

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA**

“Estudo de diferentes isolados de *Paracoccidioides brasiliensis* quanto ao padrão de adesão e expressão de ligantes da matriz extracelular.

Orientadora: Profa. Dra. Maria José Soares Mendes Giannini

Orientada: Julhiany de Fátima da Silva

ARARAQUARA

2008

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA**

“Estudo de diferentes isolados de *Paracoccidioides brasiliensis* quanto ao padrão de adesão e expressão de ligantes da matriz extracelular.

Trabalho apresentado à Comissão examinadora
para a obtenção do título de Mestre no Programa de Pós
Graduação em Análises Clínicas da Faculdade de
Ciências Farmacêuticas de Araraquara da Universidade
Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” - UNESP.

Orientadora: Profa. Dra. Maria José Soares Mendes Giannini

Orientada: Julhiany de Fátima da Silva

ARARAQUARA

2008

Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação

Silva, Julhiany de Fátima da

S586e Estudo de diferentes isolados de *Paracoccidioides brasiliensis* quanto ao padrão de adesão e expressão de ligantes da matriz extracelular. / Julhiany de Fátima da Silva. – Araraquara, 2008.
72 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Análises Clínicas

Orientador: Maria José Soares Mendes Giannini

1.Paracoccidioidomicose. 2.Adesão a matriz extra celular.
3.Micologia. I.Giannini, Maria José Soares Mendes, orient. II. Título.

CDD: 616.969

CAPES: 40300005

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Micologia Clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas-UNESP Araraquara. Recebeu apoio financeiro da Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de nível Superior (CAPES) e do PADC-FCFAR.

*“Não importa onde você parou...
Em que momento da vida você cansou...
O que importa é que sempre é possível e necessário
RECOMEÇAR.
Recomeçar é dar uma nova chance a si mesmo...
É renovar as esperanças na vida
E o mais importante...
Acreditar em você de novo.
Sofreu muito neste período?
Foi aprendido...
Chorou muito?
Foi limpeza da alma...
Ficou com raiva das pessoas?
Foi para perdoá-las um dia...
Sentiu-se só por diversas vezes?
Foi porque fechaste a porta até para os anjos...
Acreditou em tudo que estava perdido?
Era o início da tua melhora...
Onde você quer chegar?
Ir alto?
Sonhe alto...
Queira o melhor do melhor...
Se pensarmos pequeno
Coisas pequenas teremos...
Mas, se desejarmos fortemente o melhor...
E, principalmente...
Lutarmos pelo melhor...
O melhor vai se instalar em nossa vida.
Porque sou do tamanho daquilo que vejo,
E não do tamanho da minha altura.”*

ORAÇÃO DA SERENIDADE

Senhor, fazei-me instrumento de vossa paz.

Onde houver ódio, que eu leve o amor;

Onde houver ofensa, que eu leve o perdão;

Onde houver discórdia, que eu leve a união;

Onde houver dúvida, que eu leve a fé;

Onde houver erro, que eu leve a verdade;

Onde houver desespero, que eu leve a esperança;

Onde houver tristeza, que eu leve a alegria;

Onde houver trevas, que eu leve a luz.

Ó Mestre, Fazei que eu procure mais

Consolar, que ser consolado;

compreender, que ser compreendido;

amar, que ser amado.

Pois, é dando que se recebe,

é perdoando que se é perdoado,

e é morrendo que se vive para a vida eterna.

Concedei-me Senhor, a serenidade necessária para aceitar as coisas que eu não posso modificar, coragem para modificar aquelas que eu posso, e sabedoria para distinguir uma das outras.

DEDICO

Em especial, ao meu filho Giulliano, que veio para iluminar os meus dias, a força necessária para eu lutar em todos eles. A minha primeira conquista, talvez a mais gratificante de todas elas. VOCÊ É A RAZÃO DA MINHA VIDA.

À minha família (Mãe, Pai, Daiany, Caio, Giu, Vó Quinha, meus tios Samuel e Cássia e aos meus primos Samuel e Leonardo) pela força, compreensão, paciência, solidariedade e respeito. Por acreditarem e me incentivarem em todos os momentos. Por me auxiliarem a superar todas as dificuldades e chegar até o final. Pelo amor e pelo carinho, mesmo diante de todas as adversidades.

AMO MUITO VOCÊS.

À Profa Dra Maria José Soares Mendes Giannini (Zezé) pelo exemplo. Uma pessoa fantástica em todos os aspectos.
Obrigada pela oportunidade, pelo convívio, pelos ensinamentos, pela paciência e por lançar desafios todos os dias. Você me fez crescer muito mais do que eu poderia imaginar.

AGRADECIMENTOS

À LIGAÇÃO COVALENTE, Bia, Carol, Camila, Joyce, Maira e Maisa, que mesmo geograficamente distante, estiveram presentes me apoiando para vencer mais essa etapa. Vocês foram e são fundamentais nas minhas conquistas.

Às minhas amigas da cultura celular, Pat e Ju Monteiro, que muito me ensinaram e me incentivaram para chegar até aqui.

À Rô e à Tosca, as minhas “mães” no laboratório, pela paciência, ensinamentos e convívio.

Aos meus companheiros de pós graduação, Marcelo, Ana Marisa, Tati, Lili, Aline, José Nelson, Regina pelo convívio, pela paciência e por compartilhar todas as dificuldades e desafios encontrados nessa etapa.

Ao Marcelo, pela paciência nipônica em todos os momentos me auxiliando na execução deste trabalho.

À Tatiane e à Marilía (Chuchu) pelas boas conversas até São Carlos.

A todos os estagiários da Micologia, Pi, Dri, Roberta, Marina, Ju Pitica, Fábio, Natália, Carol, Fer, Marciano, Alex Rodrigo, Gabi, Flávia pelo auxílio, por proporcionar a oportunidade de ensino e também pelas boas risadas.

Aos que já concluíram a passagem por esse laboratório, (Pat, Lilian, Rosana, Susana, Simone, Gerson...), mas que deixaram muitos ensinamentos e também muitas saudades. .

À Eliana e a Tirene, pela paciência, dedicação, boa vontade e boas risadas durante esse período.

À Profa Dra Christiane Pienna Soares, pela oportunidade inicial, pelo apoio e também pelos ensinamentos.

Á todos os agregados da Micologia, Bel Cito, Marisa Imuno, Gustavo, pela colaboração e pelo bom convívio.

Á Ana Carolina Malaspina, pelo auxílio nas análises utilizando o Bionumerics.

Às meninas da pós-graduação, Laura, Sônia e Claudia, pela paciência e todo o apoio técnico para a realização deste trabalho.

A FAPESP, ao PADC-FCFAR e à CAPES pelo apoio financeiro.

A todos aqueles que por ventura eu tenha me esquecido, mas que acreditaram em mim e me deram força para concluir este trabalho, e, especialmente àqueles que duvidaram, pois estes últimos me deram a oportunidade de provar o quão eles estavam enganados.

SUMÁRIO

	PAG
Resumo	1
Abstract	3
I. Introdução	5
II. Proposição	14
III. Objetivos específicos	14
IV. Metodologia	15
1. Microrganismo	15
2. Cultura de células	15
2.1. Infecção de <i>P. brasiliensis</i> à células epiteliais	16
3. Extração de DNA genômico	16
3.1. Análise por RAPD-PCR	17
3.2. PCR fingerprinting	17
3.3. Análise de dados	18
4. Preparo de extratos de <i>P. brasiliensis</i>	18
5. Análise protéica por eletroforese bidimensional	18
6. Caracterização de proteínas de <i>P. brasiliensis</i> como ligantes de componentes da MEC por <i>Far-western</i>	18
V. Resultados	20
1. Testes de infecção de <i>P. brasiliensis</i> em cultura de células epiteliais	20
2. RAPD-PCR dos isolados de <i>P. brasiliensis</i> após o reisolamento	21
3. PCR fingerprinting	22
a)M13	22
b)GACA4	23
4. Análise dos perfis genotípicos obtidos	24
5. Análise protéica por eletrofores bidimensional e caracterização das proteínas como ligantes da MEC por <i>Far-western</i>	28
VI. Discussão	42
VII. Conclusões	49
VIII. Referencias Bibliográficas	50
Interactions of <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> with host cells: recent advances	

LISTA DE FIGURAS

	PAG
Figura 1: Comparação da capacidade de infecção dos isolados de <i>P. brasiliensis</i> avaliados antes e após o reisolamento por período de incubação de 5 horas com células A549.	20
Figura 2: RAPD - PCR demonstrativo dos isolados de <i>P. brasiliensis</i> após o reisolamento, amplificados com a seqüência iniciadora 4 do sistema comercial Ready-to-Go (GE Healthcare).	22
Figura 3: Amplificação com a seqüência minisatélite M13 dos isolados de <i>P. brasiliensis</i> após o reisolamento.	23
Figura 4: Amplificação com a seqüência microsátélite (GACA) ₄ dos isolados de <i>P. brasiliensis</i> após o reisolamento.	23
Figura 5: Dendrograma dos isolados de <i>P. brasiliensis</i> após o reisolamento, obtido pela análise dos produtos de amplificação com a seqüência iniciadora OPJ4 do sistema comercial Ready-to-Go.	25
Figura 6: Dendrogramas dos isolados de <i>P. brasiliensis</i> após o reisolamento, obtido pela análise dos produtos de amplificação com a seqüência iniciadora M13	26
Figura 7: Dendrograma dos isolados de <i>P. brasiliensis</i> após o reisolamento, obtido pela análise dos produtos de amplificação com a seqüência iniciadora (GACA) ₄ .	27
Figura 8: Eletroforese bidimensional do extrato "cell free" de isolado 01R3 de <i>P. brasiliensis</i> após reisolamento	30
Figura 9: Diagrama representativo das proteínas do extrato "cell free" do isolado 01 de <i>P. brasiliensis</i> capazes de se ligarem aos componentes da MEC	31
Figura 10: Eletroforese bidimensional do extrato "cell free" do isolado 113R3 de <i>P. brasiliensis</i> após reisolamento	33
Figura 11: Diagrama representativo das proteínas do extrato "cell free" de isolado 113 de <i>P. brasiliensis</i> capazes de se ligarem aos componentes da MEC.	34
Figura 12: Eletroforese bidimensional de antígeno "cell free" do isolado	35

265 de *P. brasiliensis* após reisolamento.

Figura 13: Diagrama representativo das proteínas do extrato “cell free” de isolado 265 de *P. brasiliensis* capazes de se ligarem aos componentes da MEC. 36

Figura 14: Eletroforese bidimensional de antígeno “cell free” do isolado 339 de *P. brasiliensis* após reisolamento. 38

Figura 15: Ensaio de *Far Western* do antígeno “cell free” do isolado 339 de *P. brasiliensis* demonstrando a capacidade de ligação das isoformas da gp43 à laminina, à fibronectina e ao colágeno tipo I antes e após o reisolamento. 39

Figura 16: Diagrama representativo das proteínas do extrato “cell free” de isolado 265 de *P. brasiliensis* capazes de se ligarem aos componentes da MEC 39

LISTA DE TABELAS

	PAG
.Tabela 1: Descrição dos isolados de acordo com a capacidade de infecção às células A549	21
.Tabela 2: Correlação entre quatro isolados de <i>P. brasiliensis</i> , antes e após reisolamento de cultura de células, suas proteínas expressas, a variação de massa molecular (MM) e dos pls.	28
.Tabela 3: Proteínas dos extratos “cell free” de quatro isolados de <i>P. brasiliensis</i> com capacidade de ligação à MEC	29
.Tabela 4: Proteínas do extrato “cell free” de isolado 01 de <i>P. brasiliensis</i> capazes de se ligarem aos componentes da MEC	31
.Tabela 5: Proteínas do extrato “cell free” de isolado 113 de <i>P. brasiliensis</i> capazes de se ligarem aos componentes da MEC	34
.Tabela 6: Proteínas do extrato “cell free” de isolado 265 de <i>P. brasiliensis</i> capazes de se ligarem aos componentes da MEC	36
.Tabela 7: Proteínas do extrato “cell free” de isolado 339 de <i>P. brasiliensis</i> capazes de se ligarem aos componentes da MEC	40
Tabela 8: Proteínas ligantes aos componentes da MEC presentes em mais de um isolado de <i>P. brasiliensis</i>	40
Tabela 9: Proteínas de <i>P. brasiliensis</i> capazes de se ligar a mais de um constituinte da MEC	41

LISTA DE ABREVIATURAS

%	Porcentagem
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µm	Micrômetro
ADS	Fator de ribosilação de ADP (difosfato de adenina)
ALS	Alanina sintetase
ATV	Solução de tripsina-EDTA-versene (Adolfo Lutz)
CaCl₂	Cloreto de cálcio
CES	Tampão constituído de citrato de sódio, EDTA e sorbitol
CHS₂	Quitina sintetase
cm	Centímetro
CTAB	Cloreto de Cetil Trimetil Amônio
DNA	Ácido deoxiribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ESTs	Expressed Sequence Tags
fase L	Fase leveduriforme de <i>P. brasiliensis</i>
fase M	Fase miceliana de <i>P. brasiliensis</i>
FKS	β 1,3 glucana sintetase
g	Gramma
gp	Glicoproteína
GAPDH	Gliceraldeído-3- fosfato d eidrogenase
Gir2	Girase-2
GPI	Glicosyl phosphatidil inositol
h	Hora
Hsp	Proteínas de choque térmico
kDa	Kilodalton
M	Molaridade
Mb	Megabase
MEC	Matriz extracelular
MgCl₂	Cloreto de magnésio
MM	Massa molecular

MS	Espectrometria de massa
mg	Miligrama
min	Minuto
mL	Mililitro
mM	Milimolar
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
ng	Nanograma
nm	Nanômetro
nº	Número
°C	Graus Celsius
pb	Pares de base
Pb	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
PBS	Tampão salina fosfato
PBS-T	Tampão salina fosfato com 0,05% de tween-20
PBS-T-BSA	Tampão salina-fosfato acrescido de Tween20 e soroalbumina bovina
PCM	Paracoccidioidomicose
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PRRs	Proteínas com regiões ricas em prolina
RAPD	Polimorfismos de DNA pela amplificação randomizada (<i>Random Amplified Polymorphic DNA</i>)
RFLP	Polimorfismos gerados pelo fragmento de restrição (<i>Restriction Fragment Length Polymorphisms</i>)
RNA	Ácido ribonucléico
rpm	Rotações por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
SFB	Soro fetal bovino
TBE	Tampão constituído de tris, ácido bórico e EDTA
TdT	Deoxinucleotidil terminal transferase
TE	Tampão constituído de tris e EDTA
UPGMA	Unweighted Pair-Group Method, Arithmetic averages

RESUMO

Paracoccidioides brasiliensis é um fungo dimórfico causador da paracoccidioidomicose, doença de comprometimento orgânico múltiplo e de evolução prolongada. A virulência de *P. brasiliensis* pode ser atenuada ou perdida após subseqüentes ciclos de subcultivos durante longos períodos e restabelecida após inoculações em animais ou pela passagem em cultura de células. Um aspecto importante na interação entre *P. brasiliensis* e seu hospedeiro é a habilidade do fungo em aderir aos componentes da matriz extracelular. O entendimento e identificação destas moléculas revestem-se de importância na descoberta de tratamentos eficientes para as micoses sistêmicas. Assim, neste trabalho, foram estudados 13 diferentes isolados de *P. brasiliensis* quanto ao padrão de infecção à cultura de células epiteliais pulmonares (A549), genotipagem com os iniciadores OPJ4, M13 e GACA4 empregando as técnicas de RAPD e PCR *fingerprinting*, bem como a verificação de proteínas expressas diferencialmente, e sua capacidade de ligação a componentes da matriz extracelular (MEC). Os diferentes isolados de *P. brasiliensis* apresentaram maior capacidade de infecção após reisolamento de células epiteliais. As amostras mais aderentes foram Pb18, Pb2508 e Pb2367 e as menos aderentes foram Pb2669, Pb2508 e Pb2367. Quanto aos genótipos, perfis diferenciais foram observados e correlação com padrão de infecção e distribuição geográfica foi observada para alguns isolados com dois dos iniciadores (OPJ4 e M13). A análise protéica dos extratos “*cell free*” de *P. brasiliensis*, por eletroforese bidimensional também forneceu perfis diferenciais entre as amostras subcultivadas e reisoladas e 62 ligantes de colágeno tipo I, 18 de laminina e 23 de fibronectina de um total de 420 proteínas expressas foram observados. Os isolados Pb01 e Pb339 apresentaram ligantes para fibronectina apenas após o reisolamento, mostrando que aparentemente estes ligantes possam ter papel na patogenicidade. O mesmo ocorreu com Pb01 para colágeno. O isolado Pb113, mesmo após reisolamento, não apresentou ligantes de laminina, enquanto que Pb265 não apresentou ligantes para fibronectina. Assim, de acordo com estes dados pode-se verificar que dependendo do isolado tem-se diferentes padrões de ligantes a MEC. Número expressivo de proteínas, com características de ligantes a MEC, foi observado chamando atenção de sua maior expressão após reisolamento em culturas celulares. Assim pode ser predito que se poderá encontrar múltiplas

adesinas, distintas dependendo da condição do microambiente. Deve-se imaginar que esta multiplicidade seja maior à medida que o microrganismo tem capacidade de se alojar em diferentes tecidos. Este perfil diferencial de ligantes de MEC sugere a habilidade de expressão destes ligantes durante a interação fungo-hospedeiro.

ABSTRACT

Paracoccidioides brasiliensis is a dimorphic fungus, etiologic agent of paracoccidioidomycosis, disease of multiple organic implications and prolonged evolution. *P. brasiliensis* virulence can be attenuated or lost after subsequent cycles of subculture for during long periods and reestablished after by the passage in animals or in the epithelial cells culture. The success of colonization is a complex event, generally involving a ligand coded by the pathogen (adhesins) and a cell receptor. An important aspect in the interaction between *P. brasiliensis* and your host is the ability to adhere to matrix extracellular components (ECM). This fungal employs a series of strategies to colonize and to disseminate, including ligands. The understanding and identification of these molecules is very important in the discovery of efficient treatments for the systemic mycoses. The aim of this study was to investigate the *P. brasiliensis* infection pattern to the pulmonary epithelial cells (A549), the molecular typing by RAPD and PCR fingerprinting using, respectively, the primers OPJ4, M13 and GACA4, as well as the protein expressed and the ligand to ECM of the different strains. All *P. brasiliensis* isolates presented different capacity to adhere to epithelial cells. The most and less adherent isolates were respectively Pb18, Pb2508ar and Pb2367ar, and Pb2669ar, Pb113 e Pb2663ar. Regarding the genomic polymorphisms, differential RAPD's profiles and PCR fingerprinting were observed and a relative correlation with the infection pattern and geographical distribution could be observed. The profile of four *P. brasiliensis* "cell-free" extracts from subcultivated and reisolated strains was analysed by two-dimensional electrophoresis. Differentially expressed proteins were identified. Furthermore, a lot of ligands were observed to ECM components, 62 ligands to collagen type I, 23 to fibronectin, and 18 to laminin of a total of 420 proteins. The isolates Pb01 and Pb339 presented fibronectin ligands only after reisolated from epithelial cells, apparently showing that these ligands may have role in pathogenicity. The same occurred with Pb01 to collagen. The Pb113, even after reisolated, did not present laminin ligands, whereas Pb265 not presented fibronectin ones. Thus, this study suggested that different patterns of the ECM ligands could occur depending on the isolate. On the other hand, multiple adhesins can appear, depending on the condition of the microenvironment. We could imagine that this diversity is greater as the microorganism is capable to accommodate in different tissues.

Expressive number of proteins, with characteristics of ECM ligands, was observed mainly after passage in the epithelial cultures. These differential profile ligands could be associated of the capability of this fungal to express different proteins in fungal-host interaction.

I. INTRODUÇÃO

O aumento das doenças fúngicas tornou-se um problema significativo de saúde pública, afetando parte da população mundial e causando conseqüentemente diminuição da qualidade e da expectativa de vida. A paracoccidioidomicose (PCM) é uma micose de grande importância em razão da gravidade de algumas de suas formas anátomo-clínicas e de suas taxas de mortalidade (LACAZ et al., 1994; BITTENCOURT et al., 2005). A PCM tem como principal agente etiológico *Paracoccidioides brasiliensis* que é fungo dimórfico que cresce na fase miceliana (M), saprobiótica, em temperaturas de 25° a 27°C, sob a forma de colônias cotonosas e esbranquiçadas. Em meios enriquecidos a 37° C desenvolve-se a fase leveduriforme (L) que constitui a forma parasitária do fungo, apresentando-se como células arredondadas, de parede dupla e brotamentos múltiplos característicos, com estruturas fúngicas semelhante às encontradas nos tecidos (LACAZ, 1994).

De acordo com a seqüência de subunidades 28S e 18S do RNA ribossomal, *Paracoccidioides brasiliensis* tem relação filogenética com os demais fungos termo-dimórficos (PETERSON E SIGLER, 1998, BIALEK et al., 2000). Assim, este fungo é classificado taxonomicamente no Reino Fungi, Divisão Eumycota, Subdivisão Ascomycota, gênero *Paracoccidioides* e espécie *brasiliensis* (GUARRO et al., 1999). O fungo apresenta 4-5 cromossomos, com variações de 2-10 Mb (MONTROYA et al., 1997;). O tamanho do genoma foi calculado em 30 Mb (CANO et al., 1998), com aproximadamente 7.500 a 9.000 genes, números que estão de acordo com o calculado em genomas de fungos pertencentes aos ascomicetos.

Isolados de *P.brasiliensis* diferem quanto à morfometria, número de brotos, capacidade de conversão de micélio para levedura e velocidade de crescimento (SVIDZINSKI et al.,1999; KASHINO et al., 1987). A variabilidade genética foi verificada nos últimos anos através de várias metodologias, como eletroforese de campo pulsado (MONTROYA et al., 1997; FEITOSA et al., 2003), RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), (CALCAGNO et al., 1998; SOARES et al., 1995). Em alguns trabalhos foi utilizada esta ultima metodologia para investigar a possível relação entre isolados de *P. brasiliensis* e origem geográfica, virulência ou tipo de patologia (SOARES et al., 1995 ; CALCAGNO et al. 1998; MOLINARI-

MADLUM et al., 1999; McEWEN et al., 2000; TOTTI et al., 1999; MOTTA et al., 2002; KUROKAWA et al., 2005). Recentemente, foi proposta a existência de três diferentes espécies filogenéticas (S1, PS2 e PS3) em *P. brasiliensis* (MATUTE et al., 2006). Para tanto, compararam as seqüências de oito regiões de cinco loci diferentes do genoma, correspondentes aos genes que codificam quitina sintetase 2 (CHS2), β -1,3 glucana sintetase (FKS), α -tubulina, fator de ribosilação de ADP (ADS), e o antígeno gp 43 (PbGP43). Baseado no polimorfismo deste último, 17 isolados provenientes de pacientes com as formas pulmonares e linfáticas foram analisados e seis genótipos foram descritos (MORAIS et al., 2000; CARVALHO et al., 2005). No entanto, em poucos casos alguma associação foi encontrada e a literatura ainda é controversa (HAHN et al., 2003). Poucos trabalhos apresentam correlação positiva entre grupos genéticos e virulência (CARVALHO et al., 2005; MOLINARI-MADLUM et al., 1999).

A via inalatória foi sugerida como o principal acesso das formas infectantes do fungo ao pulmão, pelos dados obtidos em estudos experimentais (Mc EWEN et al., 1987), pela existência de infecções assintomáticas ou subclínicas (LACAZ et al., 1959; POSADA 1968), pelo prolongado período de incubação da doença (MOLESE et al., 1957; OLIVEIRA & BAPTISTA, 1960; PEREIRO, 1974) e a demonstração de involução de lesões pulmonares no homem (MOTTA, 1956). Assim, esta via foi sugerida como a principal para a penetração do fungo no hospedeiro. As manifestações clínicas da micose podem ser variadas, desde lesões cutâneas e/ou em mucosas, podendo ocorrer comprometimento orgânico múltiplo e a doença pode ser de curso mais rápido, no caso das formas aguda/subaguda ou de evolução prolongada, na forma crônica (FRANCO et al., 1994).

Os agentes de micoses sistêmicas possuem alguns fatores que permitem o seu crescimento nas condições adversas proporcionadas pelo hospedeiro, que podem contribuir para o desenvolvimento da doença (CASADEVALL & PIROFSKI, 1999). A interação entre os determinantes de virulência do agente e os mecanismos de defesa do hospedeiro resulta num processo complexo cujo conhecimento permite melhor entendimento da patogênese das micoses sistêmicas. Assim, *P. brasiliensis* possui mecanismos que o capacitam a aderir, extravasar e invadir barreiras impostas pelos tecidos do hospedeiro (MENDES-GIANNINI et al. 1994; LOPES et al., 1985; LENZI et al., 2000), sintetizando várias

substâncias que participam direta ou indiretamente da relação parasito-hospedeiro. A estrutura antigênica de *P. brasiliensis* é bastante complexa; cerca de 60 componentes solúveis foram descritos incluindo glicoproteínas e proteínas com e sem atividade enzimática (YAZÁRBAL, 1982). Estudos da correlação entre alguns destes componentes e seu papel na virulência estão entre os assuntos abordados de grande importância.

A diferenciação da fase miceliana para a leveduriforme, dependente de temperatura é essencial na ocorrência da PCM (SAN-BLAS et al., 1982). Durante esse processo, modificações na composição de parede celular, composta de quitina e glucanas são as mais conhecidas. Tanto em *P. brasiliensis* quanto em outros fungos patogênicos, a quitina representa um importante componente da parede celular relacionada a várias funções na morfogênese, integridade da parede, desenvolvimento de conidióforos, ou estruturação de moléculas como adesinas (SAN-BLAS et al., 2002). A quitina está presente em ambas as fases (miceliana e leveduriforme), mas na leveduriforme a quantidade deste polissacarídeo é três vezes maior, além disso a conformação das glucanas também é diferente, sendo que isolados menos virulentos tem menor quantidade α -1,3 glucana. Assim, foi sugerido um possível papel desses polissacarídeos na patogenicidade desse fungo (SAN-BLAS & SAN-BLAS, 1994). Paralelamente, nas últimas décadas estudos de genes e proteínas envolvidos na transição de fases ou relacionados à virulência foram feitos e dois projetos genômicos foram concluídos, além de outros estudos, contribuindo para aumentar o conhecimento de genes deste fungo (FELIPE et al., 2005; GOLDMAN et al., 2003; MARQUES et al., 2004; NUNES et al., 2005; TAVARES et al., 2007). No entanto, os estudos para comprovação de genes envolvidos em virulência demandam a obtenção de mutantes, cujo desenvolvimento exige sistemas de transformação e outros, pouco estabelecidos neste fungo (ALMEIDA et al., 2007).

A estabilidade da virulência em diferentes isolados de *P. brasiliensis* é assunto importante em abordagens envolvendo o estudo da virulência deste fungo. Esta pode ser atenuada ou perdida após subseqüentes ciclos de subcultivos durante longos períodos (BRUMMER et al., 1990) e restabelecida após inoculações em animais (CASTANEDA et al., 1987) ou através da passagem por culturas celulares (ANDREOTTI et al., 2005).

Esforços no sentido de caracterizar a composição antigênica e de identificar um antígeno espécie-específico levaram diferentes autores a estudar a glicoproteína de 43kDa (gp43) considerada como molécula antigênica altamente específica para o diagnóstico sorológico da paracoccidiodomicose (CAMARGO et al., 1988; MENDES-GIANNINI et al., 1989; PUCCIA et al., 1991) e que também estaria envolvida nos mecanismos de adesão de *P. brasiliensis* (VICENTINI et al., 1994; ANDRÉ et al., 2004; HANNA et al., 2000; MENDES-GIANNINI et al., 2000). 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 45kDa (CASOTTO, 1990; FERREIRA-DA-CRUZ et al., 1992), uma proteína recombinante de 27kDa (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 sintetizados preferencialmente na fase leveduriforme de *P. brasiliensis* foram identificados sendo altamente homólogos a catalase, frutose-1,6-bifosfato, aldolase, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, malato desidrogenase e trifosfato isomerase de várias origens (FONSECA et al., 2001). Outra proteína aracterizada 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 78kDa presentes na fase leveduriforme de *P. brasiliensis* em que o sequenciamento de aminoácidos revelou identidade a manosil e glicosiltransferases de várias origens.

Os modelos envolvendo técnicas de culturas de células de mamíferos podem ser utilizados no intuito de se estudar a interação parasito-hospedeiro. MENDES-GIANNINI et al., (1994) utilizaram culturas de células da linhagem Vero (rim de macaco verde da África) e demonstraram que *P. brasiliensis* deve apresentar mecanismos de adesão e de invasão. *P. brasiliensis* (isolado 113) foi capaz de aderir (MENDES-GIANNINI et al., 1992), e de invadir células epiteliais de linhagem contínua (MENDES-GIANNINI et al., 2000; MENDES-GIANNINI et al., 1994). HANNA (1995) e UEMURA (1996) estudaram a cinética do processo de interação de *P. brasiliensis* às culturas celulares Vero e HeLa, respectivamente e, os prováveis fatores envolvidos nesta interação. *P. brasiliensis* foi capaz de aderir às células epiteliais e os isolados mais virulentos para animais

apresentavam maior capacidade de adesão (HANNA et al., 2000). A adesão de *P. brasiliensis* às células foi feita aparentemente por um pequeno túbulo (HANNA, 1995; HANNA, 1996; UEMURA, 1996) e ao redor da área de adesão do fungo à célula epitelial puderam ser observadas alterações nas membranas celulares, com presença de cavitações circunscritas ao redor do elemento fúngico e também vacúolos, resultantes provavelmente dos produtos extracelulares do fungo ou através de um processo fagocitário da própria célula hospedeira (MONTEIRO DA SILVA et al., 2001).

O sucesso de colonização dos tecidos do hospedeiro pelo fungo é, portanto, um evento complexo, geralmente envolvendo um ligante codificado pelo patógeno e um receptor da célula. A adesão é conferida por uma classe de proteínas especiais presentes na parede celular denominadas de adesinas. O conhecimento da composição da parede celular e dos componentes exocelulares dos fungos contribui para a identificação de ligantes na superfície celular de patógenos. Fibrinogênio, sistema complemento e vários componentes da matriz extracelular estão entre as proteínas do hospedeiro que podem se ligar às proteínas da parede celular dos fungos. Estes componentes podem funcionar como adesinas capazes de mediar interações do fungo com tecidos do hospedeiro durante a infecção.

Os avanços na caracterização de *P. brasiliensis* têm redundado também em maior conhecimento das adesinas deste fungo. Castro et al., 2005 realizaram um rastreamento das proteínas GPI ancoradas deste fungo, entre estas, há adesinas ligantes da matriz extracelular. Da mesma forma, Tomazett et al., 2005 estudaram as enzimas possivelmente envolvidas na biossíntese e remodelagem de polissacarídeos da parede celular, que tem potencial de influenciar na adesão às células do hospedeiro. Uma das estratégias possivelmente utilizadas pelo patógeno e depreendidas a partir de análises de redundância de ESTs no processo infeccioso (BAILÃO et al., 2006; 2007; BASTOS et al., COSTA et al., 2007), seria a expressão de genes relacionados ao seu micro nicho, envolvendo adaptação às condições do hospedeiro, e conseqüentemente, também podem influenciar no padrão de adesinas.

Em geral, os genes envolvidos em adesão não são constitutivamente expressos, mas sim ativados quando induzidos quando interagem no sítio de infecção no hospedeiro (CHENG et al., 2005). Uma indicação da variabilidade e

da especificidade sítio-infecção de diferentes adesinas refere-se ao modelo de *Candida albicans*, em que vários genes são diferencialmente expressos dependendo do hospedeiro. Mais especificamente, os genes ALS2, 3, 6, 7 e 9 são altamente expressos, enquanto ALS4 e ALS5 são reprimidos em modelo de candidíase vaginal (CHENG et al., 2005). Por outro lado, isolados orais mostram expressão forte de ALS1, 2, 3, 4, 5 e 9, enquanto ALS6 e ALS7 são reprimidos (GREEN et al., 2004). Esta expressão diferencial reflete a habilidade de expressão de adesinas em determinada condição. O uso de moléculas de superfície, entre outras, faz parte das estratégias do microrganismo para evadir-se do sistema imune e para a sua própria sobrevivência no hospedeiro. Adesinas estão sujeitas a trocas epigenéticas subteloméricas, resultando em padrões de expressão não determinados previamente. Assim, genes relacionados a estas apresentam repetições internas seqüenciais que levam a eventos de recombinação e a formação de novas adesinas, oferecendo assim para os fungos um reservatório de propriedades de adesão (VERSTREPEN & KLIS, 2006). Análise de adesinas de *C. albicans* identificou pelo menos 60 alelos diferentes do gene ALS7 (ZHANG et al., 2003). Estes aspectos de adesão fúngica exemplificam a plasticidade e a capacidade de adaptação a ambientes diversos. Esta variação pode prover a diversidade funcional em moléculas de superfície que permitem adaptação rápida ao meio ambiente ou como mecanismo de escape do sistema imune. Assim, ativação de adesinas em patógenos humanos acontece quando as células percebem uma mudança no hospedeiro, permitindo adesão a seus tecidos para estabelecer uma colônia ou biofilme do microrganismo patogênico (VERSTREPEN et al., 2004; DOMERGUE et al., 2005; LEVDANSKY et al., 2007). No entanto, as exatas condições que permitem esta variabilidade são ainda motivo de muito estudo em vários fungos

Alguns dos ligantes fúngicos envolvidos na interação com a MEC foram identificados a nível molecular (TRONCHIN et al., 1997; YAN et al., 1998; GAUR e KLOTZ, 1997; LOPEZ-RIBOT et al., 1999; KLOTZ et al., 1993; BROMLEY e DONALDSON, 1996; GIL et al., 1996). Moléculas com características de ligantes a laminina foram descritas em *Candida albicans* (SAKATA et al., 1999; BOUCHARA et al., 1990; LOPEZ-RIBOT et al., 1994, VERSTREPEN & KLIS, 2006), *Aspergillus fumigatus* (TRONCHIN et al., 1993; GAUR & KLOTZ, 1997), *Histoplasma capsulatum* (McMAHON et al., 1995), *Penicillium marneffeii*

(HAMILTON et al., 1998; HAMILTON et al., 1999) *Blastomyces dermatitidis* (BRANDHORST et al., 2003) e *Coccidioides immitis* (HUNG et al., 2002) Fungos e bactérias expressam em sua parede celular, proteínas com regiões ricas em prolina (PRRs), e estas também devem estar envolvidas no processo de adesão aos tecidos do hospedeiro (PERFECT et al. 1998; STAAB et al., 1999).

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 43kDa 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 à fibronectina quanto à 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), indicando que a gp 43 (particularmente o peptídeo 1), participaria mais efetivamente do processo de adesão (MENDES-GIANNINI et al., 2006). Uma adesina de 30 kDa de *P. brasiliensis*, com capacidade de ligação à laminina foi isolada sendo mais expressa em isolado de *P. brasiliensis* que apresentava alta capacidade de adesão (ANDREOTTI, 2002; ANDREOTTI et al., 2005). *P. brasiliensis* também apresenta em sua superfície celular duas proteínas com massas moleculares de 19 e 32 kDa que interagem com diferentes proteínas da MEC, tais como laminina, fibronectina e fibrinogênio (GONZALEZ et al., 2005). A proteína gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) *P. brasiliensis* foi capaz de se ligar a laminina, colágeno I e fibronectina. O tratamento de formas leveduriformes de *P. brasiliensis* com anti-GAPDH e de pneumócitos com GAPDH recombinante promoveu a inibição da infecção do fungo às células epiteliais (BARBOSA et al., 2006). Recentemente, foi isolada e caracterizada uma proteína de 70KDa, 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 triosefosfato isomerase de *P. brasiliensis* que, através de ensaios de inibição com peptídeos, foi capaz de se ligar preferencialmente à laminina.

Muitos genes têm sido descritos como provavelmente envolvidos na sobrevivência de *P. brasiliensis* no hospedeiro. Entre estes há aqueles que codificam para proteínas essenciais para a vida do fungo, assim como aqueles

envolvidos na interação com seu hospedeiro, caracterizando o fenótipo patogênico (BAILÃO et al., 2006; BASTOS et al., 2007; FELIPE et al., 2005; GOLDMANN et al., 2003; TAVARES et al., 2007). A disponibilidade da seqüência genômica e as novas técnicas de ionização em espectrometria de massa têm permitido o desenvolvimento de metodologias para o estudo em nível protéico da totalidade das proteínas expressas por um genoma de um organismo ou uma célula (WESTERMEIER et al., 2002).

A análise proteômica despertou considerável atenção e importância desde a revelação que o genoma humano constitui-se 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. A análise protéica requer várias técnicas analíticas, incluindo separação eletroforética e espectrometria de massa para identificação.

Proteínas envolvidas em processos biológicos são detectadas por mudanças quantitativas, forma de regulação e modificações pós-traducionais. O primeiro passo de análise, a expressão proteômica, implica na separação e detecção de proteínas por eletroforese bidimensional de alta resolução, seguida pela identificação e caracterização das proteínas de interesse por espectrometria de massa (MS). O passo final é o entendimento das vias biológicas incluindo as funções de todas as proteínas e complexos envolvidos. Então, a análise proteômica pode ser aplicada para a identificação de alvos na descoberta de novas drogas; na identificação de marcadores na pesquisa clínica; no desenvolvimento de fármacos, na análise de interações protéicas e na observação de modificações pós-traducionais (WESTERMEIER et al., 2002).

Com esse intuito, o proteoma de diferentes microrganismos foi desenvolvido. A análise proteômica e subproteômica em *C. albicans* permitiu avanços no entendimento do dimorfismo, resposta do hospedeiro, composição da parede celular, fatores de virulência, resistência às drogas, identificação de proteínas envolvidas no metabolismo e virulência (PITARCH et al., 2003; PITARCH et al., 1999; PARDO et al, 2000; PITARCH et al., 2002; HERNÁNDEZ

et al., 2004; EBANKS et al., 2006). As proteínas secretadas por *Aspergillus flavus* também foram analisadas por abordagem proteômica (MEDINA et al., 2005). Esta abordagem em *Saccharomyces cerevisiae* permitiu a identificação de 32 proteínas envolvidas na biogênese da parede celular, enzimas glicolíticas, proteínas de choque térmico (*Hsp*) e outras envolvidas em outros processos (PARDO et al. 2000), além da caracterização de Gir2, uma proteína de 34KDa, altamente ácida e com migração eletroforética anômala (ALVES et al., 2004).

Já com *P.brasiliensis*, a abordagem proteômica permitiu o isolamento e caracterização de uma endoproteinase de 29 KDa e pI 5.8 com alta homologia com a triosefosfato isomerase (PEREIRA et al., 2007), uma adesina de 30 kDa (ANDREOTTI et al., 2005), duas de 19 e 32 KDa da fase miceliana (GONZÁLEZ et al., 2005) e a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) (BARBOSA et al., 2006). Várias proteínas da matriz podem ser receptores potenciais para os microrganismos. A laminina foi a primeira destes componentes a ser implicada na patogênese da paracoccidiodomicose (VICENTINI et al., 1997). Nosso grupo vem trabalhando nesta abordagem e outros componentes da matriz como colágeno tipo I e IV, fibronectina e entactina estão envolvidos na adesão aos tecidos do hospedeiro (MENDES GIANNINI et al., 2006). Porém, pelo exposto, pode-se verificar que os dados ainda são bastante fragmentados, não se conhecendo se estas adesinas estão presentes em diferentes isolados e se condições diferentes alteram o seu padrão de expressão.

II. PROPOSIÇÃO

A interação de *P. brasiliensis* com células epiteliais do hospedeiro humano pode ser determinante para a evolução da infecção e para a diversidade de formas clínicas na PCM. Assim, neste trabalho pretendeu-se estudar diferentes isolados de *P. brasiliensis* para verificar o seu padrão genotípico e de infecção de células epiteliais pulmonares, bem como o de proteínas com capacidade de ligação aos componentes da matriz extracelular.

III. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar os perfis genotípicos pelas técnicas de RAPD-PCR e PCR *fingerprinting* de 13 isolados de *P. brasiliensis* após passagem por cultura de células.
- Verificar capacidade de infecção dos isolados de *P. brasiliensis*, antes e após o reisolamento de cultura de células epiteliais e correlacionar com os perfis genotípicos.
- Verificar a expressão de proteínas, de quatro diferentes isolados de *P. brasiliensis* e aquelas antes e após passagem por cultura celular, com capacidade de ligação a componentes da matriz extracelular.
- Verificar o padrão de expressão de proteínas de quatro diferentes isolados de *P. brasiliensis* antes e após reisolamento da cultura de células epiteliais.
- Verificar o padrão de expressão de proteínas com características de ligantes a componentes da matriz extracelular.

IV. METODOLOGIA

1. Microrganismo

Foram empregados os seguintes isolados de *P.brasiliensis* na fase leveduriforme nos ensaios de infecção e de genotipagem: Pb 113, Pb 265 e Pb 18, procedentes da micoteca da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FM-USP), Pb 01 e Pb1578R procedentes da micoteca de M.R.R.Silva, IPTSP, UFG, Goiânia, Brasil e os isolados Pb 1921, Pb 1934, Pb 2367, Pb 2493, Pb 2508, Pb 2663, Pb 2669 e Pb2681 de pacientes com paracoccidiodomicose da região de Araraquara – SP (Pb1921 isolado em 16/07/1998, Pb1934 isolado em 12/08/1998, Pb2367 isolado em 05/07/2000, Pb2493 isolado em 19/04/2002, Pb2508 isolado em 10/06/2002, Pb2663 isolado em 21/02/2006, Pb2669 isolado em 17/03/2006 e Pb2681 isolado em 22/05/2006). No estudo de ligantes da matriz extracelular foram empregados os isolados Pb 113, Pb 265, Pb 18 e Pb 339. Este projeto foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Esses isolados foram cultivados na fase leveduriforme a 36°C em meio sólido de Fava-Netto (FAVA NETTO, 1951), por sete dias com subcultivo contínuo. Para a recuperação da virulência, os isolados foram passados em monocamadas de células epiteliais por três vezes consecutivas e então foram reisolados em meio de Fava-Netto.

2. Cultura de células.

Foi utilizada a linhagem de pneumócitos A549, células epiteliais de pulmão humano (obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro) cultivadas em meio HAM F-12 (Cultilab) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cultilab) e mantidas a temperatura de 36.5°C. Decorridos 3 a 4 dias, as garrafas de células foram submetidas à tripsinização. Para isso, a monocamada celular formada foi lavada com 1 mL de ATV-solução de tripsina 0,2% e Versene 0,02% (Adolfo Lutz) e, após lavagem, esta foi desprezada e acrescentado mais 1 mL de ATV. Seguidos 1-2 minutos, as células foram homogeneizadas com volumes variados do meio HAM F-12, acrescido de 10% de soro fetal bovino (SFB). Nesta etapa, a tripsina (ATV) foi neutralizada pelo soro fetal bovino presente no meio de cultura e o volume total da suspensão celular foi transferido para outras garrafas, de modo a se obter uma concentração celular de 10⁶ células/mL.

2.1. Infecção por *P. brasiliensis* à monocamada de células A549.

Os ensaios de infecção foram realizados sobre lamínulas em placas de 24 orifícios. A monocamada celular foi formada por aproximadamente 24h em meio HAM-F12 (Cultilab), em seguida, cada orifício foi inoculado com 300µL da suspensão padronizada de *P.brasiliensis* em PBS acrescida de 300µL de meio HAM-F12 (Cultilab). A seguir, as células infectadas foram incubadas a 36,5°C, por 5h. As lamínulas foram coradas por Giemsa e observadas em microscópio óptico e contagens do número de fungos (aderidos e invadidos) foram realizadas em 5000 células, determinando-se a porcentagem total de infecção para a avaliação da quantidade de fungos e determinação da capacidade de infecção de cada um dos isolados da monocamada de células epiteliais antes e após o reisolamento.

3. Extração do DNA genômico dos isolados de *P. brasiliensis*

O DNA dos isolados de *P. brasiliensis* foi extraído de acordo com Lasker et al., 1992. As células leveduriformes foram lisadas em 100 mg/mL de *Lysing Enzyme from Trichoderma harzianum* (Sigma L1412) em tampão CES (Citrato de sódio 20mM, EDTA 50mM, Sorbitol 0,9M) a 30°C por 3 horas, sob agitação. Os protoplastos obtidos foram lavados adequadamente por centrifugação com tampão de estabilização CES. Em seguida, adicionou-se 500 µL de tampão de lise (Tris 10mM, EDTA 1mM, pH 8,0, N – lauryl sarcosine (1%) e 650µg/mL proteinase K-GIBCO) e incubou-se a 65°C por 1 hora. Após este período, 200 µL de NaCl 5M foram adicionados e incubou-se a 65°C por 10 minutos. Em seguida, adicionou-se 100 µL de solução 10% de CTAB/NaCl 4,1% e incubou-se novamente a 65°C por 20 minutos. Adicionou-se RNase A 50 µg/mL (Roche Diagnóstica) a 37°C por 1 hora. Duas extrações, com igual volume de clorofórmio isoamílico (24:1), foram realizadas com centrifugação em 17500xg por 10 minutos. O DNA foi precipitado com igual volume de isopropanol a – 20°C por 30 minutos. Outra centrifugação foi feita a 17500 x g /10 min e depois foi feita lavagem com etanol 70%. Em seguida, foi feita outra centrifugação em 17500xg por 5 minutos a 4°C. Após isto, o DNA obtido foi seco, ressuspenso em Tampão TE (Tris 40mM, EDTA 2mM, pH7.5) a 37°C por 1h. A determinação da pureza do DNA foi feita pela relação da leitura espectrofotométrica em densidade óptica a 260nm e 280nm e a quantificação, pela densidade óptica 260nm. (SAMBROOK et al., 2001). A eletroforese foi feita em gel 1% de agarose com tampão TBE (Tris

45mM, Ácido Bórico 45mM, EDTA 10mM pH7,5) 1x. A corrida foi realizada durante 1 hora e visualizada através de brometo de etídio em luz ultravioleta.

3.1 Análise por RAPD-PCR

A tipagem molecular dos isolados de *P. brasiliensis* foi realizada pela reação de RAPD ("Random Amplified Polymorphic DNA") com o Sistema comercial Ready to go (GE Healthcare). Foi utilizada a seqüência iniciadora 4 do sistema comercial Ready to go / RAPD Analysis Beads – GE Healthcare (5'-d[AAGAGCCCGT]-3'). Cada mistura reacional de RAPD continha 30ng/μL de DNA de *P. brasiliensis*, 25pmol da sequencia iniciadora 4 do Sistema comercial Ready to go e a mistura liofilizada deste mesmo Sistema comercial (contém 0,4mM de uma mistura de dNTP, 3mM de MgCl₂ e Taq DNA polymerase). A amplificação foi feita no termociclador (Perkin Elmer, mod Gene Amp PCR System 9700) através do seguinte ciclo: desnaturação de 95°C durante 5 minutos e 45 ciclos de 95°C por 1 minuto, 36°C por 1 minuto e 72°C por 2 minutos. Os produtos de amplificação obtidos foram analisados por eletroforese em gel de agarose 2.0% em tampão TBE 1x durante 2 horas e 30 minutos a 150 volts. Como marcador molecular foi usado 100 pb "Ladder" (GIBCO). Foi realizada coloração com brometo de etídio na concentração de 0,5-g/mL, visualização à luz ultravioleta e fotodocumentação.

3.2.PCR fingerprinting

Foram utilizadas as seqüências minisatélite específica do fago tipo-selvagem M13 (GAGGGTGGCGGTTCT) e a microsátélite específica (GACA)₄. Cada mistura reacional continha 30ng/μL de DNA de *P. brasiliensis*, 25pmol de cada seqüência iniciadora específico e a mistura liofilizada do Sistema comercial Ready to go (contém 0,4mM de uma mistura de dNTP, 3mM de MgCl₂ e Taq DNA polymerase). A amplificação foi feita no termociclador (Perkin Elmer, mod Gene Amp PCR System 9700) por 35 ciclos de 94°C por 20 segundos, 50°C por 1 minuto e 72°C por 20 segundos, seguidos por uma extensão final a 72°C por 6 minutos. Os produtos de amplificação obtidos foram analisados por eletroforese em gel de agarose 2.0% em tampão TBE 1x durante 2 horas e 30 minutos a 150 volts. Como marcador molecular foi usado 100 pb "Ladder" (GIBCO). Foi realizada

coloração com brometo de etídio na concentração de 0,5-g/mL e visualização à luz ultravioleta com fotodocumentação.

3.3 Análise de Dados

A análise estatística dos dados foi realizada utilizando o programa computacional Bionumerics (Applied Maths) e os dendrogramas foram construídos por UPMGA (Unweighted Pair-Group Method, Arithmetic averages).

4. Preparo dos extratos de *P. brasiliensis*

O extrato *cell-free* foi obtido dos diferentes isolados de *P. brasiliensis* (Pb 113, Pb 265, Pb 18 e Pb 339), na fase leveduriforme (L) antes e depois do reisolamento do fungo para isolamento e caracterização de proteínas relacionadas com infecção diferencial observada anteriormente. A concentração protéica dos extratos foi quantificada pelo método de Lowry et al. (1951) e pelo método de Bradford (BioRad) e em seguida as amostras foram avaliadas por SDS-PAGE.

5. Análise protéica por eletroforese bidimensional.

Os componentes protéicos dos isolados de *P. brasiliensis* foram primeiramente submetidos à focalização isoelétrica, 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).

6. Caracterização de proteínas de *P. brasiliensis* como ligantes de proteínas da matriz extracelular por *Far-Western*.

Para caracterizar proteínas diferencialmente expressas envolvidas na interação *P. brasiliensis* – matriz extracelular foi realizada a técnica de *Far-Western*. Para tanto, os extratos *cell-free* dos isolados antes e após o reisolamento foram submetidos à eletroforese bidimensional, posteriormente transferidos para membranas de nitrocelulose, e nesta foi realizada a técnica de *Far-Western*. Nessa etapa, as membranas foram bloqueadas com leite 5% e BSA 1% por 4h, em seguida foram incubadas com laminina (Sigma-Aldrich),

fibronectina (Sigma-Aldrich), colágeno tipo I (Sigma-Aldrich) por 90 min. Depois de lavadas por três vezes com PBS-T (PBS acrescido de 0,25% de Tween 20), foram adicionados, no título 1:100, os anticorpos primários adequados (anti-laminina (DAKO Cytomation), anti-fibronectina (DAKO Cytomation) e anti-colágeno tipo I (Sigma-Aldrich)) e incubados por 18h. Mais uma vez as membranas foram lavadas com PBS-T e o anticorpo secundário anti-rabbit IgG conjugado com peroxidase (Santa Cruz Biotechnologies) foi adicionado no título 1:5000. Finalmente, as membranas foram lavadas com PBS-T e foi adicionado peróxido de hidrogênio, luminol e ácido cumárico para então ser realizada a revelação.

V. RESULTADOS

1. Testes de infecção de *P. brasiliensis* em cultura de células epiteliais

O ensaio de infecção foi realizado com os seguintes isolados de *P. brasiliensis* antes e após o reisolamento: Pb 113, Pb 265, Pb 18, Pb 01, Pb1578R, Pb 1921, Pb 1934, Pb 2367, Pb 2493, Pb 2508, Pb 2663, Pb 2669 e Pb2681. O período de infecção analisado foi de 5h, tempo suficiente para o fungo ser internalizado. Foram realizadas contagens do número de fungos (aderidos e invadidos) em 5000 células, determinando-se a porcentagem total de infecção. As amostras reisoladas de *P. brasiliensis* foram capazes de apresentar padrão de infecção de células A₅₄₉ mais eficientemente, que aquelas subcultivadas *in vitro* como mostrado na figura 1 e também relacionados na tabela 1.

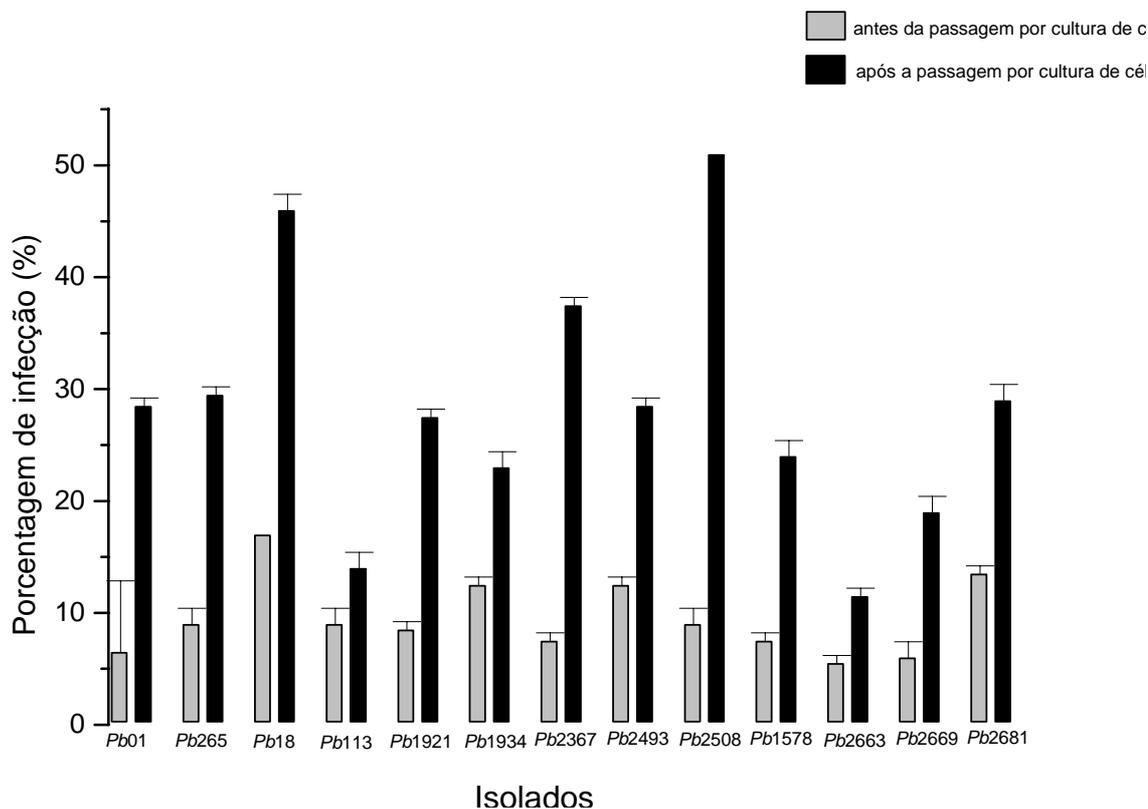


Figura 1: Comparação da capacidade de infecção dos isolados (Pb01, Pb18, Pb265, Pb113, Pb1921, Pb1934, Pb2367, Pb2493, Pb2508, Pb1578, Pb2663, Pb2669 e Pb2681) de *P. brasiliensis* avaliados antes e após o reisolamento, por período de incubação de 5 horas com células A549. O gráfico representa a porcentagem total de infecção de cada isolado com valores significantes de $p < 0,05$.

Tabela 1: Descrição dos isolados de acordo com a capacidade de infecção às células A549.

Isolado	Origem	% de Infecção antes reisolamento	% de Infecção após reisolamento	Nº de vezes de aumento da % de infecção
Pb01	Goiânia	6,5	28,5	6,4
Pb1578	Goiânia	7,0	25,0	3,6
Pb18	São Paulo	17,0	46,0	2,8
Pb113	São Paulo	9,0	14,0	1,4
Pb265	São Paulo	9,0	29,5	3,3
Pb1921	Araraquara	8,5	27,5	3,0
Pb1934	Araraquara	12,5	23,0	1,7
Pb2367	Araraquara	7,5	37,5	4,7
Pb2493	Araraquara	12,5	28,5	2,2
Pb2508	Araraquara	9,0	51,0	5,6
Pb2663	Araraquara	6,0	12,0	2,0
Pb2669	Araraquara	5,0	18,0	3,6
Pb2681	Araraquara	14,0	28,0	2,0

2. RAPD-PCR dos isolados de *P. brasiliensis* após o reisolamento

A análise do padrão genotípico foi realizada apenas nas amostras reisoladas após passagem em culturas celulares. A amplificação do DNA através da técnica de RAPD-PCR gerou perfis que variaram de quatro a oito fragmentos, com massa de 0,13 a 1,8 Kb, com polimorfismos como demonstrado na figura 2.

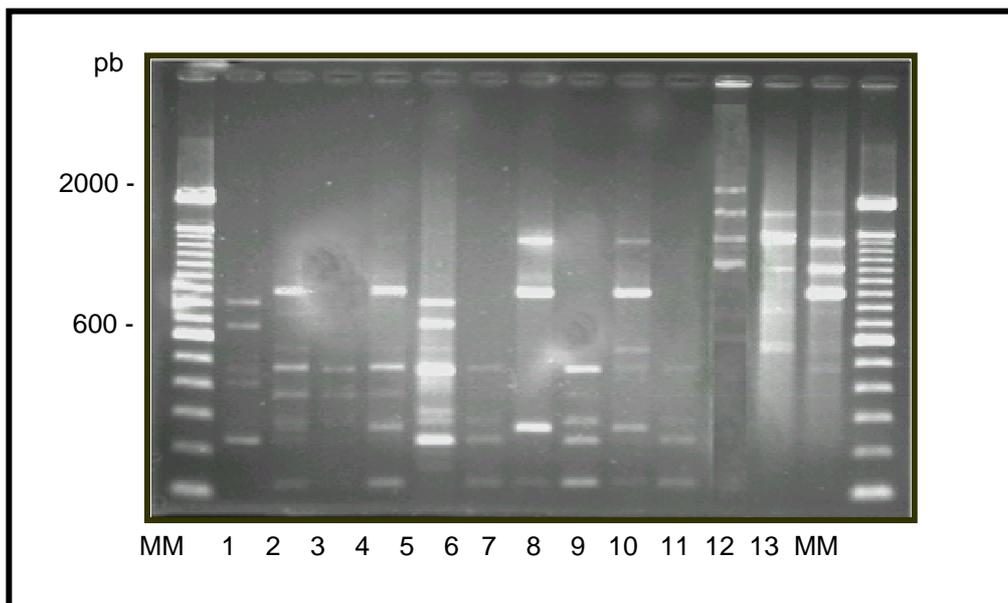


Figura 2: RAPD - PCR demonstrativo dos isolados de *P. brasiliensis* após o reisolamento, amplificados com a seqüência iniciadora 4 do sistema comercial Ready-to-Go (GE Healthcare) em gel de agarose 2% revelado com brometo de etídio. MM: marcador molecular 100pb (Gibco), 1-Pb01, 2-Pb18, 3-Pb113, 4-Pb265, 5-Pb1578, 6-Pb1921, 7-Pb1934, 8-Pb2367, 9-Pb2493, 10-Pb2508, 11-Pb 2663, 12-Pb 2669 e 13-Pb2681.

3. PCR *Fingerprinting*

Para ampliar a investigação dos perfis genotípicos, também foi realizada esta técnica e foram utilizadas as seqüências minissatélite específica do fago tipo-selvagem M13 (GAGGGTGGCGGTTCT) e a minissatélite específica (GACA)₄.

a) M13:

A amplificação do DNA dos isolados após o reisolamento apresentaram perfis que variaram de 3 a 7 fragmentos, com tamanhos de 0,1 a 1,8 Kb, como demonstrado na figura 3.

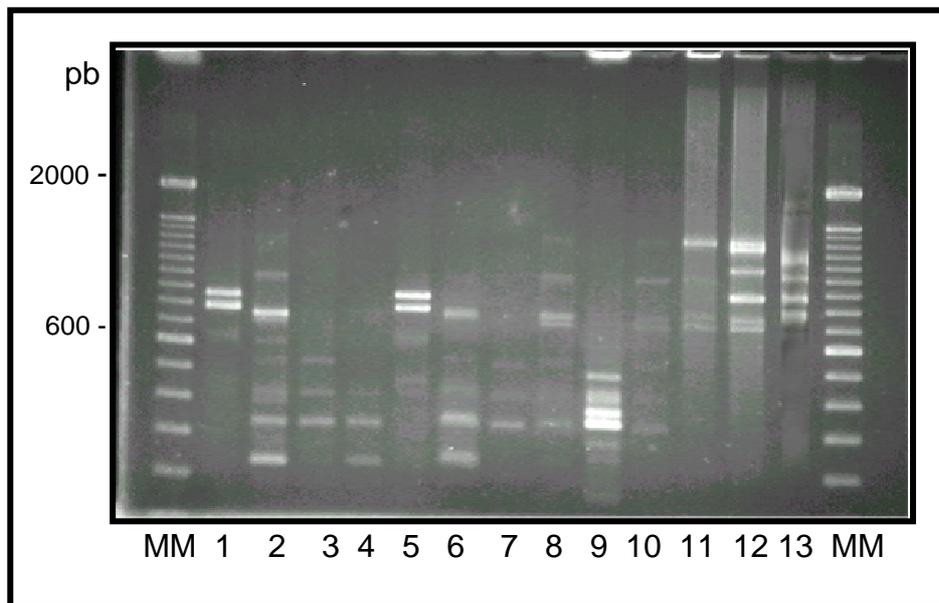


Figura 3: Amplificação com a sequência minisatélite M13 dos isolados de *P. brasiliensis* após o reisolamento em gel de agarose 2% revelado com brometo de etídio. MM: marcador molecular 100pb (Gibco), 1-Pb01, 2-Pb18, 3-Pb113, 4-Pb265, 5-Pb1578, 6-Pb1921, 7-Pb1934, 8-Pb2367, 9-Pb2493, 10-Pb2508, 11-Pb 2663, 12-Pb 2669 e 13-Pb2681.

b) (GACA)₄.

Com a seqüência microsatélite (GACA)₄, os perfis variaram de 3 a 7 fragmentos, com fragmentos de 0,2 a 2,0Kb, como demonstrado na figura 4.

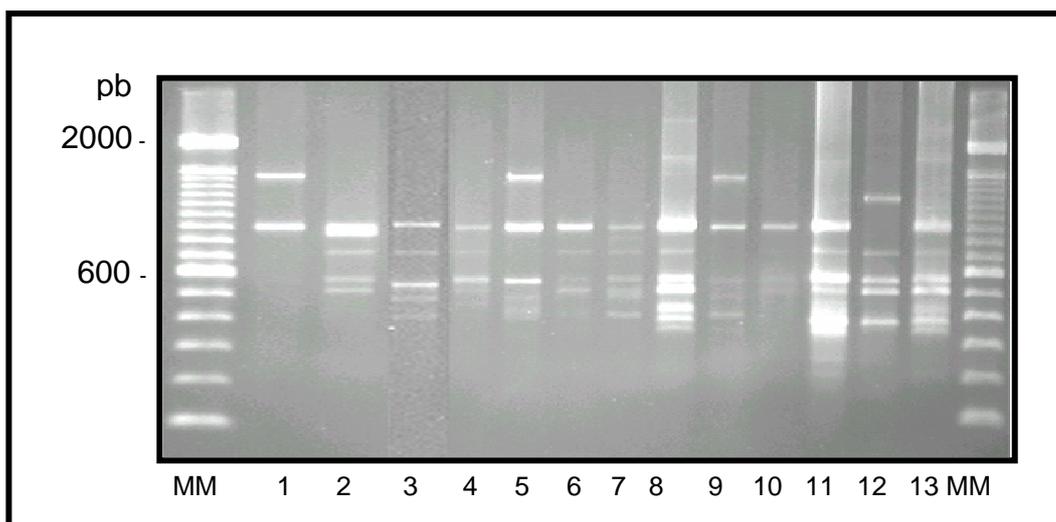


Figura 4: Amplificação com a sequência microsatélite (GACA)₄ dos isolados de *P. brasiliensis* após o reisolamento em gel de agarose 2% revelado com brometo de etídio. MM: marcador molecular 100pb (Gibco), 1-Pb01, 2-Pb18, 3-Pb113, 4-Pb265, 5-Pb1578, 6-Pb1921, 7-Pb1934, 8-Pb2367, 9-Pb2493, 10-Pb2508, 11-Pb 2663, 12-Pb 2669 e 13-Pb2681.

4. Análise dos perfis genotípicos obtidos

Os dendrogramas obtidos pela análise do RAPD e do PCR fingerprinting estão demonstrados nas figuras 5-7. Os perfis de RAPD e PCR-*fingerprinting* foram analisados de acordo com a presença ou ausência de fragmentos claros e definidos a partir das imagens digitalizadas capturadas dos géis (Figuras 2, 3 e 4) e utilizadas para a confecção dos dendrogramas.

Os isolados apresentaram similaridade entre 0,20 a 1,0 quando foi utilizada a seqüência número 4 (OPJ4) do sistema comercial Ready to go (GE Healthcare). O dendrograma obtido com esta seqüência mostrou alta heterogeneidade entre os isolados. A média do coeficiente de similaridade foi de $0,45 \pm 0,3$. Estes foram distribuídos em dois grupos principais, com baixa similaridade entre eles. O grupo I subdividiu-se em três subgrupos, envolvendo isolados com similaridade em torno de 60%. Um clone envolveu três isolados de Araraquara (Pb1921, Pb2508 e Pb2367) e similaridade de 60% entre os três subgrupos. O isolado 01R apresentou identidade de 90% com o isolado Pb1578, que é proveniente da mesma região do país e ambos com Pb18 em torno de 70% (Figura 6). No grupo II, formado apenas com três isolados, dois tinham 1,0 de similaridade (2663 e 2669) e correlação de 70% com o isolado 2681.

Os isolados de Araraquara foram distribuídos entre o grupo I e II, sendo que o este último concentrou apenas aqueles desta região. A mediana dos índices de infecção dos grupos I e II foi em torno de 28,5 e 19%, respectivamente. Os dois isolados de Goiânia apresentaram índices de similaridade altos e aproximados em relação ao de infecção, em torno de 26%. Os dois clones, presentes em grupos distintos com baixa similaridade entre si, envolveram isolados de Araraquara com índices de infecção diversos, o primeiro com média de aproximadamente 39% e o outro 15%.

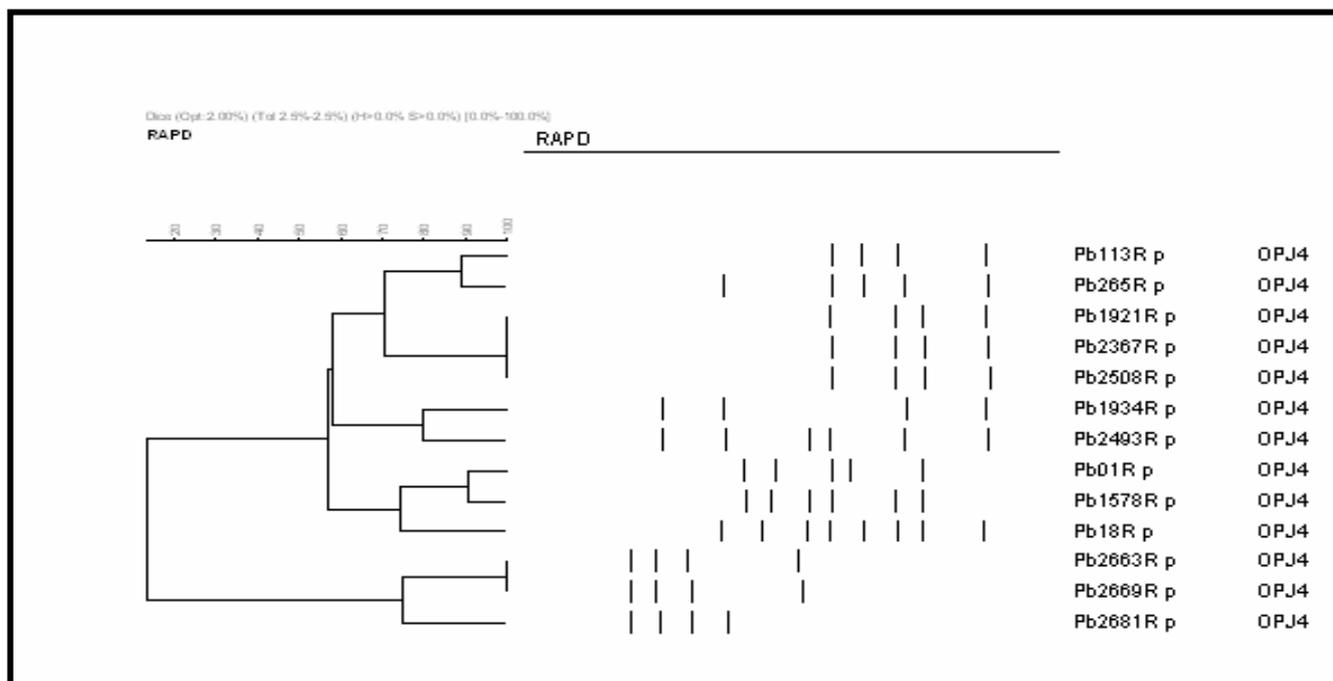


Figura 5: Dendrograma dos isolados de *P. brasiliensis* após o reisolamento, obtido pela análise dos produtos de amplificação com a seqüência iniciadora OPJ4 do sistema comercial Ready-to-Go.

O dendrograma obtido pela análise do PCR *fingerprinting* com o iniciador M13 demonstrou que a similaridade para os isolados após o reisolamento variou de 0,20 a 1,0. A média do coeficiente de similaridade foi de $0,47 \pm 0,3$. Treze isolados estavam distribuídos em dois agrupamentos, com três clones. O primeiro clone (Pb2367 e Pb2508) apresentou similaridade de 70% com os acima descritos, formando um subgrupo, com os isolados de Araraquara. Outro subgrupo incluía Pb01R e Pb1578R, com coeficiente em torno de 75%, mas com similaridade em torno de 50% em relação ao subgrupo acima descrito (Figura 6). O grupo II englobava seis isolados, com um clone formado com Pb113 e Pb1934 e com similaridade de 75% com Pb2493. Estes três isolados apresentaram relação com Pb265 em torno de 70%. Outros dois isolados que incluíam Pb18 e 1921 apresentaram similaridade de 80% entre si. O índice de similaridade entre os dois grupos foi de 30%.

Os isolados agruparam-se de maneira não muito homogênea em relação ao padrão de infecção e a localização geográfica. Os isolados de Araraquara foram distribuídos entre o grupo I e II, sendo que o I concentrou apenas aqueles desta região. A mediana dos índices de infecção dos grupos I e II foi em torno de 28,5 e 28%, respectivamente, sendo que dois dos isolados com os maiores

índices de infecção ficaram no subgrupo I e o outro no II. Os dois isolados de Goiânia apresentaram índices de similaridade altos e aproximados em relação ao de infecção, em torno de 26%. Os dois clones, presentes no grupo I apresentaram similaridade de 70% e envolveram isolados de Araraquara com índices de infecção diversos, o primeiro com média de 20% e o outro 44%. O terceiro clone, presente no subgrupo II, com baixa similaridade em relação aos do grupo I, apresentou média de infecção de 18,5%.

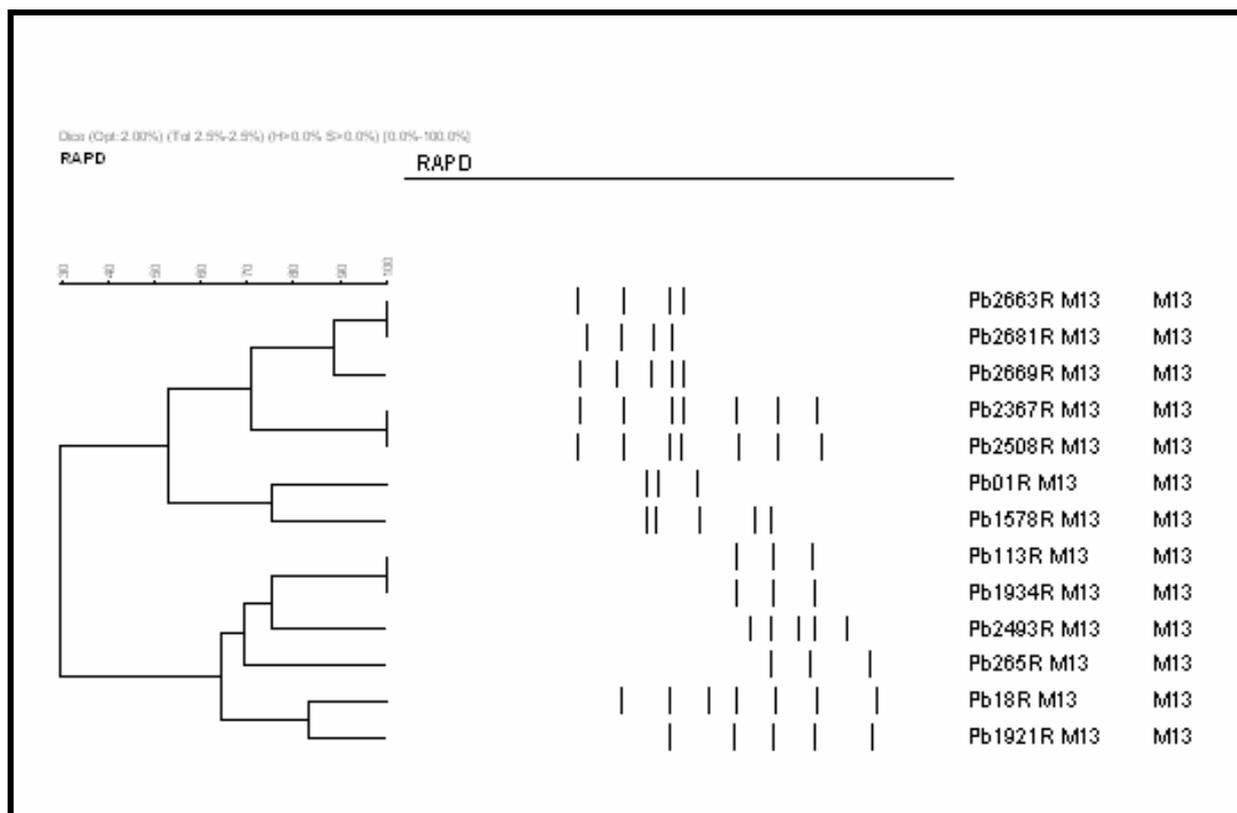


Figura 6: Dendrogramas dos isolados de *P. brasiliensis* após o reisolamento, obtido pela análise dos produtos de amplificação com a seqüência iniciadora M13.

Por fim, o dendrograma obtido pela análise do PCR *fingerprinting* com o iniciador (GACA)₄ mostrou que a similaridade para os diferentes perfis também variou de 0,20 a 1,0. A média do coeficiente de similaridade foi de $0,70 \pm 0,2$. Este iniciador amplificou seqüências que mostrou homogeneidade maior entre os isolados. Doze isolados estavam distribuídos em três agrupamentos com coeficiente de similaridade em torno de 0,70 entre eles (Figura 7). O grupo I subdividiu-se em três subgrupos. O primeiro formado por um clone com os isolados Pb2681, Pb113 e Pb265, que compartilhavam similaridade de 90% com

Pb1921. Estes quatro isolados apresentavam similaridade em torno de 80% com Pb18 e correlação com mais três isolados (1934, 2367, 2663). O subgrupo II também apresentou um clone que incluiu os isolados Pb1578 e 2493 que foram similares em torno de 80% a 2669. O isolado 2508 apareceu isoladamente com índice de similaridade em torno de 70% aos outros subgrupos, enquanto que o isolado Pb1 apareceu em outro grupo com identidade menor que 40% com os outros isolados.

Os isolados agruparam-se de maneira não muito homogênea em relação ao padrão de infecção e a localização geográfica. Os isolados de Araraquara estavam concentrados somente no grande grupo I, em que apareceram também os de São Paulo e um de Goiânia. Assim, este iniciador apresentou a menor relação com área geográfica. Os dois clones, presentes em subgrupos distintos com similaridade em torno de 70% entre si, envolveram isolados de São Paulo e de Araraquara com índices de infecção diversos, o primeiro com média de aproximadamente 24% e o outro 26%.

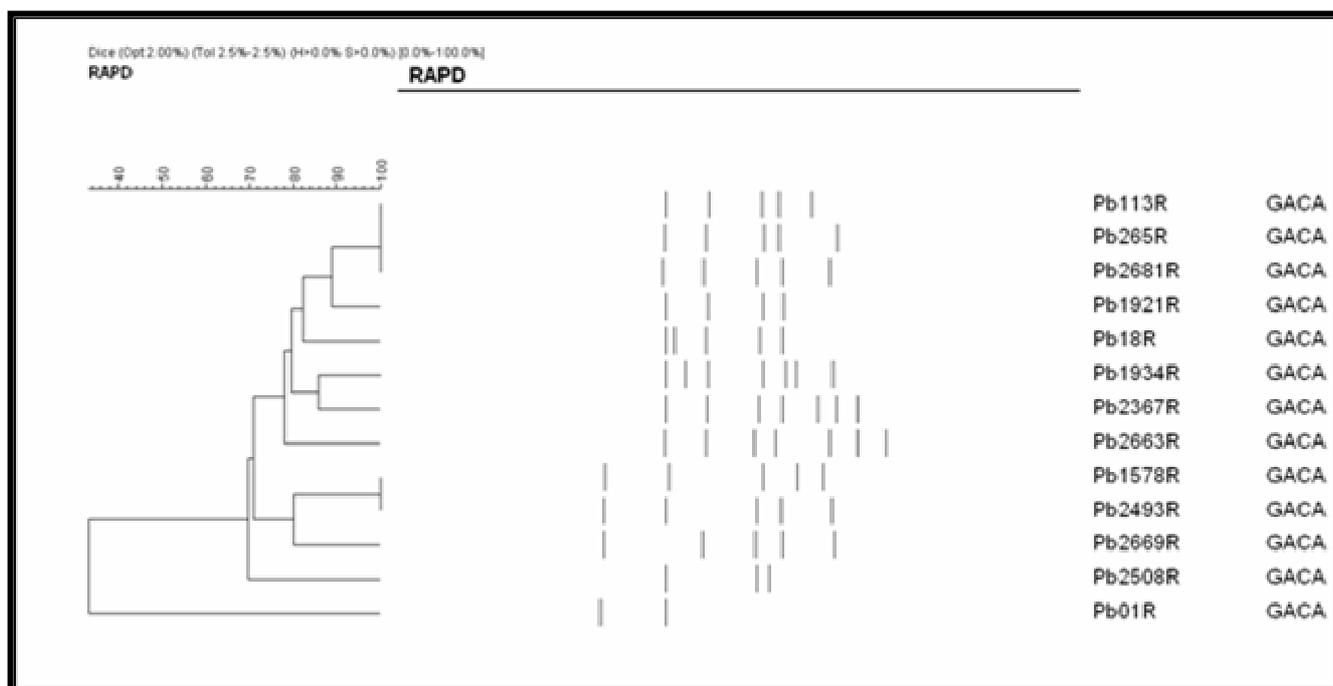


Figura 7: Dendrograma dos isolados de *P. brasiliensis* após o reisolamento, obtido pela análise dos produtos de amplificação com a seqüência iniciadora (GACA)₄.

5. Análise protéica através eletroforese bidimensional e caracterização das proteínas ligantes de matriz extracelular por *Far western*

Extratos “cell-free” dos isolados Pb01, Pb265, Pb113 e Pb339 de *P. brasiliensis* foram preparados antes e após reisolamento. O extrato 339 foi introduzido, por se tratar do principal isolado empregado por grande número de pesquisadores no preparo de antígenos. O perfil eletroforético destes extratos apresentou proteínas que variaram de 109 a 14 kDa, com a diferença principalmente relacionada à intensidade e ao número de fragmentos protéicos majoritários. As concentrações protéicas dos extratos foram determinadas e em média encontravam-se em torno de 5,0 mg/mL.

Os reisolados apresentaram maior expressão de proteínas em relação aos subcultivados. O número de espécies protéicas, as massas moleculares (MM) e os pls determinados estão demonstrados na tabela 1.

O ensaio de *Far Western* foi utilizado para caracterizar as proteínas de *P. brasiliensis* ligantes às proteínas da matriz extracelular. Várias proteínas apresentaram capacidade de ligação com a laminina, fibronectina e colágeno tipo I, que estão sumarizadas na tabela 2.

Tabela 2: Correlação entre os extratos de quatro isolados de *P. brasiliensis*, antes e após reisolamento de cultura de células, suas proteínas expressas, a variação de massa molecular (MM) e dos pls.

Isolado	Nº DE ESPÉCIES PROTÉICAS	VARIAÇÃO DE MM* (kDa)	VARIAÇÃO DE pl
Pb01	41	85 - 22	8.7 – 3.0
Pb01R3*	196	96 - 11	10.0 – 3.0
Pb113	15	90 - 10	10.0 – 3.0
Pb113R3*	135	90 - 10	10.0 – 3.0
Pb265	122	86 - 8	8.5 – 3.3
Pb265R3*	177	65 - 17	8.3 – 3.0
Pb339	18	64 - 10	9.7 – 3.2
Pb339R3*	51	96 - 10	10.0 – 3.0

*R3- amostra reisolada

Tabela 3: Proteínas dos extratos *cell-free* de quatro isolados de *P. brasiliensis* com capacidade de ligação à MEC.

Amostra	Ligantes de laminina	Proteínas comuns	Ligantes de Fibronectina	Proteínas comuns	Ligantes de Colágeno I	Proteínas Comuns
Pb01	06		00		00	
Pb01R3*	26	04	15	00	10	00
Pb113	00		00		09	
Pb113R3*	00	00	04	00	16	02
Pb265	00		00		00	
Pb265R3*	06	00	00	00	27	00
Pb339	03		00		06	
Pb339R3*	03	03	03	00	08	00

*R3- amostra reisolada

No extrato Pb01, 41 proteínas foram expressas, enquanto após o reisolamento 196 proteínas foram observadas (PB01R3); 171 proteínas foram diferencialmente expressas nessa amostra e 25 foram comuns (*matches*) as duas (Figura 8). Quanto à capacidade de ligação a laminina, Pb01 apresentou seis ligantes enquanto Pb01R3 apresentou 26, sendo quatro deles comuns às duas amostras. Quanto à capacidade de ligação a fibronectina e ao colágeno tipo I, somente Pb01R3 apresentou 15 e 10 ligantes, respectivamente (Figura 9 e Tabela 4).

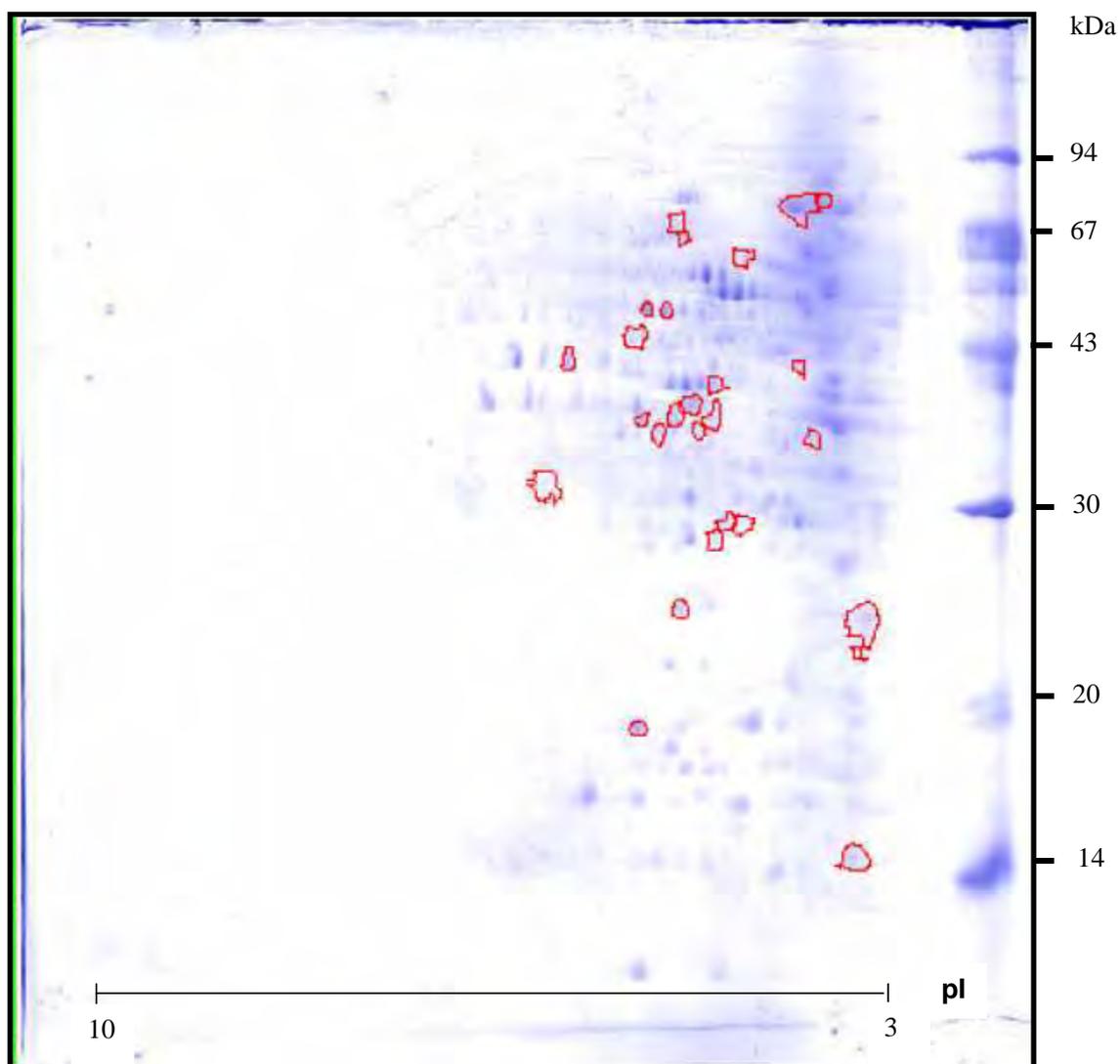


Figura 8: Eletroforese bidimensional do extrato “cell free” de isolado 01R3 de *P. brasiliensis* após reisolamento corada por Coomassie Blue. As proteínas circuladas em vermelho estavam presentes tanto antes quanto após o reisolamento (*matches*).

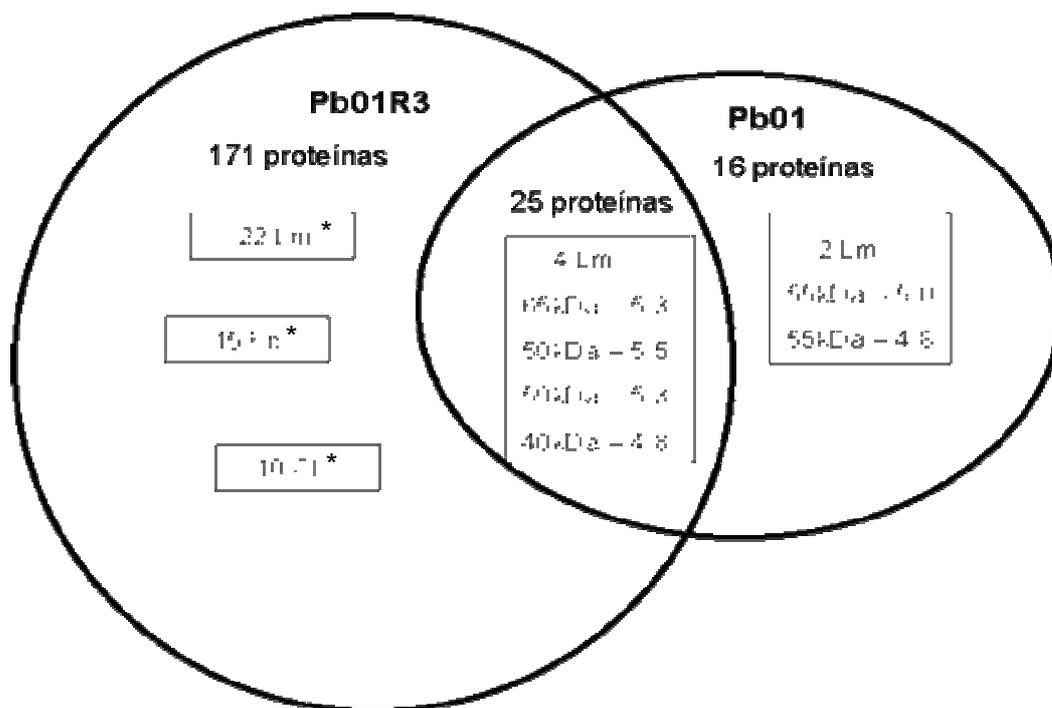


Figura 9: Diagrama representativo das proteínas do extrato “cell free” do isolado 01 de *P. brasiliensis* capazes de se ligarem aos componentes da MEC. * Os ligantes estão representados na tabela 4.

Tabela 4: Proteínas do extrato “cell free” de isolado 01 de *P. brasiliensis* capazes de se ligarem aos componentes da MEC.

pl	MM (Da)	MEC	pl	MM (Da)	MEC
4,9	59634	Lm	5,4	41264	Fn, Cl*
4,8	59102	Lm	7,2	41037	Lm
4,7	58575	Lm	5,4	40035	Fn
7,5	58313	Lm	6,0	39815	Lm
5,9	56766	Lm	4,9	39597	Lm, Fn*
7,2	57793	Lm	8,5	38103	Lm
5,7	56766	Lm	7,9	38103	Fn
5,9	53795	Lm	7,5	37790	Fn
5,6	53077	Lm	5,9	37894	Fn
5,2	52840	Lm	6,2	35769	Lm
5,2	46403	Lm	7,2	35378	Fn
4,9	46195	Cl	7,0	35281	Cl

4,4	45579	Cl	5,5	33029	Lm, Fn*
5,7	45172	Lm	5,1	32668	Lm, Fn*
5,5	44769	Lm	5,5	31608	Lm, Fn, Cl**
5,3	44769	Lm, Fn*	6,9	30415	Fn
6,2	44171	Cl	7,8	28773	Fn, Cl*
6,4	43582	Cl	6,2	28914	Fn
4,7	42882	Cl	6,8	27528	Cl
5,8	41491	Fn			

*Proteínas ligantes de dois componentes da MEC

** Proteínas ligantes de três componentes da MEC

O extrato Pb113 apresentou 15 proteínas expressas, 135 após reisolamento (PB113R3), sendo 132 diferencialmente expressas nesta amostra e três comuns (*matches*) as duas (Figura 10). Quanto à capacidade de ligação a fibronectina, somente Pb113R3 apresentou quatro ligantes; ao colágeno tipo I, Pb113 apresentou nove enquanto em Pb113R3 aumentou para 16, sendo dois comuns às duas amostras e quanto à capacidade de ligação à laminina nenhum ligante foi encontrado (Figura 11 e Tabela 5).

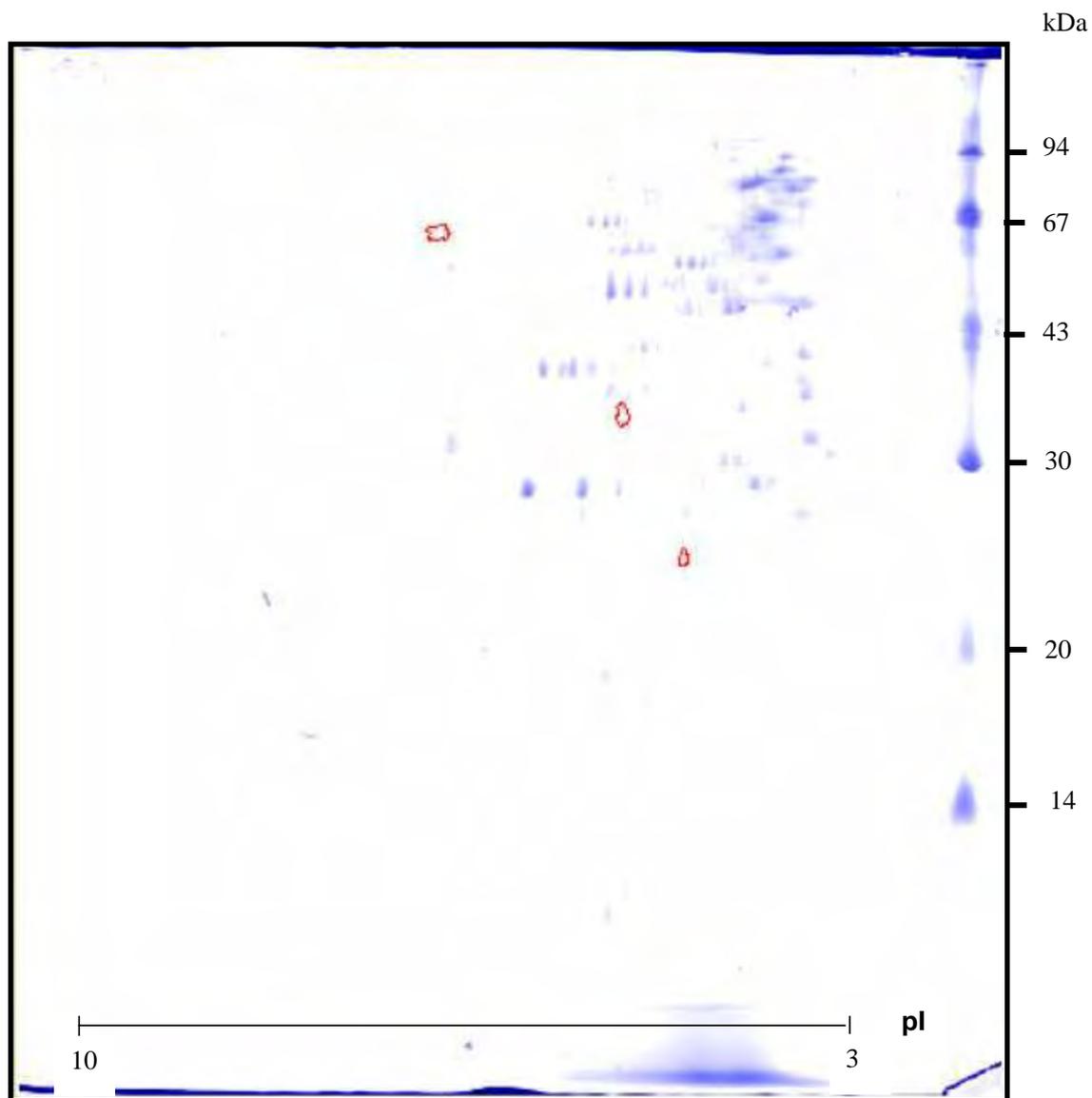


Figura 10: Eletroforese bidimensional do extrato “cell free” do isolado 113R3 de *P. brasiliensis* após reisolamento corada por Coomassie Blue. As proteínas circulas em vermelho estavam presentes tanto antes quanto após o reisolamento (*matches*).

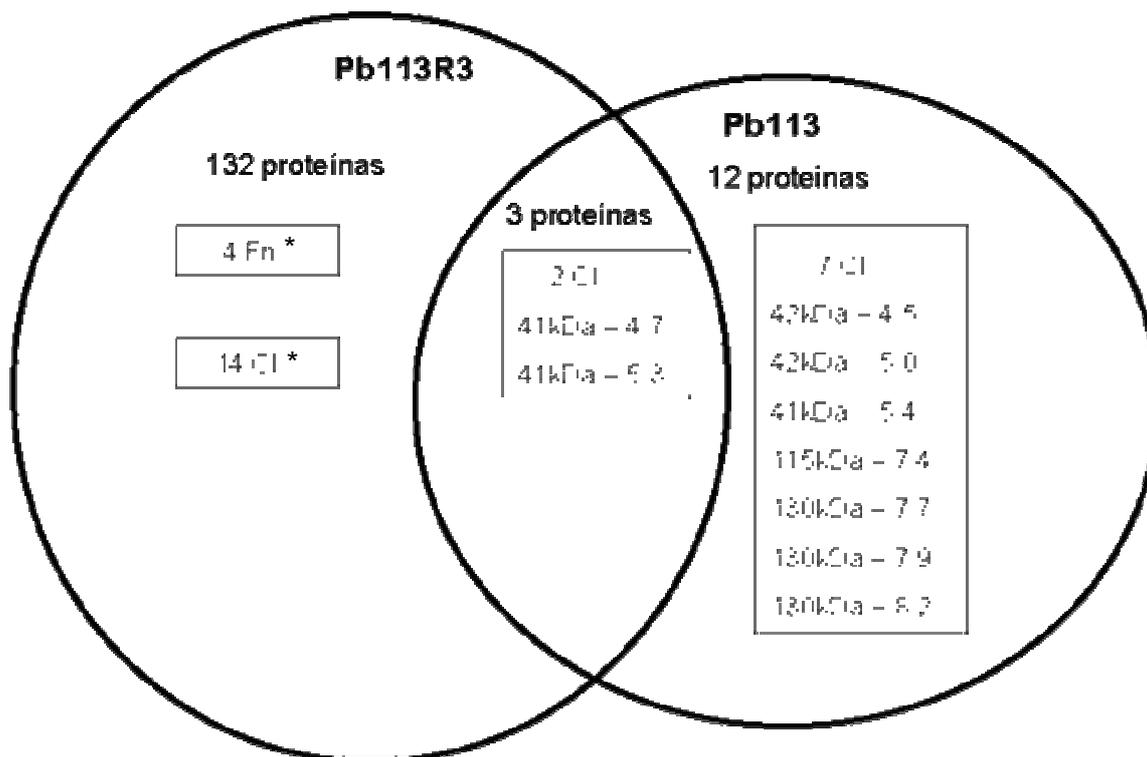


Figura 11: Diagrama representativo das proteínas do extrato “cell free” de isolado 113 de *P. brasiliensis* capazes de se ligarem aos componentes da MEC. * Os ligantes estão representados na tabela 5.

Tabela 5: Proteínas do extrato “cell free” de isolado 113 de *P. brasiliensis* capazes de se ligarem aos componentes da MEC.

pl	MM (Da)	MEC	pl	MM (Da)	MEC
4,0	48120	Cl	7,2	39223	Fn
6,1	47122	Cl	6,6	36927	Fn
5,9	47122	Cl	6,4	32731	Fn
5,7	46925	Cl	6,2	32951	Fn
4,1	46534	Cl	5,1	31865	Cl
6,6	40020	Cl	5,4	32079	Cl
6,2	40020	Cl	5,2	29720	Cl

O extrato Pb265 apresentou 122 proteínas expressas, 177 após reisolamento (PB265R3), sendo 147 proteínas diferencialmente expressas, dentre essas, apenas 30 foram comuns (*matches*) às duas amostras (Figura12). Quanto à capacidade de ligação aos componentes da MEC, somente Pb265R3 apresentou seis ligantes a laminina, 27 ao colágeno tipo I, e nenhum ligante foi encontrado à fibronectina (Figura 13 e Tabela 6) .

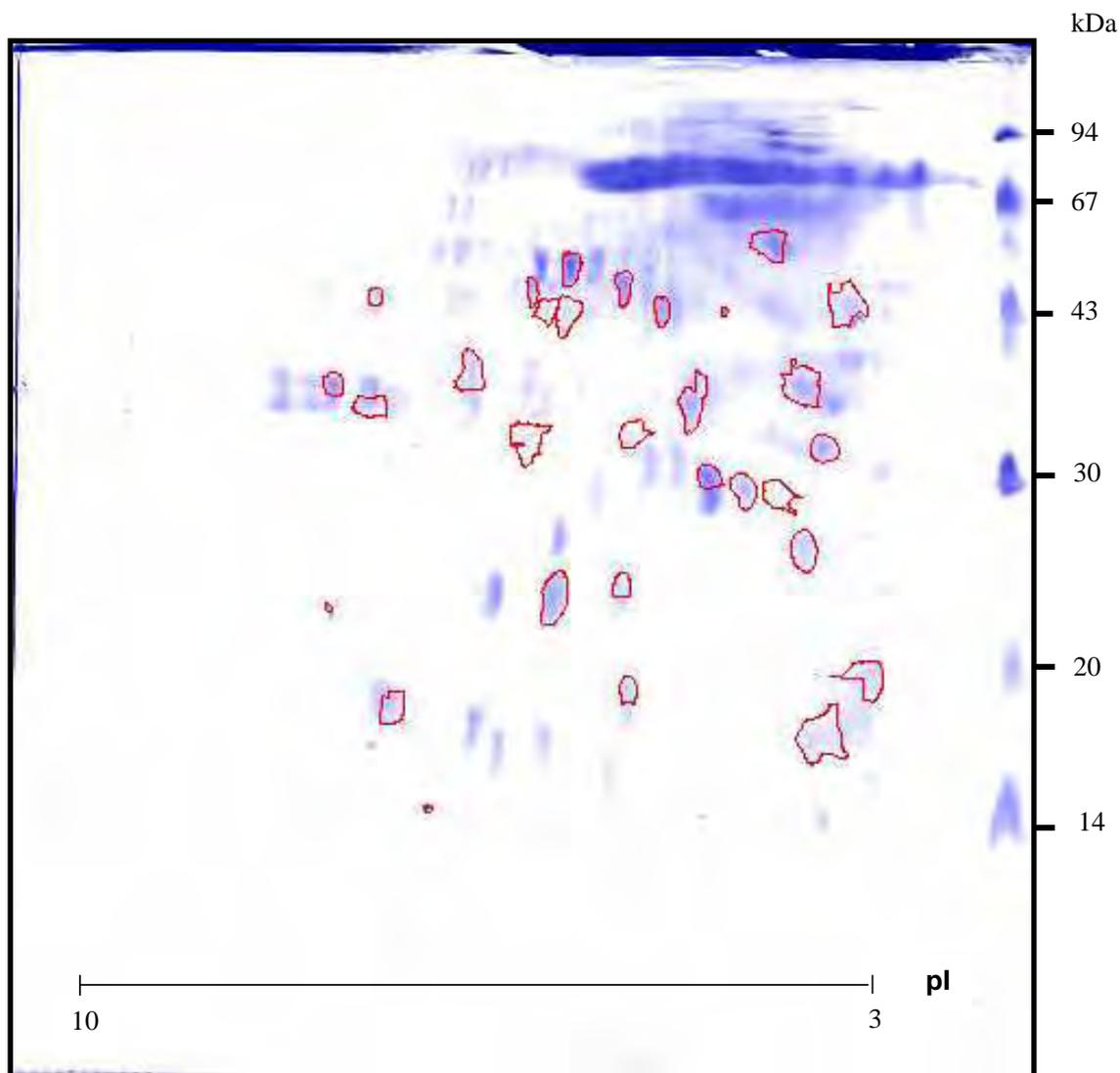


Figura 12: Eletroforese bidimensional de antígeno “cell free” do isolado 265 de *P. brasiliensis* após reisolamento corada por Coomassie Blue. As proteínas circulasdas em vermelho estavam presentes tanto antes quanto após o reisolamento (*matches*).

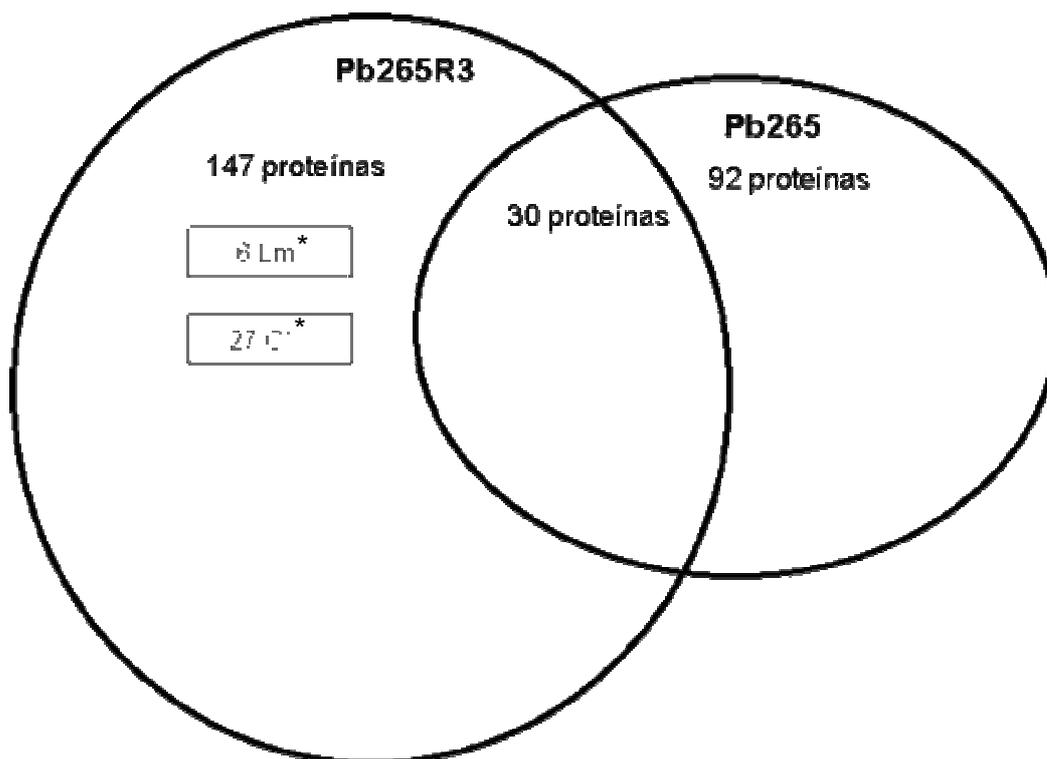


Figura 13: Diagrama representativo das proteínas do extrato “cell free” de isolado 265 de *P. brasiliensis* capazes de se ligarem aos componentes da MEC. * Os ligantes estão representados na tabela 6.

Tabela 6: Proteínas do extrato “cell free” de isolado 265 de *P. brasiliensis* capazes de se ligarem aos componentes da MEC.

pl	MM (Da)	MEC	pl	MM (Da)	MEC
4,8	65122	Cl	5,2	43436	Cl
7,0	64858	Cl	5,4	42040	Cl
4,5	63040	Cl	6,8	39490	Cl
5,9	60777	Cl	6,5	38745	Cl
5,6	57185	Lm	7,3	37500	Cl
6,9	55808	Cl	6,5	36493	Cl
7,3	54465	Lm	7,0	35321	Cl
5,9	53370	Lm	6,1	34466	Cl
5,6	53587	Lm, Cl*	5,2	31165	Cl
6,4	52510	Cl	5,4	30996	Cl
4,8	52297	Cl	5,4	29574	Cl
4,7	50216	Cl	5,2	29715	Cl
6,6	48808	Lm	5,9	28129	Cl

6,3	47633	Lm, CI	6,2	25876	CI
8,3	47056	CI	5,7	22372	CI
4,3	44878	CI			

*Proteínas ligantes de dois componentes da MEC

Por fim, a amostra protéica Pb339 apresentou 18 proteínas expressas, 51 proteínas após reisolamento (PB339R3), sendo 43 diferencialmente expressas, dentre essas, apenas 08 foram comuns (*matches*) às duas amostras (Figura 14). Quanto à capacidade de ligação a laminina, em ambas as amostras, três ligantes foram encontrados, sendo idênticos as isoformas da gp43, com pls de 6.3, 5.9 e 5.7 (Figura 15 A e B); em relação à fibronectina, apenas Pb339R3 apresentou três ligantes (Figura 15C) e ao colágeno tipo I (Figura 15C) , seis e oito ligantes, respectivamente antes (Pb339) e depois (Pb339R3), mas nenhum foi comum às duas amostras (Figura 16 e Tabela 7).

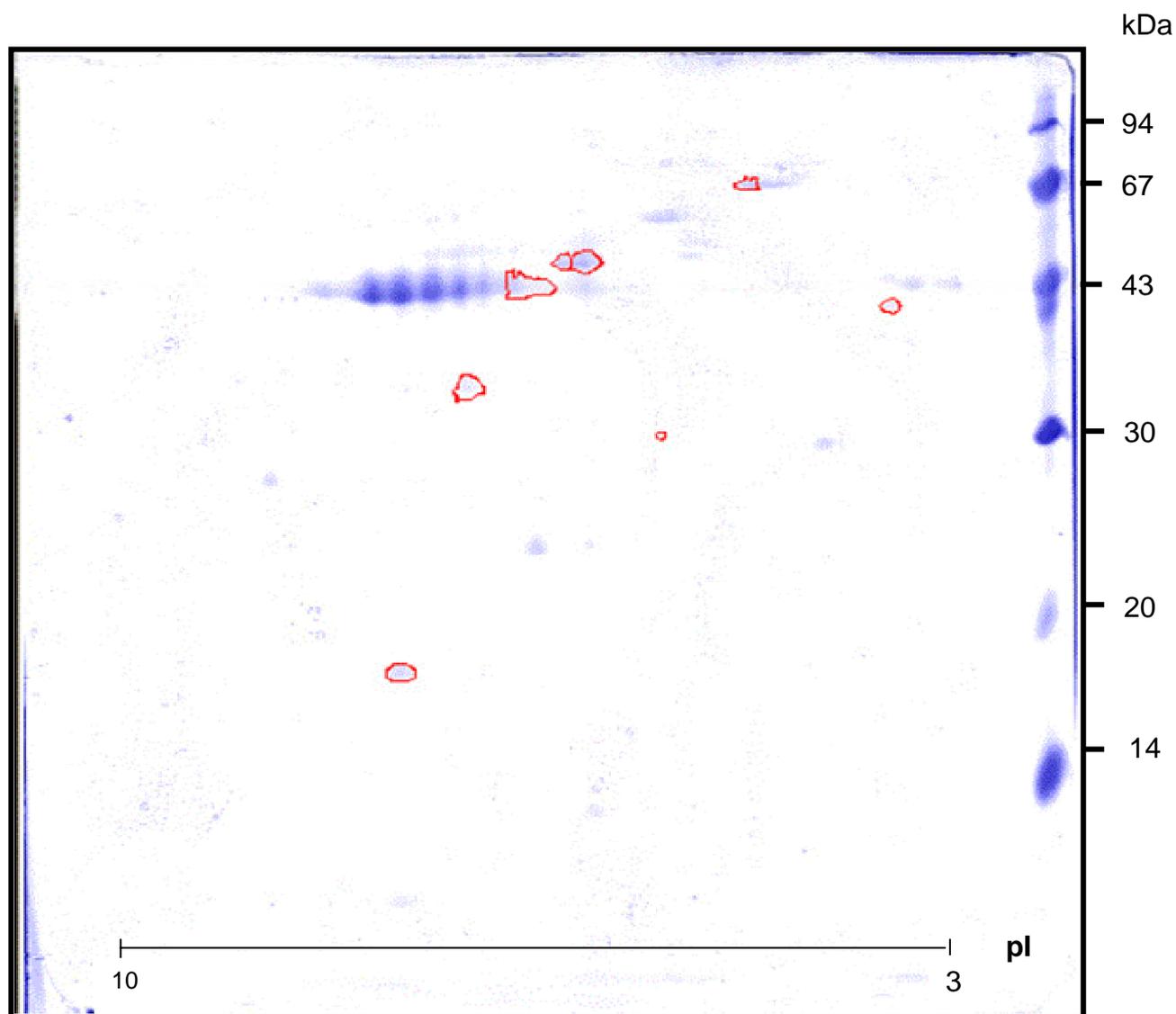


Figura 14: Eletroforese bidimensional de antígeno “cell free” do isolado 339 de *P. brasiliensis* após reisolamento corada por Coomassie Blue. As proteínas circuladas em vermelho estavam presentes tanto antes quanto após o reisolamento (*matches*).

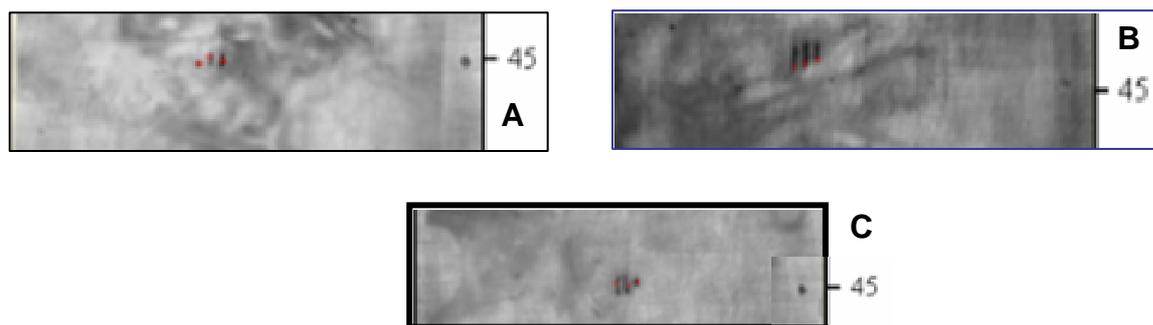


Figura 15: Ensaio de *Far Western* do antígeno “cell free” do isolado 339 de *P. brasiliensis* demonstrando a capacidade de ligação a laminina antes (A) e após (B) o reisolamento das isoformas da gp43 de pls 6.3, 5.9 e 5.7; e também a capacidade de ligação a fibronectina e ao colágeno tipo I apenas após o reisolamento (C) das isoformas da gp43 de pls 6.7, 6.6 e 5.5.

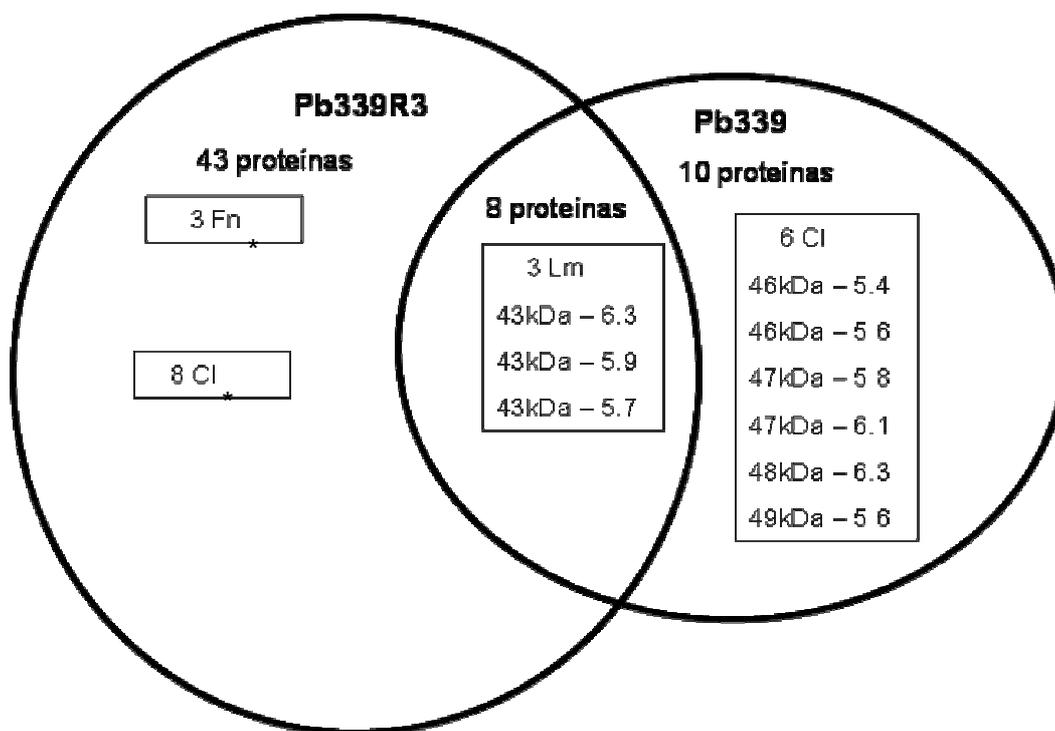


Figura 16: Diagrama representativo das proteínas do extrato “cell free” de isolado 265 de *P. brasiliensis* capazes de se ligarem aos componentes da MEC. * Os ligantes estão representados na tabela 7.

Tabela 7: Proteínas do extrato “cell free” de isolado 339 de *P. brasiliensis* capazes de se ligarem aos componentes da MEC.

pl	MM (Da)	MEC
5,1	56346	CI
4,9	48398	CI
6,6	42581	CI
6,8	42269	CI
6,7	42581	Fn, CI*
6,6	39565	Fn, CI*
5,5	38231	Fn, CI*
1,6	27389	CI

*Proteínas ligantes de dois componentes da MEC

Diante dos dados apresentados, as proteínas presentes em mais de um isolado de *P. brasiliensis* estão representadas na tabela 8 e aquelas que foram capazes de se ligar a mais de um componente da MEC foram representadas na tabela 9.

Tabela 8: Proteínas ligantes aos componentes da matriz extracelular, presentes em mais de um isolado de *P. brasiliensis*

Isolados	pl	MM (kDa)	MEC
01R3, 113R3 e 339R3	6,6	38	Fn*
01R3, 265R3	7,3	53	Lm**
01R3, 265R3	5,9	55	Lm
01R3, 265R3	5,7	57	Lm
265R3, 339R3	6,5	43	Lm
265R3, 339R3	6,7	43	Lm
265R3, 113R3	5	35	CI***
265R3, 113R3	6,7	38	CI
339R3, 113R3	5,3	40	CI
339R3, 113R3	6,7	41	CI
01R3, 113R3	4,5	42	CI
01R3, 265R3	5,3	43	CI
01R3, 339R3	6,2	44	CI
01R3, 265R3	4,3	45	CI
265R3, 113R3	6	47	CI

339R3, 113R3	5,6	46	CI
339R3, 113R3	5,4	46	CI
265R3, 113R3	6,2	47	CI
265R3, 339R3	5,6	51	CI

*Fibronectina, **Laminina, ***Colágeno tipo I

Tabela 9: Proteínas de *P. brasiliensis* capazes de se ligar a mais de um constituinte da MEC.

Isolado	pI	MM (kDa)	MEC
01R3	5,3	43	Lm**, Fn*
01R3	5,4	41	Fn, CI***
01R3	4,9	39	Lm, Fn
01R3	5,5	33	Lm, Fn
01R3	5,1	32	Lm, Fn
01R3	5,5	31	Lm, Fn, CI
01R3	7,8	26	Fn, CI
265R3	5,6	53	Lm, CI
265R3	6,3	47	Lm, CI
339R3	5,7	42	Fn, CI
339R3	5,6	39	Fn, CI
339R3	5,5	39	Fn, CI

*Fibronectina, **Laminina, ***Colágeno tipo I

DISCUSSÃO

As propriedades de *P. brasiliensis* tais como composição da parede celular (α -1,3-glucana), capacidade de crescimento à 37°C, dimorfismo, produção da gp43, proteinases, e capacidade de adesão a células do hospedeiro são relevantes e podem exercer um papel crítico na infecção (SAN-BLAS & SAN-BLAS, 1994; KUROKAWA et al., 1998; HOGAN et al., 1996; BRITTO et al., 1973; MENDES-GIANNINI et al., 2007). Este fungo após subcultivos sucessivos altera o seu padrão de patogenicidade, o que pode ser revertido pelo reisolamento do agente após passagem em animal, ou de culturas celulares recuperando assim provavelmente alguns fatores de virulência (BRUMMER et al., 1990; ANDREOTTI, 2005). A maioria dos estudos tem focado dois isolados, Pb18 e Pb01, o que contribuiu para aumentar o conhecimento que se tem hoje deste microrganismo (MOTTA et al., 2002; BAILÃO et al., 2006; ANDRADE et al., 2007; NUNES et al., 2005; FELIPE et al., 2005). Outros isolados como Pb339 e Pb113 foram principalmente empregados no estudo de extratos antigênicos em reações sorológicas (DEL NEGRO et al., 2000; CAMARGO et al., 2003).

Procurando ampliar o conhecimento deste fungo, no presente trabalho pretendeu-se estudar 13 diferentes isolados antes e após o reisolamento através da passagem por cultura de células para verificar a sua capacidade de infecção aos pneumócitos (linhagem A549). Nossos resultados mostraram padrões de infecção diferenciais entre as amostras subcultivadas e reisoladas, sendo que todas as amostras reisoladas demonstraram maior capacidade de infecção quando comparada com as subcultivadas *in vitro*. Comparando-se os diferentes isolados, verificou-se que o aumento na capacidade de infecção variou de 1,4 a 6,4 vezes, após reisolamento do agente e que os diferentes isolados apresentaram índices de infecção variáveis.

Estudos têm demonstrado a capacidade de adesão e invasão de *P. brasiliensis* (MENDES-GIANNINI et al., 1994), sendo o fenômeno de aderência variável dependendo do isolado (HANNA et al., 2000). Em estudos empregando cultura de células epiteliais foi observado que Pb18, considerada mais patogênica para animais e mais aderente, após vários subcultivos perdia esta capacidade, havendo, portanto relação entre virulência e capacidade de adesão. Amostras recém isoladas, tanto de animais como de culturas celulares, recuperavam a capacidade de aderir e invadir células epiteliais. Andreotti et. al., 2005 verificaram

um componente de 30kDa foi mais expresso após reisolamento do isolado Pb18, mostrando assim, que uma proteína com característica de adesina poderia estar envolvida na virulência deste fungo. Ainda, os isolados de *P. brasiliensis* não têm comportamento homogêneo como descrito por vários autores e estes dados referem-se às diferenças nos componentes da parede celular (SAN-BLAS & SAN-BLAS, 1982), às características morfológicas, à taxa de crescimento (KASHINO et al., 1985), à composição antigênica, em infecções experimentais (BIAGIONI et al., 1986; KASHINO et al., 1985, SINGER-VERMES et al., 1989, SINGER-VERMES et al., 1994) e também nos padrões de adesão, como demonstrado anteriormente (HANNA et al., 2000) e confirmado neste estudo com isolados recentes de pacientes (Araraquara - SP) e outros já estudados. Pb18 foi o mais aderente mesmo sem reisolamento, mas após, os isolados considerados menos patogênicos e com aderência menor, como Pb265, passaram a ter padrão de infecção semelhante ao dos isolados de Araraquara, mas menor que 30%. Assim, o padrão de infecção acima de 30% incluía somente os isolados Pb18, Pb2508 e Pb2367, e abaixo de 20% Pb2669, Pb113 e Pb2663. Os isolados Pb2669 e Pb2663 também apresentavam menor capacidade de adesão antes de reisolado. Desta maneira estudos posteriores deverão ser realizados para verificar se estas mudanças de padrão estariam relacionadas com algum componente como foi verificado por Andreotti et.al.,2005.

Por outro lado, com o progresso de técnicas de biologia molecular foi possível investigar a diversidade de patógenos baseada em suas características genômicas (CLARK & LANIGAN, 1993). A técnica do RAPD foi utilizada para detectar estas variações entre isolados de vários fungos causadores de doença em humanos entre eles *P. brasiliensis* (CALCAGNO et al., 1998; BAGAGLI et al., 1998; MOLINARI-MADLUM et al., 1999; SOARES et al., 1995). Neste estudo foram avaliados treze isolados de *P. brasiliensis* correlacionando sua virulência (capacidade de adesão em células epiteliais) com padrões em RAPD e PCR fingerprinting. Os resultados com dois iniciadores (OPJ4 e M13) mostraram grau de similaridade baixo entre os isolados, mas aparentemente houve relação entre distribuição geográfica e os padrões de infecção. Por outro lado, embora o grau de similaridade fosse maior com GACA4, os isolados agruparam-se de maneira não muito homogênea em relação ao padrão de infecção e a localização

geográfica. O iniciador GACA4 agrupou os isolados em índices ao redor de 70%. Um dado que chama atenção é quanto ao agrupamento em torno de índices de similaridade ao redor de 90% e 75% dos isolados de Goiânia (Pb01 e Pb1578), agrupados por dois dos iniciadores (OPJ4 e M13), mas bastante distinto no caso de GACA4. Por outro lado com esta seqüência iniciadora foi observada diferenciação do isolado Pb01 em relação aos demais. Os isolados empregados neste estudo foram de regiões próximas geograficamente falando, mesmo assim, apresentaram índices de similaridade distintos principalmente com GACA4, ao contrário dos resultados de CALCAGNO et al (1998) que demonstraram que diferenças genéticas poderiam estar associadas com diferentes regiões geográficas, mas não com diferentes manifestações clínicas de paracoccidiodomicose.

Fatores múltiplos podem contribuir para a grande variabilidade genética no genoma de *P. brasiliensis*, bem como de outros fungos, como observado neste estudo e em outros empregando métodos moleculares. Neste trabalho empregando três iniciadores, pode-se verificar que pelo menos em dois destes, os isolados com maior ou menor grau de infecção agruparam-se no mesmo clone ou em subgrupos aproximados. No entanto, foi observado que isolados com índices maiores e menores de infecção muitas vezes estavam no mesmo clone. Ao contrário, MOLINARI-MADLUM et al (1999) demonstraram que padrões em RAPD foram correlacionados com o grau de virulência de isolados de *P. brasiliensis*. Já MOTTA et al (2002) estudaram a diferença entre a amostra 18 de *P. brasiliensis* com virulência atenuada após subcultivos e amostras 18 após passagem e reisolamento em animais e demonstraram que estas apresentaram capacidades diferentes de infectar camundongos, mas padrões idênticos no RAPD, mostrando 100% de similaridade entre estas amostras. Contrariamente, Andreotti, 2002 verificou que as duas amostras de Pb18 apresentavam padrões diferenciais quanto adesão a células epiteliais bem como diferentes perfis no RAPD. Quando foi empregado o iniciador OPJ4 foi obtido um fragmento de 300bp para Pb18b, não observada no perfil de Pb18 a. Então a diferença encontrada no RAPD foi relacionada ao padrão diferencial de adesão de *P. brasiliensis* a células epiteliais, em contraste aos resultados de Motta et al., (2002). Esta banda quando clonada e sequenciada foi caracterizada como adaptina, que pode ter papel na virulência

deste fungo (ANDREOTTI et al., 2007). Por outro lado, a utilização em nosso estudo de GACA4 mostrou o aparecimento de uma banda homogênea de aproximadamente 900pb em todos os isolados, com exceção de Pb2669, obtido de lesão de pele o que o torna diferente dos demais isolados da região de Araraquara. Esse achado pode ter significado como marcador genético.

P. brasiliensis produz uma série de substâncias com características antigênicas ou não que podem ser liberadas ou produzidas durante o crescimento fúngico. Tais substâncias interagem com o hospedeiro de várias maneiras, provavelmente nos processos adesivos e/ou com o sistema imune. O papel da maioria dos componentes deste fungo, na patogenia da doença e na resposta inflamatória do hospedeiro, é ainda desconhecido. Diferentes componentes estão presentes no extrato denominado “cell-free” que foi primeiro utilizado por BLOTTA E CAMARGO (1993). Este preparado corresponde aos componentes mais superficiais da célula fúngica e são provavelmente os que mais diretamente entram em contato com as células do hospedeiro. Em nosso estudo este extrato foi preparado de quatro diferentes isolados, antes e após passagem em cultura de células e os padrões eletroforéticos mostraram primeiramente diferenças em relação à intensidade e ao número de fragmentos majoritários. Extratos protéicos de diferentes microrganismos têm sido caracterizados por eletroforese bidimensional, que além de diferenciar proteínas por massa molecular, também as separam de acordo com seu pI (ponto isoelétrico). Em *P. brasiliensis* esta metodologia foi utilizada para caracterizar novos antígenos da fase leveduriforme do fungo e comparar a expressão destes com a fase miceliana (FONSECA et al., 2001). No intuito de melhor caracterizar e diferenciar os perfis protéicos das amostras antes e após o reisolamento, esta metodologia foi empregada, também como etapa inicial para a verificação da capacidade de ligação destas proteínas aos componentes da MEC e para a verificação de perfis diferenciais entre os isolados. Maior expressão de proteínas nas amostras após a passagem por cultura de células também foi demonstrada em relação às amostras subcultivadas *in vitro*. Os isolados Pb01 e Pb339 apresentaram ligantes para fibronectina apenas após o reisolamento, mostrando que aparentemente estes ligantes possam ter papel na patogenicidade. O mesmo ocorreu com Pb01 para colágeno. O isolado Pb113, mesmo após reisolamento, não apresentou ligantes de laminina,

enquanto que Pb265 não apresentou ligantes para fibronectina. Assim, de acordo com estes dados pode-se verificar que dependendo do isolado tem-se diferentes padrões de ligantes a MEC. *P. brasiliensis* é capaz de causar doença em humanos e a determinação da diferença entre estes isolados tem sido útil para identificar características imunológicas e bioquímicas relacionadas à virulência (SINGER-VERMES et al, 1978).

Uma das facetas importantes de *P. brasiliensis* é a sua habilidade de aderir aos componentes de matriz extracelular, bem como a células epiteliais pulmonares. Este para colonizar e disseminar-se usa uma gama extensa de estratégias, incluindo as adesinas (MENDES-GIANNINI et al., 2006). Desta forma, proteínas do hospedeiro como laminina, colágeno, fibronectina, fibrinogênio e o componente C₃ do complemento estão sendo estudadas como ligantes dos microrganismos (PATTI et al., 1994).

Neste estudo, a proteína de 38 kDa, pl 6,6, ligante de fibronectina estava presente em três dos quatro extratos avaliados, e a de 31 kDa, pl 5,5, presente no isolado Pb01 reconheceu os três componentes da MEC estudados. As outras 18 proteínas foram expressas em pelo menos dois dos extratos estudados, como ligantes de laminina e/ou colágeno tipo I. Dentre essas podemos citar como ligantes de laminina as seguintes proteínas: 53 kDa e pl 7,3; 55 kDa e pl 5,9; 57 kDa e pl 5,7 presentes em Pb01R3 e Pb265R3; 43 kDa e pl 6,5; 43 kDa e pl 6,7 presentes em Pb265R3 e Pb339R3. Quanto aos ligantes de colágeno tipo I, presentes em mais de um isolado, podemos citar: 35 kDa e pl 5,0 presente em Pb265R3 e Pb113R3; 40 kDa e pl 5,3; 41 kDa e pl 6,7 presentes em Pb339R3 e Pb113R3; 42 kDa e pl 4,5 presente em Pb01R3 e Pb113R3; 43 kDa e pl 5,3 presente em Pb01R3 e Pb265R3; 44 kDa e pl 6,2 presente em Pb01R3 e Pb339R3; 45 kDa e pl 4,3 presente em Pb01R3 e Pb265R3; 47 kDa e pl 6,0 presente em Pb265R3 e Pb113R3; 46 kDa e pl 5,6; 46 kDa e pl 5,4 presentes em Pb339R3 e Pb113R3; 47 kDa e pl 6,2 presente em Pb265R3 e Pb113R3; 51 kDa e pl 5,6 presente em Pb265R3 e Pb339R3.

Neste trabalho também se identificou diferentes proteínas expressas por *P. brasiliensis* capazes de se ligar a diferentes constituintes da MEC simultaneamente, dentre as quais podemos citar as proteínas no isolado Pb01: 45kDa, pl 5,3 ligante de laminina e fibronectina ; 41kDa, pl 5,4 ligante de fibronectina e colágeno tipo I; 39kDa, pl 4,9 ligante de laminina e fibronectina ;

33kDa, pl 5,5 ligante de laminina e fibronectina ; 32kDa, pl 5,1 ligante de laminina e fibronectina ; 31kDa, pl 5,5 ligante de laminina e fibronectina e colágeno tipo I ; 26kDa, pl 7,8 ligante de fibronectina e colágeno tipo I ; no isolado Pb265, 53kDa, pl 5,6 ligante de laminina e colágeno tipo I ; 47kDa, pl 6,3 ligante de laminina e colágeno tipo I ; e no isolado 339, a de 42kDa, pl 5,7 ligante de fibronectina e colágeno tipo I ; 39kDa, pl 5,6 ligante de fibronectina e colágeno tipo I ; 39kDa, pl 5,5 ligante de fibronectina e colágeno tipo I. A identificação e caracterização de adesinas fungicas têm nos últimos anos sido otimizada pelos avanços da biologia molecular e mais recentemente pelo sequenciamento dos genomas de boa parte destes fungos. Algumas adesinas dos fungos estudados foram descritas, mas ainda não foram estudadas de maneira mais global. Além disso, dos dados gerados pelo conhecimento que se tem de leveduras como *Candida albicans*, que tem a maioria das adesinas caracterizadas, pode ser predito que se poderá encontrar múltiplas adesinas, distintas dependendo da condição do microambiente. Deve-se imaginar que esta multiplicidade seja maior à medida que o microrganismo tem capacidade de se alojar em diferentes tecidos. Estas adesinas podem ser codificadas por um ou mais genes. Várias proteínas têm sido descritas neste fungo e entre elas temos uma triose fosfato isomerase de 29kDa, pl 5,8 (PEREIRA et al., 2004); uma formamidase de 45kDa (BORGES et al., 2005); uma N-acetil beta -D- glucosaminidase de 64,7kDa, pl 6,35 (SANTOS et al., 2004); uma proteína ribossomal de 14,5kDa, pl 11,0 (JESUÍNO et al., 2004); uma catalase de 61kDa, pl 6,2 (MOREIRA et al., 2004). Algumas das proteínas descritas podem estar relacionadas a estas. Por outro lado, algumas proteínas foram descritas como tendo importante papel em sua patogênese (BARBOSA et al., 2006; PEREIRA et al., 2007; GONZALEZ et al., 2005; VICENTINI et al., 2004; ANDREOTTI et al., 2005; MENDES-GIANNINI et al., 2006). Entre estas se tem a gp43 (VICENTINI et al., 1994), a de 19 e 32kDa, pl 6,6 (GONZALEZ et al., 2005); a GPDH, 36kDa, pl 6,8 (BARBOSA et al., 2006), a de 30kDa, pl 4,9 (ANDREOTTI et al., 2005). Em nosso estudo as isoformas da gp43 de pls 6.0 e 6.3 (presente no isolado Pb339 e Pb265) e 5.7 (presente apenas no isolado Pb339) reagiram com laminina, enquanto as isoformas de pl 6.7, 6.6 e 5.5 (presente apenas no isolado Pb339) foram capazes de se ligar à fibronectina e ao colágeno tipo I, confirmando dados anteriores e aumentando o nosso conhecimento das diferentes isoformas da gp43 que reagem com componentes da MEC. Em trabalhos anteriores, esta

proteína foi também reconhecida como provável adesina para laminina e fibronectina, entre outros componentes (MENDES-GIANNINI et al., 2006). Assim, ampliando estes dados, descreveu-se aqui que os vários isoformas podem reagir diferentemente com componentes da MEC, dependendo do isolado.

Os ligantes para componentes da MEC possuem uma distribuição característica na superfície de células leveduriformes (HANNA et al., 2000; MONTEIRO DA SILVA et al., 2001) e foi demonstrado um padrão de reconhecimento diferencial ao se compararem estes componentes da MEC frente aos componentes antigênicos das cepas Pb18 e Pb265 (VICENZI, 2000; MENDES-GIANNINI et al., 2000). Experimentos de inibição mostraram que o tratamento do fungo com laminina e fibronectina e seus peptídeos sintéticos reduziram a aderência a células Vero (MENDES-GIANNINI et al., 2000; MENDES-GIANNINI et al., 2006), provavelmente, componentes diferenciais também estão presentes nestes dois isolados levando a diferença na adesão e conseqüentemente na sua virulência.

Mais recentemente tem sido depreendido que uma das estratégias possivelmente utilizadas por este patógeno no processo infeccioso (BAILÃO et al., 2006; 2007; BASTOS et al.2007, COSTA et al., 2007), seria a expressão de genes relacionados ao seu micronicho, envolvendo adaptação às condições do hospedeiro, que pode também estar relacionado à captação de micro nutrientes e influenciar no padrão de adesinas, conforme demonstrado recentemente, quando isolado de *P.brasiliensis* expressou número maior de proteínas com características de adesinas após reisolamento de animais, de culturas de células epiteliais, ou na presença de sangue (ANDREOTTI et al., 2005; DONOFRIO, 2006). *P.brasiliensis* é considerado um fungo intracelular facultativo, mas este pode aderir e invadir células epiteliais *in vivo* e *in vitro* (HANNA et al., 2000; MENDES-GIANNINI et al., 2000; De BRITO et al.,1973).

P. brasiliensis pode desenvolver vários fenótipos (crescimento, invasão e metástase) dependendo do isolado, o hospedeiro e outros fatores (MENDES-GIANNINI et al., 2000). Assim, o patógeno pode provavelmente regular a expressão de adesinas para sobreviver e causar doença. Esta expressão diferencial refletiria a habilidade de expressão de ligantes mais efetivas em determinada condição.

VII. CONCLUSÕES

- ✓ O reisolamento de *P. brasiliensis* aumentou a capacidade de infecção dos isolados testados demonstrando que a virulência pode ser atenuada com subseqüentes ciclos de subcultivo e recuperada através da passagem por cultura de células.
- ✓ Perfis diferenciais de RAPD e PCR *fingerprinting* foram observados e também correlação com área geográfica e padrão de infecção pode ser observada.
- ✓ A análise protéica dos extratos “cell free” de *P. brasiliensis*, por eletroforese bidimensional também forneceu perfis diferenciais entre as amostras subcultivadas e reisoladas.
- ✓ Foi observada diferença na expressão de ligantes à MEC dependendo do isolado.
- ✓ Diferentes isoformas da gp43 reagiram com diferentes componentes da MEC, incluindo colágeno tipo I.
- ✓ Foi verificado a presença em três dos quatro isolados avaliados de um ligante à fibronectina de 38kDa e pI6.6 e de um ligante aos três componentes da MEC de 31kDa e pI5.5.

VIII. REFÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA AJ, CARMONA JA, CUNHA C, CARVALHO A, RAPPLEYE CA, GOLDMAN WE, HOOYKAAS PJ, LEO C, LUDOVICO P, RODRIGUES F. Towards a molecular genetic system for the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **Fungal Genet Biol.**, 2007 (in press)

ALMEIDA AJ, MATUTE DR, CARMONA JA, MARTINS M, TORRES I, MCEWEN JG, RESTREPO A, LEO C, LUDOVICO P, RODRIGUES F. Genome size and ploidy of *Paracoccidioides brasiliensis* reveals a haploid DNA content: flow cytometry and GP43 sequence analysis. **Fungal Genet Biol.**, V. 44, p.25-31, 2007.

ALVES VS, PIMENTA DC, SATTLEGGER E, CASTILHO BA. Biophysical characterization of Gir2, a highly acidic protein of *Saccharomyces cerevisiae* with anomalous electrophoretic behavior. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.1, p.229-34, 2004.

ANDERSON L, SEILHAMER J. A comparison of selected mRNA and protein abundances in human liver. **Electrophoresis.**, v.18, p.533-37, 1997.

ANDRE DC, LOPES JD, FRANCO MF, VAZ CAC, CALICH VLG. 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. 121f. Dissertação (Mestrado em Análises Clínicas) Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2002.

ANDREOTTI PF, MONTEIRO DA SILVA JL, BAILAO AM, SOARES CM, BENARD G, SOARES CP, MENDES-GIANNINI MJ. Isolation and partial characterization of a 30 kDa adhesin from *Paracoccidioides brasiliensis*. **Microbes Infect.**, v.5, p.875-81, 2005.

BAILAO AM, SCHRANK A, BORGES CL, DUTRA V, WALQUIRIA INES MOLINARI-MADLUM EE, SOARES FELIPE MS, SOARES MENDES-GIANNINI MJ, MARTINS WS, PEREIRA M, MARIA DE ALMEIDA SOARES C. Differential gene expression by *Paracoccidioides brasiliensis* in host interaction conditions: representational difference analysis identifies candidate genes associated with fungal pathogenesis. **Microbes Infect.**, v.8, p.2686-97, 2006.

- BAILAO AM, SHRANK A, BORGES CL, PARENTE JA, DUTRA V, FELIPE MS, FIUZA RB, PEREIRA M, DE ALMEIDA SOARES CM. The transcriptional profile of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast cells is influenced by human plasma. **FEMS Immunol. Méd. Microbiol.**, v.51, p.43-57, 2007.
- BARBOSA MS, BAO SN, ANDREOTTI PF, DE FARIA FP, FELIPE MS, DOS SANTOS FEITOSA L, MENDES-GIANNINI MJ, SOARES CM. 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.1, p.382-9, 2006.
- BASTOS KP, BAILAO AM, BORGES CL, FARIA FP, FELIPE MS, SILVA MG, MARTINS WS, FIUZA RB, PEREIRA M, SOARES CM. The transcriptome analysis of early morphogenesis in *Paracoccidioides brasiliensis* mycelium reveals novel and induced genes potentially associated to the dimorphic process. **BMC Microbiol.**, v.10, p.7:29, 2007.
- BIAGIONI LM, SADATSUNE T, FRANCO MF, MATTOS MC., A comparative study of the immunoantigenicity of eight *Paracoccidioides brasiliensis* isolates. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**, v.28, p.281-286, 1986.
- BIALEK R, IBRICEVIC A, FOTHERGILL A, BEGEROW D. Small subunit ribosomal DNA sequence shows *Paracoccidioides brasiliensis* closely related to *Blastomyces dermatitidis*. **J. Clin. Microbiol.**, v.38, p.3190-3, 2000.
- BITTENCOURT JI, DE OLIVEIRA RM, COUTINHO ZF. Paracoccidioidomycosis mortality in the State of Paraná, Brazil, 1980/1998. **Cad. Saude Publica.**, v.21, p.1856-64, 2005
- BOUCHARA JP, TRONCHIN G, ANNAIX V. Laminin receptors on *Candida albicans* germ tubes. **Infect. Immun.**, v.58, p.48-54, 1990.
- BROMLEY IM, DONALDSON K. Binding of *Aspergillus fumigatus* spores to lung epithelial cells and basement membrane proteins: relevance to the asthmatic lung. **Thorax.**, v. 51, p. 1203-1209, 1996.
- BRUMMER E, RESTREPO A, HANSON LH, STEVENS DA. Virulence of *Paracoccidioides brasiliensis*: The influence of in vitro passage and storage. **Mycopathologia.**, v. 109, p. 13-8, 1990.
- CALCAGNO AM, NIÑO-VEGA G, SAN-BLAS F, SAN-BLAS G. Geographic Discrimination of *Paracoccidioides brasiliensis* Strains by Randomly Amplified Polymorphic DNA Analysis. **J. Clin. Microbiology.**, v. 36, p. 1733-1736, 1998.

- CAMARGO ZP, UNTERKIRCHER C, CAMPOY SP, TRAVASSOS LR. Production of *Paracoccidioides brasiliensis* exoantigens for immunodiffusion tests. **J. Clin. Microbiol.**, v. 26, p. 2147-51, 1988.
- CANO MI, CISALPINO PS, GALINDO I, RAMIREZ JL, MORTARA RA, DA SILVEIRA JF. Electrophoretic karyotypes and genome sizing of the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **J Clin Microbiol.**, v.36, p.742-7, 1998.
- CARVALHO KC, GANIKO L, BATISTA WL, MORAIS FV, MARQUES ER, GOLDMAN GH, FRANCO MF, PUCCIA R. Virulence of *Paracoccidioides brasiliensis* and gp43 expression in isolates bearing known PbGP43 genotype. **Microbes Infect.**, v.7, p.55-65, 2005.
- CASADEVALL A, PIROFSKI LA. Host-pathogen interactions: redefining the basic concepts of virulence and pathogenicity. **Infect. Immun.**, v. 67, p. 3703-13, 1999.
- CASOTTO, M. Characterization of the cellular antigens of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast form. **J. Clin. Microbiol.**, v. 28, p. 1188-93, 1990.
- CASTANEDA E, BRUMMER E, PAPPAGIANIS D, STEVENS DA. Chronic pulmonary and disseminated paracoccidioidomycosis in mice: quantitation of progression and chronicity. **J. Med. Vet. Mycol.**, v. 23, p. 377-87, 1987.
- CASTRO NDAS, MAIA ZA, PEREIRA M, SOARES, CM. Screening for glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins in the *Paracoccidioides brasiliensis* transcriptome. **Genet. Mol. Res.**, v.2, p.326-45, 2005.
- CHENG S, CLANCY CJ, CHECKLEY MA, ZHANG Z, WOZNIAK KL, SESHAN KR, JIA HY, FIDEL P JR, COLE G, NGUYEN MH. The role of *Candida albicans* NOT5 in virulence depends upon diverse host factors in vivo. **Infect. Immun.**, v.73, p.7190-7, 2005.
- COLTRI KC, CASABONA-FORTUNATO AS, GENNARI-CARDOSO ML, PINZAN CF, RUAS LP, MARIANO VS, MARTINEZ R, ROSA JC, PANUNTO-CASTELO A, ROQUE-BARREIRA MC. Paracoccin, a GlcNAc-binding lectin from *Paracoccidioides brasiliensis*, binds to laminin and induces TNF-alpha production by macrophages. **Microbes Infect.**, v.3, p.704-13, 2006.
- COSTA A, GOMÉZ F, PEREIRA M, FELIPE MS, JESUÍNO R, DEEPE G, SOARES CMA. Characterization of a gene which encodes a mannosyltransferase homolog of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Microb. Infect.**, v.4, p.1027, 2002.
- COSTA DL, DIAS-MELICIO LA, ACORCI MJ, BORDON AP, TAVIAN EG, PERACOLI MT, SOARES AM. Effect of interleukin-10 on the *Paracoccidioides*

brasiliensis killing by gamma-interferon activated human neutrophils. **Microbiol. Immunol.**, v.51,p. 73-80, 2007.

CUNHA DA, ZANCOPE-OLIVEIRA RM, SUELI M, FELIPE S, SALEM-IZACC SM, DEEPE GSJ, SOARES CMA. Heterologous expression, purification, and immunological reactivity of a recombinant HSP60 from *Paracoccidioides brasiliensis*. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, v.9, p. 374-7, 2002.

DIEZ S, GOMEZ BL, RESTREPO A, HAY RJ, HAMILTON AJ. *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.359-65, 2002.

DOMERGUE R, CASTANO I, DE LAS PENAS A, ZUPANCIC M, LOCKATELL V, HEBEL JR, JOHNSON D, CORMACK BP. Nicotinic acid limitation regulates silencing of *Candida* adhesins during UTI. **Science.**, v.308, p.866-70, 2005.

DONOFRIO, FC. **Isolamento e caracterização parcial de adesina de Paracoccidioides brasiliensis ligante de fibronectina.** 2007. 108p Dissertação (Mestrado em Análises Clínicas) Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2007.

EBANKS RO, CHISHOLM K, MCKINNON S, WHITEWAY M, PINTO DM. Proteomic analysis of *Candida albicans* yeast and hyphal cell wall and associated proteins. **Proteomics.**, v.7, p. 2147-56, 2006.

FELIPE MS, ANDRADE RV, ARRAES FB, NICOLA AM, MARANHAO AQ. Transcriptional profiles of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* in mycelium and yeast cells. **J. Biol. Chem.**, v.26, p. 24706-14, jul 2005.

FELIPE MS, TORRES FA, MARANHAO AQ, SILVA-PEREIRA I, POCAS-FONSECA MJ, CAMPOS EG, MORAES LM, ARRAES FB, CARVALHO MJ, ANDRADE RV, NICOLA AM, TEIXEIRA MM, JESUINO RS, PEREIRA M, SOARES CM, BRIGIDO MM. Functional genome of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v.3, p.369-81, set 2005.

FERREIRA-DA-CRUZ MF, GALVÃO-CASTRO B, DANIEL-RIBEIRO C. Isolation and antigenicity of the 43 kilodalton *Paracoccidioides brasiliensis* immunodominant antigen. **Infect. Immun.**, v. 60, p. 2667-71,1992.

- FONSECA CA, JESUÍNO RSA, FELIPE MSS, CUNHA DA, BRITO WA, SOARES CMA. Two-dimensional electrophoresis and characterization of antigens from *Paracoccidioides brasiliensis*. **Microb. Infect.**, v.3, p.535-42, 2001.
- FRANCO M, LACAZ CS, RESTREPO-MORENO A, DEL NEGRO G. Paracoccidioidomycosis. Boca Raton: CRC Press, 1994.
- GANIKO L, PUCCIA R, MARIANO VS, SANT'ANNA OA, FREYMULLER E, ROQUE-BARREIRA MC, TRAVASSOS LR. Paracoccin, an N-acetyl-glucosamine-binding lectin of *Paracoccidioides brasiliensis*, is involved in fungal growth. **Microbes Infect.**, v.9, p.695-703, 2007..
- GAUR NK, KLOTZ SA. Expression, cloning, and characterization of a *Candida albicans* gene, ALA1, that confers adherence properties upon *Saccharomyces cerevisiae* for extracellular matrix proteins. **Infect. Immun.**, v. 65, p. 5289-94, 1997.
- GIL ML, PENALVER MC, LOPEZ-RIBOT JL, O'CONNOR JE, MARTINEZ JP. Binding of extracellular proteins to *Aspergillus fumigatus* conidia. **Infect. Immun.**, v. 64, p. 5239-47, 1996.
- GOLDMAN GH, DOS REIS MARQUES E, DUARTE RIBEIRO DC, DE SOUZA BERNARDES LA, QUIAPIN AC, VITORELLI PM, SAVOLDI M, SEMIGHINI CP, DE OLIVEIRA RC, NUNES LR, TRAVASSOS LR, PUCCIA R, BATISTA WL, FERREIRA LE, MOREIRA JC, BOGOSSIAN AP, TEKAIA F, NOBREGA MP, NOBREGA FG, GOLDMAN MH. 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.1, p.34-48, 2003.
- GOMEZ BL, FIGUEROA JI, HAMILTON AJ, DIEZ S, ROJAS M, TOBON AM, HAY RJ, RESTREPO A. Antigenemia in patients with paracoccidioidomycosis: detection of the 87-kilodalton determinant during and after antifungal therapy. **J. Clin. Microbiol.**, v.36, p.3309-16, 1998.
- GONZALEZ A, GOMEZ BL, RESTREPO A, HAMILTON AJ, CANO LE. Recognition of extracellular matrix proteins by *Paracoccidioides brasiliensis* yeast cells. **Med. Mycol.**, v.7, p.637-45, 2005.
- GREEN CB, CHENG G, CHANDRA J, MUKHERJEE P, GHANNOUM MA, HOYER LL. RT-PCR detection of *Candida albicans* ALS gene expression in the

reconstituted human epithelium (RHE) model of oral candidiasis and in model biofilms. **Microbiology.**, v.150, p.267-75, 2004.

GUARRO J, GENEJ, STCHIGEL AM. Developments in fungal taxonomy. **Clin Microbiol Rev.** v.12, p.454-500, 1999.

HAHN RC, MACEDO AM, FONTES CJ, BATISTA RD, SANTOS NL, HAMDAN JS. Randomly amplified polymorphic DNA as a valuable tool for epidemiological studies of *Paracoccidioides brasiliensis*. **J. Clin. Microbiol.**, v.7, p.2849-54, 2003.

HAMILTON AJ, JEAUVONS L, YOUNGCHIM S, VANITTANAKOM N, HAY RJ. Sialic acid-dependent recognition of laminin by *Penicillium marneffe* conidia. **Infect. Immun.**, v. 66, p. 6024-6026, 1998.

HAMILTON AJ, JEAUVONS L, YOUNGCHIM S, VANITTANATON N. Recognition of fibronectin by *Penicillium marneffe* conidia via sialic acid-dependent process and its relationship to the interaction between conidia and laminin. **Infect. Immun.**, v. 67, p. 5200-5205, 1999.

HANNA, S.A. **Estudo dos mecanismos e fatores de virulência de *Paracoccidioides brasiliensis* em culturas de células.** 1995. 166f. Dissertação (Mestrado em Biologia) Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 1995.

HANNA AS, UEMURA MA, MORAES R, RICCI LC, MENDES-GIANNINI MJS. Adherence and virulence of *Paracoccidioides brasiliensis*. In: ENCUENTRO INTERNACIONAL SOBRE PARACOCCIDIOIDOMICOSIS, 6, 1996, Madri, Espanha.

HANNA AS, MONTEIRO da SILVA JL, MENDES-GIANNINI MJS. Adherence and intracellular parasitism of *Paracoccidioides brasiliensis* in Vero cells. **Microb. Infect.**, v. 2, p. 1-8, 2000.

HERNANDEZ R, NOMBELA C, DIEZ-OREJAS R, GIL C. Two-dimensional reference map of *Candida albicans* hyphal forms. **Proteomics.**, v.4, p.374-82, 2004.

HOGAN LH, KLEIN BS, LEVITZ SM. Virulence factors of medically important fungi. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.9, p. 469-488, 1996.

IZACC SM, GOMÉZ FJ, JESUÍNO RS, FONSECA CA, FELIPE MS, DEEP GS, SOARES CM. Molecular cloning, characterization and expression of the heat

- shock protein 60 gene from the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **Med. Mycol.**, v.39, p. 445-55, 2001.
- KASHINO SS, CALICH VL, BURGER E, SINGER-VERMES LM. In vivo and in vitro characteristics of six *Paracoccidioides brasiliensis* strains. **Mycopathologia**, v.92, p.173-8, 1985.
- KASHINO SS, CALICH VL, SINGER-VERMES LM, ABRAHAMSOHN PA, BURGER E. Growth curves, morphology and ultrastructure of ten *Paracoccidioides brasiliensis* isolates. **Mycopathologia.**, v.99, p.119-28, 1987.
- KLOTZ SA, RUTTEN MJ, SMITH RL, BABCOCK SR, CUNNINGHAM MD. Adherence of *Candida albicans* to immobilized extracellular matrix proteins is mediated by calcium-dependent surface glycoproteins. **Microb. Pathog.**, v. 14, p. 133-147, 1993.
- KUROKAWA CS, SUGIZAKI MF, PERAÇOLI MT. Virulence factors in fungi of systemic mycoses. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.**, v.3, p.125-135, 1998.
- KUROKAWA CS, LOPES CR, SUGIZAKI MF, KURAMAE EE, FRANCO MF, PERAÇOLI MT. Virulence profile of ten *Paracoccidioides brasiliensis* isolates: association with morphologic and genetic patterns. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.**, v. 47, p. 257-262, 2005.
- LACAZ CS, PASSOS FILHO MCR, FAVA NETTO C, MAC MARROWN B. Contribuição para o estudo da “blastomicose-infecção”. Inquérito com a paracoccidioidina. Estudo sorológico e clínico-radiológico dos paracoccidioidinopositivos. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.**, v. 1, p.245, 1959.
- LACAZ CS, RESTREPO MORENO A, DEL NEGRO G. **Paracoccidioidomycosis** Boca Raton: CRC Press, 1994.
- LAEMMLI UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature.**, v. 227, p. 680-5, 1970.
- LASKER B, PAGE LS, LOTT LT, KOBAYASHI GS. Isolation, characterization, and sequencing of *Candida albicans* repetitive element 2. **Gene.**, v.116, p. 51-57,1992.
- LENZI HL, CALICH VLG, MENDES-GIANNINI MJS, XIDIEH C, MIYAJI M, MOTA EM, MACHADO MP, RESTREPO A. Two patterns of extracellular matrix expression in experimental paracoccidioidomycosis. **Med. Mycol.**, v.38(1), p. 115-119, 2000.

- LEVDANSKY E, ROMANO J, SHADKCHAN Y, SHARON H, VERSTREPEN KJ, FINK GR, OSHEROV N. Coding tandem repeats generate diversity in *Aspergillus fumigatus* genes. **Eukaryot Cell.**, v.6, p.1380-91, 2007.
- LOPES JD, REIS MD, BRETANI RR. Presence of laminin receptors in *Staphylococcus aureus*. **Science.**, v. 229, p. 275-7,1985.
- LOPEZ-RIBOT JL, CHAFFIN WL. Binding of the extracellular matrix component entactin to *Candida albicans*. **Infect. Immun.**, v. 62, p. 4564-71, 1994.
- LOPEZ-RIBOT JL, BIKANDI J, SAN MILLAN RS, CHAFFIN WL. Interactions between *Candida albicans* and the human extracellular matrix component tenascin-C. **Mol. Cell Bio.I Res. Commun.**, v. 2, p. 58-63, 1999.
- LOWRY DH, ROSEBROUGH NJ, FAN AL, RANDALL RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, v. 193, p. 265-275, 1951.
- MANNS BJ, BAYLIS BW, URBANSKI SJ, GIBB AP, RABIN HR. Paracoccidioidomycosis: case report and review. **Clin. Infect. Dis.**, v. 23, p. 1026-32, 1996.
- MARQUES ER, FERREIRA ME, DRUMMOND RD, FELIX JM, MENOSSI M, SAVOLDI M, TRAVASSOS LR, PUCCIA R, BATISTA WL, CARVALHO KC, GOLDMAN MH, GOLDMAN GH. Identification of genes preferentially expressed in the pathogenic yeast phase of *Paracoccidioides brasiliensis*, using suppression subtraction hybridization and differential macroarray analysis. **Mol. Genet. Genomics.**, v.271, p.667-77, 2004.
- MATUTE DR, SEPULVEDA VE, QUESADA LM, GOLDMAN GH, TAYLOR JW, RESTREPO A, MCEWEN JG. Microsatellite analysis of three phylogenetic species of *Paracoccidioides brasiliensis*. **J. Clin. Microbiol**, v.44, p.2153-7, 2006.
- Mc EWEN JG, BEDOYA V, PATINO MM, SALAZAR ME, RESTREPO A. experimental murine paracoccidioidomycosis induced by inhalation of conidia. **J. Med. Mycol.**, v. 25, p. 165-175, 1987.
- Mc EWEN JG, TAYLOR JW, CARTER DXUJ, FELIPE MSS, VILGALYS R, MITCHELL TG, KASUGA T, WHITE T, BUI T, SOARES CMA . Molecular typing of pathogenic fungi. **Med. Mycol.**, v. 38, p. 189-197, 2000.
- Mc MAHON JP, WHEAT J, SOBEL ME, PASULA R, DOWNING JF, MARTIN WJ. Murine Laminin binds to *Histoplasma capsulatum*. A possible mechanism of dissemination. **J. Clin. Inv.**, v. 96, p. 1010-7, 1995.

- MEDINA ML, HAYNES PA, BRECI L, FRANCISCO WA. Analysis of secreted proteins from *Aspergillus flavus*. **Proteomics.**, v.12, p.3153-61, 2005.
- MENDES-GIANNINI MJS, BUENO JP, SHIKANAI-YASUDA MA, FERREIRA AW, MASUDA A. Detection of the 43.000-molecular-weight glycoprotein in sera of patients with paracoccidioidomycosis. **J. Clin. Microbiol.**, v. 27, p. 2842-85, 1989.
- MENDES-GIANNINI MJS, RICCI LC, UEMURA MA, TOSCANO E, ARNS CW. Invasion of Vero cells by *Paracoccidioides brasiliensis*. **Rev. Arg. Micol.**, v. 15, p. 29-36, 1992
- MENDES-GIANNINI MJS, RICCI LC, UEMURA MA, TOSCANO E, ARNS CW. Infection and apparent invasion of Vero cells by *Paracoccidioides brasiliensis*. **J. Med. Vet. Mycol.**, v. 32, p. 189-97, 1994.
- MENDES-GIANNINI MJS, TAYLOR ML, BOUCHARA JB, BURGER E, CALICH VLG, ESCALANTE ED, HANNA AS, LENZI HL, MACHADO MP, MIYAJI M, MONTEIRO DA SILVA JL, MOTA EM, RESTREPO A, RESTREPO S, TRONCHIN G, VINCENZI LR, XIDIEH CF, ZENTENO E. Pathogenesis II: Fungal responses to host responses: interaction of host cells with fungi. **Med. Mycol.**, v.38, p. 113-23, 2000.
- MENDES-GIANNINI MJ, ANDREOTTI PF, VINCENZI LR, DA SILVA JL, LENZI HL, BENARD G, ZANCOPE-OLIVEIRA R, DE MATOS GUEDES HL, SOARES CP. Binding of extracellular matrix proteins to *Paracoccidioides brasiliensis*. **Microbes Infect.**, v.6, p.1550-9, 2006.
- MENDES-GIANNINI MJ, MONTEIRO DA SILVA JL, SILVA JF, DONOFRIO FC, MIRANDA ET, ANDREOTTI PF, SOARES CP. Interactions of *Paracoccidioides brasiliensis* with host cells: recent advances. **Mycopathologia**. 2007 (in press).
- MOLESE A, PANE A, VIANGIANI A, PAGANO A. Su un caso di granulomatosi paracoccidioidica. (Malattia di Lutz-Splendore De Almeida). **G. Mal. Infec.**, v. 9, p.241, 1957.
- MOLINARI-MADLUN EEWI, FELIPE MSS, SOARES CM. Virulence of *Paracoccidioides brasiliensis* isolates can be correlated to groups defined by random amplified polymorphic DNA analysis. **Medical Mycology.**, v. 37, p. 269-276, 1999.
- MONTEIRO DA SILVA JL, MENDES-GIANNINI MJS, SANDOVAL MP, LENZI HL. Adesão e invasão de *Paracoccidioides brasiliensis* em cultura de células Vero. **Rev. Ciênc. Farm.**, v. 22, p. 103-29, 2001.

MONTOYA AE, MORENO MN, RESTREPO A, MCEWEN JG. Electrophoretic karyotype of clinical isolates of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Fungal Genet. Biol.**, v.21, p.223-7, 1997.

MOTTA LC. Granulomatose paracoccidióidica. Forma orgânica isolada. **Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. São Paulo.**, v. 11, p.353-355, 1956.

MOTTA TR, MOREIRA-FILHO CA, MENDES RP, SOUZA LR, SUGIZAK MF, BAUEB S, CALICH VLG, VAZ CAC. Evaluation of DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers (RAPD) as genetically elements to differentiate virulent and non-virulent *Paracoccidioides brasiliensis* isolates. **FEMS Immunology and Medical Microbiology.**, v. 33, p. 151-157, 2002.

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.255-62, 1988.

NINO-VEGA GA, CALCAGNO AM, SAN-BLAS G, SAN-BLAS F, GOODAY GW, GOW NA. RFLP analysis reveals marked geographical isolation between strains of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Med Mycol.**, v.38, p.437-41, 2000.

NUNES LR, COSTA DE OLIVEIRA R, LEITE DB, DA SILVA VS, DOS REIS MARQUES E, DA SILVA FERREIRA ME, RIBEIRO DC, DE SOUZA BERNARDES LA, GOLDMAN MH, PUCCIA R, TRAVASSOS LR, BATISTA WL, NOBREGA MP, NOBREGA FG, YANG DY, DE BRAGANCA PEREIRA CA, GOLDMAN GH. Transcriptome analysis of *Paracoccidioides brasiliensis* cells undergoing mycelium-to-yeast transition. **Eukaryot. Cell.**, v.4, p.2115-28, 2005.

OLIVEIRA H, BAPTISTA AP. Um caso de blastomicose sul americana (23 anos de incubação). Ação da sulfametoxipiridazina. **Coimbra Med.**, v. 7, p.661-664, 1960.

ORTIZ BI, GARCIA MA, RESTREPO A, McEWEN JG. Immunological characterization of a recombinant 27-kilodalton antigenic protein from *Paracoccidioides brasiliensis*. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, v.3, p.239-41, 1996.

ORTIZ BL, DIÉZ S, URÁN ME, RIVAS JM, 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.2651-9, 2000.

- 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.2651-9, 2000.
- PEREIRA LA, PEREIRA M, FELIPE MS, ZANCOPE-OLIVEIRA RM, SOARES CM. Proteomic identification, nucleotide sequence, heterologous expression and immunological reactivity of the triosephosphate isomerase of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Microbes Infect.**, v.10, p.892-900, 2004.
- PEREIRA LA, BAO SN, BARBOSA MS, DA SILVA JL, FELIPE MS, DE SANTANA JM, MENDES-GIANNINI MJ, DE ALMEIDA SOARES CM. Analysis of the *Paracoccidioides brasiliensis* triosephosphate isomerase suggests the potential for adhesin function. **FEMS Yeast Res.**, 2007 (in press).
- PEREIRO MM. Dos casos de blastomicosis sulamericana observados en España. **Acta Dermo-Sifilogr. Madrid.**, v. 65, p.509, 1974.
- PERFECT SE, O'CONNELL RJ, GREEN EF, DOERING-SAAD C, GREEN JR. Expression cloning of a fungal proline-rich glycoprotein specific to the biotrophic interface formed in the Colletotrichum-bean interaction. **Plant. J.**, v. 15, p.273-9, 1998.
- PETERSON SW, SIGLER L. Molecular genetic variation in *Emmonsia crescens* and *Emmonsia parva*, etiologic agents of adiaspiromycosis, and their phylogenetic relationship to *Blastomyces dermatitidis* (*Ajellomyces dermatitidis*) and other systemic fungal pathogens. **J Clin Microbiol.**, v.36, p.2918-25, 1998.
- 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.**, 1999 v.4-5, p.1001-10, 1999.
- PITARCH A, SANCHEZ M, NOMBELA C, GIL C. Sequential fractionation and two-dimensional gel analysis unravels the complexity of the dimorphic fungus *Candida albicans* cell wall proteome. **Mol. Cell Proteomics.**, v.12, p.967-82, 2002.
- PITARCH A, SANCHEZ M, NOMBELA C, GIL C. Analysis of the *Candida albicans* proteome. I. Strategies and applications. **J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.**, v.1, p.101-28, 2003.
- POSADA, GH. Encuesta sobre la tuberculosis, la histoplasmosis y la paracoccidioidomycosis en un hospital de tuberculosos. **Antioq. Med.**, v. 18, p.49-51, 1968.

- PUCCIA R, TAKAOKA DT, TRAVASSOS LR. Purification of the 43 kDa glycoprotein from the exocellular components excreted by *Paracoccidioides brasiliensis* in liquid cultura (TOM medium). **J. Med. Vet. Mycol.**, v. 29, p. 57-60, 1991.
- SAKATA N, YAMAZAKI K, KOGURE T. Identification of a 21 kDa laminin-binding component of *Candida albicans*. **Zentralbl. Bakteriol.**, v. 289, p.217-25, 1999.
- SAMBROOK J, RUSSELL DW. Molecular Cloning: a Laboratory Manual. New York: Cold Spring. **Harbor Laboratory Press**, 2001.
- SAN-BLAS G, SAN-BLAS F, ORMAECHEA E, SERRANO LE. Cell wall analysis of adenine requiring mutant of the yeast like form of *Paracoccidioides brasiliensis* strain IVICPb9. **Sabouraudia.**, v. 15, p. 297-303, 1977.
- SAN-BLAS F, SAN-BLAS G. Bioquímica y dimorfismo en *Paracoccidioides brasiliensis*. In: Del Negro, G., Lacaz, C.S., Fiorillo (Eds). *Paracoccidioidomicose*, São Paulo, Sarvier, p. 35-58, 1982.
- SAN-BLAS F, SAN-BLAS G. Biochemistry of *Paracoccidioides brasiliensis* dimorphism. In *Paracoccidioidomycosis*. FRANCO, M.; LACAZ, C.S.; RESTREPO-MORENO, A.; DEL NEGRO, G.(Eds). London: Boca raton, CRC Press., p. 49-66, 1994.
- SAN-BLAS G, NINO-VEJA G, ITURRIAGA T. *Paracoccidioides brasiliensis* and paracoccidioidomycosis: molecular approaches to morphogenesis, diagnosis, epidemiology, taxonomy and genetics. **Med. Mycol.**, v.40, p.225-42, 2002.
- SINGER-VERMES LM, BURGER E, FRANCO MJ, MOSCARDI BACHI M, MENDES-GIANNINI MJS, CALICH VLC. Evaluation of the *Paracoccidioides brasiliensis* isolates in susceptible in bred mice. **J. Med. Vet. Mycol.**, v.27, p. 71-82, 1989.
- SINGER-VERMES LM, BURGER E, CALICH VLC, MODESTO XAVIER LH. Pathogenicity and immunogenicity of *Paracoccidioides brasiliensis* isolates in the human disease and in experimental murine model. **Clin. Exper. Immun.**, v.97, p. 113-119, 1994.
- SOARES CMA, MADLUN EEWIM, SILVA SP, PEREIRA M, FELIPE MSS. Characterization of *Paracoccidioides brasiliensis* Isolates by Random Amplified Polymorphic DNA Analysis. **J. Clin. Microbiology.**, v. 33, p. 505-507, 1995.

STAAB JF, BRADWAY SD, FIDEL PL, SUNDSTROM P. Adhesive and mammalian transglutaminase substrate properties of *Candida albicans* Hwp1. **Science.**, v. 283, p.1535-8, 1999.

SVIDZINSKI TIE, MIRANDA-NETO MH, SANTANA RG, FISCHMAN O, COLOMBO AL. *Paracoccidioides brasiliensis* isolates obtained from patients with acute and chronic disease exhibit morphological differences after animal passage. **Rev. Inst. Med. Trop.**, v.41, p. 279-83, 1999.

TAVARES AH, SILVA SS, DANTAS A, CAMPOS EG, ANDRADE RV, MARANHÃO AQ, BRÍGIDO MM, PASSOS-SILVA DG, FACHIN AL, TEIXEIRA SM, PASSOS GA, SOARES CM, BOCCA AL, CARVALHO MJ, SILVA-PEREIRA I, FELIPE MS. Early transcriptional response of *Paracoccidioides brasiliensis* upon internalization by murine macrophages. **Microb. Infect.**, v.9, p. 583-590, 2007.

TOMAZETT PK, CRUZ AH, BONFIM SM, SOARES CM, PEREIRA, M. The cell wall of *Paracoccidioides brasiliensis*: insights from its transcriptome. **Genet. Mol. Res.**, v.2, p.309-25, 2005.

TOTTI DO, ROMANHA AJ, GRISARD EC, SIMPSON AJ, KOURY MC. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis of *Paracoccidioides brasiliensis* isolates. **Rev. Latinoam. Microbiol.**, v. 41, p.139-43, 1999.

TRONCHIN G, BOUCHARA JP, FERRON M, LARCHER G, CHABASSE D. Cell surface properties of *Aspergillus fumigatus* conidia: correlation between adherence, agglutination and rearrangements of the cell wall. **J. Microbiol.**, v. 41, p. 714-721, 1993.

TRONCHIN G, ESNALT K, RENIER G, FILMON R, CHABASSE D, BOUCHARA JP. Expression and identification of a laminin-binding protein a *Aspergillus fumigatus* conidia. **Infect. Immun.**, v. 1, p. 9-15, 1997.

UEMURA MA, HANNA SA, RICCI LC, SANDOVAL M, MENDES-GIANNINI MJS. An electron microscopy study of *Paracoccidioides brasiliensis* adherence and invasion of culture cells. In: ENCUENTRO INTERNACIONAL SOBRE PARACOCCIDIOIDOMICOSIS, 6, 1996, Madri, Espanha.

VENTER JC, ADAMS MD, MYERS EW. The sequence of the human genome. **Science.**, v.5507, p.1304-51, 2001.

VERSTREPEN KJ, REYNOLDS TB, FINK GR. Origins of variation in the fungal cell surface. **Nat. Rev. Microbiol.**, v.2, p.533-40, 2004.

- VERSTREPEN KJ, KLIS FM. Flocculation, adhesion and biofilm formation in yeasts. **Mol. Microbiol.**, v.60, p.5–15, 2006.
- VICENTINI AP, GESZTESI JL, FRANCO MF, de SOUZA W, de MORAES JZ, TRAVASSOS LR, LOPES JD. Binding of *Paracoccidioides brasiliensis* to Laminin through surface glycoprotein gp43 leads to enhancement of fungal pathogenesis. **Infect. Immun.**, v. 62, p. 1465-9, 1994.
- VICENTINI AP, MORAES JZ, GESZTESI JL, FRANCO MF, DE SOUZA W, LOPES JD. Laminin-binding epitope on gp43 from *Paracoccidioides brasiliensis* is recognized by a monoclonal antibody raised against *Staphylococcus aureus* laminin receptor. **J. Med.Vet. Mycol.**, v.35, p.37-43, 1997.
- WESTERMEIER R, LOYLAND S, ASBURY R. Proteomics technology. **J. Clin. Ligand. Assay.**, v.25, p.1-11, 2002.
- YAN S, RODRIGUES RG, CAHN-HIDALGO D, WALSH TJ, ROBERTS DD. Hemoglobin induces binding of several extracellular matrix proteins to *Candida albicans*. Identification of a common receptor for fibronectin, fibrinogen, and laminin. **J. Biol. Chem.**, v.273,p.5638-44,1998.
- YARZÁBAL, LA. Composición antigênica do *Paracoccidioides brasiliensis*. In: DEL NEGRO, G.; LACAZ,C.S.; FIORILLO, A.M. **Paracoccidioidomicose**. São Paulo: Sarvier, 1982.
- ZHANG N, HARREX AL, HOLLAND BR, FENTON LE, CANNON RD, SCHMID J. Sixty alleles of the ALS7 open reading frame in *Candida albicans*: ALS7 is a hypermutable contingency locus. **Genome Res.**, v.13, p.2005-17, 2003.