



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS

Patrícia Ferrari Andreotti

**“INTERAÇÃO DE *Paracoccidioides brasiliensis* COM CÉLULAS
EPITELIAIS. CARACTERIZAÇÃO DE PROVÁVEIS FATORES DE
VIRULÊNCIA”.**

Tese apresentada ao programa de
Pós-Graduação em Análises Clínicas
da Faculdade de Ciências
Farmacêuticas – UNESP – Araraquara
como pré-requisito para obtenção do
título de doutor.

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

ARARAQUARA-SP
2006

Ficha Catalográfica

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

A559i Andreotti, Patrícia Ferrari
Interação de *Paracoccidioides brasiliensis* com células epiteliais.
Caracterização de prováveis fatores de virulência / Patrícia Ferrari Andreotti. –
Araraquara, 2006.
124 f.

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

Orientadora: Maria José Soares Mendes Giannini

1. *Paracoccidioides brasiliensis* – Proteína 14-3-3. 2. *Paracoccidioides brasiliensis* – Fator de virulência. 3. Adaptina. 4. Citoesqueleto. 5. Apoptose. I. Giannini, Maria José Soares Mendes, orient. II. Título.

CDD: 616.969

CAPES: 40300005

*“Nunca ande pelo caminho traçado, pois ele conduz
somente até onde os outros já foram”*

Alexander Graham Bell (1847-1922)

*“Algumas pessoas nunca aprendem nada porque
entendem tudo muito depressa”*

Alexander Pope (1688-1744)

*“Investir em conhecimento rende sempre os melhores
juros”*

Benjamin Franklin (1706-1790)

*“O que sabemos é uma gota, o que ignoramos é um
oceano”*

Isaac Newton (1642-1727)

*“Para os crentes, Deus está no princípio de todas as
coisas. Para os cientistas, no final de toda reflexão”*

Max Planck (1858-1947)

Dedico:

A Deus

Ser transcendental e perfeito; substância infinita e soberana, imanente a todo real, que certamente: "...se fez presente em todos os momentos firmes e trêmulos. E, passo a passo, pude sentir a Sua mão na minha, transmitindo-me a segurança necessária para enfrentar meu caminho e seguir... A Sua presença é qualquer coisa como a luz e a vida, e sinto que, em meu gesto, existe o Seu gesto e, em minha voz, a Sua voz."

(Vinícius de Moraes)

Aos meus pais Alcídney e Maria Francisca

Hoje, gostaria de enxergar com seus olhos. Assim, veria sob um véu benevolente e sincero toda a minha euforia. Enfrentei um mundo que diariamente me coloca obstáculos, e cujas decisões são cada vez mais difíceis e sérias, mas venci. Gostaria, também, de ceder-lhe meu lugar, para que vocês pudessem alcançar o tamanho da vontade de retribuir. Mais do que lhes render homenagens por uma vida inteira de dedicação é fundamental agora fazer com que vocês tenham a certeza de que estão comigo em cada atitude. Então, nós, parceiros de longa data, poderíamos ser um só, como antes, quando vocês traçavam meus planos e fracassavam por mim e triunfavam por nós. Hoje, eu sou eu em minhas particularidades, mas em tudo o que faço há muito mais de vocês do que um dia eu poderia supor.

Amo Vocês!!!

Ao André

Se hoje comemoro uma conquista, esta se deve também a você que esteve ao meu lado em todos os momentos, que fez de meus sonhos seus próprios objetivos e de meus objetivos sua própria luta. A você, que me ofereceu sempre o melhor através do olhar de apoio, de sua palavra de incentivo, de seu gesto de compreensão, de sua atitude de segurança, mesmo quando me veio o desânimo. Nos momentos importantes, suportou minha ausência; nos dias de fracasso, respeitou meus sentimentos. Se hoje estou aqui é porque você acreditou em meu sucesso e caminhou ao meu lado! Obrigado pelo amor, pela paciência e pelo companheirismo.

Eu te amo!

Aos meus irmãos Marcos e Alcimara

À vocês que muito amo e que compartilharei dos meus ideais, compreenderam-me, incentivaram-me, mesmo que no silêncio e na distância.

*Aos meus sobrinhos Júlia, Matheus, Luíza e
Pedro*

A chegada de vocês durante esse trabalho iluminou os meus dias, apresentou um sentimento nunca antes vívido e preencheu minha vida de alegria...

À Profa. Dra. Maria José Mendes Giannini

“Se seus projetos são para um ano, semeie um grão.

Se são para dez anos, plante uma árvore.

Se são para cem anos, instrua um povo.

*Semeando uma vez um grão, você colherá uma única
vez.*

Plantando uma árvore, colherá dez vezes.

Instruindo um povo, colherá cem vezes.

*Se você der um peixe a um homem, ele comerá uma
única vez.*

*Se, porém, o ensinar a pescar, ele comerá a vida
inteira.”*

(Kuan -Tzu)

Obrigada pela confiança em mim depositada!

Agradecimentos

“Cada um que passa em nossa vida, passa só, pois cada pessoa é única, e nenhuma substitui a outra. Cada uma que passa em nossa vida, passa sozinha, mas não vai só, nem deixa só. Leva um pouco de nós, deixa um pouco de si. Há os que levam muito, mas não há os que não deixaram nada. Esta é a nossa vida e a prova de que duas almas não se encontram por acaso...”

(Saint-Exupéry)

Aos grandes amigos Danielle, Eliana, Gustavo, Juliana, Lillian e Tírene, pela amizade e alegria sempre presentes, por serem tudo de bom na minha vida!!!!

À Rosângela (Rô), pela paciência, grande auxílio, amizade e ótimas risadas!

À Elaine (Tosca), pelos ensinamentos e paciência em transmiti-los.

Aos queridos amigos “da Micologia” Julhiany, Marcelo, Ana Marisa, Lílíana, Fabíana, Alíne, Susana, Adriána, Paula, Ana Carolína (Pi), Natália, Rosana, José Nelson, Sebastião, pelas animadas conversas e ótímo convívio!

À Profa. Dra. Christiane Pienna Soares e Profa. Dra. Célia Maria de Almeida Soares, pela grande colaboração durante todo o trabalho e sugestões valiosas como membros da banca do exame de qualificação.

Ao Prof. Dr. Gil Benard e Camila Cacere, pela disponibilidade e grande auxílio para a realização da técnica de citometria de fluxo.

À Profa. Dra. Maria Célia Bertoliní, pelo auxílio nas técnicas de biología molecular.

*À Cláudia, Laura e Sônia pela paciência e trabalho
para que no final tudo desse certo!*

À CAPES, pela bolsa concedida

*Esse trabalho foi realizado no laboratório de
Micologia Clínica do Departamento de Análises
Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita
Filho” (UNESP) - Campus de Araraquara, São Paulo,
Brasil.*

RESUMO

Os mecanismos de virulência de *Paracoccidioides brasiliensis* não estão completamente esclarecidos. Há consenso que subcultivos sucessivos deste fungo acarretam a perda de sua patogenicidade que pode ser revertida pelo reisolamento do agente após passagem em animal, recuperando assim alguns fatores de virulência. No presente estudo, tivemos como objetivo clonar e sequenciar uma banda polimórfica de 300pb do DNA genômico do isolado de *P. brasiliensis* com alta virulência (após reisolamento de animal), e assim caracterizar um provável fator de virulência deste fungo. Esta seqüência parcial foi caracterizada como uma adaptina (formadora do complexo adaptador AP-2), demonstrando pela primeira vez, sua presença no genoma deste fungo e sugerindo que esta proteína pode exercer um importante papel como fator de virulência de *P. brasiliensis*. Estudos também caracterizaram componentes da matriz extracelular, envolvidos na interação de *P. brasiliensis* com o hospedeiro e a gp 43, seu antígeno imunodominante, tem papel de adesina, assim como a proteína de 30 kDa, ambas com capacidade de ligação à laminina. A adesina de 30 kDa foi caracterizada e a seqüência de aminoácidos de seus peptídeos internos mostrou identidade com a proteína 14-3-3 de *P. brasiliensis* e, apesar desta proteína já ter sido encontrada no genoma do fungo, sua função é ainda desconhecida. Foi também investigado o papel das adesinas de 30 e 43 kDa demonstrando que a adesão e invasão do fungo às células epiteliais foi intensamente inibida pelo seu pré-tratamento. Portanto, o estudo de moléculas de superfície de *P. brasiliensis* que têm capacidade de ligação às células do hospedeiro e que podem também atuar como invasinas, pode ser um alvo interessante para o desenvolvimento de vacinas e terapias de bloqueio de receptores. A invasão de *P. brasiliensis* afeta a estrutura do citoesqueleto das células epiteliais, interferindo em aspectos morfológicos da actina, tubulina e citoqueratina. Foi verificado o papel das duas adesinas (30 e 43 kDa) sobre a dinâmica do citoesqueleto celular, mostrando que estas são capazes de modificar de diferentes maneiras a dinâmica dos filamentos de actina e citoqueratina. Portanto, *P. brasiliensis* provavelmente utiliza estas adesinas para alterar o citoesqueleto das células do hospedeiro, no intuito de conseguir sua

internalização em células fagocíticas não-profissionais, uma vez que este fungo como outros patógenos, pode utilizar este mecanismo para escapar do sistema de defesa do hospedeiro e causar infecção. *P. brasiliensis* também induz apoptose em células epiteliais, mas permanece viável dentro destas, conseguindo se multiplicar. Neste trabalho foi avaliada a contribuição das duas adesinas (30 e 43 kDa) na indução de apoptose em pneumócitos para melhor conhecer os mecanismos que o fungo utiliza para extravasar as barreiras do hospedeiro. Para isso, as monocamadas de células epiteliais foram tratadas com as adesinas e testadas por várias técnicas de verificação de indução de apoptose: TUNEL; imunoperoxidase *in situ* revelada com anticorpos contra proteínas reguladoras de apoptose celular Bak, Bcl-2, p53 e PARP-1; citometria de fluxo com anexina V e iodeto de propídio. Os resultados mostraram que as adesinas são capazes de induzir apoptose nas células estudadas por diferentes mecanismos. Assim podemos concluir que *P. brasiliensis* dispõe, como outros patógenos, de adesinas que participam, não só da adesão deste fungo às células do hospedeiro, mas também de outros importantes mecanismos que possa estar contribuindo para a sua patogênese.

Palavras chave: *Paracoccidioides brasiliensis*, adesinas, proteína 14-3-3, adaptina, citoesqueleto, apoptose.

ABSTRACT

The *Paracoccidioides brasiliensis* virulence mechanisms are not completely clarified. There is a consensus that successive subculturing of this fungus causes the loss of its pathogenicity, which can be reversed by passage in animals, with recovery of some factors of virulence. In the present study, we cloned and sequenced a polymorphic band of 300bp from *P. brasiliensis* genomic DNA of the one isolate with high virulence (after reisolation of animal). This partial sequence was characterized as an adaptin (component of adaptor complex AP-2), demonstrating for the first time to its presence in the genome of this fungus and suggesting that this protein play a role as factor of virulence in pathogenesis of *P. brasiliensis*. Studies had also characterized components of the extracellular matrix, involved in the interaction of *P. brasiliensis* with the host. The gp 43 (immunodominant antigen) and 30 kDa proteins play a role of adhesin, both with laminin ligands. The 30 kDa adhesin was characterized and the amino acid sequence of its internal peptides showed identity with 14-3-3 protein of *P. brasiliensis*. Despite this protein have already been found in the genome of fungus, its function is still unknown. The role of the 30 and 43 kDa adhesins was investigated demonstrating that the adhesion and invasion of fungus to the epithelial cells were intensely inhibited by its pre-treatment with these molecules. Therefore, the *P. brasiliensis* surface molecules that bind to host cell receptors during adhesion and invasion may be of interest for developing vaccines and receptor-blocking therapies. The invasion of *P. brasiliensis* affects the cytoskeleton rearrangement of epithelial cells, interfering with morphologic aspects of the actin, tubulin and cytokeratin. The role of the two adhesins (30 and 43 kDa) on the cytoskeleton dynamics was verified, showing that these proteins are capable to modify, by different mechanisms, the morphology filaments of actin and cytokeratin. Therefore, *P. brasiliensis* probably uses these adhesins to modify the host cytoskeletal architecture favouring its internalization in non-professional phagocytic cells. Consequently, this fungus, as other pathogens, can use this strategy to escape of the host defense mechanisms and establish infection. *P. brasiliensis* also induces apoptosis in epithelial cells, but it remains viable inside of these and multiplied. In this work, the contribution of the two adhesins (30 and 43

kDa) in the induction of in pneumocytes apoptosis was evaluated in order to clarify the mechanisms that this fungus uses to exceed the host barriers. For this, the epithelial cells monolayers had been treated with the adhesins and tested by several apoptosis techniques: TUNEL; immunoperoxidase *in situ* with antibodies against regulating proteins of cellular apoptosis Bak, Bcl-2, p53 and Parp-1; flow cytometry with annexin V and propidium iodide. The adhesins are capable to induce apoptosis in the cells for different mechanisms. Thus, we can conclude that *P. brasiliensis* use, as many other pathogens, the adhesins as virulence factors to participate, not only of the adhesion of this fungus to the host cells, but in other important mechanisms to its pathogenesis.

Key words: *Paracoccidioides brasiliensis*, adhesins, 14-3-3 protein, adaptin, cytoskeleton, apoptosis.

LISTA DE ABREVIATURAS

%	Porcentagem
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µm	Micrômetro
AP	Adaptor-protein
ATV	Solução de tripsina-EDTA-versene (Adolfo Lutz)
BM	Banho maria
CaCl₂	Cloreto de cálcio
CES	Tampão constituído de citrato de sódio, EDTA e sorbitol
cm	Centímetro
CN	Célula normal
CTAB	<i>Cationic hexadecyl trimethyl ammonium bromide</i>
D.O.	Densidade ótica
DAB	3,3'-diaminobenzidina
DNA	Ácido deoxiribonucleico
dNTP	deoxirribonucleotídeos
DTT	<i>Dithiotreitol</i>
dUTP	deoxiuracila 5'-trifosfato
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
fase L	Fase leveduriforme de <i>P. brasiliensis</i>
fase M	Fase miceliana de <i>P. brasiliensis</i>
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
g	Grama
GAPDH	<i>Glyseraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>
h	Hora
H₂O₂	Peróxido de hidrogênio
HPLC	High performance liquid chromatography
IgG	Imunoglobulina G
kDa	Kilodalton
M	Molaridade
Mb	megabase

MEC	Matriz extracelular
mg	Miligrama
min	Minuto
mL	Mililitro
mM	Milimolar
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
ng	Nanograma
nm	Nanômetro
nº	Número
°C	Graus Célsius
PARP	poli (ADP-ribose) polimerase
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
RAPD	<i>Random Amplified Polymorphic DNA</i>
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphisms</i>
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
TUNEL	<i>Terminal deoxy-transferase mediated X-dUTP Nick End Labeling</i>
X g	Gravidade
XGal	<i>5-bromo-4-chloro-3-indolyl b-D-galactopyranoside</i>

SUMÁRIO

1. Introdução	01
1.1. <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> e a paracoccidioidomicose.....	01
1.2. Adaptinas.....	09
1.3. Estudos da interação de <i>P. brasiliensis</i> com células epiteliais <i>in vitro</i>	10
1.3.1. Adesinas como fatores de virulência.....	12
1.4. Citoesqueleto celular.....	14
1.5. Apoptose.....	20
1.6. Proteínas 14-3-3.....	29
2. Objetivos.....	32
3. Materiais e métodos.....	33
3.1. Microrganismo.....	33
3.2. Identificação da seqüência de 300pb presente em amostra 18 com alta capacidade de adesão de <i>P. brasiliensis</i>	33
3.2.1. Preparo da amostra.....	33
3.2.2. Técnica de extração de DNA de <i>P. brasiliensis</i>	33
3.2.3. Reação de RAPD – PCR.....	34
3.2.4. Isolamento e purificação da banda de 300pb do DNA genômico de <i>P. brasiliensis</i>	35
3.2.5. Clonagem do fragmento de 300 bp selecionado.....	35
3.2.5.1. Ligação do fragmento de DNA polimórfico.....	35
3.2.5.2. Preparo das células competentes de <i>E. coli</i> DH10B.....	36
3.2.5.3. Transforma�o da linhagem de <i>E. coli</i> DH10B (amplifica�o do vetor).....	36
3.2.5.4. Extra�o do DNA plasmidial.....	37
3.2.6. Sequenciamento e análise das seq�ncias obtidas.....	37
3.2.6.1. Rea�o de sequenciamento de DNA clonado	37
3.2.6.2. Análise da seq�ncia nucleotídica polimórfica.....	37
3.2.7. <i>Southern blot</i>	38
3.3. Culturas de células epiteliai.....	39

3.4. Isolamento e caracterização de proteínas relacionadas à capacidade de adesão.....	40
3.4.1. Purificação da adesina de 43 kDa.....	40
3.4.2. Purificação da adesina de 30 kDa.....	41
3.4.2.1. Análise protéica por eletroforese bidimensional.....	41
3.4.2.2. Caracterização protéica pelo sequenciamento de aminoácidos.....	41
3.4.2.3. Análise da homologia das seqüências de aminoácidos da adesina de 30kDa de <i>P. brasiliensis</i>	42
3.5. Ensaio de inibição da adesão de <i>P. brasiliensis</i> às células epiteliais pelas adesinas de 30 e 43 kDa.....	42
3.6. Influência das adesinas de 30 e 43 kDa na dinâmica do citoesqueleto das células A549.....	43
3.6.1. Tratamento das células A549 com adesinas.....	43
3.6.2. Marcação com faloidina para visualização dos filamentos de actina...	44
3.6.3. Filamentos Intermediários: Citoqueratina.....	44
3.7. Ocorrência de apoptose em células A549 tratadas com as adesinas de 30 e 43 kDa.....	45
3.7.1. Técnica de TUNEL.....	45
3.7.2. Imunoperoxidase <i>in situ</i>	46
3.7.3. Citometria de fluxo.....	47
3.8. Análise estatística.....	49
4. Resultados.....	50
4.1. Sequenciamento e análise da seqüência nucleotídica traduzida do fragmento clonado de 300pb.....	50
4.1.2. Análise por <i>Southern blot</i>	53
4.2. Avaliação da homologia dos peptídeos internos da adesina de 30kDa de <i>P. brasiliensis</i>	54
4.3. Inibição da adesão de <i>P. brasiliensis</i> às células epiteliais pelas adesinas 30 e 43 kDa.....	56
4.4. Efeitos das adesinas de 30 e 43 kDa no citoesqueleto das células A549.....	58
4.4.1. Microfilamentos de actina.....	58

4.4.2. Filamentos intermediários: Citoqueratina.....	60
4.5. Ensaio de Apoptose.....	62
4.5.1. Técnica de TUNEL.....	62
4.5.2. Imunoperoxidase <i>in situ</i> com anticorpos anti-Bak, anti-Bcl-2, anti p53 e anti-PARP-1.....	64
4.5.3. Citometria de fluxo para detecção de marcação com anexina V.....	73
5. Discussão.....	75
6. Conclusões.....	90
7. Referências Bibliográficas.....	91
8. Anexo.....	124

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Paracoccidioides brasiliensis* e a paracoccidioidomicose.

Paracoccidioides brasiliensis 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. Ao exame microscópico, observa-se a presença de filamentos micelianos hialinos, finos, septados, com conídios terminais ou intercalares e artroconídios, principalmente quando cultivado em ágar Sabouraud com extrato de levedura a 0.2%. Por outro lado, a fase leveduriforme (L) constitui a forma parasitária do fungo que em meios enriquecidos à 37°C apresenta culturas chamadas cerebriformes, com células arredondadas, de parede dupla e brotamentos múltiplos característicos, presentes também nos tecidos (LACAZ, 1994).

A forma miceliana infectante de *P. brasiliensis*, microscopicamente, apresenta hifas delgadas, hialinas, multinucleadas, septadas e ramificadas. Clamidoconídios intercalares e terminais de 5 a 20µm de diâmetro podem ser encontrados nas hifas entre uma e quatro semanas de cultivo. Essas estruturas são arredondadas e provavelmente constituem a forma de transição entre as formas de micélio e levedura do fungo (LACAZ et al., 1991). Na fase leveduriforme, o fungo tem uma forma esférica, oval, alongada ou piriforme com múltiplos brotamentos (LACAZ, 1994). A célula mãe mede 4 a 50µm e é multinucleada, porém os brotos inicialmente parecem possuir um só núcleo (FEITOSA et al., 2003; MONTOYA et al., 1999). Apesar de menos comuns, células com brotamento único ou em cadeias de blastoconídios também podem ocorrer (BRUMER et al., 1993). As leveduras apresentam uma parede celular densa e multilamelar refrátil, além de múltiplos vacúolos, gotas de lipídeos e um grande número de mitocôndrias no citoplasma (KASHINO et al., 1987).

O processo de transição da fase miceliana para a leveduriforme resulta em uma série de alterações celulares, entre as quais a estrutura da parede celular do *P. brasiliensis* é composta predominantemente de polissacarídeos do tipo quitinas e glucanas, que ocupam aproximadamente 80% do seu peso seco. Sabe-se que

a quitina é três vezes mais abundante na fase leveduriforme, contendo 95% de α -1,3-glucana e 5% de β -1,3-glucana. A fase miceliana expressa glucanas apenas do tipo β -1,3-ligadas (SAN-BLAS e SAN-BLAS, 2000). Isolados submetidos a vários subcultivos apresentam concomitantemente menor quantidade de α -1,3-glucana e menor virulência, ambas foram recuperadas após passagem em animal, o que sugeriu um papel do polissacarídeo na patogenicidade fúngica (SAN-BLAS, 1994).

A paracoccidiodomicose foi inicialmente descrita em São Paulo, em 1908, por Adolpho Lutz, com relatos das características do agente etiológico, previamente denominado de *Zymonema brasiliensis* por Splendore em 1912. Almeida (1930), após comparações com *Coccidioides immitis*, caracterizou o fungo como do gênero *Paracoccidioides* e da espécie *brasiliensis*. A classificação de *P. brasiliensis* foi considerada inicialmente pelo não conhecimento de sua fase sexuada (LACAZ et al., 1991). Assim, este foi incluído no Reino: Fungi; Divisão: Eumycota; Subdivisão: Deuteromycotina; Classe: Hyphomycetes; Ordem: Moniliales; Família: Moniliaceae; Gênero: *Paracoccidioides*; Espécie: *brasiliensis*. Posteriormente, a caracterização do fungo como pertencendo ao filo Ascomycota, mesmo não se conhecendo a fase teleomórfica, foi realizada por Leclerc et al. (1994) através de comparação entre seqüências de DNA da subunidade ribossomal maior (28S) de dermatófitos e fungos dimórficos. Guého et al. (1997) realizaram posteriormente comparações entre seqüências parciais de rRNA de fungos dimórficos, classificando *P. brasiliensis*, juntamente com os gêneros *Histoplasma*, *Emmonsia* e *Blastomyces*, como pertencentes à família Onygenaceae. Análises filogenéticas realizadas com seqüências da subunidade ribossomal menor de vários fungos reforçou a tese de que *P. brasiliensis* deveria ser agrupado na ordem Onygenales (BIALEK et al., 2000). *P. brasiliensis* é classificado atualmente como pertencendo ao reino Fungi, ao filo Ascomycota, à ordem Onygenales, à família Onygenaceae, ao gênero *Paracoccidioides* e à espécie *brasiliensis* (SAN-BLAS et al., 2005). Em recente estudo, Matute et al. (2006), utilizando análise filogenética de oito regiões em cinco locus nucleares, demonstraram a existência de três espécies distintas deste fungo até então não conhecida: S1 (espécie com 38 isolados), PS2 (espécie filogenética com seis

isolados) e PS3 (espécie filogenética com 21 isolados). Este estudo também mostra a primeira evidência de reprodução sexual em *P. brasiliensis*, encontrada apenas na espécie S1.

A paracoccidioidomicose (PCM) é uma doença invasiva no homem, geograficamente limitada à América Latina, com regiões de maior endemicidade no Brasil, Colômbia e Venezuela seguidas por outras áreas menos endêmicas como Bolívia, Paraguai, Argentina, Uruguai e outros territórios na América Central (LACAZ et al., 2002). A doença afeta principalmente homens, estando mais relacionada aos trabalhadores que se dedicam à atividade agrícola (WANKE et al., 1994).

Várias hipóteses têm sido postuladas relativas ao habitat de *P. brasiliensis* (ALBORNOZ, 1971; NAIFF et al., 1986; NAIFF e BARRET, 1989; NEGRONI, 1966; RESTREPO, 1985). O nicho ecológico de sua fase saprobiótica é desconhecido, presumindo-se que micélios, clamidoconídios e, provavelmente, conídios estejam no solo, água e em plantas à temperatura ambiente e que seriam essas suas formas infectantes (RESTREPO, 1985). A relação entre o fungo e o meio ambiente não está totalmente definida, apesar de seu isolamento esporádico do solo (ALBORNOZ, 1971; NEGRONI, 1966; FRANCO et al., 2000; NEGRONI, 1968; ROGERS e BENEKE, 1964), de ração para cães contaminada com solo e de plantações de café em Ibiá-MG (FERREIRA et al., 1990; VERGARA et al., 1996), além de sua ocorrência em animais silvestres (BAGAGLI et al., 1998, 2003; NAIFF et al., 1986).

A via inalatória foi sugerida como a principal via de acesso das formas infectantes do fungo ao pulmão. Os dados obtidos em estudos experimentais com camundongos inoculados por via intranasal (Mc EWEN et al., 1987), a existência de infecções assintomáticas ou subclínicas (LACAZ et al., 1959; POSADA, 1968), o prolongado período de incubação da doença (MOLESE et al., 1957; OLIVEIRA e BATISTA, 1960; PEREIRO, 1974) e a demonstração de involução de lesões pulmonares no homem (MOTTA, 1956) sugerem a via inalatória como a principal via para a penetração do fungo no hospedeiro (McEWEN et al., 1987; RESTREPO-MORENO, 1986).

A paracoccidiodomicose manifesta-se em indivíduos na faixa etária entre 30 e 49 anos, com predomínio de homens infectados em relação às mulheres na proporção aproximada de 15:1. Entretanto, a frequência de paracoccidiodomicose infecção, detectada por testes cutâneos com antígenos de *P.brasiliensis*, é alta entre indivíduos de 15 a 19 anos (LONDERO, 1982). Além disso, a constatação de que até a puberdade ambos os sexos contraem a doença igualmente levou a suspeita de que fatores hormonais poderiam interferir na resistência à doença. Acredita-se que o número reduzido de mulheres afetadas esteja relacionado a um efeito protetor promovido pelos hormônios femininos. Estudos *in vitro* demonstraram que as transformações micélio-levedura e conídio-levedura são inibidas na presença de estrógenos (RESTREPO et al., 1984; RESTREPO-MORENO, 1993; SALAZAR et al., 1988; SAN-BLAS, 1993).

As manifestações clínicas da micose caracterizam-se como de uma doença granulomatosa apresentando uma gama de sinais e sintomas agrupados em dois padrões principais que definem as formas aguda e crônica. A forma aguda ou subaguda, também denominada forma juvenil da paracoccidiodomicose, geralmente afeta crianças, adolescentes e adultos jovens, e tem uma história clínica de curta duração, em média de um a dois meses, com o paciente apresentando manifestações clínicas compatíveis com o envolvimento do sistema mononuclear fagocitário. Nesta forma clínica, as mucosas e os pulmões são acometidos em menor frequência, apenas em 5% dos casos (FRANCO et al., 1994; MENDES, 1994).

A forma crônica tem duração prolongada, freqüentemente excedendo seis meses, com instalação lenta e gradual, afetando principalmente indivíduos adultos, do sexo masculino, acima de 30 anos de idade. Manifestações pulmonares são evidentes em mais de 90% dos adultos doentes e as lesões podem permanecer localizadas ou envolver mais de um órgão ou sistema. Nos tecidos desses pacientes há uma tendência à formação de granuloma organizado (FRANCO et al., 1994; MENDES, 1994).

A prevenção de uma doença fúngica passa, obrigatoriamente, por um maior reconhecimento do próprio fungo, de seus fatores de virulência e dos fatores

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

Os mecanismos envolvidos, desde o primeiro contato com o agente até os estágios subseqüentes da doença são pouco conhecidos. Sabe-se, no entanto, que um amplo espectro de apresentações clínicas pode ocorrer variando desde formas cutâneas a formas sistêmicas, podendo atingir vários tecidos, com ênfase no pulmão. Os mecanismos de disseminação, bem como as etapas para a translocação dos compartimentos intravasculares para diferentes órgãos não são bem esclarecidos. Acredita-se que *P. brasiliensis*, à semelhança de outros fungos causadores de micoses sistêmicas, deva utilizar mecanismos de patogenicidade, como capacidade de adesão, colonização, disseminação, sobrevivência em ambientes hostis e escape dos mecanismos de resposta imune para se estabelecer no hospedeiro e causar doença (FRANCO, 1987; KUROKAWA et al., 1998).

Em 1989, SINGER-VERMES et al., estudaram sete amostras diferentes de *P. brasiliensis*, Pb265, IVICPb267, Pb 192, IVICPb9, PbSN, Pb2052 e Pb18, quanto aos aspectos de patogenicidade e antigenicidade e verificaram que estas poderiam se comportar como de alta, média e baixa virulência. A amostra Pb18 mostrou-se mais virulenta que a 265, em relação à sua DL₅₀ em camundongos de linhagem B10.A. Com exceção da amostra Pb265, todas as outras induziram uma peritonite granulomatosa epitelióide de intensidade variável. A amostra Pb18 disseminou-se em órgãos, como fígado, baço, pulmões, nódulos linfáticos e coração, enquanto que a 265 atingiu apenas os nódulos linfáticos, não se disseminando. Amostras de *P. brasiliensis* recém isoladas de pacientes com diferentes formas clínicas foram estudadas para avaliar se a gravidade da doença humana estaria associada à virulência da amostra. Uma associação entre a forma clínica da doença, da qual a cultura derivou, e o padrão de virulência observado

em camundongo B10.A não foi evidente (SINGER-VERMES et al., 1994). Diferentes isolados de *P. brasiliensis* são capazes de causar doença em humanos e a determinação da diferença entre estes isolados tem sido útil para identificar características bioquímicas relacionadas à virulência (SAN-BLAS et al, 2002).

A estabilidade da virulência em diferentes isolados de *P. brasiliensis* tem sido estudada de acordo com o histórico de subcultivos *in vitro* e métodos usados para estocagem. A virulência de *P. brasiliensis* 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; SAN-BLAS et al.,1977). Em *C. immitis* foi também verificada que a virulência foi atenuada após 84 transferências seriais *in vitro*, mas recuperada após passagem em ratos ou em meios complexos (LEVINE et al., 1970).

Em recente estudo, dois isolados de *P. brasiliensis*, um subcultivado *in vitro* por vários anos e outro recuperado recentemente de animais, foram avaliados e demonstrou-se que a mortalidade em camundongos, níveis de anticorpos e extensão das lesões foram significativamente maiores em animais infectados com o isolado recuperado de animais, mostrando que este foi mais virulento que aquele subcultivado *in vitro*. Esta diferença entre os dois isolados indicou atenuação da virulência após subcultivos *in vitro* (PERAÇOLI et al., 1999). Isolados de *P. brasiliensis*, obtidos de pacientes com forma aguda e crônica da doença, mantidos *in vitro* por longos períodos de tempo têm características morfológicas homogêneas, e a passagem em animal recuperou algumas das características do microrganismo, incluindo fatores de virulência (SVIDZINSKI et al., 1999). Em estudos com cultura de células epiteliais foi observado também que o isolado 18, após vários subcultivos perdeu a capacidade de aderência, havendo, portanto relação entre virulência e capacidade de adesão. Amostras recém isoladas, tanto de animais como de culturas celulares, recuperaram a capacidade de aderir e invadir células epiteliais (ANDREOTTI et al., 2005). No entanto, até hoje não foi identificado este provável fator envolvido na virulência dos isolados.

A identificação e caracterização de fungos patogênicos têm mudado com o passar dos anos com o uso de métodos moleculares. Diferentes métodos de tipagem molecular já foram utilizados para elucidar questões biológicas relacionadas com espécies, modo de reprodução e população genética. Entre eles, vários têm sido usados como o RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphisms*), que se baseia no polimorfismo gerado pela digestão do DNA genômico com enzimas de restrição (BOTSTEIN et al., 1980), RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), no qual uma única sequência iniciadora é empregada, podendo hibridizar-se aleatoriamente em diferentes regiões do DNA, produzindo segmentos de diferentes tamanhos. O perfil eletroforético destes segmentos é o que chamamos de perfil RAPD e permite a avaliação da variabilidade genotípica (WILLIAMS et al., 1990) e microsátélites, regiões de DNA que incluem um número variável de sequências repetitivas consecutivas de 2 a 6 pares de bases, estas regiões de DNA são utilizadas como marcadores para determinação dos perfis genéticos (LITT e LUTY, 1989). A técnica RAPD foi utilizada para detectar variações genômicas entre diversos isolados de fungos causadores de doenças em humanos tais como *Candida* sp. (LIN & LEHMANN, 1995; MELO et al., 1998), *Cryptococcus neoformans* (RUMA et al., 1996; LO PASSO et al., 1997), *Aspergillus fumigatus* (MONDON et al., 1995) e *P. brasiliensis* (CALCAGNO et al., 1998; SOARES et al., 1995). Sequências iniciadoras selecionadas aleatoriamente foram usadas para distinguir e caracterizar diversidade genética entre isolados de *P. brasiliensis* (SOARES et al., 1995). Utilizando dez diferentes seqüências iniciadoras, foi verificado por RAPD, que os isolados de *P. brasiliensis* diferenciavam-se em dois grupos distintos com somente 17% de identidade genômica. Os isolados dos dois grupos demonstraram diferenças no seu padrão de virulência em camundongos B10.A (MOLINARI-MADLUM et al., 1999). Por outro lado, Motta et al. (2002) analisaram 35 isolados de *P. brasiliensis* correlacionando os perfis no RAPD e grau de virulência ou o tipo de manifestação clínica da doença, não encontrando discriminação entre os isolados tanto em grau de virulência como no tipo de manifestação clínica da infecção fúngica. Recentemente, Kurokawa et al. (2005) avaliaram dez isolados de *P. brasiliensis* em relação à patogenicidade e padrão genético por amplificação genômica do DNA polimórfico (RAPD). A técnica de RAPD agrupou os isolados em dois grupos

com 56% de similaridade genética. Amostras avirulentas ou com baixa virulência apresentaram alta similaridade genética (98,7%) quando comparadas com os outros isolados estudados. O mesmo foi observado com os isolados de alta virulência, que compartilharam 96% de semelhança genética. Assim, a análise do padrão polimórfico gerado por RAPD, utilizada em conjunto com o aspecto de virulência, pode ser considerada adequada para detectar diferenças entre isolados de *P. brasiliensis*.

Andreotti (2002) avaliou duas amostras 18 de *P. brasiliensis* (antes e após passagem em animais) correlacionando sua virulência (capacidade de adesão em células epiteliais) com padrões em RAPD. A amostra com maior capacidade de adesão foi obtida após passagem em animais e uma banda polimórfica de 300pb foi observada apenas nesta amostra, mostrando assim uma diferença nos padrões de RAPD, provavelmente relacionado com adesão de *P. brasiliensis* às células epiteliais (figura 1).

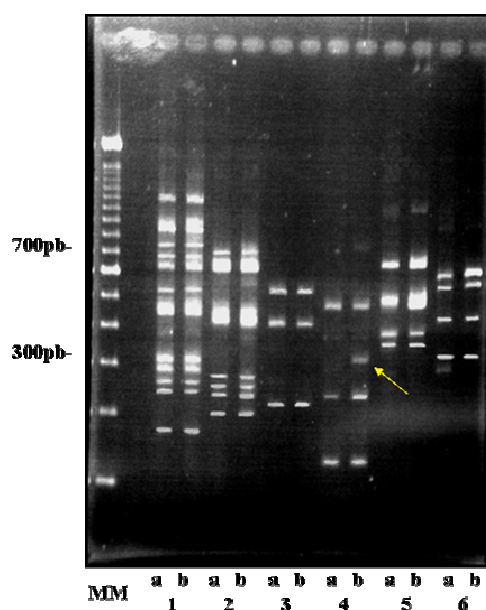


Figura 1. RAPD-PCR de *P. brasiliensis* amostra 18 com virulência atenuada após subcultivos *in vitro* (a) e após reisolamento em hamster (b); utilizando seis diferentes seqüências iniciadoras (1, 2, 3, 4, 5 e 6); marcador molecular (MM). A seta mostra a banda polimórfica de 300 pb, presente apenas na amostra b. (ANDREOTTI, 2002).

1.2. Adaptinas.

O termo adaptina foi criado por Bárbara Pearse (1975) para designar um grupo de proteínas de aproximadamente 100kDa que eram co-purificadas com clatrina, após o isolamento de vesículas revestidas com esta proteína. Mais tarde, as adaptinas foram identificadas como subunidades de complexos de proteínas adaptadoras heterotetraméricas (AP) e todas as subunidades desses complexos foram incluídas no termo adaptina. Quatro complexos básicos (AP) têm sido descritos: AP-1, AP-2, AP-3 e AP-4. Cada um desses complexos é composto de duas grandes adaptinas (cada uma de δ , γ , α , ϵ , β 1-4, respectivamente, 90-130 kDa), uma mediana (μ 1-4, ~50 kDa) e uma pequena (σ 1-4, ~20 kDa). As adaptinas análogas do complexo dos quatro APs são homólogas uma a outra (21 a 83% de identidade em seus aminoácidos) (KIRCHHAUSEN, 1999; LEWIN e MELLMAN, 1998; ROBINSON e BONIFACINO, 2001).

Os complexos APs são componentes de proteínas que se associam à face citoplasmática de organelas da via secretora e endocítica. Os complexos participam da formação do revestimento vesicular, bem como da seleção de moléculas que vão ser carregadas pelas vesículas. AP-2 medeia endocitose rápida da membrana plasmática, embora AP-1, AP-3 e AP-4 mediem eventos da rede trans-Golgi (TGN) (BOEHM e BONIFACINO, 2001). A análise genética da função de AP-2 em vários organismos elucidou sua importância em leveduras e eucariotos superiores. *Saccharomyces cerevisiae* tem subunidades do complexo AP-2 homólogas a mamíferos, mas estas não são essenciais para endocitose ou viabilidade celular, também não parece interagir física ou geneticamente com clatrininas e sua deleção parece não afetar a endocitose ou nenhuma outra via de transporte de proteínas (MUNN, 2001).

Em *Trypanosoma brucei*, uma β -adaptina tripanosomal homóloga a uma β 1-adaptina de levedura exibe expressão diferencial entre os estágios de vida do parasito, sendo menos expressa durante o ciclo no inseto e mais expressa no seu ciclo sanguíneo sugerindo que expressão alta desta adaptina está correlacionada com endocitose elevada e sobrevivência do parasito dentro das células sanguíneas (MORGAN et al., 2001)

Por outro lado, Gokool (2003) clonou e caracterizou o gene homólogo de $\sigma 1$ - e $\mu 1$ - adaptina do protozoário *Leishmania mexicana* e os mutantes com deleção para esse gene se mostraram viáveis em cultura, mas incapazes de estabelecer infecção em macrófagos ou camundongos, indicando que a função de adaptina é crucial para a patogênese destes organismos unicelulares. Até o presente não existem dados na literatura relatando a importância desta proteína em fungos patogênicos.

1.3. Estudos da interação de *P. brasiliensis* com células epiteliais *in vitro*.

A virulência está relacionada à habilidade de um microrganismo estabelecer um quadro infeccioso em um hospedeiro, podendo levar ao quadro de doença, na vigência de sintomatologia patente. A evolução deste processo é resultante da interação entre os determinantes de virulência do agente e as defesas do hospedeiro. Se as defesas deste último forem adequadas, o microrganismo pode ser eliminado ou conviver em aparente harmonia, na ausência de sintomatologia por prolongado período de tempo, caso contrário, o processo infeccioso leva a alterações nocivas, estabelecendo-se relação de parasitismo (CASADEVAL e PIROFSKI, 1999).

Mecanismos e fatores de virulência correspondem, respectivamente, às estratégias do microrganismo, ou aos produtos do mesmo, capazes de contribuir para sua virulência. A caracterização dos fatores de virulência de agentes infecciosos tem demonstrado que esta é complexa e multifatorial, e esses fatores podem ser distintos em duas categorias: os que promovem a colonização e a invasão e os que causam danos ao hospedeiro, como as toxinas e proteinases (MENDES-GIANNINI et al., 2000).

A entrada de patógenos nas células hospedeiras é iniciada pela adesão do fungo na superfície celular, gerando um sinal que pode induzir a sua interiorização. Os patógenos usam uma variedade de moléculas de superfície para se ligar a matriz extracelular (MEC) e estabelecer infecção. Por outro lado, integrinas medeiam a adesão de células a MEC de locais referidos como sítios de adesão focal, tendo papel na sinalização celular (LENGELER et al., 2000).

O modelo de culturas celulares tem sido desenvolvido no intuito de estudar os passos envolvidos desde o contato inicial de *P. brasiliensis* até os eventos que culminam em sua entrada na célula. *P. brasiliensis* (amostra 113), sem qualquer tratamento prévio, foi capaz de aderir (MENDES-GIANNINI et al., 1992), seguido aparentemente de invasão em monocamadas de células epiteliais. Inicialmente, as formas leveduriformes apareciam aderidas às células epiteliais e, após algum tempo, as células fúngicas foram observadas no citoplasma, próximas ao núcleo (MENDES-GIANNINI et al., 1994). Ao utilizar o modelo de culturas celulares, 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. Isolados de *P. brasiliensis* foram capazes de aderir às células epiteliais após 30 minutos e os mais virulentos tinham maior capacidade de adesão (HANNA et al., 2000).

A adesão de *P. brasiliensis* às células foi feita aparentemente por um pequeno túbulo (HANNA, 1995; UEMURA, 1996) e alterações nas membranas celulares foram observadas ao redor da área de adesão, com presença de cavitações circunscritas ao redor do elemento fúngico, resultantes provavelmente de seus produtos extracelulares. Formas características do fungo e na forma de protoplasto foram observadas no interior da célula após 24 horas de incubação. Alguns fungos foram observados numa forma circunscrita dentro de um vacúolo, sugerindo processo de fagocitose (HANNA et al., 2000; MONTEIRO DA SILVA et al., 2001). Assim, o fungo provavelmente entraria na célula na forma de protoplasto e no citoplasma celular ocorreria a regeneração da parede celular.

Nos estudos em células HeLa, foi verificado um processo de fagocitose semelhante após a adesão de *P. brasiliensis*. Todo este mecanismo parece exigir grandes modificações, tanto no citoesqueleto das células hospedeiras como do fungo, uma vez que algumas formas fúngicas intracitoplasmáticas apresentaram-se bastante alteradas (MENDES-GIANNINI et al., 1994; UEMURA et al., 1996).

P. brasiliensis não é um parasita essencialmente intracelular (TUDER et al., 1985). Sua presença no citoplasma de células epiteliais humanas foi verificada e esta ocorrência estaria provavelmente relacionada ao mecanismo de escape do

sistema imune do hospedeiro (BRITO et al., 1973; MENDES-GIANNINI et al., 2000).

P. brasiliensis multiplica-se no interior de macrófagos residentes, peritoneais e pulmonares, indicando que estes não são capazes de efetuar a digestão do fungo internalizado (BRUMMER et al., 1988), isto só ocorre após ativação por linfocinas (BRUMMER et al., 1989). Também, foi sugerido, que *in vivo* *P. brasiliensis* provavelmente multiplica-se após sua ingestão por macrófagos não ativados (BRUMMER et al., 1990).

1.3.1. Adesinas como fatores de virulência.

O sucesso de colonização dos tecidos do hospedeiro pelo fungo é, portanto, um evento complexo, geralmente envolvendo um ligante codificado pelo patógeno (adesinas) e um receptor da célula. O microrganismo tem como opção três tipos de componentes do hospedeiro, com os quais pode interagir: produtos secretados pela célula, superfícies da célula hospedeira ou as proteínas da matriz extracelular (MEC), como colágenos tipo I e IV, fibronectina, fibrinogênio e laminina. O entendimento e identificação de moléculas envolvidas na adesão de microrganismos a diferentes substratos no hospedeiro é um dos caminhos a serem seguidos na descoberta de tratamentos eficientes para as micoses sistêmicas. Sabe-se que durante a disseminação por via hematogênica, interações desta natureza constituem as primeiras etapas para o desenvolvimento de inúmeras infecções (OFEK et al., 1996).

Alguns dos receptores fúngicos envolvidos na interação com a MEC foram identificados em nível molecular (BOUCHARA 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 para *Candida albicans* (SAKATA et al., 1999; BOUCHARA et al., 1990; LOPEZ-RIBOT et al., 1994), *A. fumigatus* (TRONCHIN et al., 1993; BOUCHARA et al., 1997), *Histoplasma capsulatum* (McMAHON et al., 1995), *P. brasiliensis* (VICENTINI et al., 1994; HANNA et al., 2000; ANDREOTTI et al., 2005; BARBOSA et al., 2006;

GONZALEZ et al., 2005) e *Penicillium marneffe* (HAMILTON et al., 1998; HAMILTON et al., 1999). Em *C. albicans*, vários receptores de superfície celular foram identificados em células do tubo germinativo (68, 62 e 60 kDa), exibindo múltiplas afinidades para laminina, fibrinogênio, fibronectina e C3d, embora em blastoconídios, um ligante de laminina de 37 kDa foi encontrado e este não liga colágeno tipo IV, fibronectina e fibrinogênio (BOUCHARA et al., 1990; LOPEZ-RIBOT et al., 1994). Em *A. fumigatus*, um receptor de parede celular de 72 kDa foi descrito (TRONCHIN et al., 1997), bem como um ligante de laminina de 37 kDa, este foi detectado apenas no extrato protéico citoplasmático (GAUR e KLOTZ, 1997). Uma proteína de 20 kDa foi identificada no extrato protéico de parede celular de *P. marneffe* e posteriormente caracterizada como ligante de laminina e fibronectina, sugerindo que estas duas proteínas têm o mesmo receptor no fungo (HAMILTON et al., 1998; HAMILTON et al., 1999). Em *H. capsulatum* uma proteína de 50 kDa ligante de laminina está presente na parede celular e está relacionada a um possível mecanismo de reconhecimento e passagem pela membrana basal (McMAHON et al., 1995). Estudos de um gene (SOWgp) que codifica uma glicoproteína, presente na parede celular da fase parasitária de *Coccidioides immitis*, demonstraram que esta contém PRRs (regiões ricas em prolina) e o peptídeo recombinante (rSOWgp) foi capaz de se ligar às proteínas da MEC *in vitro* (laminina>fibronectina>colágeno IV), sugerindo que este antígeno de superfície celular possa funcionar como uma adesina. A deleção do gene SOWgp resultou na diminuição da adesão do fungo à proteínas da MEC e uma significativa redução na virulência dos isolados mutantes (HUNG et al., 2002).

O agente da paracoccidiodomicose, como muitos outros microrganismos, sintetiza várias substâncias que participam direta ou indiretamente da relação fungo-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 patogenicidade estão entre os assuntos abordados de grande importância. *P. brasiliensis* tem capacidade de aderir e invadir células epiteliais (MENDES-GIANNINI et al., 1994)

e o fenômeno de aderência é dependente da virulência do isolado (HANNA et al., 2000). A glicoproteína de 43 kDa, ligante de laminina, tem papel na adesão (VICENTINI et al., 1994). Fato este confirmado desde que soro anti-gp 43 inibiu o processo de adesão em 85% (HANNA et al., 2000). Mas provavelmente, outros componentes do fungo tenham papel no processo de adesão (MENDES-GIANNINI et al., 2000). Recentemente, uma adesina de 30 kDa de *P. brasiliensis*, com capacidade de ligação à laminina foi isolada. Esta proteína foi mais expressa num isolado de *P. brasiliensis* que apresentava alta capacidade de adesão (ANDREOTTI, 2002). *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), recombinante de *P. brasiliensis*, foi capaz de se ligar à laminina, colágeno I e fibronectina. O tratamento de formas leveduriformes de *P. brasiliensis* com anti-GAPDH e de pneumócitos com GAPDH recombinante promoveu a inibição da infecção do fungo às células epiteliais (BARBOSA et al., 2006).

1.4. Citoesqueleto celular.

O citoesqueleto é ligado à superfície da célula por membros da família das integrinas e estas estão ligadas ao sistema de microfilamentos de actina através de várias moléculas incluindo: talina, vinculina e α -actinina. Estas ligações formam estruturas semelhantes a âncoras, permitindo a adesão da célula eucariótica a outras células ou a MEC. Assim, parasitas intracelulares são capazes de utilizar estes sistemas e usar tais receptores para entrar na célula hospedeira (FINLAY, 1990).

As células suportam a maioria dos estresses mecânicos por meio de filamentos protéicos intracelulares (componentes do citoesqueleto) que cruzam o citoplasma de cada célula epitelial (INGBERG, 1993). Os filamentos do citoesqueleto são ligados às proteínas transmembrana, na membrana plasmática, onde junções são formadas entre as superfícies de células adjacentes com a lâmina basal subjacente. As células são conectadas pela ligação dos elementos

do citoesqueleto de uma célula ao citoesqueleto de outra célula ou a MEC, formando respectivamente as junções aderentes e hemidesmossomos (ALBERTS et al., 2002).

As diferentes atividades do citoesqueleto dependem dos microfilamentos de actina, dos microtúbulos e dos filamentos intermediários. São formados por estruturas poliméricas helicoidais, altamente dinâmicas, que interagem entre si, capazes de se polimerizar e despolimerizar rapidamente, graças às proteínas acessórias. Cada tipo de filamento é formado a partir de uma subunidade protéica diferente: a actina, nos filamentos de actina, tubulina nos microtúbulos e uma família de proteínas fibrosas, como as citoqueratinas, vimentinas e lâminas, compondo os filamentos intermediários (AMOS e AMOS, 1991).

Todas as espécies eucarióticas possuem actina, sendo esta a proteína mais abundante do citoesqueleto, constituindo, freqüentemente, 5% ou mais do total das proteínas celulares. Os filamentos de actina, distribuídos logo abaixo da membrana plasmática, são ligados entre si por várias proteínas. A colisão de sinais extracelulares localizados em uma determinada região da superfície celular pode induzir uma reorganização local do córtex de actina sob a região correspondente na membrana, por exemplo, empurrando a membrana para fora, formando microespículas finas e longas chamadas lamelipódios, ou puxando a membrana para dentro, como ocorre durante a citocinese (KREIS, 1990).

Número grande de microrganismos patogênicos pode invadir células eucarióticas e utilizar este ambiente para se multiplicar ou escapar da resposta imune do hospedeiro. Fagócitos profissionais e células normalmente não fagocíticas, como epiteliais e endoteliais, podem ser invadidos (FINLAY e FALKOW, 1997). A invasão celular pode ocorrer, uma vez que muitos microrganismos patogênicos têm a capacidade de induzir sua internalização em células epiteliais, ativando mecanismo de fagocitose forçada, em que sinais extracelulares específicos podem estimular o rearranjo do seu citoesqueleto, no sítio de contato com o microrganismo, passando a se comportar como um fagócito “não profissional” (SWANSON e WATTS, 1995; SWANSON e BAER, 1995). Células não fagocíticas como as epiteliais e fibroblastos não codificam

receptores CR₃ e, normalmente, não fagocitam. No entanto, muitos patógenos intracelulares são capazes de entrar nestas células, por mecanismos envolvendo integrinas e o citoesqueleto.

Muitos patógenos entéricos invadem células de mamíferos em cultura, influenciando os rearranjos de actina que resultam na formação de pseudópodes (lamelipódios) e na internalização da bactéria (SWANSON e BAER, 1995). Os organismos invasores ligam-se diretamente ou via MEC às integrinas ou suas assemelhadas na superfície do hospedeiro. Após esta ligação, um sinal é disparado na célula hospedeira para que os filamentos de actina liguem-se ao receptor da membrana, possivelmente via talina e outras proteínas e assim possibilitem a entrada do microrganismo na célula. Uma vez dentro, estes são capazes de causar significativa rearranjo no citoesqueleto (FINLAY e FALKOW, 1988; ROSENSHINE et al., 1992).

Bactérias do gênero *Shigomonas* sp têm sido implicadas como agentes oportunistas em infecções nosocomiais. Estudos mostraram que após a interação destas com células epiteliais houve uma drástica alteração na superfície celular, com formação de extensões projetadas para o espaço extracelular em forma de “ondas”, além disso, o uso de inibidores mostrou que os microfilamentos de actina estão envolvidos na internalização destas bactérias em células epiteliais (AMMENDOLIA et al., 2004). Uma toxina codificada por um plasmídeo (Pet) de *Escherichia coli* mostrou atividade citotóxica no citoesqueleto de células epiteliais, com contração do citoesqueleto e perda das fibras de estresse de actina (CANIZALEZ-ROMAN e NAVARRO-GARCIA, 2003). *E. coli* enteropatogênica (EPEC) e enterohemorrágica (EHEC) secretam proteínas efetoras que medeiam sua aderência e invasão à células epiteliais, pois promovem desarranjos no citoesqueleto de actina (DE VINNEY et al., 1999). Em *Helicobacter pylori* foi verificado que apenas isolados produtores de citotoxinas conseguem causar desarranjos no citoesqueleto de células epiteliais (ASHORN et al., 2000).

Yersinia enterocolítica e *Y. pseudotuberculosis* codificam uma proteína de superfície denominada invasina, que medeia aderência e a entrada destas bactérias nas células epiteliais (ISBERG, 1991). A invasina liga-se às células

epiteliais e esta interação envolve várias integrinas (ISBERG e LEONG, 1990; ISBERG, 1991; DERSCH e ISBERG, 2000) que estão ligadas ao citoesqueleto. *Yersinia* sp escapa das defesas imunológicas do hospedeiro injetando no citosol de células alvo proteínas efetoras denominadas YOPs, estas proteínas são responsáveis pela adesão da bactéria na superfície celular, além de causarem alteração no citoesqueleto celular e desarranjo nos filamentos de actina (IRIARTE e CORNELIS, 1998; LESSER e MILLER, 2001). *Yersinia* sobrevive ao ataque de macrófagos, pois possui uma estratégia anti-fagocítica na qual injeta no citosol dos macrófagos três proteínas efetoras, YopH, T, e E, que desarranjam o citoesqueleto celular (CORNELIS, 1998). YopH, uma tirosina fosfatase, desfosforila paxilina e FAK (*focal adhesion kinase*), proteínas envolvidas no rearranjo do citoesqueleto para que ocorra a fagocitose (PERSSON et al., 1997). YopT promove a despolimerização dos filamentos de actina pela indução de RhoA GTPase (ZUMBIHL et al., 1999). YopE possui a função de inibir GTPases da família Rho envolvidas na fagocitose (BLACK e BLISKA, 2000). Portanto, estas proteínas são denominadas invasinas, uma vez que medeiam a entrada do microrganismo nas células do hospedeiro (SANSONETTI, 2002).

Os filamentos intermediários são proteínas fibrosas e alongadas, ancoradas ao núcleo, abaixo do envelope nuclear e se estendem para a periferia celular, interagindo com a membrana plasmática. Apresentam-se organizados na forma polimerizada e de acordo com o polipeptídeo que os constituem são tecido-específicos, como os filamentos de queratina das células epiteliais, os neurofilamentos das células nervosas, os gliais dos astrócitos, os de desmina em células musculares, os de vimentina em fibroblastos e as lâminas nucleares, que formam a lâmina fibrosa que se estende sob o envelope nuclear (STEWART, 1993).

A família das queratinas (também chamadas de citoqueratinas) é a que apresenta a maior diversidade entre suas subunidades. As proteínas dessa família formam os filamentos de queratina em células epiteliais, e pelo menos 20 tipos diferentes foram descritos com base na sua seqüência de aminoácidos. Nas células epiteliais, os filamentos de queratina estão conectados às junções celulares especializadas: os desmossomos, que unem células vizinhas e os

hemidesmossomos que ancoram as células à membrana basal, formando uma rede contínua que se estende por todo epitélio (COULOMBE, 1993).

Outros constituintes do citoesqueleto, além dos microfilamentos de actina, foram estudados e importantes resultados têm sido evidenciados. A interação de adesinas bacterianas de *Streptococcus* do grupo B com filamentos de citoqueratina, também foi relatada, empregando-se modelos *in vitro* de cultura de células A₅₄₉ (linhagem epitelial do trato respiratório inferior). Bactérias tratadas com tripsina, não se ligaram a citoqueratina, demonstrando que a interação é mediada via adesina superficial do patógeno, de natureza protéica. Os autores sugeriram que a aderência à citoqueratina pode ser importante na manutenção dos sítios de colonização em epitélios queratinizados e mesmo causar injúrias celulares em outros sítios (TAMURA e NITTAYAJARN, 2000).

Burkholderia cepacia é um patógeno oportunista em pacientes com fibrose cística pulmonar que se liga, através de pili, aos filamentos de citoqueratina. Esta classe é quase que exclusivamente intracelular e em células epiteliais estendem-se e interagem com os desmossomos (JONES e GREEN, 1991), portanto esta interação somente poderia ocorrer se houvesse a internalização da bactéria. Este mecanismo facilitaria a translocação da bactéria através das barreiras epiteliais, evadindo-se das defesas do hospedeiro (SAJJAN et al., 2000).

E. coli enteropatogênica (EPEC) possui invasinas que desarranjam o citoesqueleto celular recrutando citoqueratina para a indução de um pedestal com ação direta na polimerização de actina e reorganização do citoesqueleto, portanto filamentos intermediários também estão envolvidos nesta infecção. (BATCHELOR et al., 2004).

Chlamydia sp se multiplica dentro de um vacúolo citoplasmático em células do hospedeiro causando rearranjos no citoesqueleto. Clivagem da citoqueratina por uma protease clamidial (CPAF) foi detectada em células infectadas, permitindo assim a expansão do vacúolo, sugerindo um mecanismo

do patógeno de modificar o citoesqueleto das células do hospedeiro e, assim conseguir a sua sobrevivência e multiplicação (DONG et al., 2004).

A entrada de um patógeno na célula hospedeira é iniciada pela ligação a sua superfície, seguida de internalização. Esses eventos permitem que o patógeno permaneça em um determinado local ou ganhe acesso a tecidos profundos. A natureza dos receptores da célula hospedeira, a força da interação física que ocorre entre o hospedeiro e as adesinas do microrganismo, e se estes desencadeiam sinais que estimulam ou impeçam a internalização, são importantes determinantes da interação parasito-hospedeiro (ISBERG e TRAN VAN NHIEU, 1994). Frente ao ativo envolvimento do citoesqueleto no processo de internalização, parece que patógenos invasivos emitem sinais que induzem a célula hospedeira a internalizá-los (ROSENSHINE et al., 1992). Este mecanismo não é utilizado por todos os microrganismos, portanto, esta condição é considerada como um fator de virulência importante.

Entre os fungos, existem várias espécies conhecidas capazes de invadir células de mamíferos *in vitro* e *in vivo*, mas existem poucos estudos descrevendo o processo de invasão (MENDES-GIANNINI et al., 2000; TSARFATY et al., 2000; WASYLNKA e MOORE, 2002; MENDES-GIANNINI et al., 2004, KOGAN et al., 2004).

Aspergillus fumigatus é um patógeno oportunista que afeta o sistema respiratório e sua penetração no epitélio pulmonar é o passo chave para o processo de infecção. Kogan et al. (2004) verificaram que este fungo é capaz de provocar mudanças estruturais no citoesqueleto de células A549 (linhagem de pneumócitos humanos), incluindo perda da característica filamentosa e formação de agregados de actina. Esses achados sugerem que *A. fumigatus* transpõe a barreira epitelial alveolar através da secreção de proteases que atuam na desorganização do citoesqueleto celular e impedem a adesão das células ao seu substrato, favorecendo assim a instalação da infecção.

Pouco é conhecido das vias de sinalização que controlam as mudanças morfológicas em *P. brasiliensis*, bem como os sinais celulares que são

desencadeados durante a interação com células do hospedeiro. A invasão de *P. brasiliensis* afeta a estrutura do citoesqueleto das células epiteliais, interferindo em aspectos morfológicos da actina, tubulina e citoqueratina. O tratamento com citocalasina D e colchicina reduziu a invasão, indicando a participação funcional dos microfilamentos e microtúbulos neste mecanismo (MENDES-GIANNINI et al., 2004). Por outro lado, a degradação de citoqueratina por *P. brasiliensis* pode ser devido a efeitos de enzimas específicas ou pela gp 43 (MENDES-GIANNINI et al., 1990; PUCCIA et al., 1998), causando a perda das características de rede filamentosa. Esta degradação de citoqueratina pode explicar tanto o processo de invasão *in vitro* como a capacidade de *P. brasiliensis* de atravessar as barreiras epiteliais *in vivo* (MENDES-GIANNINI et al., 2005).

1.5. Apoptose.

A modulação do fenômeno de apoptose tem sido muito investigada, pois estaria também relacionada à internalização de patógenos em células epiteliais (JACOBSON et al., 1997; VAUX e KORSMEYER, 1999). Este fenômeno é essencial na regulação da população de células, homeostase e também em certas condições patológicas, como câncer.

A indução de apoptose por patógenos foi bem caracterizada em certas infecções virais (THOMPSON, 1995), bacterianas (GUEIRARD et al., 1998; Mc ORIST et al., 1996; MONACK et al., 1998) e por protozoários (KHAN et al., 1996). Como consequência, os patógenos podem alcançar o meio extracelular, eliminar células fagocíticas, evadir da resposta imune ou estimular a resposta inflamatória (MONACK et al., 1996; MULLER et al., 1996; ZYCHLINSKY et al., 1996; WRONOWSKA et al., 2005).

A morte celular pode ocorrer por dois mecanismos distintos: necrose e apoptose. A necrose, também chamada de morte celular patológica ou acidental, ocorre quando as células são expostas a uma variação extrema de suas condições fisiológicas, danificando a membrana plasmática. Já em apoptose ou morte celular programada, a célula, sob condições fisiológicas normais, participa de sua própria morte (suicídio celular), existindo então várias diferenças

morfológicas, bioquímicas e fisiológicas entre apoptose e necrose celular. Enquanto as células que morrem por necrose liberam seus conteúdos citosólicos no espaço extracelular e induzem uma resposta inflamatória, as que o fazem por apoptose desaparecem, sendo rapidamente fagocitadas pelos macrófagos (ou células vizinhas) não havendo liberação de componentes citosólicos e nenhuma resposta inflamatória. Uma vez dentro do macrófago, a célula apoptótica é rapidamente destruída, e seus constituintes celulares reutilizados (ALBERTS, 2003) (Figura 2).

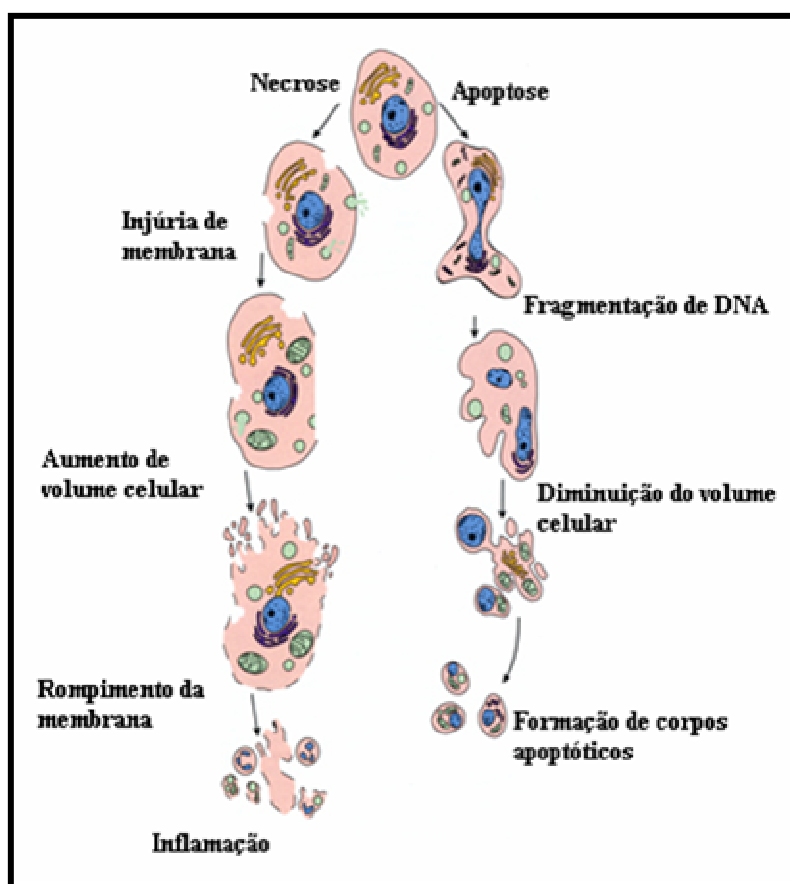


Figura 2: Esquema ilustrativo dos mecanismos distintos de necrose e apoptose (anatomy.iupui.edu/cellimages/Ross269.jpg).

A maquinaria intracelular, responsável por apoptose, depende de uma família de proteases que tem uma cisteína no seu sítio ativo e clivam essas proteínas no seu ácido aspártico específico. Elas são chamadas de caspases e são sintetizadas na célula como precursores inativos, as procaspases, que são geralmente ativadas pela clivagem na região do ácido aspártico por outras

caspsases. Uma vez ativadas, há clivagem, resultando em uma cascata proteolítica de amplificação. Algumas caspsases ativadas então, clivam outras proteínas na célula, de modo que, estas se inativam e seus restos celulares são digeridos por outra célula. A cascata de proteases não somente é destrutiva como também irreversível. O controle da proliferação e da sobrevivência celular serve para regular o número de células e ambas dependem de sinais específicos produzidos por outras células, possibilitando que esta se divida e sobreviva somente quando for necessário. O desafio é definir todos os sinais que regulam a sobrevivência e a proliferação de cada tipo de célula, determinar como seus níveis são controlados para equilibrar proliferação e morte celular de acordo com as necessidades variáveis do organismo, e entender como uma célula individual integra esses diversos sinais extracelulares de vida ou morte, e entre dividir ou permanecer quiescente (ALBERTS, 2003).

Silva et al. (1996) verificaram que a apoptose constitui-se em um modelo de morte celular que pode ser ativada em muitos sistemas, incluindo linfócitos-T e células leucêmicas e por uma variedade de estímulos químicos e físicos. Vários autores observaram que muitos agentes anti-cancerígenos podem induzir apoptose em diferentes tipos celulares (BARRY et al., 1990; SEN e D'INCALCI, 1992). Células sofrendo apoptose apresentam alterações morfológicas e bioquímicas, que incluem condensação de cromatina, fragmentação do DNA em oligonucleotídeos, redução no tamanho celular, perda da arquitetura da membrana e aparência enrugada (DIVE et al., 1992). Um importante evento bioquímico em apoptose é a ativação de uma endonuclease que cliva o DNA em sítios alvo internucleossomais. Uma outra observação, embora não universal em apoptose, é o aumento contínuo na concentração de cálcio intracelular, que estaria relacionado com ativação da endonuclease responsável pela fragmentação do DNA (ARENDS et al., 1990). Mais recentemente, estudos mostraram que o cálcio e compostos reativos de oxigênio exercem um papel fundamental na morte celular programada de organismos unicelulares (GORDEEVA et al., 2004).

A morte celular programada é também regulada por sinais extracelulares, que podem ativar a apoptose ou inibi-la. Essas moléculas sinal atuam

principalmente regulando os níveis ou atividade dos membros da família de Bcl-2 (CHAO e KORSMEYER, 1998). Alguns membros desta família inibem a apoptose, pelo menos parcialmente, bloqueando a liberação de citocromo c da mitocôndria. Outros membros da família Bcl-2 não são inibidores de morte, e sim promovem a ativação da procaspase e morte celular. Alguns desses promotores de apoptose, como o Bad, funcionam através de ligação e inativação de membros da família de inibição de morte. Outros como, Bax e Bak estimulam a liberação de citocromo c da mitocôndria. Se os genes que codificam Bax e Bak são inativados, as células são notavelmente resistentes à maioria dos estímulos de indução de apoptose, indicando a importância crucial dessas proteínas em sua indução. Apoptose é regulada por uma rede de genes, cuja associação com os do ciclo celular ainda não foi totalmente elucidada.

Bak é uma proteína homóloga, membro da família Bcl-2, com função na regulação de apoptose. As proteínas Bcl-2 interagem umas com as outras através da formação de homo e heterodímeros. A susceptibilidade das células ao estímulo apoptótico é capaz de ser controlado por taxas relativas de diferentes proteínas da família Bcl-2. Bak é uma proteína ácida, a qual acelera a taxa de apoptose, em algumas linhagens celulares. A proteína Bcl-2 é uma proteína da membrana, que está presente preferencialmente dentro da mitocôndria, e não na superfície celular, exercendo papel na inibição da morte celular programada (HOCKENBERY et al., 1990) (Figura 3).

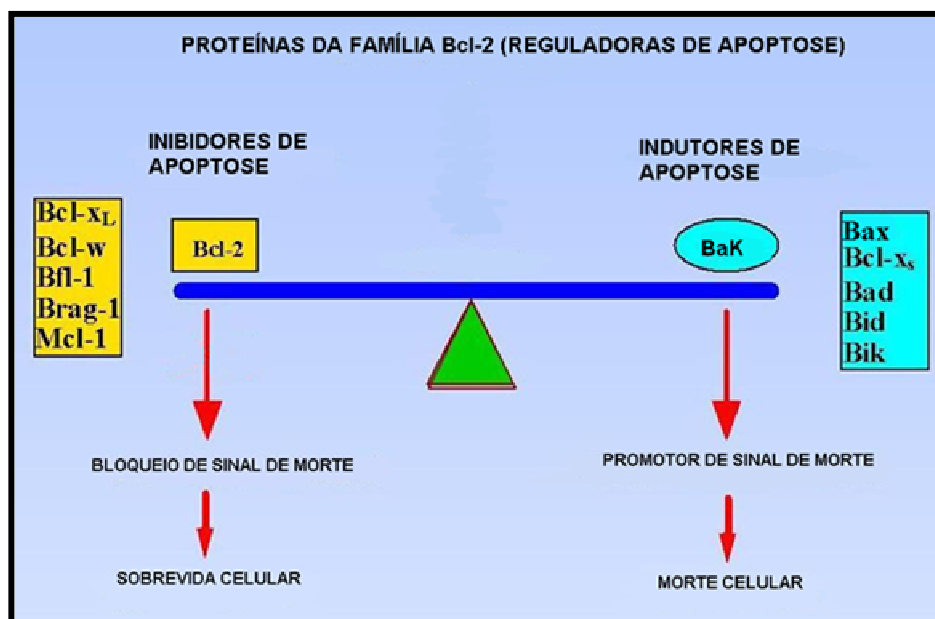


Figura 3: Esquema ilustrativo demonstrando o papel das proteínas da família Bcl-2 na regulação da morte celular programada (www.life.uiuc.edu/figures/bcl2_system.jpg).

PARP-1 [poli (ADP-ribose) polimerase-1] é o membro principal da família de enzimas PARP (AME et al., 2004). PARP-1 é uma enzima nuclear, também encontrada em centrossomos (AUGUSTIN et al., 2003; KANAI et al., 2003), sua atividade de poli (ADP-ribosil)ação é extremamente dependente da quebra da fita de DNA. Além disso, PARP-1 atua na síntese de polímeros de poli (ADP-ribose) carregados negativamente em proteínas aceptoras, incluindo histonas, fatores de transcrição e a própria PARP. PARP-1 também está envolvida em várias funções celulares, incluindo reparo de DNA, expressão gênica, carcinogênese e apoptose (D'AMOURS et al., 1999). A regulação transcricional de PARP-1 é um fator crucial para a homeostase celular (ZANIOLO et al., 2005). PARP atua em conjunto com DNA proteína quinase e p53 participando da cascata de sinalização quando ocorre dano de DNA celular (AGARWAL et al, 1998). PARP foi um dos primeiros substratos descritos para caspases (KAUFMANN et al., 1993; TEWARI et al., 1995). Embora quase todas as caspases possam clivar PARP *in vitro* (MARGOLIN et al, 1997; SALVESEN e DIXIT, 1999), acredita-se que as caspases-3 e -7 são as responsáveis pela clivagem *in vivo*, gerando à partir de PARP dois fragmentos apoptóticos de 24 e 89 kDa (SALVESEN e DIXIT, 1999).

PARP-1 tem localização nuclear em células normais, entretanto para que ocorra a sua clivagem pelas caspases no processo de apoptose, esta proteína é translocada para o citoplasma, portanto sua translocação está intimamente relacionada com morte celular programada (ANG et al., 2003). Portanto estudos utilizando quantificação da expressão ou clivagem de PARP-1 têm sido utilizados para determinar apoptose celular.

PARP e p53 são proteínas funcionalmente relacionadas e estão envolvidas com a manutenção da integridade do genoma por meio da inibição da progressão do ciclo celular (PARP) ou indução de apoptose (p53) (FUJITA et al., 2002). Existe uma grande evidência que poli (ADP-ribosil)ação de p53 por PARP é necessária para a ativação de p53 (SIMBULAN-ROSENTHAL et al., 1998; WANG et al., 1998). Guinee et al. (1996) demonstraram que a apoptose em pneumócitos está associada à superexpressão de p53 nestas células, propondo assim um mecanismo de apoptose dependente de p53. Esta proteína regula a resposta celular ao estresse estando envolvida em processos como reparo de DNA e apoptose, sendo recentemente observado que sua translocação para o citoplasma está diretamente relacionada à regulação da via mitocondrial de apoptose dependente de Bax (BAPTISTE e PRIVES, 2004) (figura 4).

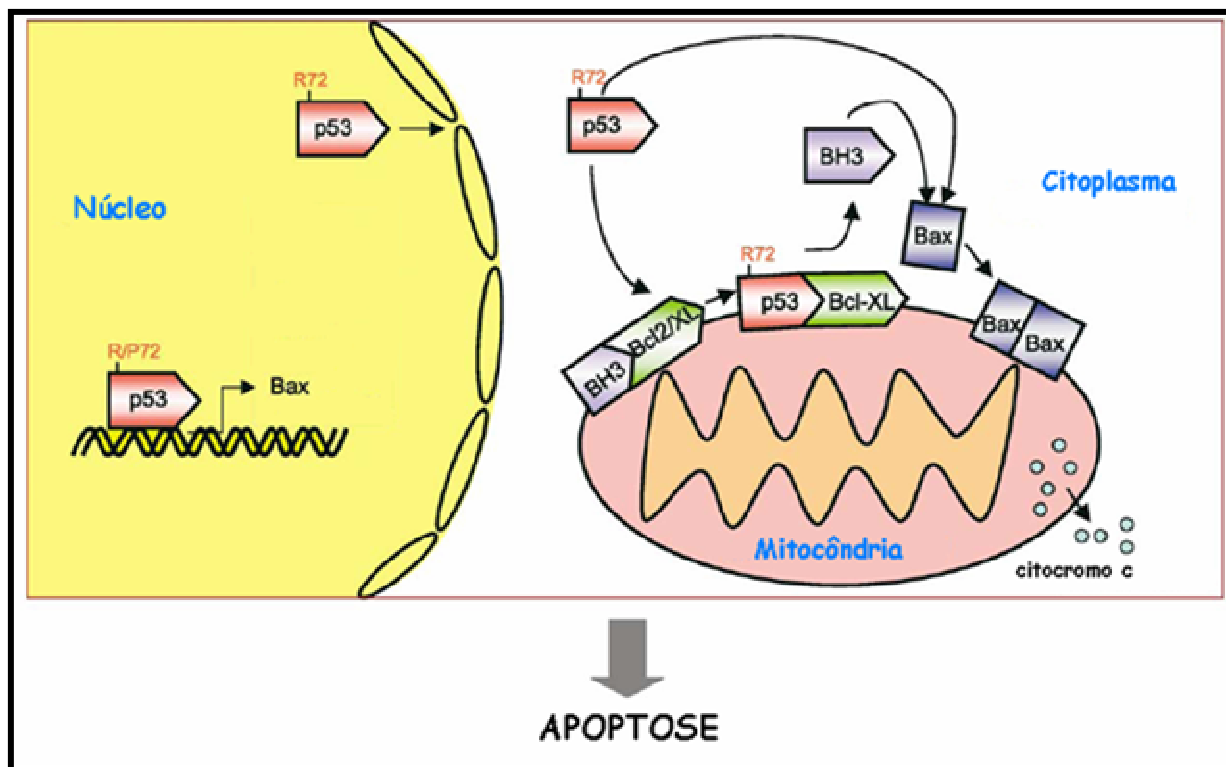


Figura 4: Papel nuclear e citoplasmático de p53 em apoptose. Sinais de estresse estabilizam p53 no núcleo, a qual ativa a transcrição de genes pró-apoptóticos (*bax*). Com a superexpressão de p53, esta é translocada para o citoplasma induzindo, na mitocôndria, dimerização de Bax ou liberando proteínas pró-apoptóticas ligadas a Bcl-2 e Bcl-XL (proteínas anti-apoptóticas), causando assim a liberação de citocromo c e induzindo apoptose (BAPTISTE e PRIVES, 2004).

Muitos patógenos são capazes de manipular as vias de apoptose nas células do hospedeiro, embora, dependendo do patógeno, as vantagens desta manipulação podem ser para ele próprio ou para o hospedeiro. Os patógenos obrigatoriamente intracelulares como *Chlamydia trachomatis* e *Rickettsia rickettsii*, inibem a apoptose nas células do hospedeiro, o que permite a estes organismos o crescimento e sobrevivência intracelularmente (CLIFTON et al., 1998; FAN et al., 1998). Por outro lado, muitas bactérias intracelulares facultativas, tais como *Mycobacterium avium* (FRATAZZI et al., 1997), *Shigella flexneri* (ZYCHLINSKY et al., 1992), *Salmonella typhimurium* (MONACK et al., 1996), *Legionella pneumophila* (GAO e ABU KWAIK, 1999; MULLER et al., 1996), e *Yersinia pseudotuberculosis* (MONACK et al., 1998), mostraram induzir apoptose na célula do hospedeiro.

Danelishvili et al., (2003) mostraram que *Mycobacterium tuberculosis* interage com macrófagos e células epiteliais no espaço alveolar do pulmão, em que é capaz de invadir e se multiplicar nessas células. Tanto cepas virulentas como atenuadas de *M. tuberculosis* induziram apoptose em macrófagos, entretanto a cepa atenuada induziu mais apoptose do que a cepa virulenta após cinco dias de infecção. Já nas células epiteliais, o mais observado foi necrose e não apoptose. Apoptose de fagócitos tem sido proposta como uma estratégia do hospedeiro para prevenir a progressão da infecção, causando a morte de microrganismos intracelulares. No entanto, isto pode também deixar os microrganismos livres para escapar e infectar células vizinhas e se disseminar para outros tecidos.

Muitos autores já demonstraram a capacidade de algumas bactérias em induzir apoptose de macrófagos *in vitro* (MONACK et al., 1996; RODRIGUES et al., 1999; RUCKDESCHEL et al., 1997; ZYCHLINSKY et al., 1992). As bactérias viáveis são fagocitadas e induzem apoptose, assim como, algumas proteínas bacterianas e uma enzima do vírus HIV (JACOTOT et al., 2000). A indução de apoptose por bactérias *in vivo* também foi demonstrada, portanto, a morte da célula seguida de alterações na secreção de citocinas deve ser importante na patogênese microbiana (MIURA et al., 2000; PERFETTINI et al., 2000). Essas observações levaram ao conceito de que a habilidade dos patógenos em induzir apoptose de fagócitos deve ser um importante fator de virulência, funcionando como mecanismo de escape das defesas do hospedeiro.

Staphylococcus aureus, além da persistência em hospedeiros saudáveis, é bem conhecido por sua habilidade em induzir infecções crônicas e resistentes à terapia convencional (MOULDING et al., 1999). Embora também não seja um patógeno intracelular, a entrada em células epiteliais, endoteliais e osteoblastos foi extensivamente documentada. Estes mecanismos foram sugeridos como uma possibilidade de manutenção de um nicho intracelular, podendo promover a colonização, em longo prazo no hospedeiro, determinando assim, o caráter da infecção crônica. Durante seu ciclo de invasão celular, esta bactéria induz sua interiorização, escapa da vesícula endossomal, multiplica-se no citoplasma celular

e alcança o meio extracelular, induzindo apoptose na célula hospedeira, através de toxinas (MENZIES e KOURTEVA, 1998).

Legionella pneumophila é capaz de induzir apoptose dentro de macrófagos, em linhagem de células monocíticas e em células epiteliais alveolares, através da ligação de receptores de morte com componentes na superfície bacteriana ou por fatores secretados pela bactéria. A inibição da via de morte mitocondrial pela superexpressão de uma proteína anti-apoptótica Bcl-2 inibiu potencialmente o processamento das caspases. Portanto, a indução de apoptose por *L. pneumophila* foi mediada pela ativação de uma via de morte mitocondrial intrínseca, e não por receptor de sinalização de morte externo (NEUMEISTER et al., 2002).

Em *E. coli*, uma de suas toxinas denominada *Shiga-like toxin*, além de causar citotoxicidade também induz apoptose em células epiteliais. Células epiteliais expostas à toxina mostraram características morfológicas relacionadas a apoptose, como o encolhimento das células e condensação da cromatina nuclear (JONES et al., 2000). A ativação de proteínas da família Bcl-2 nas células expostas à toxina foi demonstrada e houve um aumento da expressão de membros da família de proteínas pró-apoptóticas, Bax e Bad, ocorrendo também uma redução na expressão de proteína anti-apoptótica, Bcl-2 (KUTUK et al., 2005).

Em fungos patogênicos, apoptose é um elemento crítico na resposta imune para *Histoplasma capsulatum*, ocorrendo uma elevação nos níveis de IL-4 e IL-10 quando apoptose é inibida, e o aumento da liberação destas citocinas é diretamente proporcional à severidade da infecção (ALLEN e DEEPE, 2005). Em *Cryptococcus neoformans* a glucuronoxilomanana (GXM) é o mais abundante polissacarídeo capsular e representa seu principal fator de virulência. Estudos *in vitro* demonstraram que este polissacarídeo suprime a linfoproliferação, modula a produção de citocinas e promove apoptose em células mononucleares esplênicas de camundongos (CHIAPELLO et al., 2003). Em recente estudo foi demonstrado que este fenômeno também ocorre *in vivo* após inoculação intracardíaca de GXM em camundongos normais, observando um aumento dos níveis de IL-10 com

diminuição de IL-2, IFN-gama e TNF-alfa. Através da técnica de TUNEL *in situ* foi demonstrada ocorrência de apoptose em células teciduais com depósitos de GXM (CHIAPELLO et al., 2004). Estudos em camundongos infectados com *Paracoccidioides brasiliensis* mostraram que este é capaz de invadir o timo, induzindo severa atrofia, causada por morte celular programada, sugerindo que tais alterações podem estar envolvidas no fenômeno de imunossupressão frequentemente associado à paracoccidioidomicose (SOUTO et al., 2003). Mendes-Giannini e colaboradores (2004) observaram que *P. brasiliensis* induz apoptose em células epiteliais. Entretanto, o fungo permanece viável dentro destas células, conseguindo se multiplicar. Apoptose induzida por este fungo em células epiteliais infectadas foi demonstrada por vários experimentos: TUNEL, fragmentação de DNA e por técnica imunocitoquímica com anti-Bak e anti-Bcl-2. Expressão de Bak e Bcl-2 não foi alterada nas células até 24 horas de infecção, sugerindo um mecanismo de competitividade que permite a persistência da infecção. Grande expressão de Bak foi observada após 48 horas, indicando perda de competição entre os sinais de morte e sobrevivência. Com estes dados concluiu-se que os mecanismos de invasão às células do hospedeiro, persistência dentro delas e a subsequente indução de apoptose poderiam explicar a capacidade de disseminação de *P. brasiliensis*.

1.6. Proteínas 14-3-3.

As proteínas 14-3-3 são um grupo de proteínas ácidas pequenas e altamente conservadas, de aproximadamente 30 kDa, que têm sido implicadas numa variedade de processos celulares em eucariotos. Contudo, apesar de já observada a função dessas proteínas em apoptose, transdução de sinal, regulação do ciclo celular e transcrição, seu exato papel nesses processos permanece desconhecido (FU et al., 2000). Recentemente, um melhor entendimento da função destas proteínas foi sugerido. Elas devem funcionar como proteínas acessórias em vários processos, atuar como determinantes específicos que alteram a localização celular de outras proteínas, com as quais interagem e devem estar envolvidas na regulação direta da atividade enzimática (van HEMERT et al., 2001). A associação com proteínas 14-3-3 regula a função do ligante através do seqüestro inter e intra-compartimento, ativação/inativação

de atividade enzimática e promoção/inibição de interações com outras proteínas. Portanto, numerosos processos celulares, em todas as espécies que esta proteína foi estudada, são regulados por proteínas 14-3-3. Assim, esta proteína já foi encontrada em associação com proteínas reguladoras de apoptose, proteínas implicadas na sinalização oncogênica e proteínas reguladoras do ciclo celular (BENZINGER et al., 2005)

Um recente estudo em queratinócitos feito por Santoro et al. (2003), demonstrou que proteínas 14-3-3 são capazes de interagir com integrinas e modular sua capacidade da sinalização do lado extracelular. Além disso, sugeriram que esta interação induz desarranjos de hemidesmossomos na formação de contato focal necessário para migração das células. Estes achados sugerem que as proteínas 14-3-3 participam da sinalização mediada por integrinas, tanto intracelular como extracelularmente (WILKER e YAFFE, 2004).

As leveduras *S. cerevisiae* e *Schizosaccharomyces pombe* têm dois genes que codificam para proteínas 14-3-3, *BMH1* e *BMH2* e *rad24* e *rad25*, respectivamente. Estas proteínas são essenciais nestas leveduras, como em eucariotos superiores, em que estas se ligam a numerosas outras envolvidas em uma variedade de processos celulares (VAN HEUSDEN e STEENSMA, 2006).

O fungo filamentoso *Aspergillus nidulans* possui uma proteína com região conservada de alta homologia com 14-3-3 (*artA*) que previne a formação de septo. Entretanto, em vez de bloquear a septação, aumento da expressão de *artA* causa grande demora na polarização dos conidióforos, sugerindo que essas proteínas tenham um importante papel na morfogênese da hifa (KRAUS et al., 2002).

A proteína 14-3-3 também exerce um papel fundamental na infecção de *E. coli* enteropatogênica, uma vez que este patógeno secreta uma adesina denominada intimina que recruta componentes das células hospedeiras para modificar a arquitetura celular e assim conseguir invadir estas células e se multiplicar dentro delas. Tir é a principal proteína efetora que é recrutada para a membrana plasmática das células eucarióticas onde esta atua como receptor para

a adesina bacteriana, entre as proteínas recrutadas para o local da adesão, também estão proteínas do citoesqueleto que contribuem para a formação de um pedestal. Foi demonstrado que uma proteína 14-3-3 se liga especificamente à Tir de maneira independente de fosforilação, e que a interação ocorre durante o processo de infecção (PATEL et al., 2006)

Won e colaboradores (2003) identificaram a proteína 14-3-3 como um substrato para a caspase-3. A proteína 14-3-3 foi clivada em resposta ao tratamento de células em cultura com indutores de apoptose, sugerindo que esta clivagem pode contribuir para o processo de morte celular. Em *S. cerevisiae*, a proteína 14-3-3 participa de processos celulares incluindo tráfego de vesículas, exocitose, podendo atuar primariamente no citoesqueleto de actina para regular as vesículas alvo (ROTH et al., 1999).

Assim, dando continuidade aos estudos iniciados em nosso laboratório, pretendemos, neste trabalho, caracterizar prováveis fatores de virulência de *P. brasiliensis*, com o intuito de contribuir para o esclarecimento dos mecanismos de patogenicidade deste importante fungo, bem como verificar o papel de suas adesinas na interação com células epiteliais.

2. OBJETIVOS

- Caracterizar por clonagem e sequenciamento a seqüência polimórfica de 300pb do DNA genômico de um isolado de *P. brasiliensis* com alta capacidade de adesão às células epiteliais.
- Caracterizar a adesina de 30 kDa de *P. brasiliensis* através de sequenciamento de aminoácidos.
- Verificar o papel das adesinas de 30 e 43 kDa na interação de *P. brasiliensis* com células epiteliais.
- Verificar a influência das adesinas de 30 e 43 kDa sobre a dinâmica do citoesqueleto celular, bem como sua capacidade de induzir apoptose em células epiteliais *in vitro*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Microrganismo.

Foi empregado o isolado 18 de *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb 18) na fase leveduriforme, procedente da micoteca da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FCM-USP). Este foi obtido de caso de paracoccidioidomicose no Brasil. Durante a realização deste trabalho Pb 18 foi reisolado a partir da inoculação de 0.2mL de uma suspensão do fungo na fase L por via intratesticular em hamster, com turvação correspondente ao tubo nº 6 da escala MacFarland. Após 15 a 20 dias, os animais que apresentaram o desenvolvimento de orquite foram sacrificados e os testículos macerados e cultivados em ágar Sabouraud acrescidos de cloranfenicol a 25°C até o desenvolvimento de colônias características de *P. brasiliensis*, as quais foram identificadas e incubadas a 35°C em meio PYG para a reversão da fase miceliar para a fase leveduriforme (LACAZ et al., 1991). Para manutenção da virulência, após 10 repiques o isolado foi passado em monocamada de célula e reisolado em meio de Fava Netto.

3.2. Identificação da seqüência de 300pb presente no *Paracoccidioides brasiliensis* 18 com alta capacidade de adesão.

3.2.1. Preparo da amostra.

A amostra de *P. brasiliensis* 18 foi cultivada em meio líquido YEPD (extrato de levedura-peptona-glicose) e incubada a 35°C, por 18h, sob agitação. As leveduras foram quantificadas em aproximadamente 1×10^8 células/mL, centrifugadas a 800xg durante 15 minutos e lavadas por três vezes com EDTA 0,05M pH 8,0.

3.2.2. Técnica de extração de DNA de *Paracoccidioides brasiliensis*.

A técnica de extração de DNA foi baseada em Lasker et al., 1992. Após a centrifugação da amostra, foram adicionados ao *pellet* 250µL de tampão CES (20mM citrato de sódio, pH 5,6; 50mM EDTA, pH 8,0; 9,0M sorbitol) e, desta

suspensão, foram retirados 400µL para a lise das leveduras em 100mg de enzima Novozyme 234 em 6 mL de tampão CES. Os frascos foram incubados a 30°C por um período de 2 a 3 horas, sob agitação constante e, em seguida, os protoplastos obtidos, foram avaliados e quantificados. O lisado foi centrifugado com o intuito de separar as impurezas obtidas com a lise da parede das leveduras e lavado adequadamente por centrifugação com tampão de estabilização CES.

Na amostra contendo protoplastos foram adicionados 500µL de tampão de lise (Tris 10mM, EDTA 1mM, pH 8,0, N – lauryl sarcosine (1%) e proteinase K). Foram, então, incubadas sob temperatura de 37°C durante 1 hora. Adicionaram-se 200µL de NaCl 5M e incubou-se a 65°C por 10 minutos. Em seguida, adicionou-se 100µL de solução CTAB a 10% com NaCl a 4,1% e incubou-se novamente a 65°C por 20 minutos. Adicionou-se RNase 50µL/mL a temperatura de 37°C por 1 hora. Fizeram-se duas extrações com igual volume de clorofórmio isoamílico e centrifugação em 17500xg durante 10 minutos. O DNA foi precipitado com igual volume de isopropanol a – 20°C durante 30 minutos. Outra centrifugação foi feita a 17500xg/10 min e depois foi feita lavagem com etanol 70%. Em seguida, foi feita outra centrifugação em 17500xg durante 5 minutos na temperatura de 4°C. Após, o DNA obtido foi seco, ressuspenso em tampão T.E. (Tris/EDTA) e colocado em BM a 37°C durante 1 hora. A determinação da pureza do DNA foi feita pela relação da leitura espectrofotométrica em densidade óptica a 260nm e 280nm. A quantificação foi feita pela densidade óptica 260nm (SAMBROOK et al., 1995). A eletroforese foi feita em gel de agarose 1% com tampão TBE 1X (Tris/ácido bórico/EDTA) A corrida eletroforética foi realizada durante 1 hora e visualizada através de brometo de etídio em luz ultravioleta.

3.2.3. Reação de RAPD – PCR.

A tipagem molecular da amostra de *P. brasiliensis* utilizada neste trabalho foi feita pelo método de RAPD (*RANDOM AMPLIFIED POLYMORPHIC DNA*), com o uso do *Kit Ready – To – Go/RAPD Analysis Beads* (GE). A amplificação dos isolados de *P. brasiliensis* foi feita com a seqüência iniciadora 4 – (5' – d[AAGAGCCCGT] – 3') contida no *Kit*. Foram utilizadas concentrações de 25pmol de cada seqüência iniciadora e 25ng de DNA genômico num microtubo contendo

uma mistura liofilizada de dideoxinucleotídeos (0,4mM de cada dNTP), tampão (cloreto de magnésio 3mM, cloreto de potássio 30mM, Tris 10mM pH8,3) e DNA polimerase termoestável. A quantidade final da suspensão para a reação de amplificação foi de 25 μ L, sendo utilizada água *Milli-Q* estéril. A amplificação foi feita através de um ciclo inicial mediante temperatura de desnaturação de 95°C durante 5 minutos, seguido de 45 ciclos de 95°C por 1 minuto, 36°C por 1 minuto e 72°C por 2 minutos, utilizando-se aparelho termociclador Perkin Elmer modelo *Gene Amp PCR System 9700*. Os produtos de amplificação (5 μ L) foram misturados com 10 μ L de tampão de amostra (glicerol 30%, EDTA 100mM, pH 8,0 e azul de bromofenol 0,30%) e separados por eletroforese em gel de agarose a 2% em tampão TBE 1x durante 2 horas e 30 minutos a 150volts. Como padrão foi usado 100pb DNA *Ladder* (Invitrogen). Os *amplicons* no gel foram corados com brometo de etídio na concentração de 0,5 μ g/mL, visualizados à luz ultravioleta e fotodocumentados.

3.2.4. Isolamento e purificação da banda de 300pb do DNA genômico de *Paracoccidioides brasiliensis*.

A banda polimórfica com massa molecular de 300pb foi selecionada a partir da reação de RAPD-PCR anteriormente descrita, excisada, eluída e purificada do gel de agarose através do *kit SNAP Gel Purification* (Invitrogen). Posteriormente, o produto purificado foi quantificado, avaliado quanto a sua pureza e armazenado para clonagem.

3.2.5. Clonagem do fragmento de 300 bp selecionado.

3.2.5.1. Ligação do fragmento de DNA polimórfico.

O fragmento de DNA de interesse, gerado pela purificação da banda polimórfica de 300bp obtida pelo RAPD do isolado 18, foi clonado, utilizando-se o *kit pMOSBlue Blunt Ended Cloning* (GE). Inicialmente foi realizada a defosforilação do fragmento de DNA pela adição de 1 μ L de fosfatase alcalina, 1 μ L de tampão (*pk buffer*) e 0,5 μ L de DTT 100mM, a reação foi incubada 22°C por 40 minutos, e inativada a 75°C durante 10 minutos, seguida de um banho de gelo por

2 minutos. Posteriormente, foi realizada a reação de ligação ao vetor *pMOSBlue* adicionando-se 1 μ L deste (50ng) e 1 μ L de T4 DNA ligase aos componentes acima, e incubada a 22°C durante 18 horas.

3.2.5.2. Preparo das células competentes de *Escherichia coli* DH10B.

Foi utilizado o método do cloreto de cálcio segundo Sambrook et al, (1989). Uma alçada de crescimento de uma colônia previamente isolada em meio 2YT (1% Extrato de levedura, 1,6% peptona bacteriológica, 0,5% NaCl, 0,2% glicose e 2% ágar) de *E. coli* DH10B não competente foi inoculada em 100ml de caldo deste mesmo meio e incubada a 37°C sob agitação de 200rpm, até densidade ótica de 0,7 a 600nm. As células foram centrifugadas a 8900xg durante 15 minutos a 4°C e lavadas com 30mL de solução gelada de cloreto de cálcio 100mM. Estas foram ressuspensas em 8mL da mesma solução, contendo 10% de glicerol, aliquotadas e estocadas a -70°C.

3.2.5.3. Transformação da linhagem de *Escherichia coli* DH10B (amplificação do vetor).

O produto total (12 μ L) da reação de ligação foi adicionado em 100 μ L da linhagem de *E. coli* DH10B competente, seguido de incubação em banho de gelo durante 30 minutos. Posteriormente foi realizado choque térmico em temperatura de 42°C por 2 minutos. Foram adicionados 400 μ L de meio 2YT líquido, seguido de incubação a 37°C durante 1h. O plaqueamento das linhagens foi realizado em 2YT (adicionado de 2% de agar e 1 μ g/mL de ampicilina). Foi adicionado sobre a placa 40 μ L de XGal (20mg/mL) e 20 μ L de meio 2YT sem ampicilina. Através de alça de Drigalski foi realizada a semeadura e as placas incubadas durante 16 a 18 horas a 37°C, após crescimento estas foram submetidas a incubação por 6 horas a 4°C. As colônias azuis indicavam a não inserção do fragmento polimórfico no vetor e as colônias brancas indicavam positividade. Foi realizada a seleção das colônias brancas da placa onde foram recolhidas individualmente em tubo de ensaio contendo 3mL de meio 2YT com ampicilina 1 μ g/mL. As culturas foram incubadas a 37°C durante 12 horas até turvação do meio.

3.2.5.4. Extração do DNA plasmidial.

A extração do DNA plasmidial foi obtida pela utilização do *Kit MiniPrep SNAP* (Invitrogen) onde as recomendações do fabricante foram seguidas rigorosamente.

3.2.6. Sequenciamento e análise das seqüências obtidas.

3.2.6.1. Reação de sequenciamento de DNA clonado.

As reações foram realizadas com o *Kit Big Dye Terminator Cycle Sequence Ready Reaction* (Applied Biosystems), seguindo os protocolos recomendados pelo fabricante, utilizando oligonucleotídeos *T7 promoter forward* e *U-19 mer reverse*, 1,6pmol/ μ L de cada, (primers adequados, segundo a seqüência do vetor). Para o sequenciamento do fragmento do isolado 18 inserido em vetor, foram usados 500ng de DNA. Aplicou-se um ciclo inicial de 96°C por 4 minutos, seguido de 40 ciclos a 96°C por 1 minuto, 52°C por 1 minuto, 60°C por 4 minutos e finalmente 4°C. O sequenciamento do DNA foi realizado pelo método de Sanger (1977), com moléculas de DNA de fitas marcadas fluorescentemente, utilizando-se o *Kit Big Dye Terminator Cycle Sequence Ready Reaction*. Para as reações de sequenciamento foi usado um aparelho termociclador e para a análise fluorescente das seqüências utilizou-se um aparelho *ABI-PRISM 377-36 Sequencer* (PERKIN ELMER). Ambas as fitas de DNA foram seqüenciadas. As seqüências geradas foram enviadas diretamente, na forma de cromatogramas, para um computador conectado ao aparelho seqüenciador. Estes cromatogramas foram interpretados pelos softwares *Sequencing Analysis 3.3* e *Bioedit*, convertidos em seqüência de DNA. Seqüências gênicas contínuas foram obtidas utilizando-se o programa *Sequencer 3.1*.

3.2.6.2. Análise da seqüência nucleotídica polimórfica.

A seqüência nucleotídica obtida foi analisada quanto à sua homologia às seqüências depositadas no *GenBank* utilizando o algoritmo BLAST do *National Center for Biotechnology Information at the National Library of Medicine* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) (ALTSCHUL et al., 1997). Para dedução da

seqüência protéica foi utilizado o PROSITE (<http://us.expasy.org/prosite>) (FALQUET et al., 2002).

3.2.7. Southern blot.

Para a realização desta técnica 20 µg do DNA genômico das duas amostras de *P. brasiliensis* (antes e após reisolamento em animais) foi digerido com três diferentes enzimas de restrição: *Sall*, *EcoRI* e *NdeI* (Promega), de acordo com instruções do fabricante. O DNA digerido foi submetido à eletroforese em gel de agarose (1,2%) até a separação completa dos fragmentos. O gel foi então tratado com tampão de depurinação (HCl 250mM) por 10 min à temperatura ambiente sob leve agitação, seguido de uma lavagem com água destilada. O gel foi então tratado com tampão de desnaturação (NaCl 1,5M; NaOH 0,5M) por 25 min à temperatura ambiente com agitação branda e lavado com água destilada. A seguir o gel foi tratado com tampão de neutralização (NaCl 1,5M; Tris-HCl 0,5M; pH 7,5) por 30 min à temperatura ambiente com agitação, seguido de uma lavagem com água destilada, estando assim pronto para transferência para a membrana de nylon (Amersham Biosciences). A membrana foi cortada no tamanho exato do gel e embebida em tampão SSC 10X (Citrato trissódico 0,3 M; NaCl 3 M), a transferência foi feita por capilaridade conforme descrição de Sambrook et al. (1989), por 18 horas. Após transferência a membrana foi fixada por 2 h à 80°C e guardada até a hibridização.

O produto de 300pb (50ng) selecionado a partir da reação de RAPD-PCR anteriormente descrita, excisado, eluído e purificado do gel de agarose através do *kit SNAP Gel Purification* (Invitrogen) foi marcado como sonda através do *kit Gene Images Random-Prime labeling module* e detectado com o *kit Gene Image CDP-Star detection module* (Amersham Biosciences) de acordo com os protocolos recomendados pelo fabricante. A membrana foi pré-hibridizada por 30 minutos a 60°C em tampão de hibridização (SSC 5X; SDS 1%; dextran sulfato 5% [Sigma]; reagente bloqueador 1:20) acrescido de DNA de esperma de salmão 100 µg/mL (Invitrogen). Em seguida, a sonda marcada com fluoresceína foi desnaturada por 5 minutos a 95°C, incorporada ao tampão de hibridização e incubada com a membrana por 18 horas a 60°C. Após este período, a sonda foi desprezada e a

membrana foi lavada com SSC 1X e SDS 0,1% para remoção dos produtos não ligados, incubada com tampão A (Tris-HCL pH 9,5 100 mM; NaCl 300 mM) acrescido de reagente bloqueador, por 1 hora a temperatura ambiente. Nova incubação foi realizada com tampão A acrescido de anti-fluoresceína conjugado com fosfatase alcalina. O conjugado foi removido após três lavagens consecutivas com tampão A acrescido tween 20 0,3%. Foram depositados sobre a membrana 800 μ L de reagente de detecção (contendo dioxetano como substrato para fosfatase alcalina), esta foi coberta com filme plástico e exposta a filme-autoradiográfico por 2 horas e revelada.

3.3. Culturas de células epiteliais.

Neste estudo, foram utilizadas duas linhagens de células epiteliais contínuas:

- células Vero: células epiteliais de rim normal de macaco verde da África (obtidas do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo)

- células A549: células epiteliais respiratórias - pneumócitos tipo I (obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro)

As células foram cultivadas em garrafas de vidro tipo xarope, em meio 199 (células Vero) e em meio HAM F-12 (células A549) suplementados com 10% de soro fetal bovino, e mantidas a temperatura de 36.5°C.

Decorridos 3 a 4 dias, as garrafas de células foram submetidas a tripsinização. Para isso, a monocamada celular formada foi lavada com 1 mL de ATV-solução de tripsina 0,2% e EDTA 0,02% (Adolfo Lutz) e, após lavagem, foi acrescentado mais 1 mL de ATV e incubada por 1-2 minutos à 37°C. Estas células foram então transferidas para um tubo de centrífuga e a tripsina neutralizada pela adição de 3 mL de meio de cultura fresco, acrescido de 10% de soro fetal bovino (SFB), seguindo-se centrifugação à 400 x g por 10 min. O sobrenadante foi desprezado, as células ressuspensas em meio de cultura fresco acrescido de 10% SFB, contadas em hemocitômetro (Câmara de Neubauer) de

modo a se obter uma concentração celular de 10^6 células/ml e transferidas para outras garrafas.

3.4. Isolamento e caracterização de proteínas relacionadas à capacidade de adesão.

3.4.1. Purificação da adesina de 43 kDa.

Primeiramente foi obtido um filtrado de cultura (componentes exocelulares) a partir do isolado 18 de *P. brasiliensis* fase “L” (com alta capacidade de adesão às células epiteliais). As formas leveduriformes, com cinco dias de crescimento em meio de Fava Netto, foram inoculadas em 500mL de meio de Negronei modificado por Siqueira (1982) e incubado a 35°C por 15 dias, em estufa agitadora. Após este período, as células foram tratadas com Timerosal na concentração final de 0,2 g/L e foram incubadas nas mesmas condições durante quatro dias. A partir daí, o filtrado de cultura foi concentrado contra polietilenoglicol 20.000 (Sigma), analisado quanto aos teores protéicos pelo método de Lowry et al. (1951) e avaliado por SDS-PAGE (LAEMMLI, 1970; STUDIER, 1973). Finalmente, foi aliquotado e congelado a -70°C. Este filtrado de cultura foi utilizado para a obtenção do antígeno de 43kDa. Para tanto, foi empregada a técnica de cromatografia de filtração em gel. Colunas com as resinas Sephacryl S-200 e S-100 (GE) de 3,0 x 70 cm e 1,9 x 90 cm foram utilizadas, respectivamente. As colunas, acopladas no aparelho LKB-Frac 100 (GE), foram equilibradas com PBS pH 7, 4, 0,01 M e previamente calibradas com azul de dextran. Após, foram aplicados 3,0 mL da amostra de filtrado de cultura, na coluna constituída de resina Sephacryl S-200, e alíquotas de 2,0 mL foram sendo coletadas e analisadas pela absorvância a 280 nm e reunidas em “pool” de acordo com os picos obtidos para serem concentradas em polietilenoglicol e dializadas. A avaliação do eluato foi efetuada por SDS-PAGE, e as frações ricas em antígeno de 43 kDa foram novamente cromatografadas, em coluna constituída de resina Sephacryl S-100, e novamente avaliadas em SDS-PAGE.

3.4.2. Purificação da adesina de 30 kDa.

A adesina de 30 kDa se diferencia por ter sua maior expressão em amostras de *P. brasiliensis* com alta capacidade de adesão. Portanto, para se obter grande quantidade desta proteína, foi necessária a passagem do isolado 18 durante cinco vezes pela monocamada celular. As células A549 foram crescidas em garrafas de cultura de 25 cm² em meio de cultura HAM F-12, acrescido de 10% de soro fetal bovino. Após a formação da monocamada, as células foram lavadas três vezes com PBS estéril e inoculadas com 3 mL de uma suspensão de leveduras de *P. brasiliensis*, na concentração de 1X10⁸ céls/mL em PBS estéril. Após 72 horas de incubação à 37⁰C, a monocamada foi lavada 3 vezes com PBS estéril, para retirar todas as leveduras que não conseguiram aderir ou invadir as células A549, então as células infectadas com *P. brasiliensis* foram lisadas com 3 mL de água destilada estéril. O lisado foi retirado da garrafa de cultura e mantido em meio de Fava Netto à 35⁰C até o crescimento das colônias fúngicas. Este procedimento foi repetido por cinco vezes consecutivamente. Após recuperação das leveduras em meio de cultura, foi obtido o filtrado de cultura desta amostra, como descrito anteriormente e submetido ao procedimento de fracionamento no intuito de obter uma fração mais purificada, sendo empregada a técnica de cromatografia de filtração em gel com a resina Sephadex G-50 (Amersham-Pharmacia). A avaliação do eluato foi efetuada por SDS-PAGE.

3.4.2.1. Análise protéica por eletroforese bidimensional.

A proteína de 30 kDa foi primeiramente submetida à focalização isoelétrica, como descrito por O'Farrel, 1975. A segunda dimensão, realizada para a separação de proteínas de acordo com a massa molecular, foi realizada em gel de poliacrilamida num gradiente de 5 –15% de acordo com Laemmli, 1970. O gel foi corado com Coomassie Azul Brilhante G-250, segundo Neuhoff et al. (1988).

3.4.2.2. Caracterização protéica pelo sequenciamento de aminoácidos.

Para o sequenciamento dos peptídeos internos, a proteína de 30 kDa submetida à eletroforese bidimensional foi corada por Coomassie blue e cortada do gel, eluída e a digestão feita com endopeptidase tripsina. Os fragmentos foram

separados por HPLC fase reversa e submetidos à degradação de Edman (FONSECA et al., 2001).

3.4.2.3. Análise da homologia das seqüências de aminoácidos da adesina de 30kDa de *Paracoccidioides brasiliensis*.

As seqüências de aminoácidos obtidas foram comparadas a outras depositadas num banco de dados. As pesquisas de homologia foram feitas com os programas Blastp (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) (ALTSCHUL et al., 1997) e Fasta 3 (www.ebi.ac.uk/fasta33/) (PEARSON, 2000).

3.5. Ensaio de inibição da adesão de *Paracoccidioides brasiliensis* às células Vero pelas adesinas de 30 e 43 kDa.

Os ensaios de inibição foram realizados em placas de 24 poços contendo no interior uma lamínula redonda (deckglaser). Assim, após a tripsinização da monocamada celular, 0,2 mL desta foi retirada da garrafa, diluída em 1,8 mL de meio de cultivo, feita a contagem das células em hemocítômetro (Câmara de Neubauer), e através de diluições adequadas, a concentração foi ajustada para 3×10^6 células/mL. Ao término desta etapa, 0,5 mL dessa suspensão de células foi dispensada em cada poço da placa contendo a lamínula e incubadas a 36.5°C por 24 horas, para que a monocamada celular se formasse sobre esta, sendo, a partir daí, utilizada para os testes de adesão e invasão do fungo.

Células epiteliais foram pré-incubadas por 1h a 37°C com as seguintes proteínas na concentração de 25µg/mL dissolvidas em PBS (pH 7, 2): 30 kDa, 43 kDa e 30 + 43 kDa. Esta concentração foi escolhida de acordo com estudos anteriores (MARQUES DA SILVA et al., 2003; MENDES-GIANNINI et al., 2004), em que antígenos circulantes, como a gp43, podem atingir estes níveis no sangue de indivíduos com paracoccidioidomicose. Paralelamente, foram feitos controles de viabilidade celular com Azul de Tripan.

Após incubação com as proteínas, as células foram lavadas três vezes com meio de cultivo e então inoculadas com uma suspensão de leveduras de *P. brasiliensis* na concentração de 1×10^8 células/mL em PBS estéril e incubadas por

2 e 5 horas à 37⁰C. Como controle do experimento, as células epiteliais não foram pré-incubadas com nenhuma das proteínas. Após o período de infecção, as células foram lavadas cinco vezes com PBS, eliminando-se, desta forma, células fúngicas não aderentes às culturas celulares e as células infectadas foram fixadas com paraformaldeído a 4% em PBS por um período de 2 horas a temperatura ambiente. Então as lamínulas foram lavadas três vezes com PBS, e secas a temperatura ambiente. A seguir, as células epiteliais foram coradas pelo May Grünwald-Giemsa. Cada ensaio foi feito em duplicata e a porcentagem das células infectadas foi determinada por contagem aleatória de um mínimo de 300 células em cada lamínula, repetida por três vezes. O índice de adesão foi calculado pela multiplicação da média do número de leveduras aderidas pela porcentagem de células epiteliais infectadas, observadas em microscópio óptico comum com objetiva de 100^x. O índice de invasão foi determinado da mesma forma, mas usando o número de leveduras internalizadas (ESQUENAZI et al., 2003). A média e o desvio padrão de três experimentos distintos foram determinados.

3.6. Influência das adesinas de 30 e 43 kDa na dinâmica do citoesqueleto das células A549.

3.6.1. Tratamento das células A549 com adesinas.

Após formação da monocamada celular nas lamínulas redondas (como descrito anteriormente para os testes de adesão e invasão do fungo), as células foram lavadas três vezes com PBS estéril, e as adesinas purificadas na concentração de 25 µg/mL em meio HAM F-12(30 kDa, 43 kDa e 30 + 43 kDa) foram adicionadas às células e incubadas à 37⁰C durante 5 horas (paralelamente, foram feitos controles de viabilidade celular com Azul de Tripán).

Como controle da reação, as células epiteliais foram incubadas pelo mesmo período de tempo apenas no seu meio de cultivo, as quais foram denominadas de células normais (CN). Também foi feito um experimento controle, com as adesinas submetidas à desnaturação por temperatura de 120⁰C por 15 min. Após incubação, as células foram lavadas três vezes com PBS estéril,

fixadas com paraformaldeído a 4% em PBS e lavadas outra vez para realização dos experimentos de citoquímica e imunofluorescência e indireta, como descritos nos itens 3.6.2 e 3.6.3. O fluorocromo utilizado foi o isotiocianato de fluoresceína (FITC - fluorescein isothiocyanate) com comprimento de onda para absorção de 450-500 nm e comprimento de onda de emissão de 500-550 nm que é observado pela cor verde.

3.6.2. Marcação com faloidina para visualização dos filamentos de actina.

A faloidina é uma toxina que se liga à actina polimérica, estabilizando-a. Reação de fluorescência (citoquímica) das células epiteliais tratadas e não tratadas com as adesinas (como descrito no item anterior), foi feita em lamínulas fixadas com paraformaldeído a 4% em PBS. As lamínulas com células cultivadas por 24 horas, na concentração de 3×10^6 células/mL, foram permeabilizadas com solução de Triton X-100, 0,5% em PBS por 20 minutos, lavadas três vezes com PBS e, a seguir, adicionado conjugado faloidina-FITC (Sigma) no título de 1:50 em Azul de Evans, por 50 minutos a 37°C, no escuro. Paralelamente foi feito um controle onde se omitiu a marcação com faloidina-FITC, para a observação da autofluorescência das células. As lamínulas foram novamente lavadas por três vezes com PBS, montadas em lâmina com solução de glicerina tamponada com *antifade* (p-fenilenodiamino [Sigma] à 300µg/mL). Estas foram examinadas em microscópio de fluorescência (Leica) e, para documentação, foi usado filme Fujicolor super HG de 400 asas.

3.6.3. Filamentos Intermediários: Citoqueratina.

As células tratadas e não tratadas com adesinas, após fixação com paraformaldeído a 4% em PBS, foram submetidas a reação de imunofluorescência indireta. Para a observação dos filamentos de citoqueratina foi utilizado o anticorpo monoclonal anti-pan citoqueratina (Sigma) diluído 1:4 em PBS, e como anticorpo secundário IgG de cabra anti-IgG de camundongo marcado com FITC (Sigma) diluído 1:60 em Azul de Evans, por 1 h a 37 °C, no escuro. Paralelamente um controle foi feito omitindo-se os passos de marcação com os anticorpos, para a visualização do padrão de autofluorescência das

células. As lamínulas foram novamente lavadas com PBS, montadas em lâmina com solução de glicerina tamponada com *antifade* (p-fenilenodiamino [Sigma] à 300µg/mL). As análises foram realizadas em microscópio ótico de fluorescência (Leica) e, para documentação, foi usado filme Fujicolor super HG de 400 asas.

3.7. Ocorrência de apoptose em células A549 tratadas com as adesinas de 30 e 43 kDa.

Para avaliar se as adesinas de *P. brasiliensis* são capazes de induzir apoptose em células epiteliais, três metodologias diferentes foram realizadas: técnica de TUNEL, imunoperoxidase *in situ* com anticorpos (Dako-Cytomation) anti-Bak, anti-Bcl-2, anti-p53 e anti-PARP-1 e citometria de fluxo com anexina V-FITC (BD Biosciences Pharmingen) e iodeto de propídio (BD Biosciences Pharmingen).

3.7.1. Técnica de TUNEL.

Uma das metodologias empregadas foi a técnica de TUNEL (Terminal deoxy-transferase mediated X-dUTP Nick End Labeling) que tem como princípio a marcação específica de seqüências de DNA da fragmentação que ocorre durante o processo de apoptose celular.

Para tanto, em lamínulas contendo células epiteliais tratadas com as adesinas na concentração de 25 µg/mL em meio HAM F-12(30 kDa, 43 kDa e 30 + 43 kDa) em tempos de 5 e 24 horas à 37°C, e células não tratadas, como controle negativo, após a fixação e lavagens, foram adicionadas solução de bloqueio composta por leite desnatado a 5% e BSA a 3% em PBS, lavadas e incubadas com a mistura dos componentes do “TUNEL” com sonda fluorescente (Boehringer Mannheim), transferase terminal (TdT) e a sonda marcada com fluoresceína (d-UTP fluoresceína), por uma hora a 37°C. Durante este tempo, na extremidade 3' dos fragmentos apoptóticos de DNA foram incorporados os nucleotídeos marcados com fluoresceína, catalisados pela transferase terminal. Após lavagens com PBS-T (tampão salina fosfato com 0,05% de tween 20) gelado, as lamínulas foram contra coradas com azul de Evans por 30 minutos a 37°C, novamente lavadas com PBS-T. As lamínulas foram montadas com

glicerina tamponada e *antifade* e observadas em microscópio ótico de fluorescência. As células que apresentaram núcleos com carística de apoptose foram contadas. Cada ensaio foi feito em duplicata e a porcentagem de células apoptóticas foi determinada por contagem aleatória de 100 células por lamínula, repetida por três vezes e um gráfico foi montado para melhor avaliação do experimento.

3.7.2. Imunoperoxidase *in situ*.

A reação de imunoperoxidase *in situ* foi realizada segundo Polak e Van Noorden (1986), utilizando quatro anticorpos anti-proteínas reguladoras de apoptose celular Bak, Bcl-2, p53 e PARP-1.

Células epiteliais foram cultivadas em placas de 24 orifícios até a confluência e tratadas com as adesinas na concentração de 25 µg/mL em meio HAM F-12(30 kDa, 43 kDa e 30 + 43 kDa) em tempos de 5, 24, 48 e 72 horas à 37°C, bem como, células não tratadas, usadas como controle negativo, foram fixadas com paraformaldeído 4% em PBS. As células foram então submetidas a digestão enzimática com proteinase K (25 µg/ml) em Tris-HCl 0,05M e Cloreto de Cálcio 20mM, pH 8,0 por 3 minutos à 37°C no escuro. A seguir, foram lavadas com PBS e bloqueadas com tampão BSA 3% por 1 hora a 37°C. Decorrido esse tempo foram lavadas com PBS por três vezes e incubadas com os anticorpos primários monoclonais anti-Bak (1:200), anti-Bcl-2 (1:80), anti-p53 (1:100) (Dako-Cytomation) e anti-PARP-1 (1:100) (Santa Cruz). Foi utilizado como conjugado o *Kit StreptAB complex/HRP Duet, Mouse/Rabbit* (Dako-Cytomation).

A revelação foi feita utilizando diaminobenzidina (DAB) 0,005g em 30 mL de PBS e 150 µL de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) até a observação de uma leve tonalidade castanha. A reação foi bloqueada usando água e em seguida as lâminas foram contra coradas com Hematoxilina de Mayer por 1 minuto, passando posteriormente em água amoniacal por alguns segundos e depois algumas vezes em água de torneira. As lamínulas foram secas a temperatura ambiente, montadas em Permount e observadas em microscópio com objetiva de 100X, as reações foram feitas em triplicata. As células que apresentaram positividade no

citoplasma (coloração castanha) foram contadas, cada ensaio foi feito em duplicata e a porcentagem de células positivas foi determinada por contagem aleatória de 100 células por lamínula, repetida por três vezes e um gráfico foi montado com o resultado destes experimentos. Como controle positivo, para proteína Bak, foi utilizado tratamento das células com Metatrexato (1µg/mL), um antimetabólico, análogo ao ácido fólico, que inibe a diidrofolato redutase, enzima necessária para a síntese de nucleotídeos e aminoácidos. Assim, reduz a síntese de DNA, inibe a mitose e a proliferação de células de divisão rápida, sendo por isso utilizado como controle positivo para apoptose, segundo Kobayashi et al. (2002). Foi feito ainda controle do conjugado omitindo os anticorpos primários.

3.7.3. Citometria de fluxo.

Os métodos para analisar a ocorrência de apoptose normalmente baseiam-se na avaliação da alteração da membrana citoplasmática, que passa a expor fosfatidilserina, componente de membrana translocado no processo de apoptose, ou pela avaliação da fragmentação do DNA. Existem vários marcadores para detecção de morte celular programada. A anexina V, proteína ligante de fosfolípido dependente de cálcio possui alta afinidade para fosfatidilserina. Uma das técnicas para detectar apoptose utilizando citometria de fluxo é o uso da anexina V marcada com FITC (para avaliar células com translocação de fosfatidilserina para o lado exterior da membrana) em conjunto com iodeto de prodígio (IP), que é capaz de penetrar em células com injúria e/ou rompimento de membrana características de células em processo de necrose.

O protocolo utilizado foi padronizado por Vasconcelos et al. (2001), com algumas alterações. As células epiteliais foram cultivadas em garrafas de 25 cm² por 48 horas. As células foram tratadas com as adesinas na concentração de 25 µg/mL em meio HAM F-12 (30 kDa, 43 kDa e 30 + 43 kDa) em tempos de 5, 24 e 72 horas à 37°C, e células não tratadas, como controle. Também foi feito um controle positivo tratando as células com Metotrexato a 1µM, por 24 horas.

Após os tempos de incubação, cada monocamada celular foi lavada três vezes com PBS estéril e adicionado 500 µL de tripsina, incubada por 1 a 2 min à

37°C (para descolamento total da monocamada). Às células, foram adicionados mais 500 µL de meio de cultivo HAM F-12 suplementado com 10% de soro fetal bovino, feita homogeneização e centrifugada a 380 x *g* por 1 minuto. O sobrenadante foi retirado e ao *pellet* foi adicionado 400 µL de tampão de ligação (10 mM HEPES/NaOH, pH 7,4, 140 mM NaCl e 2,5 mM CaCl₂), 5 µL (1µg/mL) de anexina V-FITC, marcador específico para apoptose precoce (VERMES et al., 1995, 2000) e 5 µL de iodeto de propídio a 2µg/mL. A suspensão celular foi gentilmente misturada no vórtex (paralelamente, após este procedimento, foi feito um controle de viabilidade celular, cujo índice foi de 95%, o mesmo das células que não passaram por este passo) e incubada por 30 minutos a 4°C no escuro, sob leve agitação. Após incubação, foram adicionados 100 µL de paraformaldeído a 1% na mistura e mantida a 4°C. No momento da leitura, foram adicionados 400 µL de tampão de ligação a cada tubo e as células analisadas no citômetro de fluxo (Coulter, EPICS-XL). A quantificação de apoptose foi feita de acordo com a figura 5, onde as células em apoptose precoce são representadas graficamente no quadrante D1. No quadrante D2, aparecem as células em apoptose tardia, também chamada necrose secundária, (passo posterior a apoptose), ou seja, células que se ligam a anexina e permitem a entrada do iodeto de propídio, pois apresentam certa permeabilidade na membrana (VERMES et al., 2000). Em D4, são representadas as células que apenas incorporam o iodeto de propídio, representando necrose celular, isto é, células que não iniciaram o processo de apoptose, e finalmente em D3 células viáveis, que não apresentam nenhuma marcação. O número de células presente nos quadrantes D1 e D2 foi considerado neste experimento para avaliar a ocorrência de apoptose nas células epiteliais após tratamento com as adesinas de *P. brasiliensis*.

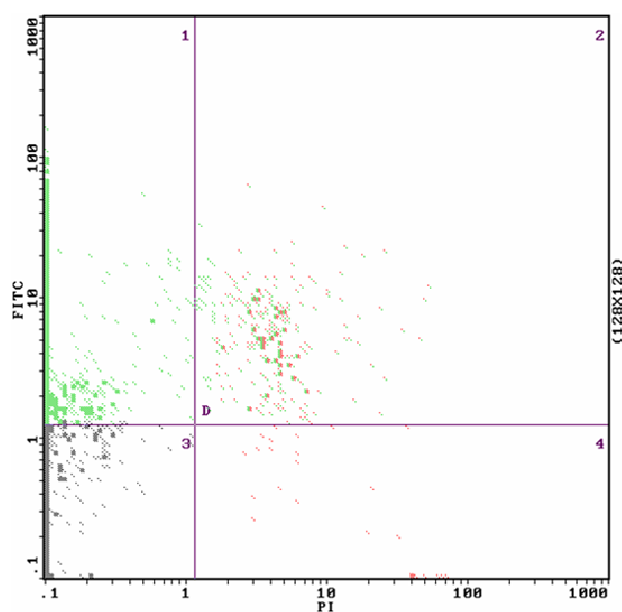


Figura 5: Gráfico representativo da análise de apoptose por citometria de fluxo utilizando anexina V-FITC e iodeto de propídio (PI). Quadrante 1: células marcadas apenas com anexina V (apoptose precoce); Quadrante 2: células Marcadas com anexina V e PI (apoptose tardia); Quadrante 3: células não marcadas (células viáveis); Quadrante 4: Células marcadas apenas com PI (necrose).

3.8. Análise estatística.

Análise estatística foi realizada utilizando um método de análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste *t* de Student para avaliar a diferença significativa entre pares. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. As análises foram feitas com o programa Origin 5.0 (OriginLab).

4. RESULTADOS

4.1. Sequenciamento e análise da seqüência nucleotídica traduzida do fragmento clonado de 300pb.

Após a recuperação do DNA plasmidial e sequenciamento dos clones positivos, um fragmento de 308pb foi obtido, com 84 aminoácidos, interrompido por um intron putativo de 66pb. A seqüência de nucleotídeos, com a dedução de aminoácidos deste fragmento está ilustrada na figura 6.

A seqüência de nucleotídeos do fragmento, quando analisada no programa BLASTX (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST), apresentou identidade para as seqüências de *Aspergillus nidulans* (XP663554), *Magnaporthe grisea* (XP361676) e *Neurospora crassa* (XP324589) já depositadas, destacando três grandes regiões de maior homologia: do aminoácido 4 (C) ao 15 (M), do 21 (C) ao 44 (N) e do 60 (Y) ao 66 (H) (Figura 2). Posteriormente, a proteína hipotética de *A. nidulans* do banco de dados citada acima foi analisada através do programa BLASTp e identidade alta foi encontrada para “Adapter-related protein complex 2 beta 1 subunit (Beta-adaptin)” de *A. fumigatus*, *Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Xenopus laevis*, *Danio rerio* dentre outros (Figura 7). Nestes organismos, esta proteína varia de aproximadamente 700 (*A. fumigatus*, *A. nidulans*, *M. grisea* e *N. crassa*) a 950 aminoácidos (*Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Xenopus laevis*, *Danio rerio*).

A seqüência de 308pb analisada corresponde à parte inicial da proteína, sendo possivelmente equivalente aos aminoácidos 70 a 130. Esta seqüência foi denominada “*Paracoccidioides brasiliensis* adaptin-like protein” e depositada no *GenBank* com o número AY675222.

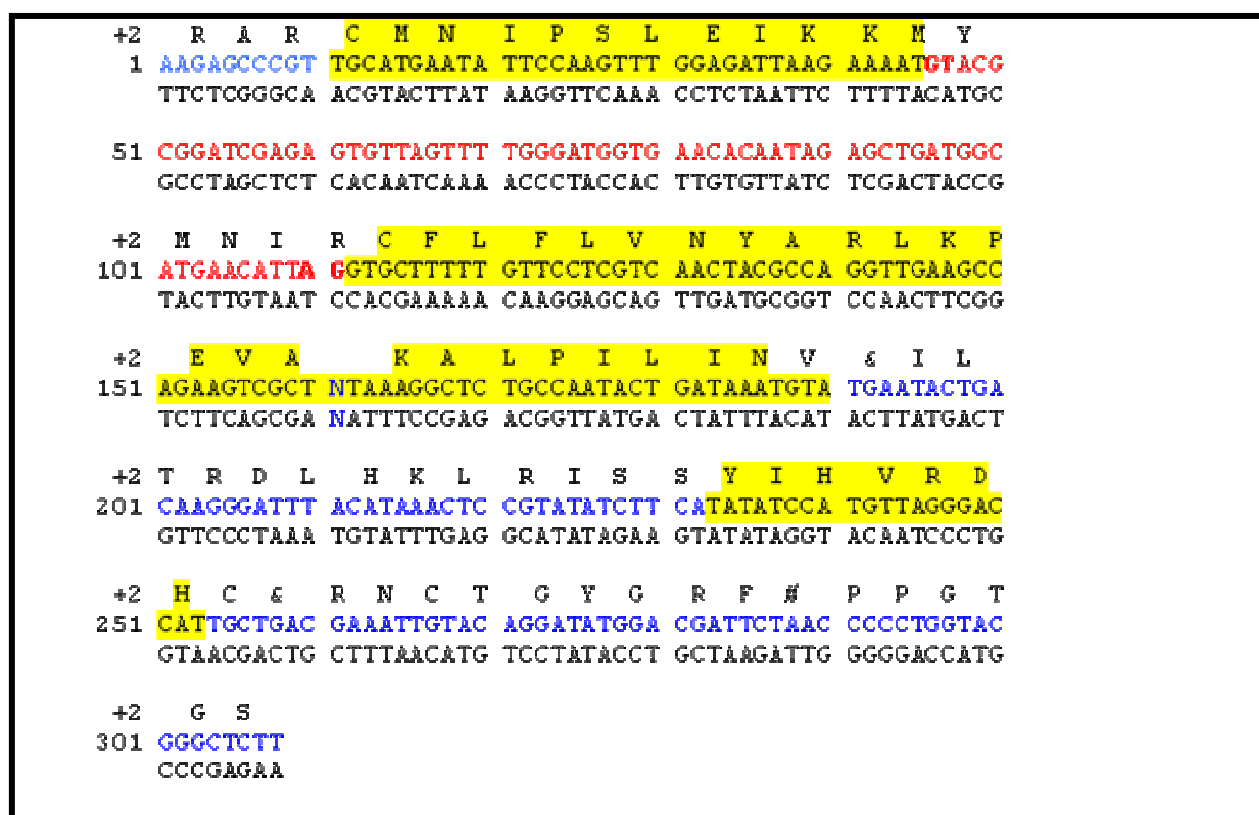


Figura 6: Seqüência nucleotídica do fragmento de 308pb clonado, traduzida em seqüência de aminoácidos. Em vermelho estão representadas as prováveis regiões de *introns* e em amarelo, a região codificante que apresentou identidade para as seqüências de *A. nidulans*, *M. grisea* e *N. crassa*.

Proteína	Organismo	GenBank n°	Identidade (%)	Similaridade (%)	E value
AP-2 adaptor complex subunit beta	<i>Aspergillus fumigatus</i>	XP755367	84	91	0.0
Adaptor-related protein complex 2	<i>Homo sapiens</i>	NP001273.1	48	73	4e ⁻¹⁵⁷
Adaptor-related protein complex 2	<i>Mus musculus</i>	NP082191.1	50	75	4e ⁻¹⁵⁷
Ap2b1-prov protein	<i>Xenopus laevis</i>	AAH43793.1	50	75	2e ⁻¹⁵⁶
Adaptor-related protein complex 2	<i>Danio rerio</i>	AAH66566.1	50	75	2e ⁻¹⁵⁶

Figura 7: Análise comparativa da seqüência hipotética traduzida depositada de *A. nidulans* (XP663554) com identidade ao fragmento polimórfico, com outras seqüências depositadas através do BLASTp. Resumo dos valores calculados para similaridade e identidade de aminoácidos entre a seqüência da proteína de *A. nidulans* XP663554 e de outros organismos.

4.1.2. Análise por *Southern blot*.

A análise por *Southern blot* do DNA genômico das duas amostras de *P. brasiliensis* (antes e após reisolamento), usando como sonda a seqüência polimórfica de 300pb detectou um único fragmento no DNA digerido com as enzimas de restrição *Sall*, *EcoRI* e *NdeI* e este fragmento foi detectado apenas no DNA genômico da amostra de *P. brasiliensis* após o reisolamento em animais, como mostra a figura 8.

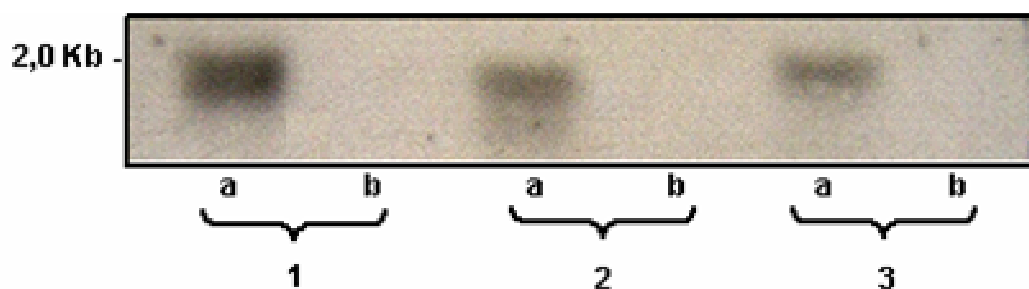


Figura 8: Análise por *Southern blot* para determinação da presença da seqüência parcial de 300pb (*adaptin-like protein*) no DNA genômico de duas amostras de *P. brasiliensis*, antes (a) e após reisolamento (b) em animal. 20 μ g de DNA total foi digerido com as enzimas de restrição: *Sall* (1), *NdeI* (2) e *EcoRI* (3). A membrana foi hibridizada com a sonda de 300pb marcada com fluoresceína.

4.2. Avaliação da homologia dos peptídeos internos da adesina de 30kDa de *P. brasiliensis*.

O sequenciamento dos peptídeos internos da adesina de 30 kDa de *P. brasiliensis* gerou três seqüências de aminoácidos: IVASADKELSVEER, NLLSVAYK e NATEVAQTDLAPTHPIR. Estas seqüências foram submetidas aos bancos de dados e analisadas pelos programas Blastp (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) e Fasta 3 (www.ebi.ac.uk/fasta33/). Nas duas análises o resultado foi o mesmo, os peptídeos têm similaridade com a proteína 14-3-3 de *P. brasiliensis*. A seqüência de aminoácidos dos peptídeos internos desta adesina mostrou identidade com duas regiões da proteína 14-3-3 de *P. brasiliensis* já depositada no *GenBank* (AAR24348): a primeira do aminoácido 28 ao 50 com identidade de 100% e a segunda do aminoácido 153 ao 169 com 100% de identidade, como mostra a figura 9.

Seqüência de aminoácidos da adesina de 30 kDa	IVASADKELSVEERNLLSVAYKN
Aminoácidos idênticos nas duas seqüências	IVASADKELSVEERNLLSVAYKN
Seqüência da proteína 14-3-3 de <i>P. brasiliensis</i>	28 IVASADKELSVEERNLLSVAYKN 50
Identidade	100%
Seqüência de aminoácidos da adesina de 30 kDa	NATEVAQTDLAPTHPIR
Aminoácidos idênticos nas duas seqüências	NATEVAQTDLAPTHPIR
Seqüência da proteína 14-3-3 de <i>P. brasiliensis</i>	153 NATEVAQTDLAPTHPIR 169
Identidade	100%

Figura 9: Resultados de identidade da adesina de 30 kDa com a proteína 14-3-3 de *P. brasiliensis* obtidos a partir de análises com os programas Blastp e Fasta 3.

4.3. Inibição da adesão de *P. brasiliensis* às células epiteliais pelas adesinas 30 e 43 kDa.

Os índices de adesão e invasão obtidos na interação de *P. brasiliensis* com células epiteliais tratadas com as adesinas de 30 e 43 kDa foram comparados com o controle (sem tratamento com adesinas), para calcular a porcentagem de inibição da adesão e invasão causadas por estas proteínas (Figura 10). Quando as células epiteliais foram pré-tratadas com a adesina de 30 kDa, a inibição da adesão e invasão foi, respectivamente, de aproximadamente 73% ($p < 0,05$) e 45%, quando comparadas com as células não tratadas, após duas horas de contato do fungo com as células e 72% ($p < 0,0005$) e 86% ($p < 0,0005$), após 5 horas. O pré-tratamento com 43 kDa diminuiu os índices de adesão e invasão em 56% ($p < 0,05$) e 48%, respectivamente, após duas horas de infecção e em 65% ($p < 0,05$) e 70% ($p < 0,0005$), após 5 horas.

Por outro lado, o pré-tratamento com as duas adesinas (30 e 43 kDa) concomitantemente exerceu aumento significativo na inibição tanto em duas horas como em cinco horas de infecção ($p < 0,0005$). A redução no índice de adesão foi de 90% em duas horas e 86% em cinco horas, já o índice de invasão diminuiu em 90% e 91% nas infecções de duas e cinco horas, respectivamente.

As células tratadas e não tratadas com as proteínas por 5 horas apresentaram índice de viabilidade celular de 92% e 95%, respectivamente.

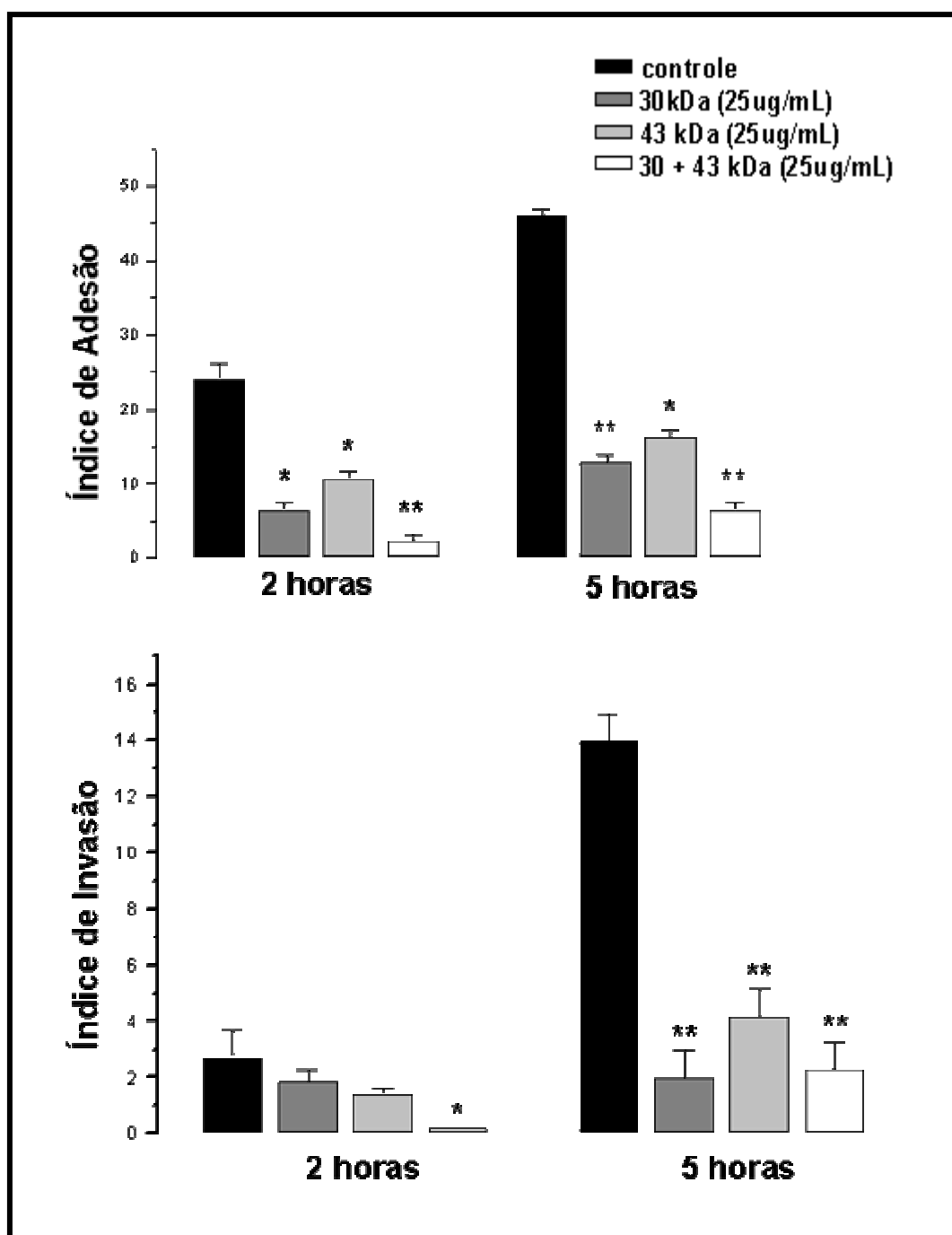


Figura 10: Ensaio de inibição da interação de *P. brasiliensis* e células epiteliais pelas adesinas de 30 e 43 kDa. As células epiteliais foram pré-tratadas ou não (controle) por uma hora com 25µg/mL de 30 kDa, 43 kDa e 30 + 43 kDa, antes da interação com as células leveduriformes por duas e cinco horas. Os índices de adesão e invasão são representados por média e desvio padrão (\pm S.D) de três experimentos independentes (triplicata). (*) = $p < 0,05$ e (**) = $p < 0,0005$ (ANDREOTTI et al., 2005).

4.4. Efeitos das adesinas de 30 e 43 kDa no citoesqueleto das células A549.

Muitos patógenos capazes de invadir fagócitos não profissionais, inclusive *P. brasiliensis*, induzem alterações na organização do citoesqueleto celular dessas células. Para verificar a influência das adesinas de *P. brasiliensis* na organização ou redistribuição dos microfilamentos polimerizados de actina e citoqueratina, durante o processo de interação às células epiteliais, foi empregada microscopia de fluorescência.

4.4.1. Microfilamentos de actina.

Células epiteliais não tratadas com as adesinas apresentaram marcação fluorescente intensa dos filamentos actínicos, caracteristicamente alongados (figura 11A). Após tratamento com as duas adesinas (30 e 43 kDa), alterações visíveis foram observadas na organização dos filamentos de actina (figuras 11B, 11C e 11D). O tratamento nas células epiteliais foi feito com as adesinas na concentração de 25 µg/mL durante cinco horas e as seguintes alterações foram observadas: redistribuição da actina ocorreu após o tratamento com a adesina de 30 kDa, aumentando a sua concentração junto à membrana celular com formação de protusões ricas em actina (figura 11B). O tratamento com 43 kDa também modificou o citoesqueleto de actina, levando aparentemente à sua distribuição na periferia celular, produzindo um efeito semelhante a “ondas” na membrana como mostra a figura 7C. Por outro lado, o tratamento com as duas adesinas, concomitantemente, mostrou um padrão similar ao do tratamento apenas com 30 kDa, sugerindo que o efeito desta proteína se sobrepõe ao da 43 kDa (figura 11D). A figura 11E mostra o padrão de fluorescência de células não marcadas (autofluorescência das células epiteliais), que apresentam coloração vermelha quando observadas em microscópio de fluorescência, utilizando o filtro detector de comprimento de onda 500-550nm (detecção de FITC).

Não houve alteração no citoesqueleto de actina após tratamento com as adesinas desnaturadas.

O índice de viabilidade celular após tratamento com as proteínas por 5 horas foi de aproximadamente 90%, feito em triplicata.

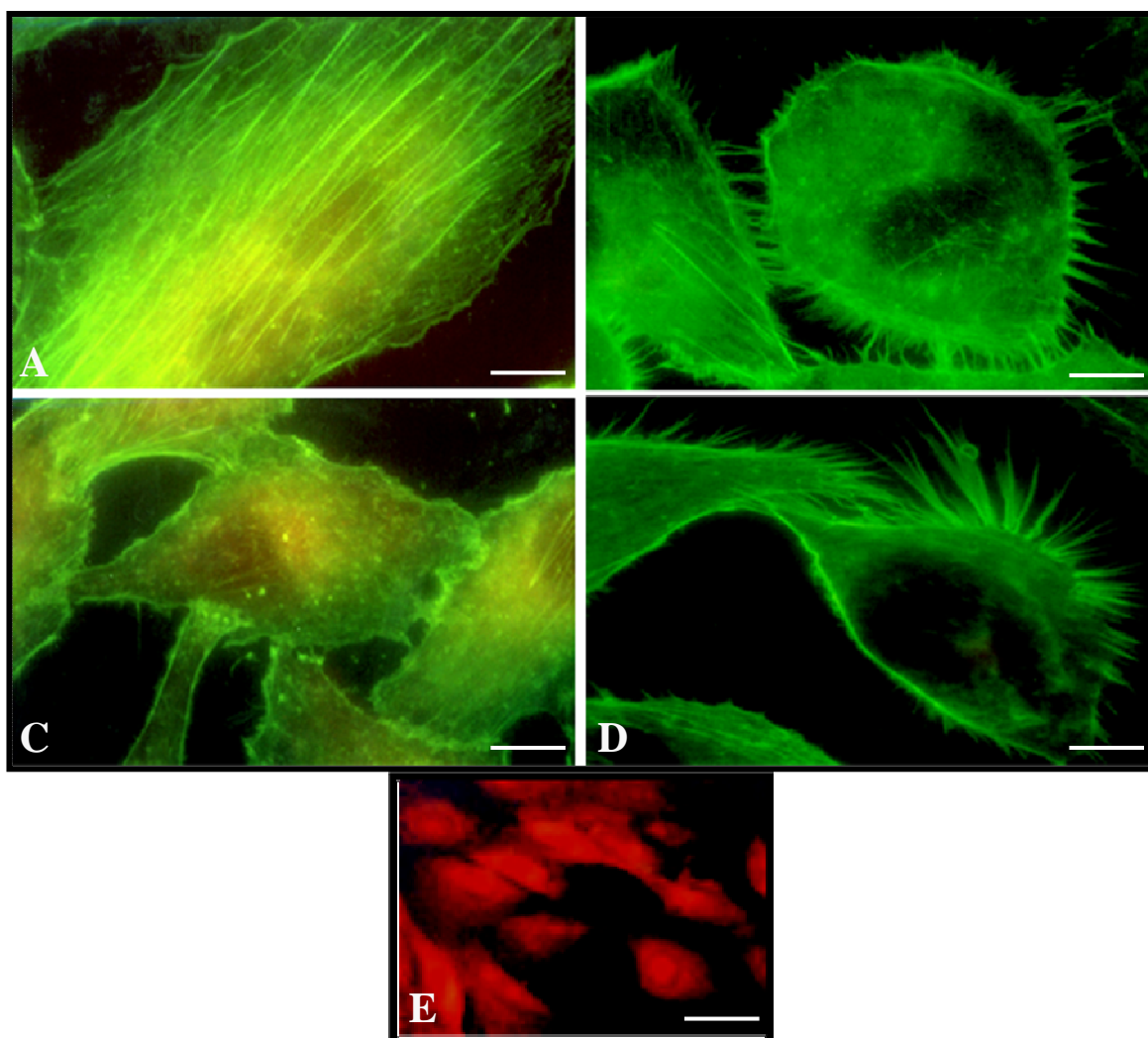


Figura 11: Microscopia de fluorescência de células epiteliais A549 mostrando o padrão de marcação dos filamentos de actina revelados por faloidina-FITC após tratamento com adesinas de *P. brasiliensis*. Painel A: Células-controlé não tratadas; barra: 1 μ m. Painel B: Células tratadas com adesina de 30 kDa (25 μ g/ml); barra: 1 μ m. Painel C: Células tratadas com adesina de 43 kDa (25 μ g/mL); barra: 1 μ m. Painel D: Células tratadas com as adesinas de 30 e 43 kDa, concomitantemente (25 μ g/mL); barra: 1 μ m. Painel E: Controle de células epiteliais, sem o tratamento com as adesinas, não marcadas com faloidina-FITC; barra: 25 μ m.

4.4.2. Filamentos intermediários: Citoqueratina.

As células epiteliais (A549) quando imunomarcadas com o anticorpo monoclonal anti-citoqueratina, apresentaram uma rede de filamentos curtos que se estendiam da região perinuclear até a membrana citoplasmática das células (figura 12A). Modificações acentuadas foram observadas no padrão de marcação de citoqueratina nas células epiteliais após tratamento com as adesinas. O tratamento com adesina de 30 kDa revelou uma marcação intensa, porém menor do que o controle. Os filamentos de citoqueratina aparentemente despolimerizaram-se, apresentando um padrão de bandeamento ao redor do núcleo e despolimerização no citoplasma, caracterizado pela menor intensidade de marcação (figura 12B). Por outro lado, o tratamento com adesina de 43 kDa apresentou fraca marcação da citoqueratina nas células epiteliais, aparentemente resultante da despolimerização desses filamentos intermediários (figura 12C). Quando as células foram tratadas com as duas adesinas ao mesmo tempo, ocorreu a predominância do padrão observado no tratamento apenas com a adesina de 30 kDa (figura 12D), sugerindo que esta proteína tenha um efeito inibitório sobre a ação da 43 kDa. A figura 12E mostra o padrão de autofluorescência das células epiteliais, que apresentam coloração vermelha quando observadas em microscópio de fluorescência, utilizando o filtro detector de comprimento de onda 500-550nm (detecção de FITC).

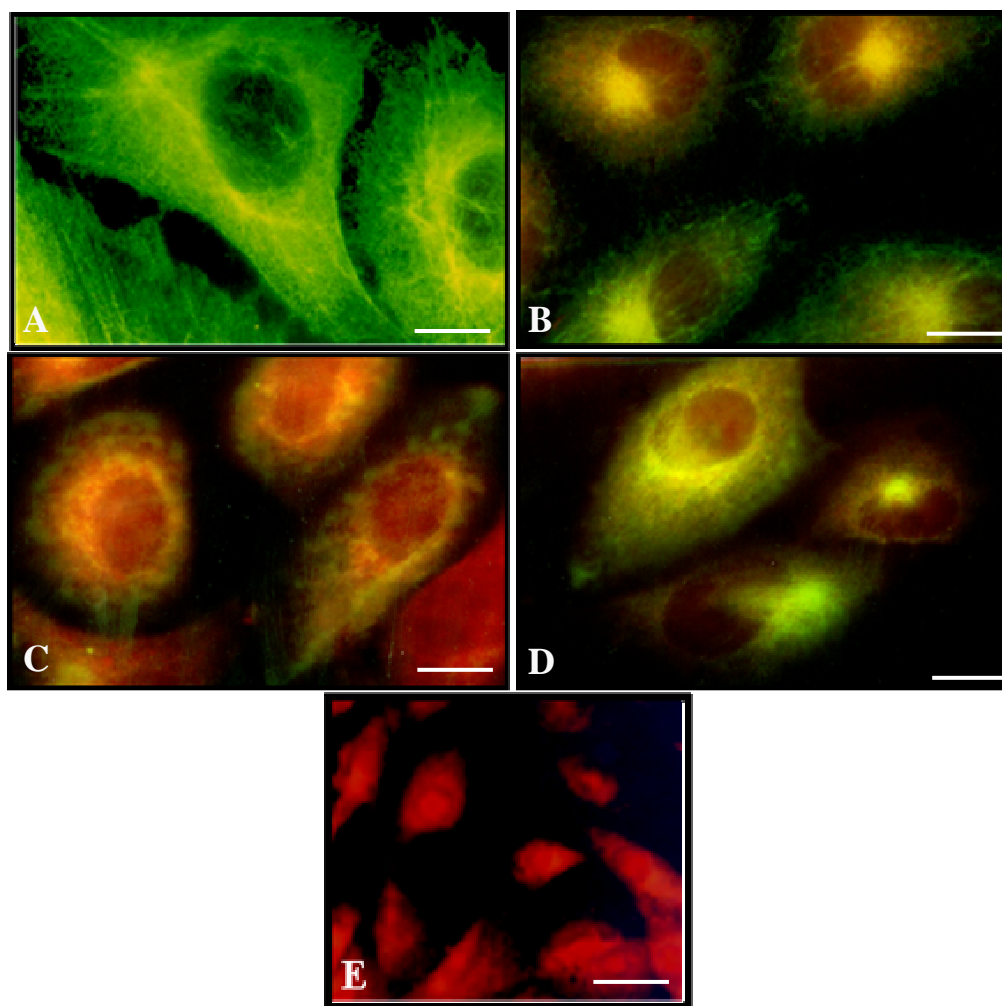


Figura 12: Interação de adesinas de *P. brasiliensis* com citoqueratina de células epiteliais A549, reveladas por imunofluorescência indireta utilizando como anticorpo primário anti-pan citoqueratina e anticorpo secundário IgG de cabra anti-IgG de camundongo marcado com FITC. Painel A: Padrão do conteúdo de citoqueratina em células epiteliais sem tratamento com as adesinas; barra: 1 μ m. Painel B: Células tratadas com adesina de 30 kDa (25 μ g/ml); barra: 1 μ m. Painel C: Células tratadas com adesina de 43 kDa (25 μ g/mL); barra: 1 μ m. Painel D: Células tratadas com as adesinas de 30 e 43 kDa, concomitantemente (25 μ g/mL); barra: 1 μ m. Painel E: Controle de células epiteliais não marcadas, sem o tratamento com as adesinas; barra: 25 μ m.

4.5. Ensaio de Apoptose.

Os eventos de indução de apoptose, pelas adesinas de *P. brasiliensis* (30 e 43 kDa) nas células epiteliais, foram analisados através de várias metodologias: técnica de TUNEL, imunoperoxidase *in situ* e citometria de fluxo.

4.5.1. Técnica de TUNEL.

Pela técnica do túnel, células que apresentavam fragmentação do DNA, característica esta, específica da morte celular programada foram observadas em microscópio de fluorescência. Células não tratadas com as adesinas (controle) apresentaram cerca de 1% das células com características de apoptose (núcleo com corpos apoptóticos). Após o tratamento com as adesinas por cinco horas, não houve aumento significativo de células apoptóticas, quando comparadas com o controle. Por outro lado, com o tratamento por 24 horas houve um aumento de células apoptóticas ($p < 0,0005$), sendo 4% quando tratadas com 30 kDa, 6% com 43 kDa e 10% quando tratadas com as duas adesinas (figura 13).

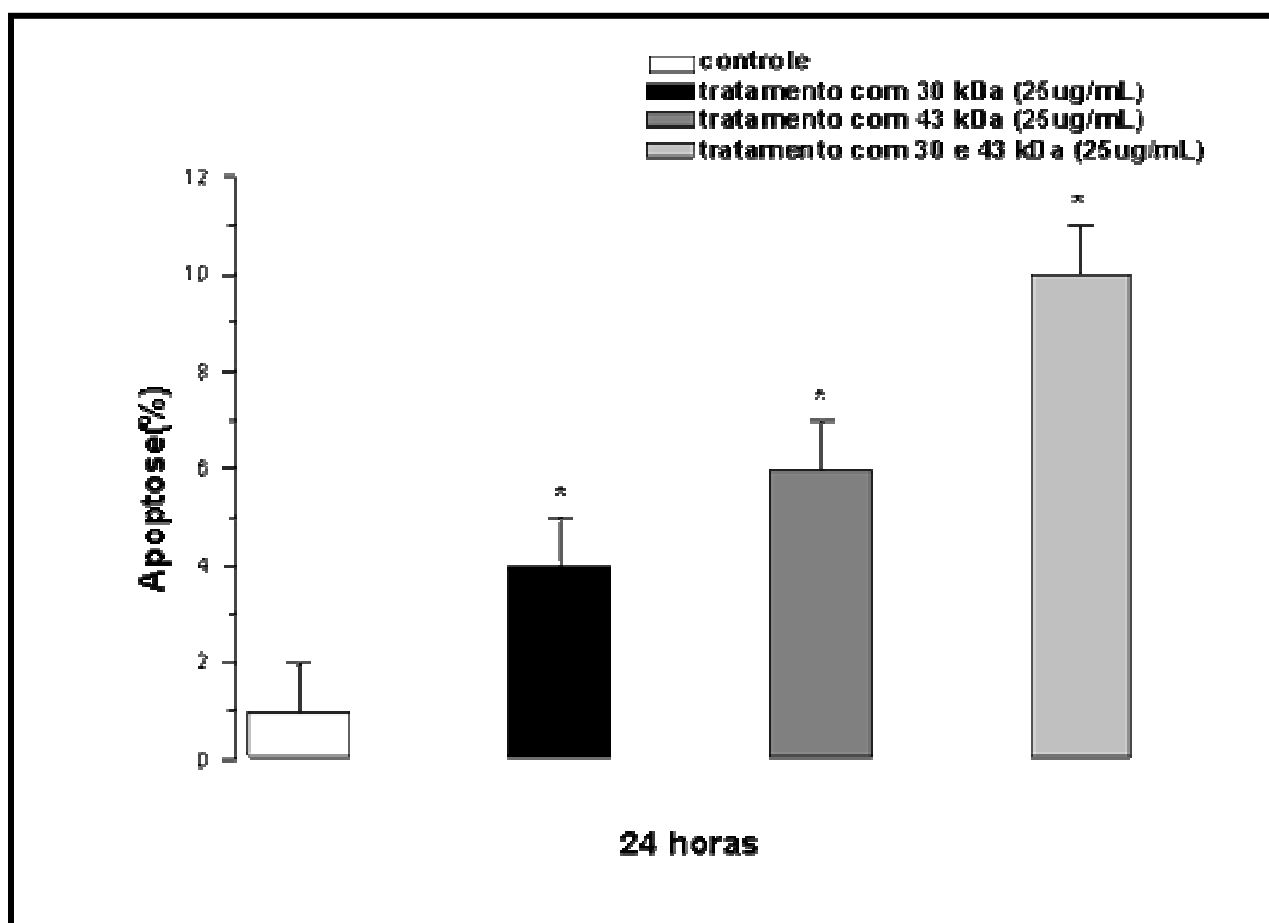


Figura 13: Gráfico representativo de células epiteliais A549 tratadas com adesinas de *P. brasiliensis* durante 24 horas, reveladas pela técnica de TUNEL para demonstração de corpos apoptóticos observadas em microscópio de fluorescência. Experimento realizado em duplicata para cada tratamento. A porcentagem de células apoptóticas foi determinada por contagem aleatória de 100 células em cada lamínula, repetida por três vezes. Células não tratadas foram utilizadas como controle da reação. (*) = $p < 0,0005$.

4.5.2. Imunoperoxidase *in situ* com anticorpos anti-Bak, anti-Bcl-2, anti p53 e anti-PARP-1.

Outra metodologia foi desenvolvida utilizando anticorpos monoclonais de proteínas marcadoras de apoptose (Bak, Bcl-2, p53 e PARP-1).

O controle, onde a marcação com os anticorpos anti-Bak (figura 14A) e anti-Bcl-2 (figura 14D) foram omitidas na reação, não foram observadas marcações positivas, não havendo, portanto, revelação inespecífica de peroxidase endógena. Os padrões considerados para células positivas, marcadas com os anticorpos anti-Bak e anti-Bcl-2 são representados nas figuras 14B e 14E, respectivamente. A figura 14C mostra a marcação com o anticorpo anti-Bak após o tratamento das células com Metotrexato.

A figura 15 mostra os resultados do tratamento com as adesinas por diferentes períodos de tempo. No tempo de 5 horas a marcação com os anticorpos anti-Bak (figura 14A) e anti-Bcl-2 (figura 14B) foi negativa para células não tratadas (controle). Quando as células foram tratadas com a adesina de 30 kDa, a marcação com estes anticorpos foi semelhante. Número pequeno de células positivas marcadas com o anticorpo anti-Bcl-2 (não significativa) e nenhuma marcação para o anticorpo anti-Bak foram observadas nas células tratadas com adesina de 43 kDa. As células tratadas com as duas adesinas foram marcadas com os anticorpos anti-Bak e anti-Bcl-2 na mesma proporção.

Com 24 horas de tratamento, as células não tratadas (controle) apresentaram poucas células marcadas com os anticorpos anti-Bak e anti-Bcl-2. O tratamento com 43 kDa mostrou o mesmo resultado do controle. Por outro lado, o tratamento com 30 kDa apresentou aumento de células marcadas com os dois anticorpos, quando estes resultados foram comparados com o experimento de cinco horas. Entretanto, aumento da marcação com anti-Bak em relação ao anti-Bcl-2 foi observada após o tratamento com ambas adesinas.

Após 48 horas, tanto as células controle como as tratadas com adesinas não mostraram marcação positiva quando foi utilizado o anticorpo anti-Bcl-2. Poucas células marcadas com o anticorpo anti-Bak foram observadas no controle

e no tratamento com 43 kDa. Entretanto, o tratamento com 30 kDa mostrou aumento de células positivas para Bak (8,5%), o mesmo ocorrendo com as duas adesinas, porém, em menor proporção (5,5%).

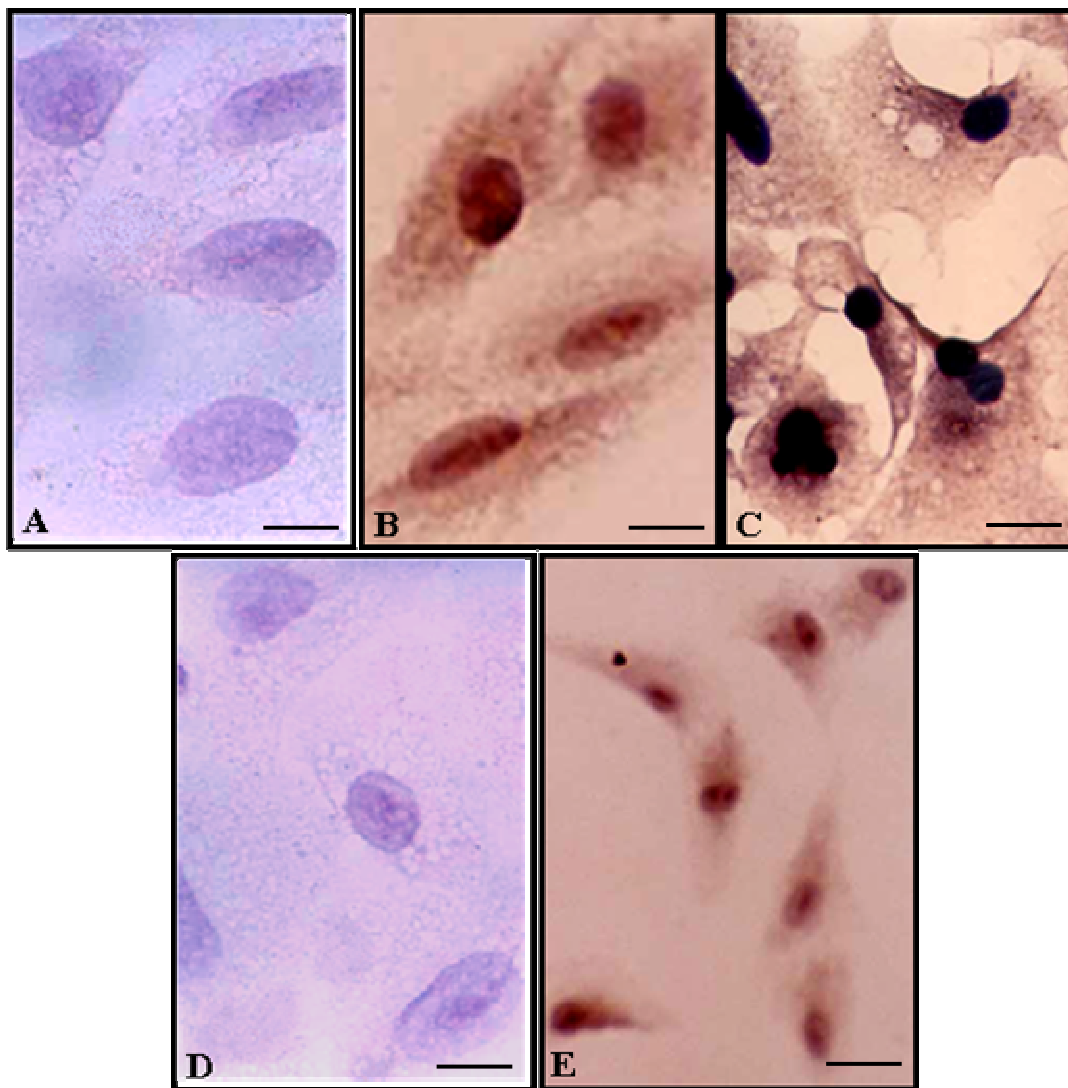


Figura 14: Micrografias representativas da reação de imunoperoxidase *in situ* revelada com anticorpos primários anti-Bak e anti-Bcl-2, e *Kit StreptAB complex/HRP Duet, Mouse/Rabbit* (Dako-Cytomation). Painel A: Controle negativo omitindo marcação com anti-Bak; barra: 1 μ m. Painel B: Padrão de marcação positiva para anti-Bak; barra: 1 μ m. Painel C: Controle de marcação positiva com anti-Bak em células tratadas com Metotrexato; barra: 1 μ m. Painel D: Controle negativo omitindo marcação com anti-Bcl-2; barra: 1 μ m. Painel E: Padrão de marcação positiva para anti-Bcl-2; barra: 25 μ m.

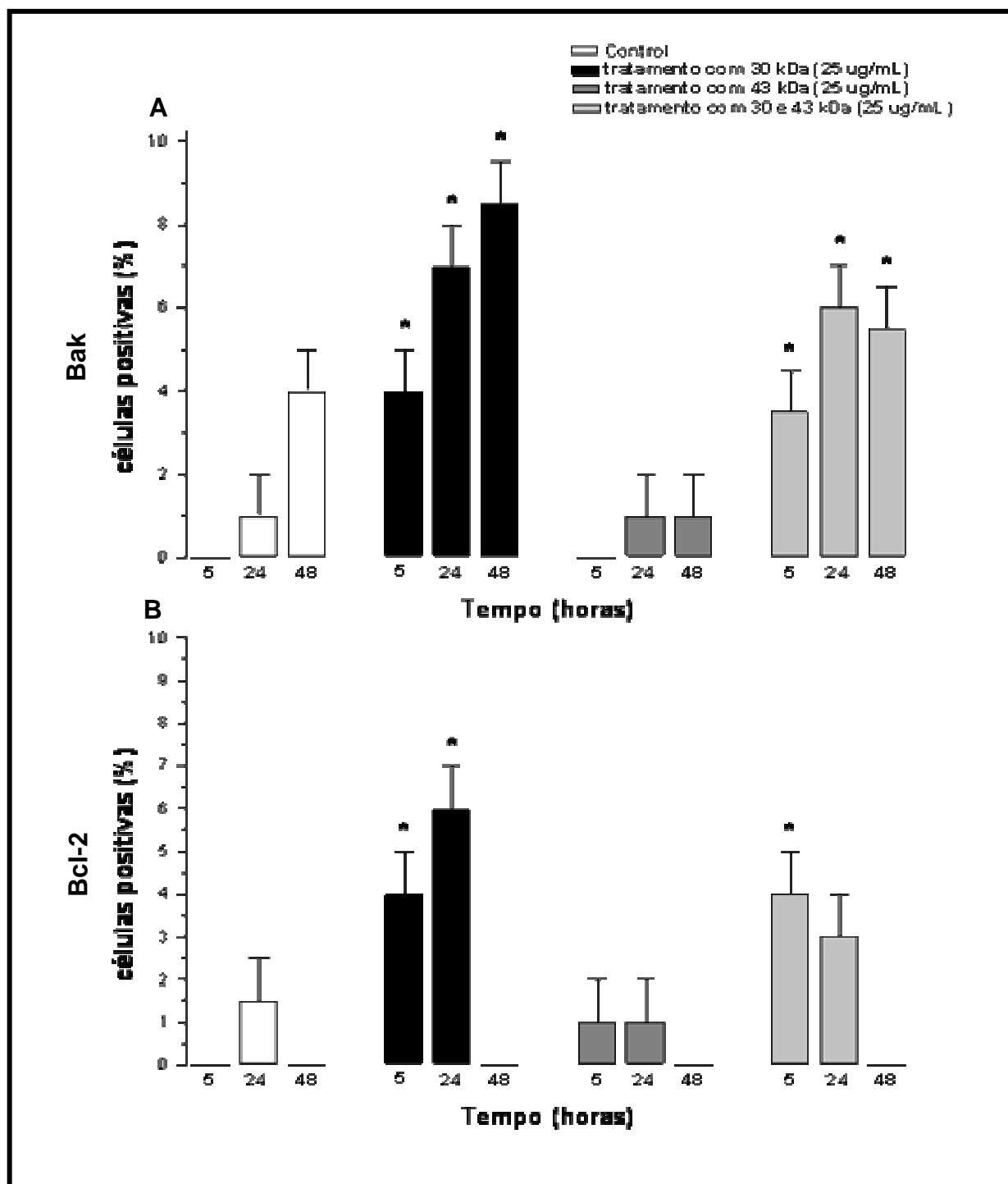


Figura 15: Gráfico representativo de células epiteliais A549 tratadas com adesinas de *P. brasiliensis* (30 e 43 kDa à 25 µg/mL), mostrando número de células marcadas com anticorpos anti-Bak e anti-Bcl-2, revelados por imunoperoxidase *in situ*. A porcentagem foi calculada pela contagem de células positivas, cada ensaio foi feito em duplicata e a porcentagem de células positivas foi determinada por contagem aleatória de 100 células por lamínula, repetida por três vezes. (A) revelação com anti-Bak; (B) revelação com anti-Bcl-2. * representa diferença significativa em relação ao controle ($p < 0,05$).

O controle, onde a marcação com o anticorpo anti-p53 foi omitida na reação, não foi observada nenhuma marcação positiva, não havendo, portanto, revelação inespecífica de peroxidase endógena (figura 16A). A figura 16B demonstra o padrão considerado para células positivas, com a proteína p53 translocada para o citoplasma, sugestivo de apoptose.

Quando as células tratadas e não tratadas com as adesinas de 30 e 43 kDa foram reveladas com o anticorpo anti-p53 foram obtidos os seguintes resultados representados na figura 17: com 5 horas de tratamento houve baixa positividade das células para p53, tanto em células tratadas como as não tratadas com as adesinas (1% de células positivas). Após 24 horas de tratamento, foi verificado um aumento significativo (10%) na positividade das células tratadas com as adesinas em relação às células não tratadas ($p < 0,05$), não havendo, entretanto, diferenças entre os tratamentos com 30 kDa, 43 kDa ou 30 e 43 kDa, ocorrendo o mesmo em 48 horas. No entanto, após 72 horas de tratamento foi observada, além de um aumento significativo de células positivas tratadas com as adesinas em relação às células não tratadas ($p < 0,05$), uma diferença significativa ($p < 0,005$) na positividade das células para p53 entre os tratamentos com as diferentes adesinas. Assim, foi verificado 20% de células positivas para 30 kDa, 34% para 43 kDa e 45% quando as células foram tratadas com 30 e 43 kDa concomitantemente.

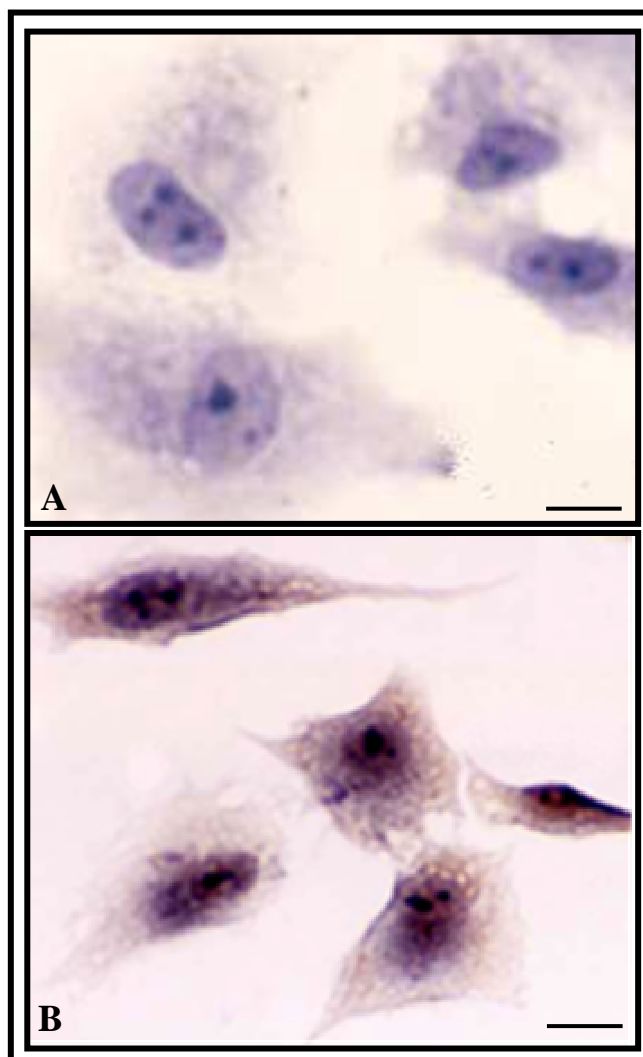


Figura 16: Micrografias representativas da reação de imunoperoxidase *in situ* revelada com anticorpo primário anti-p53 e *Kit StreptAB complex/HRP Duet, Mouse/Rabbit* (Dako-Cytomation) Painel A: Controle negativo com omissão do anticorpo primário anti-p53; barra: 1 μ m. Painel B: Padrão de marcação positiva considerada neste experimento para o anticorpo anti-p53; barra: 1 μ m.

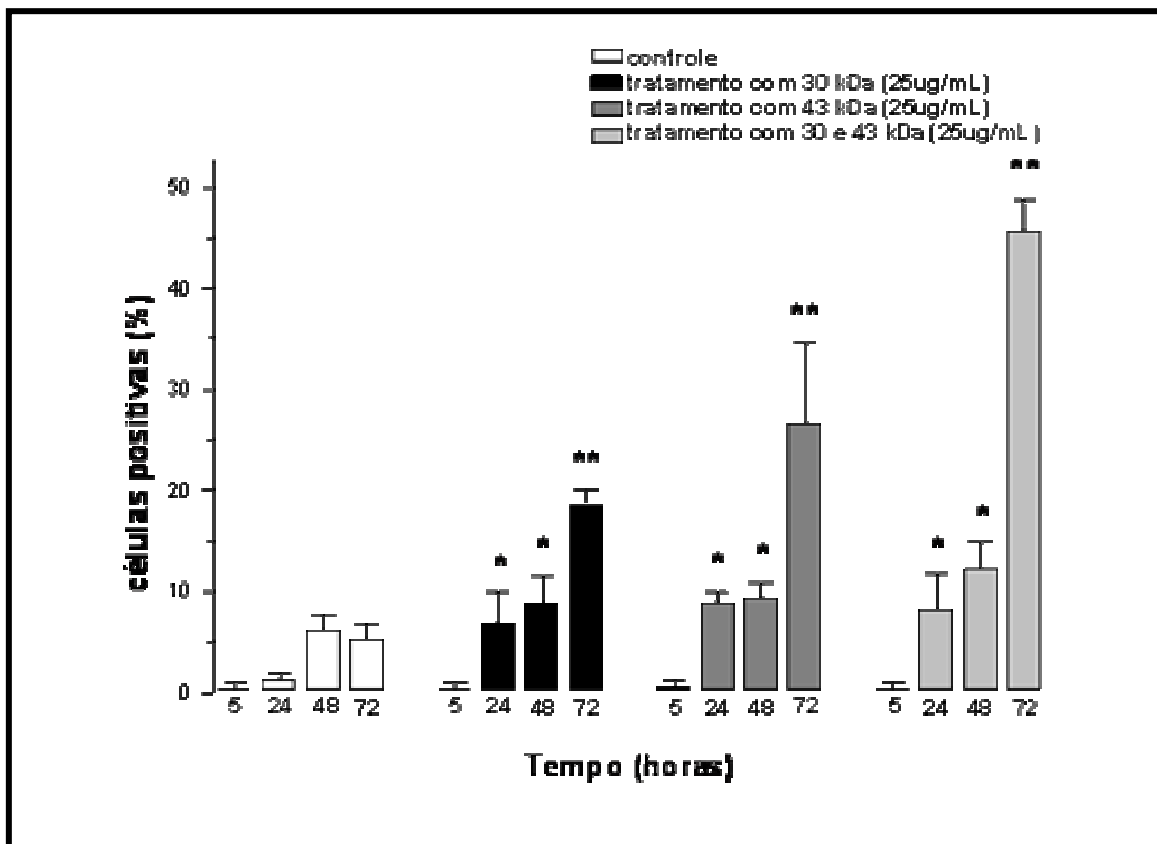


Figura 17: Gráfico representativo de células epiteliais A549 tratadas com adesinas de *P. brasiliensis* (30 e 43 kDa à 25 µg/mL) por diferentes períodos de tempo (5, 24, 48 e 72 horas), mostrando número de células marcadas com anticorpos anti-p53, revelado por imunoperoxidase *in situ*. A porcentagem foi calculada pela contagem de células positivas. Cada ensaio foi feito em duplicata e a porcentagem de células positivas foi determinada por contagem aleatória de 100 células por lamínula, repetida por três vezes * representa diferença significativa ($p < 0,05$) entre células tratadas e não tratadas; ** representa diferença significativa ($p < 0,005$) entre os tratamentos com as diferentes adesinas.

O anticorpo anti-PARP-1 também foi utilizado na reação de imunoperoxidase para demonstrar o perfil de expressão da proteína PARP-1 em células tratadas com as adesinas 30 kDa e 43 kDa de *P. brasiliensis* por diferentes períodos de tempo. A figura 18A mostra o controle negativo da reação, onde foi omitido o passo de marcação com o anticorpo primário anti-PARP-1, demonstrando que não houve marcação inespecífica de peroxidase endógena neste experimento. O padrão de marcação considerada positiva para este experimento é demonstrado na figura 18B, onde o anticorpo anti-PARP-1, mostra uma marcação tanto nuclear quanto citoplasmática desta proteína.

Após 5 horas de tratamento das células epiteliais houve um aumento significativo ($p < 0,0005$) da porcentagem de células positivas nas tratadas com as adesinas em relação às células não tratadas, contudo, não houve diferenças significativas entre os diferentes tratamentos com 30, 43 ou 30 e 43 kDa. Quando as células epiteliais foram tratadas com as adesinas por 24 horas foi observado um aumento ainda maior na positividade de PARP-1 em relação às células não tratadas ($p < 0,0005$) e, ainda, uma diferença significativa ($p < 0,005$), quando foi comparada a porcentagem de células positivas no tratamento com a adesina de 30 kDa com os outros dois tratamentos (com 43 kDa apenas ou com 30 e 43 kDa juntas). Em tempos superiores de tratamento das células epiteliais com as adesinas de *P. brasiliensis* houve uma diminuição significativa ($p < 0,0005$) de células expressando PARP-1 em relação aos tempos anteriores, chegando à igualdade com as células não tratadas (figura 19).

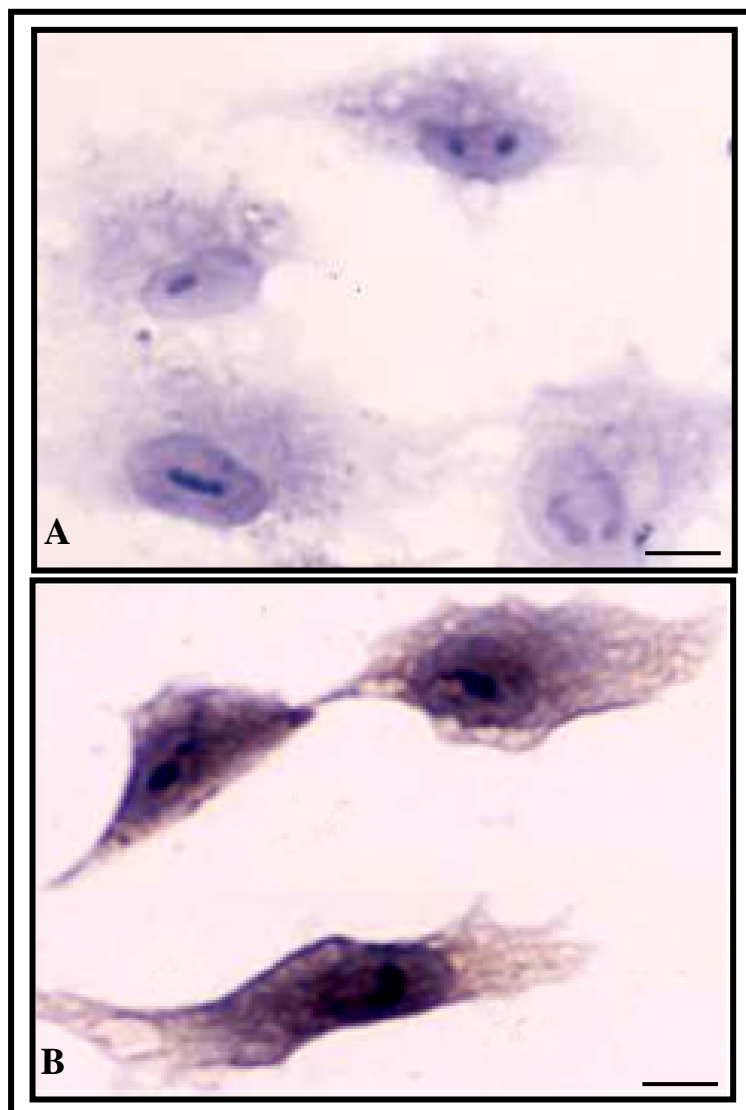


Figura 18: Micrografias representativas da reação de imunoperoxidase *in situ* revelada com anticorpo primário anti-PARP-1 e *Kit StreptAB complex/HRP Duet, Mouse/Rabbit* (Dako-Cytomation). Painel A: Controle negativo com omissão do anticorpo primário anti-PARP-1; barra: 1µm. Painel B: Padrão de marcação positiva considerada neste experimento para o anticorpo anti-PARP-1; barra: 1µm.

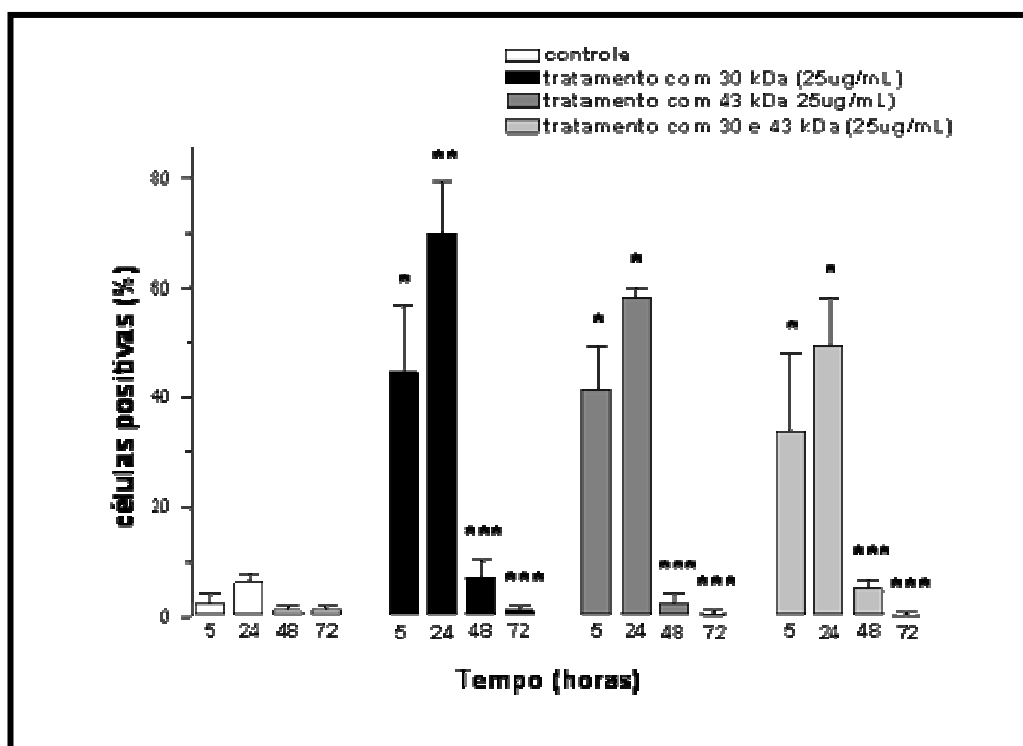


Figura 19: Gráfico representativo de células epiteliais A549 tratadas com adesinas de *P. brasiliensis* (30 e 43 kDa à 25 µg/mL) por diferentes períodos de tempo (5, 24, 48 e 72 horas), mostrando número de células marcadas com anticorpos anti-PARP-1, revelado por imunoperoxidase *in situ*. A porcentagem foi calculada pela contagem de células positivas. Cada ensaio foi feito em duplicata e a porcentagem de células positivas foi determinada por contagem aleatória de 100 células por lamínula, repetida por três vezes * representa diferença significativa ($p < 0,0005$) entre células tratadas e não tratadas; ** representa diferença significativa ($p < 0,005$) entre os tratamentos com as diferentes adesinas. *** representa diferença significativa ($p < 0,0005$) entre os períodos de 5 e 24 horas.

4.5.3. Citometria de fluxo para detecção de anexina V.

A quantificação das células apoptóticas foi obtida pela avaliação da expressão da fosfatidilserina pelas células através da ligação da proteína anexina V, que apresenta afinidade dependente de cálcio por este fosfolípido.

O tratamento das células epiteliais com as adesinas de *P. brasiliensis* (30 e 43 kDa na concentração de 25µg/mL) durante cinco horas não mostrou aumento significativo de apoptose quando comparado com o controle (células não tratadas). Com 24 horas de tratamento, as células tratadas com as adesinas mostraram um aumento significativo de células apoptóticas. Assim, as células controle apresentaram em torno de 4,5% de células em apoptose, as células tratadas com a 30 kDa apresentaram 8,5% ($p < 0,05$) de células apoptóticas e quando tratadas com 43 kDa, cerca de 9% ($p < 0,05$) das células entraram em apoptose. Após o tratamento com as duas adesinas, concomitantemente, a porcentagem de células apoptóticas foi de aproximadamente 10% ($p < 0,05$). Portanto, o tratamento com as adesinas por 24 horas induziu aumento significativo de células apoptóticas em relação ao controle (figura 20).

A figura 20 também mostra que após o tratamento com as adesinas durante 72 horas houve um aumento significativo de células apoptóticas quando as células A549 foram tratadas com a adesina de 30kDa e com as duas adesinas ao mesmo tempo, em torno de 38% ($p < 0,05$), comparados com a célula controle (sem tratamento). Já quando as células epiteliais foram tratadas apenas com a 43 kDa a porcentagem de células apoptóticas (28%) foi menor.

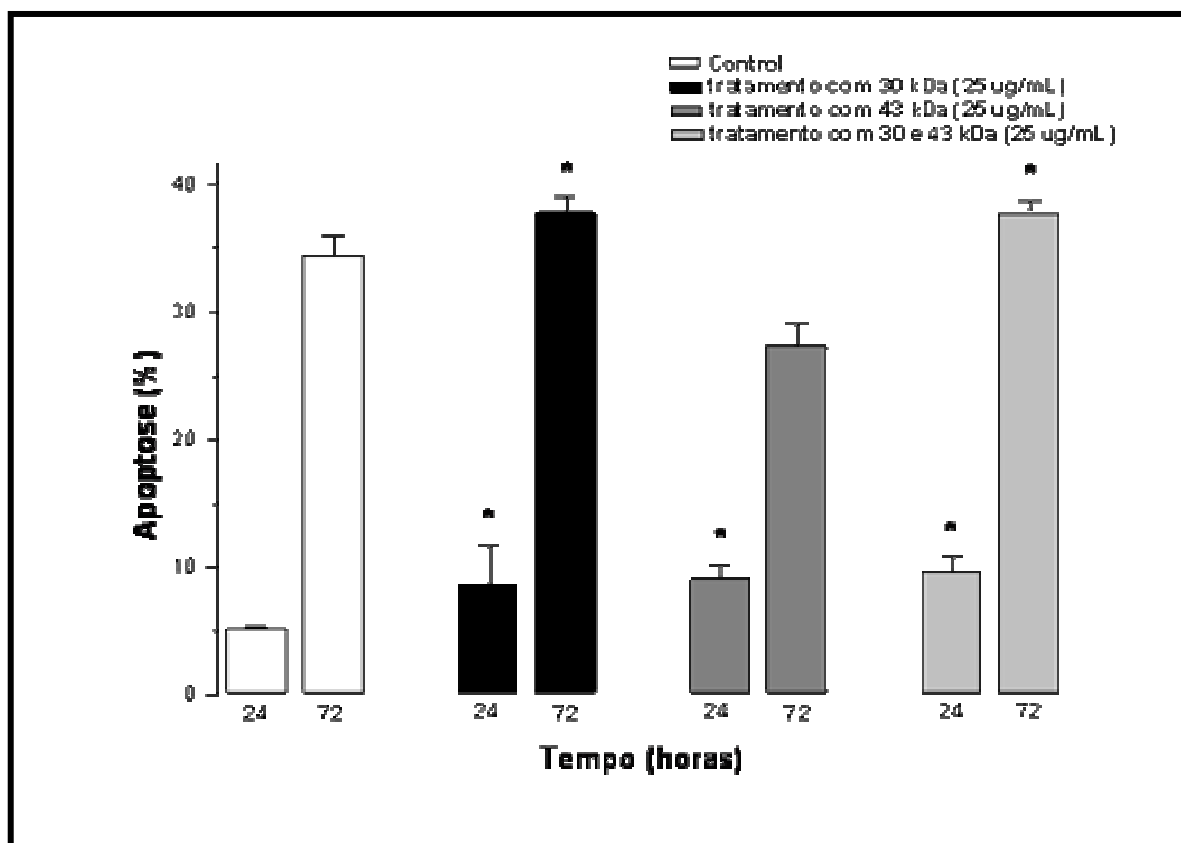


Figura 20: Gráfico representativo da indução de apoptose em células epiteliais A549 pelo tratamento durante 24 e 72 horas com adesinas de *P. brasiliensis* (30 e 43 kDa na concentração de 25 μ g/mL), reveladas através da ligação com anexina V-FITC e analisadas por citometria de fluxo. * representa diferença significativa em relação ao controle ($p < 0,05$).

5. DISCUSSÃO

Os mecanismos de virulência de *P. brasiliensis* não estão completamente esclarecidos. Há consenso que subcultivos sucessivos deste fungo acarretam a perda de sua patogenicidade que pode ser revertida pelo reisolamento do agente após passagem em animal, recuperando assim alguns fatores de virulência (BRUMMER et al., 1990). Embora este dado já tenha sido bastante discutido na literatura, até o momento, nenhum trabalho procurou identificar os possíveis fatores envolvidos na perda da virulência, entre estas amostras.

O estudo com amostras de *P. brasiliensis* demonstrou que a técnica de RAPD pode ser uma ferramenta útil para demonstrar diferenças associadas com a virulência e com o tempo de subcultivo *in vitro*. Andreotti (2002) avaliou duas amostras 18 de *P. brasiliensis* correlacionando capacidade de adesão em células epiteliais com padrões em RAPD. Uma banda polimórfica de 300pb foi observada na amostra após passagem em animal, com características de adesão aumentada e ausente antes do reisolamento, apresentando assim uma provável diferença nos padrões de RAPD relacionado com adesão de *P. brasiliensis* às células epiteliais. Na sequência deste estudo, a banda polimórfica de 300pb do DNA genômico do isolado de *P. brasiliensis* com alta virulência foi clonada e sequenciada, com intuito de se caracterizar um provável fator de virulência deste fungo. Após sequenciamento dos clones positivos e a sequência nucleotídica do fragmento analisada, um fragmento de 308pb foi obtido com identidade alta para “Adapter-related protein complex 2 beta 1 subunit (Beta-adaptin)” de *A. fumigatus*, *Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Xenopus laevis*, *Danio rerio* dentre outros. Esta sequência parcial foi então denominada “*Paracoccidioides brasiliensis* adaptin-like protein” e depositada no *GenBank* com o número AY675222.

O papel das adaptinas em fungos patogênicos ainda não foi estudado. Em *Saccharomyces cerevisiae* as subunidades do complexo AP-2 não são essenciais para endocitose ou viabilidade celular (MUNN, 2001), por outro lado o complexo AP-1 parece estar relacionado com a reprodução nesta levedura (BOEHM e BONIFACINO, 2002). Em recente estudo foi demonstrado que o tráfego vesicular mediado por adaptinas é essencial para a sobrevivência de *Leishmania* spp.

dentro de macrófagos, tendo assim um papel importante na patogênese deste parasita (GOKOOL, 2003). Em *T. cruzi*, adaptinas e clatrininas exercem um importante papel, uma vez que este microrganismo obrigatoriamente intracelular é capaz de infectar diferentes tipos celulares no hospedeiro. Esta adaptação necessita dos complexos adaptina/clatrina para atuarem na modulação de moléculas de superfície do parasito e no escape ativo de vacúolos “parasitófagos” dentro do citoplasma celular, permitindo assim a sobrevivência deste microrganismo (TAN e ANDREWS, 2002). Também em *Leishmania* sp, observações levaram a proposta de que a apresentação de antígenos e a eliminação do parasito, por macrófagos infectados, podem ser moduladas via sistema endocítico do próprio parasito (ANTOINE et al., 1998, 1999). Além disso, a atividade proteolítica é significativamente aumentada durante a diferenciação do estágio de promastigota (no inseto) para o de amastigota (mamífero) e há correlação com o aparecimento de lisossomos multi-vesiculares (megassomos) e assim aumento da atividade endocítica (COURRET et al., 2001). Estas mudanças morfológicas e fisiológicas no sistema interno de membrana podem sugerir diferenças funcionais entre os estágios promastigota (inseto) e amastigota (mamífero) do parasito e tais diferenças podem exercer um papel potencial na patogênese.

Neste trabalho foi caracterizada uma seqüência parcial do genoma de um isolado, de *P. brasiliensis* com alta virulência (alta capacidade de adesão às células epiteliais), como uma adaptina (formadora do complexo adaptador AP-2), demonstrando pela primeira vez sua presença no genoma deste fungo. Estudos mais aprofundados deverão ainda ser feitos para melhor elucidar o papel das adaptinas na patogenicidade de *P. brasiliensis*. Uma vez que esta seqüência está presente apenas em isolado de alta virulência e recém isolado de animal (como confirmado pela análise por *southern blot*), podemos sugerir, com base nos dados da literatura sobre seu papel na patogênese de tripanosomatídeos, que esta proteína pode exercer um importante papel como fator de virulência em *P. brasiliensis*.

Muitos patógenos infectam seus hospedeiros sem penetrar nas suas células. Outros, entretanto, são patógenos intracelulares obrigatórios ou

facultativos e o seu nicho preferido para replicação e sobrevivência é o citoplasma ou os compartimentos intracelulares da célula hospedeira (FINLAY, 1990). Estas estratégias têm uma série de vantagens, pois o patógeno não fica acessível aos anticorpos e consegue escapar mais facilmente das células fagocíticas. O primeiro passo envolve a adesão à superfície da célula hospedeira alvo, e adesinas específicas reconhecem e se ligam a moléculas de superfície (DEITACH et al., 1997; GALAN, 1996).

Num estudo anterior foi isolada uma adesina de 30 kDa de *P. brasiliensis* (mais expressa num isolado com alta capacidade de adesão), com habilidade de ligar-se à laminina, mas não a outros componentes da MEC (ANDREOTTI et al., 2005). Assim, no presente trabalho deu-se continuidade ao estudo iniciado e foi caracterizada, através do sequenciamento de aminoácidos, a adesina de 30 kDa de *P. brasiliensis*. A seqüência de aminoácidos dos peptídeos internos desta adesina mostrou identidade com duas regiões da proteína 14-3-3 de *P. brasiliensis* já depositada no *GenBank* (AAR24348): a primeira do aminoácido 28 ao 50 com identidade de 100% e a segunda do aminoácido 153 ao 169, também com 100% de identidade.

A ligação de 14-3-3 com outras proteínas ocorrem em muitos processos celulares como apoptose, transdução de sinal, regulação do ciclo celular e transcrição (FU et al., 2000). Interação entre integrinas e proteínas 14-3-3 também foram identificadas, sugerindo uma importante função desta proteína na regulação da adesão celular (HAN et al., 2001). Aparentemente, esta seria a função fundamental encontrada em nosso estudo, desde que a adesão é o passo inicial para futura colonização do microrganismo. A expressão aumentada desta proteína, após passagem em animal, poderia estar ligada a esta importante atividade (ANDREOTTI et al., 2005)

Pouco ainda é conhecido sobre a função das proteínas 14-3-3 em fungos patogênicos. Estudos com leveduras demonstraram que *Saccharomyces cerevisiae* e *Schizosaccharomyces pombe* têm dois genes que codificam para proteínas 14-3-3 e estas, como em eucariotos superiores, se ligam a numerosas proteínas envolvidas em uma variedade de processos celulares (VAN HEUSDEN

e STEENSMA, 2006). Já com o fungo filamentoso *Aspergillus nidulans* foi demonstrado que este possui uma proteína com alta homologia a 14-3-3 (*artA*) que previne a formação de septo. Entretanto, em vez de bloquear a septação, aumento da expressão de *artA* causa grande demora na polarização dos conidióforos, sugerindo que essas proteínas tenham um importante papel na morfogênese da hifa (KRAUS et al., 2002). Em *P. brasiliensis*, apesar de esta proteína já ter sido encontrada no genoma do fungo, sua função é ainda desconhecida. Portanto neste trabalho foi demonstrado que a proteína 14-3-3 de *P. brasiliensis* pode ter importante papel na patogênese deste fungo, atuando como uma adesina às células epiteliais. O patógeno deve regular a expressão de suas adesinas para sobreviver e produzir doença. Em *P. brasiliensis*, várias adesinas foram descritas e acredita-se que possam desempenhar papel importante na patogênese (VICENTINI et al., 1994; GONZALEZ et al., 2005; BARBOSA et al., 2006). No entanto, até o momento como não se dispõe de *P. brasiliensis* alterados geneticamente para estas adesinas, pode-se apenas inferir que estas a semelhança das descritas para *Candida albicans* (SUNDSTROM et al., 2002; ZHAO et al., 2004), *C. glabrata* (CORMACK et al., 1999), *Blastomyces dermatitidis* (BRANDHORST et al., 2003) e *Coccidioides immitis* (HUNG et al., 2002) tem importante papel como fator de virulência. Cepas de *C. albicans* alteradas geneticamente quanto a algumas adesinas foram incapazes de aderir a células epiteliais e endoteliais (SUNDSTROM et al., 1999; ZHAO et al., 2004). Igualmente, *B. dermatitidis* modificado geneticamente quanto a sua principal adesina, foi incapaz de se ligar a tecidos pulmonares, entrar em macrófagos, além de menos virulentos do que a cepa selvagem (BRANDHORST et al., 1999; KLEIN, 2000).

O papel de adesinas presentes na superfície de células leveduriformes de *P. brasiliensis* foi investigado neste trabalho. A maioria do conhecimento sobre determinantes de virulência de fungos patogênicos é originada de estudos da infecção no hospedeiro, principalmente em modelos animais e mais recentemente com estudos *in vitro*, em culturas celulares. Os fungos exibem geralmente relações intra-e/ou extracelulares com o hospedeiro e o fenômeno de parasitismo depende de moléculas de superfície (MENDES-GIANNINI et al., 2000). Adesão

de *P. brasiliensis* às células epiteliais foi intensamente inibida pelo pré-tratamento destas com adesinas ligantes de laminina (30 e 43 kDa). A concentração de 25µg/mL de gp43 foi escolhida, pois estes níveis podem ser encontrados no sangue de indivíduos com paracocidioidomicose (MARQUES DA SILVA et al., 2003). Todavia, quando as células epiteliais foram pré-tratadas apenas com a adesina de 30 kDa houve um aumento maior da inibição, tanto da adesão quanto da invasão, quando comparada com a inibição apenas com a adesina de 43 kDa. Por outro lado, a combinação das duas adesinas no pré-tratamento diminuiu significativamente os índices de adesão e invasão. Portanto, o estudo de moléculas de superfície de *P. brasiliensis* que têm capacidade de ligação às células do hospedeiro e que podem também atuar como invasinas, pode ser um alvo interessante para o desenvolvimento de vacinas e terapias de bloqueio de receptores.

Neste estudo foi verificado também o papel de duas adesinas (30 e 43 kDa) de *P. brasiliensis* sobre a dinâmica do citoesqueleto celular. O tratamento das células epiteliais com as adesinas foi feito durante 5 horas, pois neste tempo foi observado que ocorre a internalização de *P. brasiliensis* em pneumócitos. Nossos resultados mostraram a redistribuição da actina após o tratamento com a adesina de 30 kDa, aumentando a sua concentração junto à membrana celular com formação de protusões ricas em actina, projeções de membrana como filopódios (provável ativação de Cdc42). O tratamento com a proteína de 43 kDa também modificou o citoesqueleto de actina, levando aparentemente à sua distribuição na periferia celular, produzindo um efeito semelhante a “ondas” na membrana, sugerindo formação de lamelipódios (provável ativação de Rac). Por outro lado, o tratamento com as duas adesinas, concomitantemente, mostrou um padrão similar ao do tratamento apenas com 30 kDa, sugerindo que o efeito desta proteína se sobrepõe ao da 43 kDa. Como a adesina de 30 kDa corresponde a uma proteína 14-3-3 e sabendo que esta família de proteínas também participa da regulação e organização do citoesqueleto celular através da ativação de RhoGTPases (JIN et al., 2004), atuando como mediadores nas mudanças do citoesqueleto via integrinas, mostrando um importante papel na ativação de Cdc42 (BIALKOWSKA et al., 2003), podemos mais uma vez sugerir que *P.*

brasiliensis utiliza-se desta proteína como um importante fator de virulência durante sua patogênese. Assim, frente a este estímulo, o sinal intracelular pode ativar proteínas de citoesqueleto, como Rho, Rac e Cdc42, resultando na modificação conformacional da célula. Rho, Rac e Cdc42 são da família de pequenas proteínas ligadas a GTP que atua na regulação do citoesqueleto de actina, controlando uma variedade de processos celulares como motilidade, adesão e citocinese (COOPER, 2000). Rho controla a formação de fibras de estresse, contatos focais e contração celular (RIDLEY e HALL, 1992), Cdc42 gera extensões de filamentos de actina denominados filopódios (KOZMA et al., 1995; NOBES e HALL, 1995) e Rac promove a formação de “ondas” na membrana celular conhecida como lamelipódios (RIDLEY et al., 1992). Várias bactérias produzem toxinas (fator de necrose citotóxica de *Escherichia coli*, CNF-1; toxina dermonecrótica, DNT de *Bordetella pertussis*) que ativam de maneira seletiva a família das RhoGTPases. Outras toxinas (C3 exoenzima de *Clostridium botulinum*, toxina A e B de *Clostridium difficile* e a toxina letal de *Clostridium sordellii*) inativam proteínas desta família por ribosilação e glicosilação de ATP (LERM et al., 2000). A existência destas toxinas sugerem a importância da família RhoGTPases nos processos infecciosos e estas toxinas têm sido usadas para elucidar o papel das primeiras no controle de vários processos celulares pela inibição de sua atividade (VERMA e IHLER, 2002).

A fagocitose é um processo ativo de englobamento de partículas relativamente grandes (maiores que 0,5 μ m de diâmetro) levando a sua subsequente internalização. Fagócitos profissionais, tais como, macrófagos e neutrófilos, têm papel importante nas defesas do hospedeiro e na eliminação de células apoptóticas (RABINOVITCH, 1995). Outros tipos de células, como as epiteliais, não são normalmente consideradas fagocíticas, mas são capazes de internalizar partículas extracelulares (MUKHERJEE et al., 1997).

A capacidade de invadir células normalmente não fagocíticas foi observada em muitos microrganismos patogênicos. O processo é semelhante à fagocitose e requer a reorientação do citoesqueleto, no foco de contato com o patógeno (SWANSON e BAER, 1995). *P. brasiliensis* pode tirar vantagem, alterando componentes do citoesqueleto, como demonstrado em outros microrganismos

(DOORBAR et al., 1991; DRAMSI e COSSART, 1998; SAJJAN et al., 2000; STEWART, 1993). A invasão de *P. brasiliensis* a células epiteliais afeta a estrutura do citoesqueleto das células, interferindo nos aspectos morfológicos da actina, tubulina e citoqueratina (MENDES-GIANNINI et al., 2004). A associação entre actina e a internalização microbiana tem sido demonstrada para vários microrganismos (GOLDBERG e SANSONETTI, 1993; SAJJAN et al., 2000). A infecção de células epiteliais por *P. brasiliensis* causa alteração na membrana da célula como se esta emitisse pseudópodes, provavelmente interferindo na actina celular (MONTEIRO DA SILVA et al., 2001). A ligação de *P. brasiliensis* às células epiteliais parece gerar um sinal, que induz alterações no citoesqueleto, levando a dissipação dos filamentos de actina próximo à área de contacto com o fungo e redistribuição desse material na periferia celular (MONTEIRO DA SILVA, 2004).

Recentemente, estudos das interações de proteínas (adesinas e toxinas) de patógenos e das vias de sinalização das células do hospedeiro são importantes no esclarecimento de como estas proteínas podem modular a fisiologia celular. Durante o curso da infecção, muitas bactérias patogênicas produzem toxinas que atuam no citoesqueleto celular e suas proteínas regulatórias. Estas toxinas podem atuar como reguladores positivos, promovendo o arranjo do citoesqueleto de actina ou, alternativamente, como reguladores negativos promovendo o desarranjo dos filamentos. A modulação do citoesqueleto facilita vários processos infecciosos, críticos para o sucesso da colonização do patógeno. Bactérias intracelulares, como *Salmonella typhimurium* utilizam toxinas para promover tanto o arranjo como o desarranjo do citoesqueleto de actina durante o processo infeccioso, resultando na internalização da bactéria por células epiteliais dentro de vacúolos que permitem sua multiplicação. Por outro lado, *Yersinia* sp. utiliza toxinas moduladoras de actina para bloquear sua internalização por células apresentadoras de antígenos profissionais, como macrófagos e células dendríticas. A modulação da resposta imune através da produção de toxinas reguladoras de actina parece ser um mecanismo comum adotado por vários patógenos extracelulares. Assim, o repertório de proteínas modificadoras de actina, produzidas por várias espécies de microrganismos é especificamente expresso para facilitar a sobrevivência do patógeno. A presença

de múltiplas proteínas que modulam a dinâmica dos filamentos de actina demonstra a importância da interferência no citoesqueleto celular para minimizar os efeitos das defesas do hospedeiro, promovendo assim a sobrevivência e multiplicação dos patógenos (BALDWIN e BARBIERI, 2005).

Além de verificada a importância das adesinas sobre o efeito no citoesqueleto de actina, também foi demonstrada sua influência sobre os filamentos intermediários (citoqueratinas). As citoqueratinas são proteínas fibrosas, ancoradas abaixo do envelope nuclear e que também se estendem para a periferia celular, onde interagem com a membrana citoplasmática e junções celulares. Tem como função principal dar resistência e sustentação às células e estão classificadas como filamentos intermediários do citoesqueleto (JONES e GREEN, 1991). Entretanto, ainda não está esclarecido o papel da citoqueratina na patogênese da paracoccidiodomicose. Modificações acentuadas foram observadas no padrão de marcação de citoqueratina nas células epiteliais após tratamento com as adesinas. O tratamento com adesina de 30 kDa revelou uma marcação intensa, porém menor do que o controle, próxima ao núcleo, com progressiva despolimerização no citoplasma. Estudos mostraram que as proteínas 14-3-3 ligam-se aos filamentos intermediários de citoqueratina promovendo sua reorganização ou redistribuição celular (KU et al., 1998; TAKIHARA et al., 2000; KU et al., 2002). Assim, uma vez que a adesina de 30 kDa apresenta alta homologia com a proteína 14-3-3, podemos inferir que *P. brasiliensis* possa utilizar esta proteína para modificar o citoesqueleto de citoqueratina durante a interação com células epiteliais, sugerindo um provável mecanismo de patogenicidade. Por outro lado, o tratamento com adesina de 43 kDa apresentou fraca marcação da citoqueratina nas células epiteliais. Quando as células foram tratadas com as duas adesinas ao mesmo tempo, ocorreu a predominância do padrão observado no tratamento apenas com a adesina de 30 kDa, sugerindo que esta proteína tenha um efeito inibitório sobre a ação da 43 kDa. Monteiro da Silva (2004) observou uma diminuição da marcação da citoqueratina das células epiteliais, infectadas com *P. brasiliensis*, sugerindo degradação desta proteína por enzimas específicas secretadas pelo fungo (MENDES-GIANNINI et al., 1990; PUCCIA et al., 1998), ocasionando perda da

organização filamentosa deste componente do citoesqueleto. Este fato não foi constatado com actina e tubulina, enquanto que, a degradação de citoqueratina foi observada como consequência da interação fungo-célula. A presença de proteases fúngicas específicas talvez tenha um papel importante na internalização e até na translocação de fungos pelas barreiras epiteliais. Portanto, neste trabalho foi mostrado que *P. brasiliensis* possui componentes com características de adesinas que podem alterar o citoesqueleto das células do hospedeiro, no intuito de conseguir sua internalização em células fagocíticas não-profissionais, uma vez que este fungo como outros patógenos, pode utilizar este mecanismo para escapar do sistema de defesa do hospedeiro e causar infecção. A partir destes resultados, pode-se inferir que as interações entre *P. brasiliensis* e este componente do citoesqueleto seriam necessárias para o processo de invasão *in vitro* ou quando *P. brasiliensis* atravessa barreiras epiteliais *in vivo*.

A sobrevivência de *P. brasiliensis* no ambiente intracelular pode beneficiá-lo, por ser um mecanismo protetor contra componentes envolvidos na resposta imune e ação dos antimicrobianos. Contudo, especula-se a vantagem na modulação de apoptose, desde que, fagócitos “não profissionais” não possuem maquinaria microbicida eficiente como os macrófagos, e a morte dessas células não comprometeriam a homeostase do organismo. Contudo, a morte de células com *P. brasiliensis* fagocitado, poderia prover uma via de disseminação a sítios distantes, como os focos metastáticos. Outra hipótese seria que estas células apoptóticas com o fungo fagocitado, serviriam como um veículo para a entrada em macrófagos sem o estímulo das atividades microbicidas. A sucessão de eventos que ocorrem nas células epiteliais infectadas com *P. brasiliensis in vitro* seria de adesão, translocação do fungo para o citoplasma das células, multiplicação e a indução de apoptose. A correlação com os mecanismos de patogênese *in vivo* pode elucidar os passos iniciais da infecção (MONTEIRO DA SILVA, 2004). Com a indução de apoptose em macrófagos, os microrganismos poderiam realizar duas tarefas: primeiro, matar a célula microbicida mais efetivamente no tecido e, assim evitar sua própria morte; e segundo, estimulando a resposta inflamatória, invadir o tecido como consequência dos danos teciduais desta resposta (BAYLES et al., 1998; LEWIS, 2000).

Mendes-Giannini e colaboradores (2004) observaram que *P. brasiliensis* induz apoptose em células epiteliais, mas permanece viável dentro destas células, conseguindo se multiplicar. Concluindo que os mecanismos de invasão às células do hospedeiro, persistência dentro delas e a subsequente indução de apoptose podem explicar a capacidade de disseminação de *P. brasiliensis*. Assim, no presente estudo foi avaliada a contribuição de duas adesinas (30 e 43 kDa) de *P. brasiliensis* na indução de apoptose em linhagens celulares de pneumócitos humanos para melhor conhecer os mecanismos que este fungo utiliza para extravasar as barreiras do hospedeiro, causando infecção e posterior disseminação para outros tecidos. Para isso as monocamadas de células epiteliais foram tratadas com as adesinas de 30 e 43 kDa, na concentração de 25µg/mL, por diferentes períodos de tempo e testadas por várias técnicas de verificação de indução de apoptose.

Empregando-se a técnica do “TUNEL” com sonda fluorescente (ZYCHLINSKY e SANSONETTI, 1997), onde células com fragmentação de DNA (característica específica da morte celular programada) são marcadas, Mendes-Giannini et al. (2004) demonstraram que a indução de apoptose em células epiteliais por *P. brasiliensis* é dependente do tempo de exposição ao fungo. Nossos resultados com esta metodologia mostraram que após o tratamento com as adesinas por cinco horas, não houve aumento significativo de células apoptóticas, quando comparadas com o controle. Por outro lado, com o tratamento por 24 horas houve aumento de células apoptóticas, demonstrando assim que tanto o fungo quanto suas adesinas são capazes de induzir apoptose em células epiteliais e esta é dependente do tempo de exposição.

Apoptose tem sido implicada em mecanismos de patogênese bacteriana (ZYCHLINSKY e SANSONETTI, 1997) que envolvem uma variedade de interações patógeno-hospedeiro (ROTSTEIN et al., 2000; VAUX e KORSMEYER, 1999). A modulação de apoptose é uma estratégia amplamente utilizada entre bactérias extra e intracelulares, mas os mecanismos exatos pelos quais levam a essa morte programada ainda estão mal esclarecidos. O arsenal pró-apoptótico de várias espécies de bactérias é conhecido, sendo capazes de prevenir ou induzir apoptose de células hospedeiras (NEUMEISTER et al., 2002). Em

bactérias do gênero *Legionella* foi observado que algumas espécies induzem apoptose em linhagem monocítica humana (MM6). O nível de apoptose foi dose e virulência dependente e esta foi ativada pela adesão direta da bactéria na superfície celular mais do que pela sua multiplicação intracelular (NEUMEISTER et al., 2002; WALZ et al., 2000). Outros patógenos bacterianos, como *Shigella flexneri*, precisam ser internalizados para causar apoptose (ZYCHLINSKY e SANSONETTI, 1997).

Muitos patógenos possuem proteínas de superfície ou secretam metabólitos capazes de funcionar como importantes indutores de apoptose na célula do hospedeiro. Em *Staphylococcus aureus* foi demonstrado que a invasão de células endoteliais causa indução de apoptose, isso ocorre apenas quando a bactéria expressa um componente denominado α -toxina, a qual é a principal participante do processo de indução de apoptose nestas células, sendo, portanto este processo dependente de fatores de virulência (HASLINGER-LÖFFLER et al., 2005). *Yersinia* sp. expressa em sua superfície uma proteína ligante de integrina denominada *inv*, responsável pela adesão e internalização desta bactéria à células epiteliais intestinais. Também é conhecido que a interação desta bactéria com células animais resulta numa variedade de respostas nas células infectadas, incluindo indução de apoptose. Neste caso a indução de apoptose ajuda o estabelecimento da bactéria no hospedeiro, uma vez que, assim, aquela pode ter acesso aos tecidos, além disso, apenas *Yersinia* sp. capaz de expressar *inv* pode induzir apoptose (SUPERTI et al., 2005).

Mendes-Giannini et al., (2004) também avaliaram a indução de apoptose por *P. brasiliensis* através da técnica de imunoperoxidase com Bak e Bcl-2, observando um padrão de marcação semelhante entre Bak e Bcl-2 até 24 horas em células infectadas, sugerindo um mecanismo de competição para promover uma infecção fúngica persistente. Após 48 horas esse padrão se alterou e as células passaram a expressar mais a proteína Bak, indicando a perda da regulação entre sinal de vida e morte celular. Nossos resultados sugerem que *P. brasiliensis* se mantém vivo dentro da célula por tempo suficiente para se multiplicar. Evidências anteriores sugerem que *P. brasiliensis* se reproduz com mais frequência quando está livre, dentro do citoplasma da célula hospedeira, e

menos quando está circundado por vacúolo (MENDES-GIANNINI et al., 2004), e essas células fúngicas livres no citoplasma podem escapar dos mecanismos de defesa das células hospedeiras. Nesse trabalho também foi verificado o perfil de marcação das proteínas reguladoras de apoptose, Bak e Bcl-2, em pneumócitos após o tratamento destes com as adesinas de *P. brasiliensis* por diferentes períodos de tempo, com o objetivo de verificar o papel das adesinas sobre esta regulação. Assim, em tempos iniciais a quantidade de células marcadas com anticorpo anti-Bak e anti-Bcl-2 foi semelhante, quando as células foram tratadas com a adesina de 30 kDa e com as duas adesinas ao mesmo tempo, sugerindo que em tempo curto de tratamento, a adesina de 30 kDa induz expressão de proteínas pró-apoptóticas (Bak) e a célula também expressa proteínas inibidoras da apoptose (Bcl-2), provavelmente na tentativa de sobrevivência. Após 24 horas, a adesina de 30 kDa apresentou aumento de células marcadas com os dois anticorpos, ao contrário da 43 kDa. Em tempos maiores de tratamento, as células não mostraram marcação positiva quando foi utilizado o anticorpo anti-Bcl-2, sugerindo perda de sinal de sobrevivência após este período. Poucas células marcadas com o anticorpo anti-Bak foram observadas no tratamento com 43 kDa, oposto ao tratamento com 30 kDa que mostrou aumento de células positivas para anti-Bak, o mesmo ocorrendo com as duas adesinas, porém, em menor proporção. Estes resultados sugerem que a adesina de 43 kDa sozinha, ao contrário de 30 kDa, talvez não atue sobre tais proteínas reguladoras para indução de apoptose nos tempos testados, podendo esta utilizar-se de outras vias para este fim. Já a adesina de 30 kDa mostra o mesmo padrão de indução de morte celular programada verificada durante a infecção com *P. brasiliensis*, sugerindo a sua importância como fator de virulência.

Resultados semelhantes foram observados em *E. coli*, onde uma de suas toxinas denominada *Shiga-like toxin*, além de causar citotoxicidade também induz apoptose em células epiteliais. Durante 24 a 48 horas de exposição à toxina, células epiteliais mostraram características morfológicas relacionadas a apoptose, como o encolhimento das células e condensação da cromatina nuclear (JONES et al., 2000). Estes fatores morfológicos de morte celular programada são acompanhados por fragmentação de DNA, ativação de caspases e degradação

de PARP, fatores estes indicativos de uma resposta apoptótica (CHING et al., 2002). Também houve aumento dos níveis de membros da família pró-apoptótica Bax e Bad, com uma redução na quantidade de proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 quando as células foram expostas a *Shiga-like toxin* (JONES et al., 2000).

Nosso trabalho mostra além da marcação das proteínas Bak e Bcl-2, também analisa duas outras proteínas reguladoras de apoptose, PARP-1 e p53. Como afirmado anteriormente, PARP-1 e p53 são proteínas funcionalmente relacionadas e estão envolvidas com a manutenção da integridade do genoma por meio da inibição da progressão do ciclo celular ou indução de apoptose (FUJITA et al., 2002). Existe uma grande evidência que poli(ADP-ribosil)ação de p53 por PARP é necessária para a ativação de p53 (SIMBULAN-ROSENTHAL et al., 1998; WANG et al., 1998). Guinee et al. (1996) demonstraram que a apoptose em pneumócitos está associada à superexpressão de p53 nestas células, propondo assim um mecanismo de apoptose dependente desta molécula. Em nosso estudo, quando as células tratadas com as adesinas de 30 e 43 kDa foram reveladas com o anticorpo anti-p53 um aumento significativo na positividade foi observado após 24 horas de tratamento, com aparente translocação desta proteína para o citoplasma celular, caracterizando o processo de apoptose. Não havendo, entretanto, diferenças entre os tratamentos com 30 kDa, 43 kDa ou 30 e 43 kDa. Somente após 72 horas foi observado um aumento significativo de células positivas tratadas com as adesinas em relação às células não tratadas e uma diferença significativa na positividade das células para p53 entre os tratamentos com as diferentes adesinas. Estes resultados sugerem que as adesinas de *P. brasiliensis* testadas são capazes de induzir apoptose pela via de p53 sugerida para células epiteliais pulmonares e que em longos períodos de tempo a adesina de 43 kDa é capaz de melhor ativar esta via em relação à adesina de 30 kDa.

Da mesma maneira, aumento significativo foi observado na porcentagem de células positivas para o anticorpo anti-PARP-1 após 5 horas, contudo, não houve diferenças significativas entre os diferentes tratamentos com 30, 43 ou 30 e 43 kDa. Após 24 horas, houve um aumento ainda maior na positividade de PARP-1 e diferença significativa, quando se comparou a porcentagem de células

positivas entre a adesina de 30 kDa e os outros dois tratamentos. Em tempos superiores houve uma diminuição significativa de células marcadas com anti-PARP-1 em relação aos tempos anteriores, chegando à igualdade com as células não tratadas. PARP-1 é um dos substratos descritos para caspases (KAUFMANN et al., 1993; TEWARI et al., 1995) e, portanto, um marcador de apoptose. O aumento de sua expressão está relacionado ao mecanismo de reparo do DNA celular e a sua diminuição com apoptose. Nossos resultados mostram evidente tentativa de reparo nos primeiros períodos de tratamento com as adesinas, uma vez que até 24 horas existe um aumento da positividade de PARP-1, entretanto, em tempos superiores podemos sugerir que a sinalização celular é desviada para o mecanismo de apoptose, pois o reparo de DNA já não é vantajoso para a célula.

Uma técnica adicional foi realizada para comprovar a contribuição de adesinas na indução de apoptose por *P. brasiliensis*. Citometria de fluxo foi utilizada para quantificação das células apoptóticas, obtida pela avaliação da expressão da fosfatidilserina pelas células através da ligação da proteína anexina V, que apresenta afinidade por este fosfolípido. Os resultados obtidos mostraram que o tratamento com as adesinas induziu aumento significativo de células apoptóticas. Entretanto, um período maior de tratamento com a adesina de 43 kDa não induziu aumento significativo de apoptose. Assim mais uma vez mostramos que *P. brasiliensis* utiliza suas adesinas como fator de virulência, sendo estas também responsáveis por indução de apoptose em células epiteliais pulmonares. Também descrevemos mais um importante papel, até então não demonstrado, das proteínas 14-3-3 na patogênese fúngica, sugerindo que *P. brasiliensis* utiliza tal proteína em diferentes processos de modificação da fisiologia da célula do hospedeiro, facilitando assim, sua colonização, disseminação e infecção.

No fungo patogênico, intracelular obrigatório, *H. capsulatum* a apoptose é um elemento crítico na resposta imune, ocorrendo uma elevação nos níveis de IL-4 e IL-10 quando a apoptose é inibida, e o aumento da liberação destas citocinas é diretamente proporcional à severidade da infecção (ALLEN e DEEPE, 2005). Entretanto, Panagio et al. (2002) estudaram uma cepa de *C. albicans* que induziu o aparecimento de fosfatidilserina na membrana de macrófagos, o que sugere a

indução de apoptose como fator de virulência. Essas observações *in vitro* sugerem que *C. albicans* induz apoptose como um mecanismo para se evadir das defesas do hospedeiro. Em culturas de células mononucleares do sistema periférico de pacientes com paracoccidioidomicose estimuladas com gp 43, foram encontrados níveis altos de IL-10 e a adição de um anticorpo neutralizante anti-IL-10 nessas culturas resultou em aumento dos níveis de apoptose somente em células estimuladas com gp 43, sugerindo o papel anti-apoptótico de IL-10 (CACERE et al., 2002). *P. brasiliensis* é um patógeno mais extracelular do que intracelular (LENZI et al., 2000; TUDER et al., 1985) e o escape do compartimento intracelular pode favorecer sua disseminação, enquanto em histoplasmose, o fungo permanece dentro dos corpos apoptóticos e são em seguida destruídos. Portanto, os mecanismos de invasão da célula hospedeira, a persistência no seu interior e a subsequente indução de apoptose desta mesma célula, podem explicar o comportamento eficiente de *P. brasiliensis* para promover a infecção dos tecidos e/ou disseminação sanguínea. Isso mostra que uma mesma resposta do hospedeiro pode resultar em diferentes questões para a interação parasito-hospedeiro (MONTEIRO DA SILVA, 2004).

Assim, podemos concluir com os resultados apresentados que *P. brasiliensis* dispõe, como muitos outros patógenos, de adesinas como fatores de virulência que participam, não só da adesão deste fungo às células do hospedeiro, mas também de outros importantes mecanismos que levam à sua patogênese. Entre estas adesinas está a de 30 kDa que apresenta identidade com a proteína 14-3-3, até então de função não conhecida em muitos fungos patogênicos.

6. CONCLUSÕES

- 6.1. Foi caracterizada uma seqüência polimórfica de 300pb do DNA genômico com identidade a proteína adaptina de um isolado de *P. brasiliensis* com alta capacidade de adesão às células epiteliais.
- 6.2. Foi caracterizada adesina de 30 kDa de *P. brasiliensis* através de sequenciamento de aminoácidos, mostrando que esta tem identidade com a proteína 14-3-3 de *P. brasiliensis*.
- 6.3. O papel das proteínas de 30 e 43 kDa na interação do fungo com células epiteliais foi investigado e a adesão e invasão de *P. brasiliensis* foram intensamente inibidas pelo pré-tratamento destas células com as adesinas.
- 6.4. Foi verificada a influência das adesinas (30 e 43 kDA) de *P. brasiliensis* na reorganização e redistribuição de microfilamentos polimerizados de actina e do filamento intermediário, citoqueratina, durante o processo de interação às células epiteliais.
- 6.5. O tratamento com as adesinas (30 e 43 kDA) de *P. brasiliensis* induziu aumento significativo de células apoptóticas em células A549.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGARWAL, M.L.; TAYLOR, W.R.; CHERNOV, M.V.; CHERNOVA, O.B.; STARK, G.R. The p53 network. **J. Biol. Chem.**, v. 1, p. 1-4, 1998.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Molecular Biology of the Cell**. 4th. ed. 2002. 1462p.

ALBERTS, B. **Essential Cell Biology**. 2th ed. 2003, 896p.

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

ALLEN, H.L.; DEEPE, G.S. JR. Apoptosis modulates protective immunity to the pathogenic fungus *Histoplasma capsulatum*. **J. Clin. Invest.**, v. 10, p. 2875-2885, 2005.

ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHAFFER, A.A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D.J. BLAST. PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Res.**, v. 1, p.3389-3402, 1997.

AME, J. C.; SPENLEHAUER, C.; DE MURCIA, G. The PARP superfamily. **BioAssays**, v. 26, p.882–893, 2004.

AMMENDOLIA, M.G.; BERTUCCINI, L.; MINELLI, F.; MESCHINI, S.; BALDASSARRI, L. *Sphingomonas* bacterium interacting with epithelial cells. **Res. Microbiol.**, v. 155, p.636-646, 2004.

AMOS, L. A.; AMOS, W. B. **Molecules of the cytoskeleton**. New York: Guilford Press, 1991.

ANDREOTTI, P.F. **Isolamento e caracterização de adesina envolvida na interação de *Paracoccidioides brasiliensis* com células epiteliais**. 2002. Dissertação (Mestrado em Análises Clínicas) Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2002. 121f.

ANDREOTTI, P.F.; MONTEIRO DA SILVA, J.L.; BAILAO, A.M.; SOARES, C.M.; BENARD, G.; SOARES, C.P.; MENDES-GIANNINI, M.J.S. Isolation and partial characterization of a 30 kDa adhesin from *Paracoccidioides brasiliensis*. **Microbes Infect.**, v.7, p. 875-881, 2005.

ANG, B.T.; YAP, E.; LIM, J.; TAN, W.L.; NG, P.Y.; NG, I.; YEO, T.T. Poly(adenosine diphosphate-ribose) polymerase expression in human traumatic brain injury. **J. Neurosurg.**, v.1, p.125-130, 2003.

ANTOINE, J.C.; PRINA, E.; LANG, T.; COURRET, N. The biogenesis and properties of the parasitophorous vacuoles that harbour *Leishmania* in murine macrophages. **Trends Microbiol.**, v.10, p.392-401, 1998.

ANTOINE, J.C.; LANG, T.; PRINA, E.; COURRET, N.; HELLIO, R. H-2M molecules, like MHC class II molecules, are targeted to parasitophorous vacuoles of *Leishmania*-infected macrophages and internalized by amastigotes of *L. amazonensis* and *L. mexicana*. **J. Cell. Sci.**, v.15, p.2559-2570, 1999.

ARENDS, M. J.; MORRIS, R. G.; WYLLIE, A. H. Apoptosis. The role of endonuclease. **Am. J. Pathol.**, v. 136, p. 593-608, 1990.

ASHORN, M.; CANTET, F.; MAYO, K.; MEGRAUD, F. Cytoskeletal rearrangements induced by *Helicobacter pylori* strains in epithelial cell culture: possible role of the cytotoxin. **Dig. Dis. Sci.**, v. 45, p. 1774-1780, 2000.

AUGUSTIN, A.; SPENLEHAUER, C.; DUMOND, H.; MENISSIER-DE MURCIA, J.; PIEL, M.; SCHMIT, A.C.; APIOU, F.; VONESCH, J.L.; KOCK, M.; BORNENS, M.; DE MURCIA, G. PARP-3 localizes preferentially to the daughter centriole and interferes with the G1/S cell cycle progression. **J. Cell Sci.**, v.8, p.1551-1562, 2003.

BAGAGLI, E.; SANO, A.; COELHO, K. I.; ALQUATI, S.; MIYAJI, M.; CAMARGO Z. P.; GOMES, G. M.; FRANCO, M.; MONTENEGRO, M. R. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillos (*Dasypus novemcinctus*) captured in

an endemic area of paracoccidioidomycosis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 58, p. 505-512, 1998.

BAGAGLI, E.; FRANCO, M.; BOSCO, S. M.; HEBELER-BARBOSA, F.; TRINCA, L. A.; MONTENEGRO, M. R. High frequency of *Paracoccidioides brasiliensis* infection in armadillos (*Dasypus novemcinctus*): an ecological study. **Med. Mycol.**, v. 41, p. 217-223, 2003.

BALDWIN, M.R.; BARBIERI, J.T. The type III cytotoxins of *Yersinia* and *Pseudomonas aeruginosa* that modulate the actin cytoskeleton. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.**, v.291, p.147-166, 2005.

BAPTISTE, N.; PRIVES, C. p53 in the cytoplasm: a question of overkill? **Cell.**, v.4, p.487-489, 2004.

BARBOSA, M.S.; BAO, S.N.; ANDREOTTI, P.F.; DE FARIA, F.P.; FELIPE, M.S.; DOS SANTOS FEITOSA, L.; MENDES-GIANNINI, M.J.; SOARES, C.M. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Paracoccidioides brasiliensis* is a cell surface protein involved in fungal adhesion to extracellular matrix proteins and interaction with cells. **Infect. Immun.**, v. 74, p. 382-389, 2006.

BARRY, M. A.; BEHNKE, C. A.; EASTMAN, A. Activation of programmed cell death (apoptosis) by cisplatin, other anticancer drugs, toxins and hyperthermia. **Biochem. Pharmacol.**, v. 40, p. 2353-2362, 1990.

BATCHELOR, M.; GUIGNOT, J.; PATEL, A.; CUMMINGS, N.; CLEARY, J.; KNUTTON, S.; HOLDEN, D.W.; CONNERTON, I.; FRANKEL, G. Involvement of the intermediate filament protein cytokeratin-18 in actin pedestal formation during EPEC infection. **EMBO Rep.**, v. 1, p. 104-110, 2004.

BAYLES, K. W.; WESSON, C. A.; LIOU, L. E.; FOX, L. K.; BOHACH, A.; TRUMBLE, W. R. Intracellular *Staphylococcus aureus* escapes the endosome and induces apoptosis in epithelial cells. **Infect. Immun.**, v. 66, p. 336-342, 1998.

BENZINGER, A.; POPOWICZ, G.M.; JOY, J.K.; MAJUMDAR, S.; HOLAK, T.A.; HERMEKING, H. The crystal structure of the non-liganded 14-3-3sigma protein:

insights into determinants of isoform specific ligand binding and dimerization. **Cell Res.**, v.4, p.219-227, 2005.

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.9, p.3190-3193, 2000.

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

BLACK, D.S.; BLISKA, J.B. The RhoGAP activity of the *Yersinia pseudotuberculosis* cytotoxin YopE is required for antiphagocytic function and virulence. **Mol. Microbiol.**, v.3, p.515-527, 2000.

BOEHM, M.; BONIFACINO, J.S. Adaptins: the final recount. **Mol. Biol. Cell**, v. 12, p. 2907-2920, 2001.

BOTSTEIN, D.; WHITE, R.L.; SKOLNICK, M.; DAVIS, R.W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **Am. J. Hum. Genet.**, v.3, p.314-331, 1980.

BOUCHARA J. P.; TRONCHIN G.; ANNAIX V. Laminin receptors on *Candida albicans* germ tubes. **Infect. Immun.**, v.58, p.48-54, 1990.

BOUCHARA, J.P. ; SANCHEZ, M. ; CHEVAILLER, A. ; MAROT-LEBLOND, A. ; LISSITZKY, J.C. ; TRONCHIN, G. ; CHABASSE, D. Sialic acid-dependent recognition of laminin and fibrinogen by *Aspergillus fumigatus* conidia. **Infect. Immun.**, v.65, p.2717-2724, 1997.

BRANDHORST, T.T; WUTHRICH, M.; WARNER, T.; KLEIN, B. Targeted gene disruption reveals an adhesin indispensable for pathogenicity of *Blastomyces dermatitidis*. **J. Exp. Med.**, v.8, p.1207-1216, 1999.

BRANDHORST, T.; WUTHRICH, M.; FINKEL-JIMENEZ, B.; KLEIN, B. A C-terminal EGF-like domain governs BAD1 localization to the yeast surface and fungal adherence to phagocytes, but is dispensable in immune modulation and pathogenicity of *Blastomyces dermatitidis*. **Mol Microbiol.**, v.1, p.53-65, 2003.

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

BROMLEY, I.M.; DONALDSON, K. Binding of *Aspergillus fumigatus* spores to lung epithelial cells and basement membrane proteins: relevance to the asthmatic lung. **Thorax**, v. 51, p. 1203-1209, 1996.

BRUMMER, E.; HANSON, L. H.; RESTREPO, A.; STEVENS, D. A. *In vivo* and *in vitro* activation of pulmonary macrophages by gamma-interferon for enhanced killing of *Paracoccidioides brasiliensis* or *Blastomyces dermatitidis*. **J. Immunol.**, v. 140, p. 2786-2793, 1988.

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

BRUMMER, E.; RESTREPO, A.; HANSON, L. H.; STEVENS, D. A. Virulence of *Paracoccidioides brasiliensis*: The influence of *in vitro* passage and storage. **Mycopathologia**, v.109, p.13-18, 1990.

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

CACERE, C. R.; ROMANO, C. C.; MENDES-GIANNINI, M. J.; DUARTE, A. J.; BENARD, G. The role of apoptosis in the antigen-specific T cell hyporesponsiveness of paracoccidioidomycosis patients. **Clin. Immunol.**, v. 105, p. 215-22, 2002.

CALCAGNO, A.M.; NINO-VEGA, G.; SAN-BLAS, F.; SAN-BLAS, G. Geographic discrimination of *Paracoccidioides brasiliensis* strains by randomly amplified polymorphic DNA analysis. **J. Clin. Microbiol.**, v.36, p.1733-1736, 1998.

CANIZALEZ-ROMAN, A.; NAVARRO-GARCIA, F. Fodrin CaM-binding domain cleavage by Pet from enteroaggregative *Escherichia coli* leads to actin cytoskeletal disruption. **Mol. Microbiol.**, v. 48, p. 947-958, 2003.

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

CASTANEDA E.; BRUMMER E.; PAPPAGIANIS D.; STEVENS D.A. Chronic pulmonary and disseminated paracoccidioidomycosis in mice: quantitation of progression and chronicity. **J. Med. Vet. Mycol.**, v. 23, p. 377-87, 1987.

CHAO D. T.; KORSMEYER, S. J. Bcl₂ family: regulators of cell death. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 16, p. 395-419, 1998.

CHIAPELLO, L.S.; AOKI, P.; RUBINSTEIN, H.R.; MASIH, D.T. Apoptosis induction by glucuronoxylomannan of *Cryptococcus neoformans*. **Med. Mycol.**, v.4, p.347-353, 2003.

CHIAPELLO, L.S.; BARONETTI, J.L.; AOKI, M.P.; GEA, S.; RUBINSTEIN, H.; MASIH, D.T. Immunosuppression, interleukin-10 synthesis and apoptosis are induced in rats inoculated with *Cryptococcus neoformans* glucuronoxylomannan. **Immunology.**, v.3, p. 392-400, 2004.

CHING, J.C.; JONES, N.L.; CEPONIS, P.J.; KARMALI, M.A.; SHERMAN, P.M. *Escherichia coli* shiga-like toxins induce apoptosis and cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase via in vitro activation of caspases. **Infect. Immun.**, v.8, p. 4669-4677, 2002.

CLIFTON, D.R.; GOSS, R.A.; SAHNI, S.K.; VAN ANTWERP, D.; BAGGS, R.B.; MARDER, V.J.; SILVERMAN, D.J.; SPORN, L.A. NF-kappa B-dependent

inhibition of apoptosis is essential for host cell survival during *Rickettsia rickettsii* infection. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.**, v.8, p.4646-4651, 1998.

COOPER, J. A. Effects of cytochalasin and phalloidin on actin. **J. Cell. Biol.**, v. 105, p.173-178, 2000.

CORMACK, B.P.; GHORI, N.; FALKOW, S. An adhesin of the yeast pathogen *Candida glabrata* mediating adherence to human epithelial cells. **Science.**, v.5427, p.578-582, 1999.

CORNELIS, G.R. The *Yersinia* Yop virulon, a bacterial system to subvert cells of the primary host defense. **Folia Microbiol. (Praha)**., v.3, p.253-261,1998.

COULOMBE, P. A. The cellular and molecular biology of keratins: beginning a new era. **Curr. Opin. Cell. Biol.**, v. 5, p.17-29, 1993.

COURRET, N. ; FREHEL, C. ; PRINA, E. ; LANG, T. ; ANTOINE, J.C. Kinetics of the intracellular differentiation of *Leishmania amazonensis* and internalization of host MHC molecules by the intermediate parasite stages. **Parasitology.**, v.3, p.263-279, 2001.

D'AMOURS, D. ; DESNOYERS, S. ; D'SILVA, I. ; POIRIER, G.G. Poly(ADP-ribose)ation reactions in the regulation of nuclear functions. **Biochem. J.**, v.2, p.249-268, 1999.

DANELISHVILI, L.; Mc GARVEY, J. L. Y.; BERMUDEZ, L. E. *Mycobacterium tuberculosis* infection causes different levels of apoptosis and necrosis in human macrophages and alveolar epithelial cells. **Cell. Microbiol.**, v. 5, p. 649-660, 2003.

DE VINNEY, R.; GAUTHIER, A.; ABE, A.; FINLAY, B.B. Enteropathogenic *Escherichia coli*: a pathogen that inserts its own receptor into host cells. **Cell. Mol. Life Sci.**, v.6-7, p.961-976, 1999.

DEITACH, K.W.; MOXON, E.R.; WELLEMS, T.E. Shared themes of antigenic variation and virulence in bacterial, protozoal and fungal infections. **Mol. Biol. Res.**, v.61, p. 281-293, 1997.

DERSCH, P.; ISBERG, R.R. An immunoglobulin superfamily-like domain unique to the *Yersinia pseudotuberculosis* invasin protein is required for stimulation of bacterial uptake via integrin receptors. **Infect. Immun.**, v. 68, p. 2930-2938, 2000.

DIVE, C.; GREGORY, C. D.; PHILIPS, D. J.; EVANS, D. L.; MILNER, A. E.; WYLLIE, A. H. Analysis and discrimination of necrosis and apoptosis (programmed cell death) by multiparameter flow cytometry. **Biochem. Biophys. Acta.**, v. 1133, p. 275-285, 1992.

DONG, F.; SU, H.; HUANG, Y.; ZHONG, Y.; ZHONG, G. Cleavage of host keratin 8 by a *Chlamydia*-secreted protease. **Infect. Immun.**, v.7, p.3863-3868, 2004.

DOORBAR, J.; ELY, S.; STERLING, J.; Mc LEAN, C.; CRAWFORD, L. Specific interaction between HPV-16 E1-E4 and cytokeratins result in collapse of epithelial cell intermediate filament network. **Nature**, v. 352, p. 824-827, 1991.

DRAMSI, S.; COSSART, P. Intracellular pathogens and actin cytoskeleton. **Annu. Rev. Cell Dev. Biol.**, v. 14, p. 137-166, 1998.

ESQUENAZI, D.; DE SOUZA, W.; ALVIANO, C.S.; ROZENTAL, S. The role of surface carbohydrates on the interaction of microconidia of *Trichophyton mentagrophytes* with epithelial cells. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v. 35, p.113-123, 2003.

FALQUET, L.; PAGNI, M.; BUCHER, P.; HULO, N.; SIGRIST, C.J.; HOFMANN, K.; BAIROCH, A. The PROSITE database, its status in 2002. **Nucleic Acids Res.**, v.1, p.235-238, 2002.

FAN, T.; LU, H.; HU, H.; SHI, L.; MCCLARTY, G.A.; NANCE, D.M.; GREENBERG, A.H.; ZHONG, G. Inhibition of apoptosis in *chlamydia*-infected cells: blockade of mitochondrial cytochrome c release and caspase activation. **J. Exp. Med.**, v.4, p.487-496,1998.

FEITOSA, L. DOS S.; CISALPINO, P.S.; DOS SANTOS, M.R.; MORTARA, R.A.; BARROS, T.F.; MORAIS, F.V.; PUCCIA, R.; DA SILVEIRA, J.F.; DE CAMARGO, Z.P. Chromosomal polymorphism, syntenic relationships, and ploidy in the

pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **Fungal Genet. Biol.**, v. 39, p. 60-69, 2003.

FERREIRA, M. S.; FREITAS, L. H.; LACAZ, C. S.; DEL NEGRO, G. M. B.; MELO, N. T.; GARCIA, N. M.; ASSIS, C. M.; SALEBIAN, A.; HEINS VACCARI, E. M. Isolation and characterization of a *Paracoccidioides brasiliensis* strain from a dog food probably contaminated with soil in Uberlândia, Brazil. **J. Med. Vet. Mycol.**, v. 28, p. 253-256, 1990.

FINLAY, B. B. Cell adhesion and invasion mechanisms in microbial pathogenesis. **Curr. Op. Cell. Biol.**, v. 2, p. 815-820, 1990.

FINLAY, B. B.; FALKOW, S. Comparison of the invasion strategies used by *Salmonella cholerae-suis*, *Shigella flexneri* and *Yersinia enterocolitica* to enter cultured animal cells: endosome acidification is not required for bacterial invasion or intracellular replication. **Biochimie**, v. 70, p. 1089-1099, 1988.

FINLAY, B. B.; FALKOW, S. Common themes in microbial pathogenicity revisited. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 61, p. 136-169, 1997.

FONSECA, C.A.; JESUÍNO, R.S.A.; FELIPE, M.S.S.; CUNHA, D.A.; BRITO, W.A.; SOARES, C.M.A. Two-dimensional electrophoresis and characterization of antigens from *Paracoccidioides brasiliensis*. **Microb. Infect.**, v.3, p.535-542, 2001.

FRANCO, M. F. Host-parasite relationship in paracoccidioidomycosis. **J. Med. Vet. Mycol.**, v. 25, p. 548, 1987.

FRANCO, M.; LACAZ, C.S.; RESTREPO-MORENO, A.; DEL NEGRO, G. **Paracoccidioidomycosis**. Boca Raton: CRC Press, 1994.

FRANCO, M.; BAGALI, E.; SCAPOLIO, S.; LACAZ, C. S. A critical analysis of isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from soil. **Med. Mycol.**, v. 38, p. 185-191, 2000.

FRATAZZI, C.; ARBEIT, R. D.; CARINI, C.; REMOLD, H. G. Programmed cell death of *Mycobacterium avium* serovar 4 infected human macrophages prevents

the mycobacteria from spreading and induces mycobacterial growth inhibition by freshly added, uninfected macrophages. **J. Immunol.**, v. 158, p. 4320-4327, 1997.

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

FUJITA, T.; MARUYAMA, M.; ARAYA, J.; SASSA, K.; KAWAGISHI, Y.; HAYASHI, R.; MATSUI, S; KASHII, T; YAMASHITA, N; SUGIYAMA, E.; KOBAYASHI, M. Hydrogen peroxide induces upregulation of Fas in human airway epithelial cells via the activation of PARP-p53 pathway. **Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.**, v.5, p.542-552, 2002.

GALAN, J.E. Molecular genetic bases of *Salmonella* entry into host cells. **Mol. Microbiol.**, v. 20, p. 263-271, 1996.

GAO, L. Y.; ABU KWAIK, Y. Apoptosis in macrophages and alveolar epithelial cells during early stages of infection by *Legionella pneumophila* and its role in cytopathogenicity. **Infect. Immun.**, v. 67, p. 862-870, 1999.

GAUR, N.K.; KLOTZ, S.A. Expression, cloning, and characterization of a *Candida albicans* gene, ALA1, that confers adherence properties upon *Saccharomyces cerevisiae* for extracellular matrix proteins. **Infect. Immun.**, v. 65, p. 5289-5294, 1997.

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

GOKOOL, S. Sigma 1- and mu 1-Adaptin homologues of *Leishmania mexicana* are required for parasite survival in the infected host. **J. Biol. Chem.**, v. 278, p. 29400-29409, 2003.

GOLDBERG, M. B.; SANSONETTI, P. J. *Shigella* subversion of the cellular cytoskeleton a strategy of epithelial colonization. **Infect. Immun.**, v. 61, p. 4941-4946, 1993.

GONZALEZ, A.; GOMEZ, B.L.; DIEZ, S.; HERNANDEZ, O.; RESTREPO, A.; HAMILTON, A.J.; CANO, L.E. Purification and partial characterization of a *Paracoccidioides brasiliensis* protein with capacity to bind to extracellular matrix proteins. **Infect. Immun.**, v. 73, p.2486-2495, 2005.

GORDEEVA, A.V.; LABAS, Y.A.; ZVYAGILSKAYA, R.A. Apoptosis in unicellular organisms: mechanisms and evolution. **Biochemistry (Mosc)**., v. 69, p. 1055-1066, 2004.

GUÉHO, E.; LECLERC, M.C.; HOOG, G.S.; DUPONT, B. Molecular taxonomy and epidemiology of *Blastomyces* and *Histoplasma* species. **Mycoses**, v.40, p.69-81, 1997.

GUEIRARD, P.; DRUILHE, A.; PRETOLANI, M.; GUIISO, N. Role of adenylate cyclase-hemolysin in alveolar macrophage apoptosis during *Bordetella pertussis* infection *in vivo*. **Infect. Immun.**, v. 66, p. 1718-1725, 1998.

GUINEE, D. JR; FLEMING, M.; HAYASHI, T.; WOODWARD, M.; ZHANG, J.; WALLS, J.; KOSS, M.; FERRANS, V.; TRAVIS, W. Association of p53 and WAF1 expression with apoptosis in diffuse alveolar damage. **Am. J. Pathol.**, v.2, p.531-538, 1996.

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

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

HAN, D.C.; RODRIGUEZ, L.G.; GUAN, J.L. Identification of a novel interaction between integrin beta1 and 14-3-3beta. **Oncogene**., v.3, p.346-357, 2001.

HANNA, S. A. **Estudo dos mecanismos e fatores de virulência de *Paracoccidioides brasiliensis* em culturas de células.** Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências - UNESP, 1995, 166f.

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

HASLINGER-LOFFLER, B.; KAHL, B.C.; GRUNDMEIER, M.; STRANGFELD, K.; WAGNER, B.; FISCHER, U.; CHEUNG, A.L.; PETERS, G.; SCHULZE-OSTHOFF, K.; SINHA, B.; Multiple virulence factors are required for *Staphylococcus aureus*-induced apoptosis in endothelial cells. **Cell Microbiol.**, v.8, p.1087-1097, 2005.

HOCKENBERY, D.; NUNEZ, G.; MILLIMAN, C.; SCHREIBER, R. D.; KORSMEYER, S. J. Bcl₂ is na inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. **Nature**, v. 348, p. 334-336, 1990.

HUNG, C.Y.; YU, J.J.; SESHAN, K.R.; REICHARD, U.; COLE, G.T. A parasitic phase-specific adhesin of *Coccidioides immitis* contributes to the virulence of this respiratory fungal pathogen. **Infect. Immun.**, v. 70, p.3443-3456, 2002.

INGBERG, D. E. Cellular integrity: defining new rules of biological design that govern the cytoskeleton. **J. Cell Sci.**, v. 104, p. 613-627, 1993.

IRIARTE, M.; CORNELIS, G.R. YopT, a new *Yersinia* Yop effector protein, affects the cytoskeleton of host cells. **Mol. Microbiol.**, v. 29, p. 915-929, 1998.

ISBERG, R. R. Discrimination between intracellular uptake and surface adhesion of bacterial pathogens. **Science**, v. 252, p. 934-938, 1991.

ISBERG, R. R.; LEONG, J. M. Multiple β_1 chain integrins are receptor for invasion, a protein that promotes bacterial penetration into mammalian cells. **Cell**, v. 60, p. 861-871, 1990.

ISBERG, R. R.; TRAN VAN NHIEU, G. Binding and internalization of microorganisms by integrin receptors. **Trends Microbiol.**, v. 2, p.10-14, 1994.

JACOBSON, M. D.; WEIL, M.; RALF, M. C. Programmed cell death in animal development. **Cell**, v. 88, p. 347-354, 1997.

JACOTOT, E.; RAVAGNAN, L.; LOEFFLER, M.; FERRI, K. F.; VIEIRA, H. L.; ZAMZAMI, N.; CONSTANTINI, P.; DRUILLENNEC, S.; HOEBEKE, J.; BRIAND, J. P.; IRINOPOULOU, T.; DAUGAS, E.; SUSIN, S. A.; COINTE, D.; XIE, Z. H.; REED, J. C.; ROQUES, B. P.; KROEMER, G. The HIV-1 viral protein R induces apoptosis via a direct effect on the mitochondrial permeability transition pore. **J. Exp. Med.**, v. 191, p. 33-46, 2000.

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

JONES, J.C.; GREEN, K.J. Intermediate filament-plasma membrane interactions. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v. 3, p. 127-132, 1991.

JONES, N.L.; ISLUR, A.; HAQ, R.; MASCARENHAS, M.; KARMALI, M.A.; PERDUE, M.H.; ZANKE, B.W.; SHERMAN, P.M. *Escherichia coli* Shiga toxins induce apoptosis in epithelial cells that is regulated by the Bcl-2 family. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.**, v. 278, p. 278-285, 2000.

KANAI, M.; TONG, W.M.; SUGIHARA, E.; WANG, Z.Q.; FUKASAWA, K.; MIWA, M. Involvement of poly(ADP-Ribose) polymerase 1 and poly(ADP-Ribosyl)ation in regulation of centrosome function. **Mol. Cell Biol.**, v.7, p.2451-2462, 2003.

KASHINO, S.S.; CALICH, V.L.; SINGER-VERMES, L.M.; ABRAHAMSOHN, P.A.; BURGER, E. Growth curves, morphology and ultrastructure of ten *Paracoccidioides brasiliensis* isolates. **Mycopathologia.**, v. 2, p.119-128, 1987.

KAUFMANN, S.H.; DESNOYERS, S. ; OTTAVIANO, Y. ; DAVIDSON, N.E.; POIRIER, G.G. Specific proteolytic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: an

early marker of chemotherapy-induced apoptosis. **Cancer Res.**, v.17, p.3976-3985,1993.

KHAN, I. A.; MATSUURA, T.; KASPER, L. H. Activation-mediated D4+ T cell unresponsiveness during acute *Toxoplasma gondii* infection in mice. **Int. Immunol.**, v. 8, p. 887-896, 1996.

KIRCHHAUSEN, T. Adaptors for clathrin-mediated traffic. **Annu. Rev. Cell Dev. Biol.**, v. 15, p. 705-732, 1999.

KLEIN, B.S. Molecular basis of pathogenicity in *Blastomyces dermatitidis*: the importance of adhesion. **Curr. Opin. Microbiol.**, v.3, p.339-343, 2000.

KLOTZ, S.A.; RUTTEN, M.J.; SMITH, R.L.; BABCOCK, S.R.; CUNNINGHAM, M.D. Adherence of *Candida albicans* to immobilized extracellular matrix proteins is mediated by calcium-dependent surface glycoproteins. **Microb. Pathog.**, v. 14, p. 133-147, 1993.

KOBAYASHI, K.; TERADA, C.; TSUKAMOTO, I. Methotrexate-induced apoptosis in hepatocytes after partial hepatectomy. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 438, p.19-24, 2002.

KOGAN, T.V.; JADOUN, J.; MITTELMAN, L.; HIRSCHBERG, K.; OSHEROV, N. Involvement of secreted *Aspergillus fumigatus* proteases in disruption of the actin fiber cytoskeleton and loss of focal adhesion sites in infected A549 lung pneumocytes. **J. Infect. Dis.**, v.11, p.1965-1973, 2004.

KOZMA, R. ; AHMED, S. ; BEST, A. ; LIM, L. The Ras-related protein Cdc42Hs and bradykinin promote formation of peripheral actin microspikes and filopodia in Swiss 3T3 fibroblasts. **Mol. Cell Biol.**, v.15, p. 1942-1952, 1995.

KRAUS, P.R.; HOFMANN, A.F.; HARRIS, S.D. Characterization of the *Aspergillus nidulans* 14-3-3 homologue, ArtA. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 23, p.61-66, 2002.

KREIS T. E. Role of microtubules behavior of organization of the Golgi apparatus. **Cell Motil. Cytoskel.**, v. 15, p. 67-70, 1990.

KU, N.O.; LIAO, J.; OMARY, M.B. Phosphorylation of human keratin 18 serine 33 regulates binding to 14-3-3 proteins. **EMBO J.**, v.7, p.1892-1906, 1998.

KU, N.O.; MICHIE, S.; RESURRECCION, E.Z.; BROOME, R.L.; OMARY, M.B. Keratin binding to 14-3-3 proteins modulates keratin filaments and hepatocyte mitotic progression. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v.7, p.4373-4378, 2002.

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

KUROKAWA, C.S.; LOPES, C.R.; SUGIZAKI, M.F.; KURAMAE, E.E.; FRANCO, M.F.; PERAÇOLI, M.T. Virulence profile of ten *Paracoccidioides brasiliensis* isolates: association with morphologic and genetic patterns. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**, v. 47, p. 257-262, 2005.

KUTUK, O.; PEDRECH, A.; HARRISON, P.; BASAGA, H. Pramnicin induces apoptosis in Jurkat leukemia cells: a role for JNK, p38 and caspase activation. **Apoptosis**, v. 10, p. 597-609, 2005.

LACAZ, C.S.; PASSOS FILHO, M.C.R.; FAVA NETTO, C.; MACARRON, B. Contribuição para o estudo da “blastomicose-infecção”. Inquérito com a paracoccidioidina. Estudo sorológico e clínico-radiológico dos paracoccidioidinopositivos. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 1, p.245, 1959.

LACAZ, C.S.; PORTO, E.; MARTINS, J.E.C. **Micologia médica: fungos, actinomicetos e algas de interesse médico**. Sarvier, 8ed, 1991.

LACAZ, C.S. *Paracoccidioides brasiliensis*: morphology, evolutionary cycle, maintenance during saprophytic life, biology, virulence, taxonomy. In: FRANCO M.; LACAZ C. S.; RESTREPO MORENO A.; DEL NEGRO G. **Paracoccidioidomycosis** Boca Raton: CRC Press, 1994.

LACAZ, C.S. ; PORTO, E.; MARTINS, J.E.C.; HEINS-VACCARI, E.M.; MELO, N.T. **Tratado de Micologia Médica Lacaz**. Sarvier, 9º ed, 2002.

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

LASKER, B.; PAGE, L.S.; LOTT T.J.; KOBAYASHI G.S. Isolation, characterization, and sequencing of *Candida albicans* repetitive element 2. **Gene**, v.116, p. 51-57,1992.

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

LENGELER, K. B.; DAVIDSON, R. C.; D'SOUZA, C.; HARASHIMA, T.; SHEN, W.; WANG, P.; PAN, X.; WAUGH, M.; HEITMAN, J. Signal Transduction Cascades Regulating Fungal Development and Virulence. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 64, p. 746-785, 2000.

LENZI, H. L.; CALICH, V. L. G.; MENDES-GIANNINI, M. J. S.; XIDIEH, C. F.; MIYAJI, M.; MOTA, E. M.; MACHADO, M. P.; RESTREPO, A. Two patterns of extracellular matrix expression in experimental paracoccidioidomycosis. **Med. Mycol.**, v.38, p. 115-119, 2000.

LERM, M. ; SCHMIDT, G. ; AKTORIES, K. Bacterial protein toxins targeting rho GTPases. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 188, p. 1-6, 2000.

LESSER, C.F. ; MILLER, S.I. Expression of microbial virulence proteins in *Saccharomyces cerevisiae* models mammalian infection. **EMBO J.**, v. 20, p. 1840-1849, 2001.

LEVINE H. B.; PAPPAGIANIS D.; COBB J. M. Development of vaccines for coccidioidomycosis. **Mycopathol.** V. 41, p. 177-85, 1970.

LEWIN, D.A.; MELLMAN, I. Sorting out adaptors. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1401, p. 129-145, 1998.

LEWIS, K. Programmed death in bacteria. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 64, p. 503-514, 2000.

LIN, D.; LEHMANN, P.F. Random amplified polymorphic DNA for strain delineation within *Candida tropicalis*. **J. Med. Vet. Mycol.**, v. 33, p.241-246, 1995.

LITT, M.; LUTY, J.A. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. **Am. J. Hum. Genet.**, v.3, p.397-401, 1989.

LO PASSO, C.; PERNICE, I.; GALLO, M.; BARBARA, C.; LUCK, F.T.; CRISEO, G.; PERNICE, A. Genetic relatedness and diversity of *Cryptococcus neoformans* in the Maltese Islands. **J. Clin. Microbiol.**, v.35, p.751-755, 1997.

LONDERO, A.T. **Epidemiologia**. In: Del Negro, G., Lacaz C.S., Fiorillo A.M. (ed.). Paracoccidioidomycose. São Paulo: Sarvier 1982, p. 85-90.

LOPEZ-RIBOT, J.L.; CASANOVA, M.; MONTEAGUDO, C.; SEPÚLVEDA, P.; MARTÍNEZ, P.J. Evidence for the presence of a high-affinity laminin-receptor-like molecule on the surface of *Candida albicans* yeast cells. **Infect. Immun.**, v. 62, p. 742-746, 1994.

LOPEZ-RIBOT, J.L.; BIKANDI, J.; SAN MILLAN, R.S.; CHAFFIN, W.L. Interactions between *Candida albicans* and the human extracellular matrix component tenascin-C. **Mol. Cell Bio. Res. Commun.**, v. 2, p. 58-63, 1999.

LOWRY, D.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FAN, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, v. 193, p. 265-275, 1951.

MARGOLIN, N.; RAYBUCK, S.A.; WILSON, K.P.; CHEN, W.; FOX, T.; GU, Y.; LIVINGSTON, D.J. Substrate and inhibitor specificity of interleukin-1 beta-converting enzyme and related caspases. **J. Biol. Chem.**, v.11, p.7223-7228, 1997.

MARQUES DA SILVA, S. H.; COLOMBO, A. L.; BLOTTA, M. H.; LOPES, J. D.; QUEIROZ-TELLES, F.; PIRES DE CAMARGO, Z. Detection of circulating gp 43 antigen in serum, cerebrospinal fluid and bronchoalveolar lavage fluid of patients with paracoccidioidomycosis. **J. Clin. Microbiol.**, v. 41, p. 3675-3680, 2003.

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

Mc EWEN, J.G.; BEDOYA, V.; PATINO, M.M.; SALAZAR, M.E.; RESTREPO, A. A experimental murine paracoccidioidomycosis induced by inhalation of conidia. **J. Med. Mycol.**, v. 25, p. 165-175, 1987.

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

Mc ORIST, S.; ROBERTS, L.; JASNI, S.; ROWLAND, A. C.; LAWSON, G. H.; GEBHART, C. L.; BOSWORTH, B. Developed and resolving lesions in porcine proliferative enteropathy: possible pathogenetic mechanisms. **J. Comp. Pathol.**, v. 115, p. 35-45, 1996.

MELO, A.S.; ALMEIDA, L.P.de; COLOMBO, A.L.; BRIONES, M.R. Evolutionary distances and identification of *Candida* species in clinical isolates by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD). **Mycopathologia**, v. 142, p. 57-66, 1998.

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

MENDES-GIANNINI, M. J. S.; MORAES, R. A.; RICCI, T. A. Proteolytic activity of the 43,000 molecular weight antigen secreted by *Paracoccidioides brasiliensis*. **Rev. Inst. Med. Trop.**, v. 32, p. 385, 1990.

MENDES-GIANNINI, M. J. S.; RICCI, L.C.; UEMURA, M. A.; TOSCANO, E.; ARNS, C. W. Invasion of Vero cells by *Paracoccidioides brasiliensis*. **Rev. Arg. Micol.**, v. 15, p. 29-36, 1992.

MENDES-GIANNINI, M.J.S.; RICCI, L.C.; UEMURA, M.A.; TOSCANO, E.; ARNS, C.W. Infection and apparent invasion of Vero cells by *Paracoccidioides brasiliensis*. **J. Med. Vet. Mycol.**, v. 32, p. 189-197, 1994.

MENDES-GIANNINI, M. J. S.; TAYLOR, M. L.; BOUCHARA, J. B.; BURGER, E.; CALICH, V. L. G.; ESCALANTE, E. D.; HANNA, S.A.; LENZI, H. L.; MACHADO, M. P.; MIYAJI, M.; MONTEIRO DA SILVA, J. L.; MOTA, E. M.; RESTREPO, A.; RESTREPO, S.; TRONCHIN, G.; VINCENZI, L.R.; XIDIEH, C. F.; ZENTENO, E. Pathogenesis II: Fungal responses to host responses: interaction of host cells with fungi. **Med. Mycol.**, v.38, p. 113-123, 2000.

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

MENDES-GIANNINI, M.J.; SOARES, C.P.; DA SILVA, J.L.; ANDREOTTI, P.F. Interaction of pathogenic fungi with host cells: Molecular and cellular approaches. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v. 45, p. 383-394, 2005.

MENZIES, B. E.; KOURTEVA, I. Internalization of *Staphylococcus aureus* by endothelial cells induces apoptosis. **Infect. Immun.**, v. 66, p. 5994-5998, 1998.

MIURA, T.; NISHIKAWA, S.; SASAKI, S.; YAMADA, K.; HASEKAWA, S.; MIZUKI, D.; MIZUKI, M.; HATAYAMA, I.; SEKIKAWA, K.; TAGAWA, Y.; IWAKURA, Y.; NAKANE, A. Role of endogenous cytokines in liver apoptosis of mice in lethal *Listeria monocytogenes* infection. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v. 28, p. 335-341, 2000.

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-MADLUM E. E. W. I.; FELIPE M. S. S.; SOARES C. M. A. Virulence of *Paracoccidioides brasiliensis* isolates can be correlated to groups defined by random amplified polymorphic DNA analysis. **Med. Mycol.**, v. 37, p. 269-276, 1999.

MONACK, D. M.; MECASAS, J.; BOULEY, D.; FALKOW, S. *Yersinia*-induced apoptosis *in vivo* aids in the establishment of a systemic infection of mice. **J. Exp. Med.**, v.188, p. 2127-2137, 1998.

MONACK, D. M.; RAUPACH, B.; HROMOKYJ, A. E.; FALKOW, S. *Salmonella typhimurium* invasion induces apoptosis in infected macrophages. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 93, p. 9833-9838, 1996.

MONDON, P.; THELU, J.; LEBEAU, B.; AMBROISE-THOMAS, P.; GRILLOT, R. Virulence of *Aspergillus fumigatus* strains investigated by random amplified polymorphic DNA analysis. **J. Med. Microbiol.**, v. 42, p.299-303, 1995.

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

MONTEIRO DA SILVA, J. L. **Adesão e invasão de *Paracoccidioides brasiliensis* em cultura de células: envolvimento do citoesqueleto, evento de sinalização e ocorrência de apoptose.** Tese (Doutorado em Análises Clínicas) Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2004, 134f.

MONTOYA, A.E.; ALVAREZ, A.L.; MORENO, M.N.; RESTREPO, A.; McEWEN, J.G. Eletrophoretic kariotype of environmental isolates of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Med. Mycol.**, v.37, p. 219-22, 1999.

MORGAN, G.W.; ALLEN, C.L.; JEFFRIES, T.R.; HOLLINSHEAD, M.; FIELD, MC. Developmental and morphological regulation of clathrin-mediated endocytosis in *Trypanosoma brucei*. **J. Cell Sci.**, v.14, p.2605-2615, 2001.

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

MOTTA, T.R.; MOREIRA-FILHO, C.A.; MENDES, R.P.; SOUZA, L.R.; SUGIZAK, M.F.; BAUEB, S.; CALICH, V.L.; VAZ, C.A. Evaluation of DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers (RAPD) as genetically associated elements to differentiate virulent and non-virulent *Paracoccidioides brasiliensis* isolates. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v. 33, p.151-157, 2002.

MOULDING, D. A.; WALTER, C.; HART, A.; EDWARDS, S. W. Effects of staphylococcal enterotoxins on human neutrophil functions and apoptosis. **Infect. Immun.**, v. 67, p. 2312-2318, 1999.

MUKHERJEE, S.; GHOSH, R. N.; MAXFIELD, F. R. Endocytosis. **Physiol. Rev.**, v. 77, p. 759-803, 1997.

MULLER, A.; HACKER, J.; BRAND, B. C. Evidence for apoptosis of human macrophages-like HL-60 cells by *Legionella pneumophila* infection. **Infect. Immun.**, v. 64, p. 4900-4906, 1996.

MUNN, A.L. Molecular requirements for the internalization step of endocytosis: insights from yeast. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1535, p. 236-257, 2001.

NAIFF, R. D.; FERREIRA, L. C. L.; BARRET, T. V.; NAIFF, M. F.; ARIAS, J. R. Enzootic paracoccidioidomycosis in armadillos (*Dasypus novemcinctus*) in the State of Para. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 28, p. 19-27, 1986.

NAIFF, R. D.; BARRET, T. V. Novos registros de *Paracoccidioides brasiliensis* em tatus (*Dasypus novemcinctus*). In: XI Congresso Brasileiro de Parasitologia, São Paulo Brasil, 1989.

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

NEGRONI, P. Estudios sobre la ecología del *Paracoccidioides brasiliensis* en la Argentina. **Torax**, v. 17, p. 60-62, 1968.

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

NEUMEISTER, B.; FAIGLE, M.; LAUBER, K.; NORTHOFF, H.; WESSELBORG, S. *Legionella pneumophila* induces apoptosis via the mitochondrial death pathway. **Microbiology**, v. 148, p. 3639-3650, 2002.

NOBES, C.D. ; HALL, A. Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. **Cell.**, v..81, p. 53-62, 1995.

O'FARRELL, P.H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. **J. Biol. Chem.**, v.250, p. 4007-4021, 1975.

OFEK, I.; KAHANE, I.; SHARON, N. Toward anti-adhesion therapy for microbial diseases. **Trends in Microbiol.**, v. 4, p. 297-299, 1996.

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

PANAGIO, L. A.; FELIPE, I.; VIDOTTO, M. C.; GAZIRI, L. C. J. Early membrane exposure of phosphatidylserine followed by late necrosis in murine macrophages induced by *Candida albicans* from HIV-infected individual. **J. Med. Microbiol.**, v. 51, p. 929-936, 2002.

PATEL, A.; CUMMINGS, N.; BATCHELOR, M.; HILL, P.J.; DUBOIS, T.; MELLITS, K.H.; FRANKEL, G.; CONNERTON, I. Host protein interactions with enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC): 14-3-3tau binds Tir and has a role in EPEC-induced actin polymerization. **Cell Microbiol.**, v.1, p.55-71, 2006.

PEARSE, B.M. Coated vesicles from pig brain: purification and biochemical characterization. **J. Mo.l Biol.**, v. 97, p. 93-98, 1975.

PEARSON, W.R. Flexible sequence similarity searching with the FASTA3 program package. **Methods Mo.l Biol.**, v. 132, p.185-219, 2000.

PERAÇOLI, M.T., SUGIZAKI, M.F., MENDES, R.P., NAIFF, R., MONTENEGRO, M.R. *Paracoccidioides brasiliensis* isolated from armadillos is virulent to Syrian hamsters. **Mycopathologia**. v.148, p.123-30, 1999.

PEREIRO, M.M. Dos casos de blastomicosis sulamericana observados en España. **Acta Dermo-Sifilogr. Madrid**, v. 65, p.509, 1974.

PERFETTINI, J. L.; DARVILLE, T.; GACHELIN, G.; SOUQUE, P.; DAUTRY-VARSAT, A.; OJCIUS, D. M. Effect of *Chlamydia trachomatis* infection and subsequent tumor necrosis factor alpha secretion on apoptosis in the murine genital tract. **Infect. Immun.**, v. 68, p. 2237-2244, 2000.

PERSSON, C.; CARBALLEIRA, N.; WOLF-WATZ, H.; FALLMAN, M. The PTPase YopH inhibits uptake of *Yersinia*, tyrosine phosphorylation of p130Cas and FAK, and the associated accumulation of these proteins in peripheral focal adhesions. **EMBO J.**, v.9, p.2307-2318, 1997.

POLACK, J.M.; VAN NOORDEN, S. **Immunocytochemistry-Modern Methods and Applications**. Wright, 2^o ed., 1986.

POSADA, G.H. Encuesta sobre la tuberculosis, la histoplamosis y la paracoccidioidomycosis en un hospital de tuberculosos. **Antioq. Med.**, v. 18, p.49-51, 1968.

PUCCIA, R.; CARMONA, A.K.; GESZTESI, J.L.; JULIANO, L.; TRAVASSOS, L.R. Exocellular proteolytic activity of *Paracoccidioides brasiliensis*: cleavage of components associated with the basement membrane. **Med. Mycol.**, v.36, p.354-358, 1998.

RABINOVITCH, M. Professional and non-professional phagocytes: an introduction. **Trends Cell Biol.**, v. 5, p. 85-88, 1995.

RESTREPO, A. The ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*: a puzzle still unsolved. **J. Med. Vet. Mycol.**, v. 23, p. 323-34, 1985.

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

RESTREPO-MORENO, A. Mycosis in Colombia. A review of the national literature. **Torax**, v. 17, p. 99-103, 1986.

RESTREPO-MORENO, A. **Paracoccidioidomycosis**. In Murphy, J.W., Friedman, H., Bendinlli. (ed.). Fungal infections and immune responses. New York: Plenum Press 1993. p. 251-76.

RIDLEY, A.J.; HALL, A. The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. **Cell.**, v. 70, p. 389-399, 1992.

RIDLEY, A.J.; PATERSON, H.F.; JOHNSTON, C.L.; DIEKMANN, D.; HALL, A. The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. **Cell.**, v. 70, p. 401-410, 1992.

ROBINSON, M.S.; BONIFACINO, J.S. Adaptor-related proteins. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v. 13, p. 444-453, 2001.

RODRIGUES, V. S.; VIDOTTO, M. C.; FELIPE, I.; GAZIRI, L. C. Apoptosis of murine peritoneal macrophages induced by an avian pathogenic strain of *Escherichia coli*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 179, p. 73-78, 1999.

ROGERS, A. L.; BENEKE, E. S. Human pathogenic fungi recovered from brazilian soils. **Mycopathol. Mycol. Appl.**, v. 22, p. 15-20, 1964.

ROSENSHINE, I.; DURONIO, V.; FINLAY, B. B. Tyrosine protein kinase inhibitors block invasion-promoted bacterial uptake by epithelial cells. **Infect. Immun.**, v. 60, p. 2211-2217, 1992.

ROTH, D.; BIRKENFELD, J.; BETZ, H. Dominant-negative alleles of 14-3-3 proteins cause defects in actin organization and vesicle targeting in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **FEBS Lett.**, v. 460, p. 411-416, 1999.

ROTSTEIN, D.; PARODO, J.; TANEJA, R.; MARSHALL, J. C. Phagocytosis of *Candida albicans* induces apoptosis of human neutrophils. **Shock.**, v. 14, p. 278-283, 2000.

RUCKDESCHEL, K.; ROGGENKAMP, A.; LAFONT, V.; MANGEAT, P.; HEESEMANN, J.; ROUT, B. Interaction of *Yersinia enterocolitica* with macrophages leads to macrophage cell death through apoptosis. **Infect. Immun.**, v. 65, p. 4813-4821, 1997.

RUMA, P.; CHEN, S.C.; SORRELL, T.C.; BROWNLEE, A.G. Characterization of *Cryptococcus neoformans* by random DNA amplification. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 23, p. 312-316, 1996.

SAJJAN, U. S.; SYLVESTER, F. A.; FORSTNER, J. F. Cable-pilited *Burkholderia cepacia* binds to cytokeratin 13 of epithelial cells. **Infect. Immun.**, v. 68, p. 1787-1795, 2000.

SAKATA, N.; YAMAZAKI, K.; KOGURE, T. Identification of a 21 kDa laminin-binding component of *Candida albicans*. **Zentralbl. Bakteriol.**, v. 289, p.217-225, 1999.

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

SALVESEN, G.S.; DIXIT, M.V. Caspase activation: The induced-proximity model. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.**, v.20, p. 10964–10967, 1999.

SAMBROOK, J.; MANIATS,T.; FRITSCH, E. F. **Molecular cloning**. Cold Spring Harbor Laboratory, 1989, v.2.

SAMBROOK, J.; MANIATS, T.; FRITSCH, E.F. **Molecular cloning**, Cold Spring Harbor Laboratory, 1995, v. 2

SAN-BLAS, G.; SAN-BLAS, F.; ORMAECHEA, E.; SERRANO, L.E. Cell wall analysis of adenine requiring mutant of the yeast like form of *Paracoccidioides brasiliensis* strain IVICPb9. **Sabouraudia**, v. 15, p. 297-303, 1977.

SAN-BLAS, G. Paracoccidioidomycosis and its etiologic agent *Paracoccidioides brasiliensis*. **J. Med. Vet. Mycol.**, v. 31, p. 99-113, 1993.

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, 1994, p. 49-66.

SAN-BLAS, G.; SAN-BLAS, F. *Paracoccidioides brasiliensis*: virulence and host response. In **Fungal pathogenesis: principles and clinical applications**. CIHLAR, R.L.; CALDERONE, R.A. (Eds). New York: Marcel Dekker, Inc, 2000.

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.

SAN-BLAS, G.; PRIETO, A.; BERNABE, M.; AHRAZEM, O.; MORENO, B.; LEAL, J.A. alpha-galactose 1 -->6-alpha-mannopyranoside side chains in *Paracoccidioides brasiliensis* cell wall are shared by members of the Onygenales, but not by galactomannans of other fungal genera. **Med. Mycol.**, v.2, p.153-159, 2005.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COUSON, A. R. DNA sequencing with chain termination inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 74, n. 12, p. S463-S467, 1977.

SANSONETTI, P. [New aspects of intestinal bacterial invasion]. **Gastroenterol. Clin. Biol.**, v.5, p.24-31, 2002.

SANTORO, M.M.; GAUDINO, G.; MARCHISIO, P.C. The MSP receptor regulates alpha6beta4 and alpha3beta1 integrins via 14-3-3 proteins in keratinocyte migration. **Dev. Cell.**, v. 2, p.257-271, 2003

SEN, S.; D'INCALCI, M. Apoptosis. Biochemical events and relevance to cancer chemotherapy. **FEBS Lett.**, v. 307, p. 122-127, 1992.

SILVA, C. P.; OLIVEIRA, C. R.; LIMA, M. C. P. Apoptosis as a Mechanism of Cell Death Induced by Different Chemotherapeutic Drugs in Human Leukemic T-Lymphocytes. **Bioch. Pharmacol.**, v. 51, p. 1331-1340, 1996.

SIMBULAN-ROSENTHAL, C.M.; ROSENTHAL, D.S.; DING, R.; BHATIA, K.; SMULSON, M.E. Prolongation of the p53 response to DNA strand breaks in cells depleted of PARP by antisense RNA expression. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.3, p.864-868, 1998.

SINGER-VERMES, L.M.; BURGER, E.; FRANCO, M.J.; MOSCARDI BACHI, M.; MENDES-GIANNINI, M.J.S.; CALICH, V.L.C. Evaluation of the *Paracoccidioides brasiliensis* isolates in susceptible in bred mice. **J. Med. Vet. Mycol.** v.27, p. 71-82, 1989.

SINGER-VERMES, L.M.; BURGER, E.; CALICH, V.L.C.; MODESTO XAVIER, L.H. Pathogenicity and immunogenicity of *Paracoccidioides brasiliensis* isolates in the human disease and in experimental murine model. **Clin. Exper. Immun.** v.97, p. 113-9, 1994.

SIQUEIRA, A. M. **Avaliação da sensibilidade e especificidade de algumas provas sorológicas no diagnóstico, prognóstico e controle de cura da paracoccidioidomicose. Caracterização imunoquímica do antígeno E2 de *Paracoccidioides brasiliensis*.** Dissertação (Doutorado)-Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 1982, 256p.

SOARES, C.M.A.; MOLINARI-MADLUN, E.E.W.I.; SILVA, S.P. da; PEREIRA, M.; FELIPE, M.S.S. Characterization of *Paracoccidioides brasiliensis* isolates by

random amplified polymorphic DNA analysis. **J. Clin. Microbiol.**, v. 33, p.505-507, 1995.

SOUTO, P.C.; BRITO, V.N.; GAMEIRO, J.; DA CRUZ-HOFLING, M.A.; VERINAUD, L. Programmed cell death in thymus during experimental paracoccidioidomycosis. **Med. Microbiol. Immunol.**, v. 4, p.225-229, 2003.

STEWART, M. Intermediate filament structure and assembly. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v. 5, p. 3-11, 1993.

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

SUNDSTROM, P.; BALISH, E.; ALLEN, C.M. Essential role of the *Candida albicans* transglutaminase substrate, hyphal wall protein 1, in lethal oroesophageal candidiasis in immunodeficient mice. **J. Infect. Dis.**, v.4, p.521-530, 2002.

SUPERTI, F.; PIETRANTONI, A.; DI BIASE, A.M.; LONGHI, C.; VALENTI, P.; TINARI, A. Inv-mediated apoptosis of epithelial cells infected with enteropathogenic *Yersinia*: a protective effect of lactoferrin. **Res. Microbiol.**, v. 5-6, p.728-737, 2005.

SVIDZINSKI, T.I.E.; MIRANDA-NETO, M.H.; SANTANA, R.G.; FISCHMAN, O.; COLOMBO, A.L. *Paracoccidioides brasiliensis* isolates obtained from patients with acute and chronic disease exhibit morphological differences after animal passage. **Rev. Inst. Med. Trop.**, v.41, p. 279-83, 1999.

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

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

TAKIHARA, Y.; MATSUDA, Y.; IRIE, K.; MATSUMOTO, K.; HARA, J. 14-3-3 protein family members have a regulatory role in retinoic acid-mediated induction of cytokeratins in F9 cells. **Exp. Cell Res.**, v.1, p. 96-104, 2000.

TAMURA, G. S.; NITTAYAJARN, A. Group B streptococci and other gram-positive cocci bind to cytokeratin 8. **Infect. Immun.**, v.68, p. 2129-2134, 2000.

TAN, H.; ANDREWS, N.W. Don't bother to knock--the cell invasion strategy of *Trypanosoma cruzi*. **Trends Parasitol.**, v.10, p.427-428, 2002.

TEWARI, M.; QUAN, L.T.; O'ROURKE, K.; DESNOYERS, S.; ZENG, Z.; BEIDLER, D.R.; POIRIER, G.G.; SALVESEN, G.S.; DIXIT, V.M. Yama/CPP32 beta, a mammalian homolog of CED-3, is a CrmA-inhibitable protease that cleaves the death substrate poly(ADP-ribose) polymerase. **Cell.** , v.5, p.801-809, 1995.

THOMPSON, C.B. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. **Science**, v. 267, p.1456-1462, 1995.

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

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

TSARFATY, I.; SANDOVSKY-LOSICA, H.; MITTELMAN, L.; BERDICEVSKY, I.; SEGAL, E. Cellular actin is affected by interaction with *Candida albicans*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 189, p. 225-232, 2000.

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

UEMURA, M. A. **Evidências da participação dos mecanismos de adesão e invasão celular na patogenicidade do *Paracoccidioides brasiliensis***. Dissertação (Mestrado)-Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, 1996, 99p.

UEMURA, M. A.; HANNA, S. A.; RICCI, L. C.; SANDOVAL, M. P.; MENDES-GIANNINI, M. J. S. An electron microscopy study of *Paracoccidioides brasiliensis* adherence and invasion of culture cells. In: Encontro Internacional sobre Paracoccidioidomycosis. Porto Alegre-Rio Grande do Sul, 1996.

VAN HEMERT, M.J.; STEENSMA, H.Y.; VAN HEUSDEN, G.P. 14-3-3 proteins: key regulators of cell division, signalling and apoptosis. **Bioassays**, v.23, p.936-946, 2001.

VAN HEUSDEN, G.P.; STEENSMA, H.Y. Yeast 14-3-3 proteins. **Yeast**, v.3, p.159-171, 2006.

VASCONCELOS, D. M.; ORII, N. M.; ROMANO, C. C.; IQUEOKA, R. Y.; DUARTE, A. J. S. Characterization of the cellular immune function of patients with chronic mucocutaneous candidiasis. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 123, p. 247-253, 2001.

VAUX D. L.; KORSMEYER, S. J. Cell death in development. **Cell**, v. 96, p. 245-254, 1999.

VERGARA, M. L. S.; MARTINEZ, R.; CHADU, M. A.; MADEIRA, M.; SILVA, G. F.; MAFFEI, C. M. L. **Isolamento de nova amostra do *Paracoccidioides brasiliensis* em plantação de café.** In: VI Encontro International Sobre Paracoccidioidomycosis. II Simposio Iberoamericano Sobre Relation Hongo-Hospedeiro, Montevideo-Uruguai, 1996, p.80.

VERMA, A.; IHLER, G.M. Activation of Rac, Cdc42 and other downstream signalling molecules by *Bartonella bacilliformis* during entry into human endothelial cells. **Cell Microbiol.**, v. 4, p. 557-569, 2002.

VERMES, I.; HAANEN, C.; NAKKEN-STEFFEN, H.; REUTELINGSPERGER, C. A novel assay for apoptosis flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. **J. Immunol. Methods**, v. 184, p. 39-51, 1995.

VERMES, I.; HAANEN, C.; REUTELINGSPERGER, C. Flow cytometry of apoptotic cell death. **J. Immunol. Methods**, v. 243, p. 167-190, 2000.

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

WALZ, J.M.; GERHARDT, H.; FAIGLE, M.; WOLBURG, H.; NEUMEISTER, B. *Legionella* species of different human prevalence induce different rates of apoptosis in human monocytic cells. **APMIS.**, v. 108, p. 398-408, 2000.

WANG, X.; OHNISHI, K.; TAKAHASHI, A.; OHNISHI, T. Poly(ADP-ribosyl)ation is required for p53-dependent signal transduction induced by radiation. **Oncogene**, v.22, p.2819-2825, 1998.

WANKE, B.; LONDERO, A.T. Epidemiology and Paracoccidioidomycosis infection. In **Paracoccidioidimycosis**. FRANCO, M.; LACAZ, C.S.; RESTREPO, A.; DEL NEGRO, G. (Eds). Boca Raton: CRC, 1994, p. 109-120.

WASYLNKA, J. A.; MOORE, M. M. Uptake of *Aspergillus fumigatus* Conidia by Phagocytic and Nonphagocytic Cells In Vitro: Quantitation Using Strains Expressing Green Fluorescent Protein. **Infect. Immun.**, v. 70, p. 3156-3163, 2002.

WILKER, E.; YAFFE, M.B. 14-3-3 Proteins--a focus on cancer and human disease. **J. Mol. Cell Cardiol.**, v.3, p.633-642, 2004.

WILLIAMS, J.G.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, J.A.; TINGEY, S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Res.**, v.22, p.6531-6535, 1990.

WON, J.; KIM, D.Y.; LA, M.; KIM, D.; MEADOWS, G.G.; JOE, C.O. Cleavage of 14-3-3 protein by caspase-3 facilitates bad interaction with Bcl-x(L) during apoptosis. **J. Biol. Chem.**, v. 278, p.19347-19351, 2003.

WRONOWSKA, W.; GODLEWSKA, R.; JAGUSZTYN-KRYNICKA, E.K. Influence of human gastrointestinal tract bacterial pathogens on host cell apoptosis. **Postepy Biochem.**, v. 51, p. 270-279, 2005.

YAN, S.; RODRIGUES, R.G.; CAHN-HIDALGO, D.; WALSH, T.J.; ROBERTS, D.D. 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. 5638-5644, 1998.

YARZÁBAL, L.A. Composición antigênica do *Paracoccidioides brasiliensis*. In: DEL NEGRO, G.; LACAZ, C.S.; FIORILLO, A.M. **Paracoccidioidomicose**. São Paulo: Sarvier, 1982.

ZANIOLO, K.; RUFIANGE, A.; LECLERC, S. ; DESNOYERS, S. ; GUERIN, S.L. Regulation of the poly(ADP-ribose) polymerase-1 gene expression by the transcription factors Sp1 and Sp3 is under the influence of cell density in primary cultured cells. **Biochem. J.**, v. 2, p. 423-433, 2005.

ZHAO, X.; OH, S.H.; CHENG, G.; GREEN, C.B.; NUESSEN, J.A.; YEATER, K.; LENG, R.P.; BROWN, A.J.; HOYER, L.L. *ALS3* and *ALS8* represent a single locus that encodes a *Candida albicans* adhesin; functional comparisons between *Als3p* and *Als1p*. **Microbiology**, v. 7, p.2415-2428, 2004.

ZUMBIHL, R.; AEPFELBACHER, M.; ANDOR, A.; JACOBI, C.A.; RUCKDESCHEL, K.; ROUOT, B.; HEESEMANN, J. The cytotoxin YopT of *Yersinia enterocolitica* induces modification and cellular redistribution of the small GTP-binding protein RhoA. **J. Biol. Chem.**, v.41, p.29289-29293, 1999.

ZYCHLINSKY, A.; PREVOST, M. C.; SANSONETTI, P. J. *Shigella flexneri* induces apoptosis in infected macrophages. **Nature**, v. 358, p. 167-169, 1992.

ZYCHLINSKY, A.; THIRUMALAI, K.; ARONDEL, J.; CANTEY, R.J.; ALIPRANTIS, A.O.; SANSONETTI, P.J. *In vitro* apoptosis in *Shigella flexneri* infections. **Infect. Immun.**, v. 64, p. 5357-5365, 1996.

ZYCHLINSKY, A.; SANSONETTI, P.J. Apoptosis in bacterial pathogenesis. **J. Clin. Invest.**, v. 100, p. 63-65, 1997.

8. ANEXO

TERMO DE CONSENTIMENTO

unesp  **UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**
CÂMPUS DE ARARAQUARA

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Protocolo nº 06/2001-CEP

Interessado: MARIA JOSÉ SOARES MENDES GIANNINI

Projeto: AVALIAÇÃO DA ADESÃO E INVASÃO DE
PARACOCCIDIOIDES BRASILIENSIS EM CULTURA DE
CÉLULAS EPITELIAIS E ENDOTELIAIS – ENVOLVIMENTO
DO CITOESQUELETO E EVENTOS DE SINALIZAÇÃO

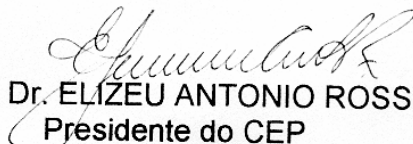
Parecer nº 08/2001 – Comitê de Ética em Pesquisa

O projeto “Avaliação da adesão e invasão de *paracoccidoides brasiliensis* em cultura de células epiteliais e endoteliais – envolvimento do citoesqueleto e eventos de sinalização”, encontra-se adequado em conformidade com as orientações constantes da Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde/MS.

Por essa razão, o Comitê de Ética em Pesquisa desta Faculdade considera o referido projeto estruturado dentro de padrões éticos e é de PARECER FAVORÁVEL à sua execução.

Lembramos Vossa Senhoria da necessidade de entrega de relatório parcial em setembro de 2002 e de relatório final em setembro de 2003.

Araraquara, 1º de agosto de 2001.


Prof. Dr. ELIZEU ANTONIO ROSSI
Presidente do CEP