase of *Candida albicans* is a surface antigen. **J Bacteriol.**, v. 179(16), p. 4992-4999, 1997.

GOLDANI, L.Z.; SUGAR, A.M. Paracoccidioidomycosis and AIDS: an overview. **Clin Infect Dis.**, v. 21(5), p. 1275-1281, 1995.

GOLDMAN, G.H.; DOS REIS MARQUES, E.; DUARTE RIBEIRO, D.C.; DE SOUZA BERNARDES, L.A.; QUIAPIN, A.C.; VITORELLI, P.M.; SAVOLDI, M.; SEMIGHINI, C.P.; DE OLIVEIRA, R.C.; NUNES, L.R.; TRAVASSOS, L.R.; PUCCIA, R.; BATISTA, W.L.; FERREIRA, L.E.; MOREIRA, J.C.; BOGOSSIAN, A.P.; TEKAIA, F.; NOBREGA, M.P.; NOBREGA, F.G.; GOLDMAN, M.H. Expressed sequence tag analysis of the human pathogen *Paracoccidioides brasiliensis* yeast phase: identification of putative homologues of *Candida albicans* virulence and pathogenicity genes. **Eukaryot Cell.**, v. 2(1), p. 34-48, 2003.

GÓMEZ, B.L.; FIGUEROA, J.I.; HAMILTON, R.J.; DÍEZ, S.; ROJAS, M.; TOBÓN, A.M.; HAY, R.J.; RESTREPO, A. Antigenemia in patients with paracoccidioidomycosis: Detection of the 87kDa Determinant during and after antifungal therapy. **J. Clin. Microbiol.**, v. 36, p. 3309-3316, 1998.

GONZÁLEZ, A.; GOMEZ, B.L.; DIEZ, S.; HERNANDEZ, O.; RESTREPO, A.; HAMILTON, A.J.; CANO, L.E. Purification And Partial Characterization Of A *Paracoccidioides brasiliensis* Protein With Capacity To Bind To Extracellular Matrix Proteins. **Infect. Immun.**, v. 73, p. 2486-2495, 2005.

GOULD, T.A.; VAN DE LANGEMHEEN, H.; MUÑOZ-ELÍAS, E.J.; MCKINNEY, J.D.; SACCHETTINI, J.C. Dual role of isocitrate lyase 1 in the glyoxylate and methylcitrate cycles in *Mycobacterium tuberculosis*. **Mol Microbiol.**, v. 61(4), p. 940-947, 2006.

GOZALBO, D.; GIL-NAVARRO, I.; AZORÍN, I.; RENAUI-PIQUERAS, J.; MARTÍNEZ, J.P.; GIL, M.L. The cell wall-associated glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Candida albicans* is also a fibronectin and laminin binding protein. **Infect Immun.**, v. 66(5), p. 2052-2059, 1998.

GOW, N.A.; BROWN, A.J.; ODDS, F.C. Fungal morphogenesis and host invasion. **Curr Opin Microbiol.**, v. 5, p. 366-371, 2002.

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

GROSS, G.N.; REHM, S.R.; PIERCE, A.K. The effect of complement depletion on lung clearance of bacteria. **J. Clin. Invest.**, v. 62, p. 373–378, 1978.

GUO, K.; CHANG, W.T.; NEWELL, P.C. Isolation of spermidine synthase gene (spsA) of *Dictyostelium discoideum*. **Biochim Biophys Acta**, v. 1449(3), p. 211-216, 1999.

HANNA, S.A. “**Estudo dos mecanismos e fatores de virulência de *Paracoccidioides brasiliensis* em culturas de células**” 1995. Dissertação (Mestrado em Biologia) Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 1995.

HANNA, A.S.; MONTEIRO DA SILVA, J.L.; MENDES-GIANNINI, M.J.S. Adherence and intracellular parasitism of *Paracoccidioides brasiliensis* in Vero cells. **Microb. Infect.**, v. 2, p. 1-8, 2000.

HERNÁNDEZ, O.; ALMEIDA, A.J.; GONZALEZ, A.; GARCIA, A.M.; TAMAYO, D.; CANO, L.E.; RESTREPO, A.; MCEWEN, J.G. A 32-Kilodalton Hydrolase plays an important role in *Paracoccidioides brasiliensis* adherence to host cells and influences pathogenicity. **Infect. Immun.**, v. 78, p. 5280-5286, 2010.

HÖHFELD, J.; HARTL, F.U. Role of the chaperonin cofactor Hsp10 in protein folding and sorting in yeast mitochondria. **J Cell Biol.**, v. 126(2), p. 305-315, 1994.

HONG, Y.Q.; GHEBREHIWET, B. Effect of *Pseudomonas aeruginosa* elastase and alkaline protease on serum complement and isolated components C1q and C3. **Clin. Immunol. Immunopathol.**, v. 62, p. 133–138, 1992.

HROMATKA, B.S.; NOBLE, S.M.; JOHNSON, A.D. Transcriptional response of *Candida albicans* to nitric oxide and the role of the YHB1 gene in nitrosative stress and virulence. **Mol Biol Cell**, v. 16, p. 4814–4826, 2005

HU, Y.; FISETTE, P.L.; DENLINGER, L.C.; GUADARRAMA, A.G.; SOMMER, J.A.; PROCTOR, R.A.; BERTICS, P.J. Purinergic receptor modulation of lipopolysaccharide signaling and inducible nitric-oxide synthase expression in RAW 264.7 macrophages. **J Biol Chem**, v. 273, p. 27170–27175, 1998.

HWANG, C.S.; RHIE, G.E.; OH, J.H.; HUH, W.K.; YIM, H.S.; KANG, S.O. Copper- and zinc-containing superoxide dismutase (Cu/ZnSOD) is required for the protection of *Candida albicans* against oxidative stresses and the expression of its full virulence. **Microbiology.**, v. 148, p. 3705-3713, 2002.

IIDA, H. & YAHARA, I. Yeast heat shock protein of Mr 48,000 is an isoprotein of enolase. **Nature.**, v. 351, p. 688-690, 1985.

IIDA, H.; YAHARA, I. Durable synthesis of high molecular weight heat shock proteins in G0 cells of the yeast and other eucaryotes. **J Cell Biol.**, v. 99(1 Pt 1), p. 199-207, 1984.

IKEGUCHI ,Y.; BEWLEY, M.C.; PEGG, A.E. Aminopropyltransferases: function, structure and genetics. **J Biochem.**, v. 139(1), p. 1-9, 2006.

IZACC, S.M.; GOMÉZ, F.J.; JESUÍNO, R.S.; FONSECA, C.A.; FELIPE, M.S.; DEEP, G.S.; SOARES, C.M. Molecular Cloning, Characterization And Expression Of The Heat Shock Protein 60 Gene From The Human Pathogenic Fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **Med. Mycol.**, v. 39, p. 445-455, 2001.

JANULCZYK, R.F.; IANNELLI, A.; SJHOLM G.; POZZI, G.; BJÖRCK, L. Hic, a novel surface protein of *Streptococcus pneumoniae* that interferes with complement function. **J. Biol. Chem.**, v. 275, p. 37257–37263, 2000.

JEFFERY, C.J. Moonlighting proteins. **Trends Biochem Sci.**, v. 24(1), p. 8-11, 1999.

JENSEN, JR.K.A.; RYAN, Z.C.; WYMELENBERG, A.V.; CULLEN, D.; HAMMEL, K.E. An NADH: Quinone oxidoreductase active during biodegradation by the brown-rot basidiomycete *Gloeophyllum trabeum*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 68, p. 2699–2703, 2002.

JIANG, B.H.; AGANI, F.; PASSANITI, A.; SEMENZA, G.L. V-SRC induces expression of hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) and transcription of genes encoding vascular endothelial growth factor and enolase 1: involvement of HIF-1 in tumor progression. **Cancer Res.**, v. 57, p. 5328-5335, 1997.

JIN, Y.; BOK, J.W.; GUZMAN-DE-PEÑA, D.; KELLER, N.P. Requirement of spermidine for developmental transitions in *Aspergillus nidulans*. **Mol Microbiol.**, v. 46(3), p. 801-812, 2002.

JIN, J.; SMITH, F.D.; STARK, C.; WELLS, C.D.; FAWCETT, J.P.; KULKARNI, S.; METALNIKOV, P.; O'DONNELL, P.; TAYLOR, P.; TAYLOR, L.; ZOUGMAN, A.; WOODGETT, J.R.; LANGEBERG, L.K.; SCOTT, J.D.; PAWSON, T. Proteomic, functional, and domain-based analysis of in vivo 14-3-3 binding proteins involved in cytoskeletal regulation and cellular organization. **Curr. Biol.**, v. 14, p. 1436-1450, 2004.

JOLODAR, A.; FISCHER, P.; BERGMANN, S.; BÜTTNER, D.W.; HAMMERSCHMIDT, S.; BRATTIG, N.W. Molecular cloning of an alpha-enolase from the human filarial parasite *Onchocerca volvulus* that binds human plasminogen. **Biochim Biophys Acta.**, v. 1627(2-3), p. 111-120, 2003.

JONG, A.Y.; CHEN, S.H.M.; STINS, M. F.; KIM, K.S.; TUAN, T.; HUANG, S. Binding of *Candida albicans* enolase to plasmin(ogen) results in enhanced invasion of human brain microvascular endothelial cells. **Journal of Medical Microbiology.**, v. 52, p. 615–622, 2003.

JOHNSSON, E.; BERGGÅRD, K.; KOTARSKY, H.; HELLWAGE, J.; ZIPFEL, P.F.; SJÖBRING, U.; LINDAHL, G. Role of the hypervariable region in streptococcal M proteins: binding of a human complement inhibitor. **J. Immunol.**, v. 161, p. 4894–4901, 1998.

JOZEFOWSKI, S.; SOBOTA, A.; KWIATKOWSKA, K. How *Mycobacterium tuberculosis* subverts host immune responses. **Bioessays.**, v. 30(10), p. 943–954, 2008.

KASHINO, S.S.; FAZIOLI, R.A.; CAFALLI-FAVATI, C.; MELONI-BRUNERI, L.H.; VAZ, C.A.; BURGER, E.; SINGER, L.M.; CALICH, V.L. 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(1), p. 89-97, 2000.

KAZARIAN, T.; JABBAR, A.A.; WEN, F.Q.; PATEL, D.A.; VALENTINO, L.A. Gangliosides regulate tumor cell adhesion to collagen. **Clin Exp Metastasis.**, v. 20(4), p. 311-319, 2003.

KIMBERLIN, C.L.; HARIRI, A.R.; HEMPEL, H.O.; GOODMAN, N.L. Interactions between *Histoplasma capsulatum* and macrophages from normal and treated mice: comparison of the mycelial and yeast phases in alveolar and peritoneal macrophages. **Infect Immun.**, v. 34(1), p. 6-10, 1981.

KIMURA, L.H.; PEARSALL, N.N. Relationship between germination of *Candida albicans* and increased adherence to human buccal epithelial cells. **Infection and Immunity**, v. 28, p. 464-468, 1980.

KINGSBURY, J.M.; YANG, Z.; GANOUS, T.M.; COX, G.M.; MCCUSKER, J.H. Novel chimeric spermidine synthase-saccharopine dehydrogenase gene (SPE3-LYS9) in the human pathogen *Cryptococcus neoformans*. **Eukaryot Cell.**, v. 3(3), 752-763, 2004.

KLOTZ, S.A.; PENDRAK, M.L.; HEIN, R.C. Antibodies to alpha5beta1 and alpha(v)beta3 integrins react with *Candida albicans* alcohol dehydrogenase. **Microbiology.**, v. 147(Pt 11), p. 3159-64, 2001.

KNAUST, A.; WEBER, M.V.R.; HAMMERSCHMIDT, S.; BERGMANN, S.; FROSCH, M.; OLIVER, K. Cytosolic Proteins Contribute to Surface Plasminogen Recruitment of *Neisseria meningitides*. **JOURNAL OF BACTERIOLOGY**, v. 189, p. 3246–3255, 2007.

KOLLI, B.K.; KOSTAL, J.; ZABORINA, O.; CHAKRABARTY, A.M.; CHANG, K.P. *Leishmania*-released nucleoside diphosphate kinase prevents ATP-mediated cytolysis of macrophages. **Mol Biochem Parasitol.**, v. 158(2), p. 163-175, 2008.

KRAICZY, P.; SKERKA, C.; KIRSCHfINK, M.; BRADE, V.; ZIPFEL, P.F. Immune evasion of *Borrelia burgdorferi* by acquisition of human complement regulators FHL-1/reconnectin and Factor H. **Eur. J. Immunol.**, v. 31, p. 1674–1684, 2001.

KUNERT, A.; LOSSE, J.; GRUSZIN, C.; HÜHN, M.; KAENDLER, K.; MIKKAT, S.; VOLKE, D.; HOFFMANN, R.; JOKIRANTA, T.S.; SEEBERGER, H.; MOELLMANN, U.; HELLWAGE, J.; ZIPFEL, P.F. Immune evasion of the human

pathogen *Pseudomonas aeruginosa*: elongation factor Tuf is a factor H and plasminogen binding protein. **J Immunol.**, v. 179(5), p. 2979-2988, 2007.

KUROKAWA, C.S.; SUGIZAKI, M.F.; PERAÇOLI, M.T. Virulence factors in fungi of systemic mycoses. **Rev Inst Med Trop.**, v. 40(3), p. 125-135, 1998.

KURTENBACH, K.; DE MICHELIS, S.; ETTI, S.; SCHÄFER, S.M.; SEWELL, H.S.; BRADE, V.; KRAICZY, P. Host association of *Borrelia burgdorferi* sensu lato: the key role of host complement. **Trends Microbiol.**, v. 10, p. 74–79, 2002.

KWON-CHUNG, K.J.; RHODES, J.C. Encapsulation and melanin formation as indicators of virulence in *Cryptococcus neoformans*. **Infect Immun.**, v. 51(1), p. 218-223, 1986.

KWON-CHUNG, K. Gene disruption to evaluate the role of fungal candidate virulence genes. **Curr Opin Microbiol.**, v. 1(4), p. 381-389, 1998.

KOTTON, D.N.; FINE, A. Derivation of lung epithelium from bone marrow cells. **Cytotherapy.**, v. 5(2), p. 169-173, 2003.

LACAZ, C.S. Historical evolution of the knowledge on paracoccidioidomycosis and its etiological agent, *Paracoccidioides brasiliensis*. **Paracoccidioidomycosis**. CRC Press, p. 1-11. 1993

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

LANDFEAR, S.M.; ULLMAN, B.; CARTER, N.S.; SANCHEZ, M.A. Nucleoside and nucleobase transporters in parasitic protozoa. **Eukaryot Cell.**, v. 3, p. 245–254, 2004.

LAUGHLIN, T.F.; AHMAD, Z. Inhibition of *Escherichia coli* ATP synthase by amphibian antimicrobial peptides. **International Journal of Biological Macromolecules.**, v. 46, p. 367–374, 2010.

LEACH, M.D.; STEAD, D.A.; ARGO, E.; MACCALLUM, D.M.; BROWN, A.J. Molecular and proteomic analyses highlight the importance of ubiquitination for the stress resistance, metabolic adaptation, morphogenetic regulation and virulence of *Candida albicans*. **Mol Microbiol.**, v. 79(6), p. 1574-1593, 2011.

LECLERC, M.C.; PHILIPPE, H.; GUEHO, E. Phylogeny of dermatophytes and dimorphic fungi based on large subunit ribosomal RNA sequence comparisons. **J Med Vet Mycol.**, v.32 (5), p. 331-341, 1994.

LEE, W.L.; GOLD, B.; DARBY, C.; BROT, N.; JIANG, X. *Mycobacterium tuberculosis* expresses methionine sulfoxide reductases A and B that protect from killing by nitrite and hypochlorite. **Mol Microbiol.**, v. 71(3), p. 583–593, 2009.

LENG, P.; SUDBERY, P.E.; BROWN, A.J.P. Rad6p represses yeast-hypha morphogenesis in the human fungal pathogen *Candida albicans*. **Mol Microbiol.**, v. 35, p. 1264–1275, 2000.

LENZI, H.L.; CALICH, V.L.G.; MENDES-GIANNINI, M.J.S.; XIDIEH, C.F.; MIYAJI, M.; MOTA, E. M.; MACHADO, M.P.; RESTREPO, A. Two Patterns Of Extracellular Matrix Expression In Experimental Paracoccidioidomycosis. **Med. Mycol.**, v. 38, p. 115-119, 2000.

LINDQUIST, S.; CRAIG, E.A. The heat-shock proteins. **Annu Rev Genet.**, v. 22, p. 631-677, 1988.

LO, H.J.; KOHLER, J.R.; DIDOMENICO, B.; LOEBENBERG, D.; CACCIAPUOTI, A.; FINK, G. Nonfilamentous *C. albicans* mutants are avirulent. **Cell.**, v. 90, p. 939–949, 1997.

LONDERO, A.T.; RAMOS, C.D.; MATTE, S.W. Actinomycotic mycetomas in Rio Grande do Sul--report of 4 cases. **Mem Inst Oswaldo Cruz.**, v. 81, p.73-77, 1986.

LÓPES-VILLAR, E.; MONTEOLIVA, L.; LARSEN, M.R.; SACHON, E.; SHABAZ, M.; PARDO, M.; PLA, J.; GIL, C.; ROEPSTORFF, P.; NOMBELA, C. Genetic and proteomics evidences support the localization of yeast enolase in the cell surface. **Proteomics.**, v. 6, p. 107-118, 2006.

LORENZ, M.C.; FINK, G.R. The glyoxylate cycle is required for fungal virulence. **Nature.**, v. 412(6842), p. 83–86, 2001.

LORENZ, M.C.; FINK, G.R. Life and death in a macrophage: role of the glyoxylate cycle in virulence. **Eukaryot Cell.**, v. 1(5), p. 657-662, 2002.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J Biol Chem.**, v. 193(1), p. 265-75, 1951.

MARESCA, B.; KOBAYASHI, G.S. Dimorphism in *Histoplasma capsulatum* and *Blastomyces dermatitidis*. **Contrib Microbiol.**, v. 5, p. 201-216, 2000.

MARINI, M.M.; ZANFORLIN, T.; SANTOS, P.C.; BARROS, R.R.; GUERRA, A.C.; PUCCIA, R.; FELIPE, M.S.; BRIGIDO, M.; SOARES, C.M.; RUIZ, J.C.; SILVEIRA, J.F.; CISALPINO, P.S. Identification and characterization of Tc1/mariner-like DNA transposons in genomes of the pathogenic fungi of the *Paracoccidioides* species complex. **BMC Genomics.**, v. 11, p. 130, 2010.

MARQUES, S.A. Paracoccidioidomicose: Atualização Epidemiológica, Clínica e Terapêutica. **Na. Bras. Dermatol.**, v. 78(2), p. 135-150, 2003.

MARTÍNEZ, J.P.; GIL, M.L.; LÓPEZ-RIBOT, J.L.; CHAFFIN, W.L. Serologic response to cell wall mannoproteins and proteins of *Candida albicans*. **Clin Microbiol Rev.**, v.11(1), p. 121-141, 1998.

MCEWEN, J.G.; GARCIA, A.M.; ORTIZ, B.L.; BOTERO, S.; RESTREPO, A. In search of the natural habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Arch Med Res. Autumn.**, v. 26(3), p. 305-306, 1995.

MCKINNEY, J.D.; HOENER, Z.U.; BENTRUP, K.; MUNOZ-ELIAS, E.J.; MICZAK, A.; CHEN, B.; CHAN, W.T.; SWENSON, D.; SACCHETTINI, J.C.; JACOBS, W.R. Jr, RUSSELL, D.G. Persistence of *Mycobacterium tuberculosis* in macrophages and mice requires the glyoxylate shunt enzyme isocitrate lyase. **Nature**, v. 406(6797), p. 735-738, 2000.

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

MEDOFF, G.; PAINTER, A.; KOBAYASHI, G.S. Mycelial- to yeast-phase transitions of the dimorphic fungi *Blastomyces dermatitidis* and *Paracoccidioides brasiliensis*. **J Bacteriol.**, v. 169(9), p. 4055-4060, 1987.

MENDES-GIANNINI, M.J.S.; TAYLOR, M.L.; BOUCHARA, J.B.; BURGER, E.; CALICH, V.L.G.; ESCALANTE, E.D.; HANNA, S.A.; LENZI, H.L.; MACHADO, M.P.; MIYAJI, M.; MONTEIRO DA SILVA, J.L.; MOTA, E.M.; RESTREPO, A.; RESTREPO, G.; TRONCHIN, G.; VICENZI, L.R.; XIDIEH, C.F.; ZENTENO, E. Pathogenesis II: Fungal Responses To Host Responses: Interaction Of Host Cells With Fungi. **Med. Mycol.**, v. 38, p. 113-123, 2000.

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

MENDES-GIANNINI, M.J.; ANDREOTTI, P.F.; VINCENZI, L.R.; DA SILVA, J.L.; LENZI, H.L.; BENARD, G.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R.; DE MATOS GUEDES, H.L.; SOARES, C.P. Binding of extracellular matrix proteins to *Paracoccidioides brasiliensis*. **Microbes Infect.**, v. 6, p. 1550-1559, 2006.

MCEWEN, J.G.; ORTIZ, B.L.; GARCÍA, A.M.; FLOREZ, A.M.; BOTERO, S.; RESTREPO, A. Molecular cloning, nucleotide sequencing, and characterization of a 27-kDa antigenic protein from *Paracoccidioides brasiliensis*. **Fungal Genet Biol.**, v. 20(2), p. 125-131, 1996.

MERI, T.; HARTMANN, A.; LENK, D.; ECK, R.; WÜRZNER, R.; HELLWAGE, J.; MERI, S.; ZIPFEL, P.F. The yeast *Candida albicans* binds complement regulators Factor H and FHL-1. **Infect. Immun.**, v. 70, p. 5185-5192, 2002.

MISSALL, T.A.; PUSATERI, M.E.; DONLIN, M.J.; CHAMBERS, K.T.; CORBETT, J.A.; LODGE, J.K. Posttranslational, translational, and transcriptional responses to nitric oxide stress in *Cryptococcus neoformans*: implications for virulence. **Eukaryot Cell**, v. 5, p. 518-529, 2006.

MOHRI, H. Fibronectin-binding proteins of gram-positive cocci. **J Investig Med.**, v. 44(8), p. 429-441, 1996.

MONTENEGRO, M.R.; MIYAJI, M.; FRANCO, M.; NISHIMURA, K.; COELHO, K.I.; HORIE, Y.; MENDES, R.P.; SANO, A.; FUKUSHIMA, K.; FECCHIO, D. 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(6), p. 665-70, 1996.

MOTSHWENE, P.; BRANDT, W.; LINDSEY, G. Significant quantities of the glycolytic enzyme phosphoglycerate mutase are present in the cell wall of yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochem J.** v. 369(Pt 2), p. 357-362, 2003.

MUELLER-ORTIZ, S.L.; DROUIN, S.M.; WETSEL, R.A. The alternative activation pathway and complement component C3 are critical for a protective immune response against *Pseudomonas aeruginosa* in a murine model of pneumonia. **Infect. Immun.**, v. 72, p. 2899–2906, 2004.

MUKHERJEE, P.K.; MOHAMED, S.; CHANDRA, J.; KUHN, D.; LIU, S.; ANTAR, O.S.; MUNYON, R.; MITCHELL, A.P.; ANDES, D.; CHANCE, M.R.; ROUABHIA, M.; GHANNOUM, M.A. Alcohol dehydrogenase restricts the ability of the pathogen *Candida albicans* to form a biofilm on catheter surfaces through an ethanol-based mechanism. **Infect Immun.**, v. 74(7), p. 3804-3816, 2006.

MUNDODI, V.; KUCKNOOR, A.S.; ALDERETE, J.F. Immunogenic and plasminogen-binding surface-associated α -enolase of *Trichomonas vaginalis*. **Infect Immun.**, v. 76, p. 523-531, 2008.

MUÑOZ-ELÍAS, E.J.; MCKINNEY, J.D. *Mycobacterium tuberculosis* isocitrate lyases 1 and 2 are jointly required for in vivo growth and virulence. **Nat Med.**, v. 11(6), p. 638-644, 2005.

NAVARATHNA, D.H.; ROBERTS, D.D. *Candida albicans* heme oxygenase and its product CO contribute to pathogenesis of candidemia and alter systemic chemokine and cytokine expression. **Free Radic Biol Med.**, v. 49(10), p. 1561-73, 2010.

NAVARATHNA, D.H.; HORNBY, J.M.; KRISHNAN, N.; PARKHURST, A.; DUHAMEL, G.E.; NICKERSON, K.W. Effect of farnesol on a mouse model of systemic candidiasis, determined by use of a DPP3 knockout mutant of *Candida albicans*. **Infect. Immun.**, v. 75, p. 1609–1618, 2007

NEGRONI, P. El *Paracoccidioides brasiliensis* vive saprofíticamente en el suelo argentino. **Prensa Med. Argent.**, v. 53 (39), p. 2381-2382, 1966.

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

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

NEWMAN, S.L.; BUCHER, C.; RHODES, J.; BULLOCK, W.E. Phagocytosis of *Histoplasma capsulatum* yeasts and microconidia by human cultured macrophages and alveolar macrophages. Cellular cytoskeleton requirement for attachment and ingestion. **J Clin Invest.**, v. 85(1), p. 223-230, 1990.

NICOLA, A.M.; ANDRADE, R.V.; SILVA-PEREIRA, I. Molecular chaperones in the *Paracoccidioides brasiliensis*. **Genet. Mol. Res.**, v. 4(2), p. 346-357, 2005.

NOGUEIRA, S.V.; FONSECA, F.L.; RODRIGUES, M.L.; MUNDODI, V.; ABICHACRA, E.A.; WINTERS, M.S.; ALDERETE, J.F.; DE ALMEIDA SOARES, C.M. *Paracoccidioides brasiliensis* enolase is a surface protein that binds plasminogen and mediates interaction of yeast forms with host cells. **Infect Immun.**, v. 78(9), p. 4040-4050, 2010.

NUNES, L.R.; COSTA DE OLIVEIRA, R.; LEITE, D.B.; DA SILVA, V.S.; DOS REIS MARQUES, E.; DA SILVA FERREIRA, M.E.; RIBEIRO, D.C.; DE SOUZA BERNARDES, L.A.; GOLDMAN, M.H.; PUCCIA, R.; TRAVASSOS, L.R.; BATISTA, W.L.; NÓBREGA, M.P.; NOBREGA, F.G.; YANG, D.Y.; DE BRAGANÇA PEREIRA, C.A.; GOLDMAN, G.H. Transcriptome analysis of *Paracoccidioides brasiliensis* cells undergoing mycelium-to-yeast transition. **Eukaryot Cell.**, v. 4(12), p. 2115-2128, 2005.

ODDS, F.C. *Candida and Candidosis*. Baltimore; University Park Press, 1979.

ODDS, F.C.; GOW, N.A.; BROWN, A.J. Fungal virulence studies come of age. **Genome Biol.**, v. 2(3), 2001.

OEHMCKE, S.; PODBIELSKI, A.; KREIKEMEYER, B. Function of the fibronectin-binding serum opacity factor of *Streptococcus pyogenes* in adherence to epithelial cells. **Infect Immun.** v. 72, p. 4302–4308, 2004.

OLIVAS, I.; ROYUELA, M.; ROMERO, B.; MONTEIRO, M.C.; MÍNGUEZ, J.M.; LABORDA, F.; DE LUCAS, J.R. Ability to grow on lipids accounts for the fully virulent phenotype in neutropenic mice of *Aspergillus fumigatus* null mutants in the key glyoxylate cycle enzymes. **Fungal Genet.** v. 45(1), p. 45-60, 2008.

OHNUMA, M.; TERUI, Y.; TAMAKOSHI, M.; MITOME, H.; NIITSU, M.; SAMEJIMA, K.; KAWASHIMA, E.; OSHIMA, T. N1-aminopropylagmatine, a new polyamine produced as a key intermediate in polyamine biosynthesis of an extreme thermophile, *Thermus thermophilus*. **J Biol Chem.**, v. 280(34), p.30073-30082, 2005.

ORTIZ, B.I.; GARCIA, M.A.; RESTREPO, A.; MCEWEN, J.G. Immunological characterization of a recombinant 27-kilodalton antigenic protein from *Paracoccidioides brasiliensis*. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, v. 3, p. 239-241, 1996.

ORTIZ, B.L.; DÍEZ, S.; URÁN, M.E.; RIVAS, J.M.; ROMERO, M.; CAICEDO, V.; RESTREPO, A.; MCEWEN, J.G. Use of the 27-kilodalton recombinant protein from *Paracoccidioides brasiliensis* in serodiagnosis of paracoccidioidomycosis. **Clin Diagn Lab Immunol.** v. 5(6), p. 826-830, 1998.

ORTIZ, B.L.; DÍEZ, S.; URÁN, M.E.; RIVAS, J.M.; ROMERO, M.; CAICEDO, V.; PARDO, M.; WARD, M.; PITARCH, A.; SANCHEZ, M.; NOMBELA, C.; BLACKSTOCK, W.; GIL, C. Cross-species identification of novel *Candida albicans* immunogenic proteins by combination of two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis and mass spectrometry. **Electrophoresis.**, v. 13, p. 2651-2659, 2000.

OZKAYNAK, E.; FINLEY, D.; SOLOMON, M.J.; VARSHAVSKY, A. The yeast ubiquitin genes: a family of natural genefusions. **EMBO J**, v. 6, p. 1429–1439, 1987.

PAL-BHOWMICK, I.; MEHTA, M.; COPPENS, I.; SHARMA, S.; JARORI, G.K. Protective properties and surface localization of *Plasmodium falciparum* enolase. **Infect. Immun.**, v. 75, p. 5500-5508, 2007.

PANCHOLI, V.; FISCHETTI, V. A. Alfa-Enolase, a novel strong plasmin(ogen) binding protein on the surface of pathogenic streptococci. **J Biol Chem**, v. 273, p. 14503–14515, 1998.

PANCHOLI, V.; FISCHETTI, V.A. Regulation of the phosphorylation of human pharyngeal cell proteins by group A streptococcal surface dehydrogenase: signal transduction between streptococci and pharyngeal cells. **J Exp Med.**, v. 186(10), p. 1633-1643, 1997.

PANCHOLI, V. Multifunctional alpha-enolase: its role in diseases. **Cell Mol Life Sci.**, v. 58, p. 902-920, 2001.

PANKOV, R., YAMADA, K.M.. 2002. Fibronectin at a glance. **J. Cell Sc.**, v. 20, p. 3861-3863, 2002.

PARDO, M.; WARD, M.; PITARCH, A.; SANCHEZ, M.; NOMBELA, C.; BLACKSTOCK, W.; GIL, C. Cross-species identification of novel *Candida albicans* immunogenic proteins by combination of two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis and mass spectrometry. **Electrophoresis.**, v. 13, p. 2651-2659, 2000.

PARK, M.H.; LEE, Y.B.; JOE, Y.A. Hypusine is essential for eukaryotic cell proliferation. **Biol. Signals.**, v. 6, p. 115-123, 1997.

PARK, M.H.; JOE, Y.A.; KANG, K.R. Deoxyhypusine synthase activity is essential for cell viability in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **J Biol Chem.**, v. 273(3), p. 1677-83, 1998.

PARK, M.H.; COOPER, H.L.; FOLK, J.E. The biosynthesis of protein-bound hypusine (N epsilon -(4-amino-2-hydroxybutyl)lysine). Lysine as the amino acid precursor and the intermediate role of deoxyhypusine (N epsilon -(4-aminobutyl)lysine). **J Biol Chem.**, v. 257(12), p. 7217-7222, 1982.

PARK, M.H.; WOLFF, E.C.; FOLK, J.E. Hypusine: its post-translational formation in eukaryotic initiation factor 5A and its potential role in cellular regulation. **Biofactors.**, v. 4(2), p. 95-104, 1993.

PARK, M.H.; WOLFF, E.C.; FOLK, J.E. Is hypusine essential for eukaryotic cell proliferation? **Trends Biochem Sci.**, v. 18(12), p. 475-479, 1993.

PEREIRA, T.M. “**Caracterização de genes de *Paracoccidioides brasiliensis* associados à função ATP sintase mitocondrial**” 2006. Dissertação (Mestrado) – Universidade de Vale do Paraíba Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento- São José dos Campos. 2006.

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

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

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

PHILIPS, J.A. Mycobacterial manipulation of vacuolar sorting. **Cell Microbiol.** v. 10(12), p. 2408–2415, 2008.

PIACENZA, L.; PELUFFO, G.; ALVAREZ, M.N.; KELLY, J.M.; WILKINSON, S.R.; RADI, R. Peroxiredoxins play a major role in protecting *Trypanosoma cruzi* against macrophage- and endogenously-derived peroxynitrite. **Biochem J.** v. 410(2), p. 359-368, 2008.

PITARCH, A.; PARDO, M.; JIMENEZ, A.; PLA, J.; GIL, C.; SANCHEZ, M.; NOMBELA, C. Two-dimensional gel electrophoresis as analytical tool for identifying *Candida albicans* immunogenic proteins. **Electrophoresis.**, v.4(5), p. 1001-10, 1999.

PLOW, E.F.; HERREN, T.; REDLITZ, A.; MILES, L.A.; HOOVER-PLOW, J.L. The cell biology of the plasminogen system. **Faseb J.**, v. 9, p. 939-45, 1995.

POSTEL, E.H.; BERBERICH, S.J.; FLINT, S.J.; FERRONE, C.A. Human c-myc transcription factor PuF identified as nm23-H2 nucleoside diphosphate kinase, a candidate suppressor of tumor metastasis. **Science**, v. 261,p. 478–480, 1993.

PRADO, M.; DA SILVA, M.B.; LAURENTI, R.; TRAVASSOS, L.R.; TABORDA, C.P. Mortality due to systemic mycoses as a primary cause of death or in association with AIDS in Brazil: review from 1996-2006. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 513-521, 2009

QUIÑONES, W.; PEÑA, P.; DOMINGO-SANANES, M.; CÁCERES, A.; MICHELS, P.A.; AVILAN, L.; CONCEPCIÓN, J.L. *Leishmania mexicana*: molecular cloning and characterization of enolase. **Exp Parasitol.**, v. 116(3), p. 241-51, 2007.

RAM, S.; MCQUILLEN, D.P.; GULATI, S.; ELKINS, M.K.; PANGBURN, M.K.; RICE, A.P. Binding of complement factor H to loop 5 of porin protein 1A: a molecular mechanism of serum resistance of nonsialylated *Neisseria gonorrhoeae*. **J. Exp. Med.**, v. 188, p. 671-680, 1998.

RAMOS-E-SILVA, M.; SARAIVA, L.E. Paracoccidioidomycosis. **Dermatol. Clin.**, v. 26(2), p. 257-269, 2008.

RAO, S.P.; ALONSO, S.; RAND, L.; DICK, T.; PETHE, K. The proton motive force is required for maintaining ATP homeostasis and viability of hypoxic, nonreplicating *Mycobacterium tuberculosis*. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, v. 105(33), p. 11945-11950, 2008.

RAPPLEYE, C.A.; GOLDMAN, W.E. Defining virulence genes in the dimorphic fungi. **Annu Rev Microbiol.**, v. 60, p. 281-303, 2006.

REDLITZ, A.; FOWLER, B.I.; PLOW, E.F.; MILES, L.A. The role of an enolase-related molecule in plasminogen binding to cells. **Eur J Biochem.**, v. 227, p. 407-415, 1995.

REID, M.F.; FEWSON, C.A. Molecular characterization of microbial alcohol dehydrogenases. **Crit Rev Microbiol.**, v. 20(1), p. 13-56, 1994.

RESTREPO MORENO, A. Mycosis in Colombia. A review of the national literature. **Torax.**, v. 17(1), p. 99-103, 1968.

RESTREPO, A.; SALAZAR, M.E.; CANO, L.E.; STOVER, E.P.; FELDMAN, D.; STEVENS, D.A. Estrogens inhibit mycelium-to-yeast transformation in the fungus

Paracoccidioides brasiliensis: implications for resistance of females to paracoccidioidomycosis. **Infect Immun.**, v. 46(2), p. 346-53, 1984.

RESTREPO, A. The ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*: a puzzle still unsolved. **Sabouraudia.**, v. 23(5), p. 323-334, 1985.

RESTREPO, A.; BENARD, G.; DE CASTRO, C.C.; AGUDELO, C.A.; TOBÓN, A.M. Pulmonary paracoccidioidomycosis. **Semin Respir Crit Care Med.**, v.29(2), p. 182-197, 2008.

RODRIGUES, M.L.; NAKAYASU, E.S.; OLIVEIRA, D.L.; NIMRICHTER, L.; NOSANCHUK, J.D.; ALMEIDA, I.C.; CASADEVALL, A. Extracellular vesicles produced by *Cryptococcus neoformans* contain protein components associated with virulence. **Eukaryot Cell**, v. 7, p. 58–67, 2008.

ROHDE, K.; YATES, R.M.; PURDY, G.E.; RUSSELL, D.G. *Mycobacterium tuberculosis* and the environment within the phagosome. **Immunol Rev**, v. 219, p. 37–54, 2007.

RINGQVIST, E.; AVESSON, L.; SÖDERBOM, F.; SVÄRD, S.G. Transcriptional changes in *Giardia* during host-parasite interactions. **Inf J Parasitol**, v. 41(3-4), p. 277-285, 2010.

ROBERTS, S.C.; JIANG, Y.; JARDIM, A.; CARTER, N.S.; HEBY, O.; ULLMAN, B. Genetic analysis of spermidine synthase from *Leishmania donovani*. **Mol Biochem Parasitol.**, v. 115(2), p. 217-226, 2011.

ROIG, P.; GOZALBO, D. Depletion of polyubiquitin encoded by the UBI4 gene confers pleiotropic phenotype to *Candida albicans* cells. **Fungal Gen Biol**, v. 39: 70–81, 2003.

ROSIN, F.M.; WATANABE, N.; LAM, E. Moonlighting vacuolar protease: multiple jobs for a busy protein. **Trends Plant Sci.**, v. 10(11), p. 516-518, 2005.

ROSPERT, S.; JUNNE, T.; GLICK, B.S.; SCHATZ, G. Cloning and disruption of the gene encoding yeast mitochondrial chaperonin 10, the homolog of *E. coli* groES. **FEBS Lett.**, v. 335(3), p. 358-360, 2003.

RUDE, T.H.; TOFFALETTI, D.L.; COX, G.M.; PERFECT, J.R. Relationship of the glyoxylate pathway to the pathogenesis of *Cryptococcus neoformans*. **Infect. Immun.**, v. 70(10), p. 5684 – 5694, 2002.

SALAZAR, M.E.; RESTREPO, A.; STEVENS, D.A. Inhibition by estrogens of conidium-to-yeast conversion in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **Infect. Immun.**, v. 56(3), p. 711-713, 1988.

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(3), p. 225-242, 2002.

SAN-BLAS, G.; NIÑO-VEGA, G. *Paracoccidioides brasiliensis*: chemical and molecular tools for research on cell walls, antifungals, diagnosis, taxonomy. **Mycopathologia.**, v. 165 (4-5), p. 183-195, 2008.

SALVATO, F. **Purificação de misturas de peptídeos para Espectrometria de massas (ESI-MS/MS) utilizando ZipTips**. Departamento de Genética, Laboratório Max Feffer de Genética de Plantas. ESALQ-USP, Piracicaba-São Paulo, 2010.

SANTOS, R.; BUISSON, N.; KNIGHT, S.; DANCIS, A.; CAMADRO, J.M.; LESUISSE, E. Haemin uptake and use as an iron source by *Candida albicans*: role of CaHMX1-encoded haem oxygenase. **Microbiology**. v. 149(Pt 3), p. 579-588, 2003.

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

SANTOS, W.A.; SILVA, B.M.; PASSOS, E.D.; ZANDONADE, E.; FALQUETO, A. Associação entre tabagismo e paracoccidioidomicose: um estudo de caso-controle no Estado do Espírito Santo, Brasil. **Cad. Saúde Pública**, v. 19(1), p. 245-253, 2003.

SARASTE, M. Oxidative phosphorylation at the fin de siècle. **Science.**, v. 283(5407), p. 1488-1493, 1999.

SAVILLE, S.P.; LAZZELL, A.L.; MONTEAGUDO, C.; LOPEZ-RIBOT, J.L. Engineered control of cell morphology in vivo reveals distinct roles for yeast and

filamentous forms of *Candida albicans* during infection. **Eukaryot Cell**, v. 2, p. 1053–1060, 2003.

SCHERAGA, H.A.; LASKOWSKI, M. Jr. The Fibrinogen-Fibrin Conversion. **Advances in Protein Chemistry**, v. 12, p. 1-131, 1957.

SCHILLER, N.L.; JOINER, K.A. Interaction of complement with serum-sensitive and serum-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. **Infect. Immun.**, v. 54, p. 689–694, 1986.

SCHMIDTCHEN, A.; HOLST, E.; TAPPER, H.; BJÖRCK, L. 2003. Elastase-producing *Pseudomonas aeruginosa* degrade plasma proteins and extracellular products of human skin and fibroblasts, and inhibit fibroblast growth. **Microb. Pathog.** v. 34, p. 47–55, 2003.

SCHWARZ-LINEK, U.; HÖÖK, M.; POTTS, J.R. Fibronectin-binding proteins of gram-positive cocci. **Microbes Infect.**, v. 8(8), p. 2291-8, 2006.

SHIKANAI-YASUDA, M.A.; TELLES FILHO FDE, Q.; MENDES, R.P.; COLOMBO, A.L.; MORETTI, M.L. Guidelines in paracoccidioidomycosis. **Rev Soc Bras Med Trop.** v. 39(3), p. 297-310, 2006.

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.90-94, 1963.

SILVA-VERGARA, M.L.; MARTINEZ, R.; CHADU, A.; MADEIRA, M.; FREITAS-SILVA, G.; LEITE MAFFEI, C.M. Isolation of a *Paracoccidioides brasiliensis* strain from the soil of a coffee plantation in Ibiá, State of Minas Gerais, Brazil. **Med Mycol.**, v. 36(1), p. 37-42, 1998.

SILVA-VERGARA, M.L.; MARTINEZ, R.; CAMARGO, Z.P.; MALTA, M.H.; MAFFEI, C.M.; CHADU, J.B. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillos (*Dasypus novemcinctus*) in an area where the fungus was recently isolated from soil. **Med Mycol.**, v. 38(3), p. 193-199, 2000.

SINGER-VERMES, L.M.; BURGER, E.; FRANCO, M.F.; DI-BACCHI, M.M.; MENDES-GIANNINI, M.J.; CALICH, V.L. Evaluation of the pathogenicity and

immunogenicity of seven *Paracoccidioides brasiliensis* isolates in susceptible inbred mice. **J. Med. Vet. Mycol.**, v. 27, p. 71-82, 1989.

SIROVER, M.A. New insights into an old protein: the functional diversity of mammalian glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. **Biochim Biophys Acta.**, v. 1432(2), p. 159-184, 1999.

SKERL, K.G.; CALDERONE, R.A.; SEGAL, E.; SREEVALSAN, T.; SCHELD, W.M. In vitro binding of *Candida albicans* yeast cells to human fibronectin. **Can J Microbiol.**, v. 30(2), p. 221-227, 1984.

SMITH, D.A.; NICHOLLS, S.; MORGAN, B.A.; BROWN, A.J.; QUINN, J. A conserved stress-activated protein kinase regulates a core stress response in the human pathogen *Candida albicans*. **Mol Biol Cell**, v. 15, p. 4179–4190, 2004.

SOTO, G.E.; HULTGREN, S.J. Bacterial adhesins: common themes and variations in architecture and assembly. **J Bacteriol.**, v. 181(4), p. 1059-1071, 1999.

SRIRAM, G.; MARTINEZ, J.A.; MCCABE, E.R.; LIAO, J.C.; DIPPLE, K.M. Single-gene disorders: what role could moonlighting enzymes plays. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 76, p. 911-924, 2005.

STEEN, B.R.; ZUYDERDUYN, S.; TOFFALETTI, D.L.; MARRA, M.; JONES, S.J.; PERFECT, J.R.; KRONSTAD, J. *Cryptococcus neoformans* gene expression during experimental cryptococcal meningitis. **Eukaryot Cell**, v. 2, p. 1336–1349, 2003.

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

SUN, J.; WANG, X.; LAU, A.; LIAO, T.Y.; BUCCI, C.; HMAMA, Z. Mycobacterial nucleoside diphosphate kinase blocks phagosome maturation in murine RAW 264.7 macrophages. **PLoS One.**, v. 5(1), p.8769, 2010.

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

SWANSON, J.A.; WATTS, C. Macropinocytosis. **Trends Cell Biol.**, v. 5, p. 424-428, 1995.

SWANSON, J.A.; BAER, S.C. Phagocytosis by zippers and triggers. **Trends Cell Biol.**, v. 5, p. 89-93, 1995.

TEIXEIRA, M.M.; THEODORO, R.C.; DE CARVALHO, M.J.; FERNANDES, L.; PAES, H.C.; HAHN, R.C.; MENDOZA, L.; BAGAGLI, E.; SAN-BLAS, G.; FELIPE, M.S. Phylogenetic analysis reveals a high level of speciation in the *Paracoccidioides* genus. **Mol Phylogenet Evol.**, v. 52(2), p. 273-283, 2009.

TERUI, Y.; OHNUMA, M.; HIRAGA, K.; KAWASHIMA, E.; OSHIMA, T. Stabilization of nucleic acids by unusual polyamines produced by an extreme thermophile, *Thermus thermophilus*. **Biochem J.**, v. 388(Pt 2), p. 427-433, 2005.

TOMPA, P.; SZÁSZ, C.; BUDAY, L. Structural disorder throws new light on moonlighting. **Trends Biochem Sci.** v. 30(9), p. 484-489, 2005.

TORRES-GUERERRO, H.; EDMAN, J.C. Melanin-deficient mutants of *Cryptococcus neoformans*. **J Med Vet Mycol.** v. 32(4), p. 303-313, 1994.

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

TROYANOVSKY, S.M. Mechanism of cell-cell adhesion complex assembly. **Current Opinions in Cell Biology**, v. 11, p. 561-566, 1999.

ULLBERG, M.; KRONVALL, G.; KARLSSON, I.; WIMAN, B. 1990. Receptors for human plasminogen on Gram-negative bacteria. **Infect. Immun.**, v. 58, p. 21-25, 1990.

VAN DER STRAETEN, D.; RODRIGUES-POUSADA, R.A.; GOODMAN, H.M.; VAN MONTAGU, M. Plant enolase: gene structure, expression, and evolution. **Plant Cell.**, v. 3(7), p. 719-735, 1991.

VANEGAS, G.; QUIÑONES, W.; CARRASCO-LÓPEZ, C.; CONCEPCIÓN, J.L.; ALBERICIO, F.; AVILÁN, L. Enolase as a plasminogen binding protein in *Leishmania mexicana*. **Parasitol Res.**, v. 101, p. 1511-1516, 2007.

VENTER, J.C.; ADAMS, M.D.; MYERS, E.W. The sequence of the human genome. **Science.**, v. 5507, p. 1304-1351, 2001.

VICENTINI, A.P.; GESZTESI, J.L.; FRANCO, M.F.; DE SOUZA, W.; DE MORAES, J.Z.; TRAVASSOS, L.R.; LOPES, J.D. Binding of *Paracoccidioides brasiliensis* to laminin through surface glycoprotein gp 43 leads to enhancement of fungal pathogenesis. **Infect. Immun.**, v. 62, p. 1465-1469, 1994.

XIE, Q.W.; TABOR, C.W.; TABOR, H. Deletion mutations in the speED operon: spermidine is not essential for the growth of *Escherichia coli*. **Gene.**, v. 126(1), p. 115-117, 1993.

XU, Z.; WICKNER, W.. Thioredoxin is required for vacuole inheritance in *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Cell Biol.**, v. 132, p. 787-794, 1996.

ZACHARIAS, D.; UEDA, A.; MOSCARDI-BACCHI, M.; FRANCO, M.; SAN-BLAS, G.A.. A comparative histopathological, immunological, and biochemical study of experimental intravenous paracoccidioidomycosis induced in mice by three *Paracoccidioides brasiliensis* isolates. **J. Med. Vet. Mycol.**, v. 24, p. 445-454, 1986.

ZAMBUZZI-CARVALHO, P.F.; CRUZ, A.H.; SANTOS-SILVA, L.K.; GOES, A.M.; SOARES, C.M.; PEREIRA, M. The malate synthase of *Paracoccidioides brasiliensis* Pb01 is required in the glyoxylate cycle and in the allantoin degradation pathway. **Med Mycol**, v. 47 (7), p. 734-744, 2009.

ZARA, S.; ANTONIO FARRIS, G.; BUDRONI, M.; BAKALINSKY, A.T. HSP12 is essential for biofilm formation by a Sardinian wine strain of *S. cerevisiae*. **Yeast.**, v. 19(3), p. 269-76, 2002.

ZIPFEL, P.F.; SKERKA, C.; HELLWAGE, J.; JOKIRANTA, S.T.; MERI, S.; BRADE, V.; KRAICZY, P.; NORIS, M.; REMUZZI, G.. Factor H family proteins: on complement, microbes and human diseases. **Biochem. Soc. Trans.**, v. 30, p. 971-978, 2002.

ZÜGEL, U.; KAUFMANN, S.H. Immune response against heat shock proteins in infectious diseases. **Immunobiology.**, v. 201(1), p. 22-35, 1999.

YAMADA, K. Adhesive recognition sequences. **J. Biol. Chem.**, v. 266, p. 12809-12812, 1991.

YAMADA, K.M.; PANKOV, R.; CUKIERMAN, E. Dimensions and dynamics in integrin function. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 36, p. 959-966, 2003.

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

YANG, Y.L. Virulence factors of *Candida* species. **J Microbiol Immunol Infect.**, v. 36, p. 223-228, 2003.

YOUNGER, J.G.; SHANKAR-SINHA, S.; MICKIEWICZ, M.; BRINKMAN, A.S.; VALENCIA, G.A.; SARMA, J.V.; YOUNKIN, E.M.; STANDIFORD, T.J.; ZETOUNE, F.S.; WARD, P.A. 2003. Murine complement interactions with *Pseudomonas aeruginosa* and their consequences during pneumonia. **Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.**, v. 29, P. 432–438, 2003.

WALLACE, H.M.; FRASER, A.V.; HUGHES, A. A perspective of polyamine metabolism. **Biochem J.**, v. 376(Pt 1), p. 1-14, 2003.

WANG, Z.X.; BRAMER, C.O.; STEINBUCHER, A. The glycolate bypass of *Ralstonia eutropha*. **FEMS Microbiology Letters.**, v. 228, p. 63-71, 2003.

WANKE, B.; AIDE, M.A. Capítulo 6 – Paracoccidioidomicose. **J. Bras. Pneumol.**, v. 35 (12), p. 1245-1249, 2009.

WESTERMEIER, R.; LOYLAND, S.; ASBURY, R. Proteomics technology. **J Clin Ligand Assay.**, v. 25, p. 1-11, 2002.

WILLIAMSON, P.R. Laccase and melanin in the pathogenesis of *Cryptococcus neoformans*. **Front Biosci.** v. 2 p. 99-107, 1997.

WILKINSON, S.R.; MEYER, D.J.; TAYLOR, M.C.; BROMLEY, E.V.; MILES M.A.; KELLY, J.M. The *Trypanosoma cruzi* enzyme TcGPXI is a glycosomal peroxidase and can be linked to trypanothione reduction by glutathione or tryparedoxin. **J Biol Chem**, v. 277(19), p. 17062-17071, 2002.

WOLCOTT, R.G.; FRANKS, B.S.; HANNUM, D.M.; HURST, J.K. Bactericidal potency of hydroxyl radical in physiological environments. **J Biol Chem.**, v. 269(13), p. 9721-9728, 1994.

