

ADRIANA YUMI DE CAMARGO KONNO

**Peptídeos derivados da gp43 de *Paracoccidioides
brasilensis* inibem a fagocitose.**

**Tese apresentada à Universidade Federal
de São Paulo – Escola Paulista de
Medicina, para obtenção do Título de
Mestre em Ciências.**

**São Paulo
2008**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA**

**DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA, IMUNOLOGIA E
PARASITOLOGIA**

DISCIPLINA DE IMUNOLOGIA

Orientador: Prof. Dr. José Daniel Lopes

Chefe de departamento:

Prof. Dr. José Daniel Lopes

Coordenador do curso de pós-graduação:

Prof. Dr. Renato Arruda Mortara

Ficha Catalográfica

Konno, Adriana Yumi de Camargo

Peptídeos derivados da gp43 de *Paracoccidioides brasiliensis* inibem a fagocitose. / Adriana Yumi de Camargo Konno – São Paulo, 2007.

Tese (Mestrado) – Universidade Federal de São Paulo, Escola Paulista de Medicina.
Programa de Pós-graduação em Microbiologia e Imunologia.

Título em inglês. Peptides derived from the *Paracoccidioides brasiliensis* gp43
sequence inhibit macrophage functions

1. *Paracoccidioides brasiliensis* 2. Gp43 3. Peptides 4. Inibição da fagocitose 5. PCM
experimental

**“Só se pode alcançar um grande êxito quando nos mantemos
fiéis a nós mesmos.”**

Friedrich Nietzsche

ADRIANA YUMI DE CAMARGO KONNO

**Peptídeos derivados da gp43 de *Paracoccidioides*
brasiliensis inibem a fagocitose.**

**Tese apresentada à Universidade Federal
de São Paulo – Escola Paulista de
Medicina, para obtenção do Título de
Mestre em Ciências.**

ADRIANA YUMI DE CAMARGO KONNO

**Peptídeos derivados da gp43 de *Paracoccidioides
brasiliensis* inibem a fagocitose.**

Presidente da banca: Prof. Dr. José Daniel Lopes

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Vera Lúcia Garcia Calich

Prof. Dr. Arnaldo Lopes Colombo

Prof. Dr. Zoilo Pires de Camargo

Prof. Dr. Jorge Elias Kalil Filho

Aprovada em julho de 2008

Este trabalho foi desenvolvido na Disciplina de Imunologia do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina, com auxílios financeiros concedidos pela Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) concedido pela Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES).

DEDICATÓRIA

*À minha família, que me apoiou e esteve presente
nos momentos difíceis, conquistas
e alegrias.*

Agradecimentos

Ao Profº Dr. José Daniel Lopes que me deu oportunidade e confiança para realização desse trabalho. Mais ainda, pelos inestimáveis ensinamentos e primorosa orientação;

Aos professores da disciplina de imunologia Dra. Miriam Galvonas Jasiulionis, Dra. Zulma Peixinho, Dra. Célia Regina Whitaker Carneiro, Dra. Ieda Maria Longo Maugéri, Dr. Joel Machado Jr., Dr. Mário Mariano, pelo auxílio e orientação sempre que necessário;

À pós-graduanda Fabiana Toshie de Camargo Konno, minha irmã, amiga e companheira de bancada, que sempre esteve ao meu lado em todos os momentos;

Às Dra. Ana Flávia Vigna, Dra. Patrícia Xander e Dra. Daniela De Mattos Grosso pelas ajudas e ensinamentos;

À aluna de doutorado Juliana Maricato que me acompanhou e auxiliou da melhor maneira possível;

Às pós-graduandas e amigas Aline Morgado, Amanda Gonçalves, Fabiana Aliperti, Dra. Tatiana Ricca e a Dra. Fanny Tzelepis pela amizade e diversos momentos de descontração;

Aos alunos da pós-graduação Camila Caldini, Bruno Vivanco, Márcia Guerreschi, Érika Seki Kioshima e Lívia Pugliese, aos doutores Luciano Santos Feitosa e Elisabeth Cristina Perez e as estagiárias Patrícia Khoury e Marcela da Costa Antônio pela convivência e ajuda sempre que requerida;

Aos funcionários da disciplina, Aparecido Mendes, Ivone Mozat, Zélia Pereira, Gisélia Lopes, Creusa Marina, Creusa Rosa, Eraldina do Nascimento, Geová dos Santos e Mércia Maia, pelo auxílio contínuo;

Às minhas amigas Thereza Jatobá, Giovana Borba e Ana Luiza Antunes que sempre estiveram ao meu lado;

Aos alunos da disciplina de imunologia que de alguma forma me ajudaram na realização deste trabalho;

À minha família;

E a todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Abreviaturas

AMP	peptídeos microbianos
APS	persulfato de amônio
BCG	<i>Mycobacterium bovis</i> - bacillus Calmette-Guérin
BSA	soro albumina bovina
°C	graus <i>Celsius</i>
CD	<i>cluster of Differentiation</i>
D.O.	densidade óptica
DMSO	dimetilsulfoxido
DNA	ácido desoxidoribonucléico
ECM	matriz extracelular
EDTA	ácido etilenodiamino tetracético
ELISA	<i>enzyme linked Immunosorbent assay</i>
g	aceleração da gravidade
gp	glicoproteína
GM-CSF	<i>granulocyte macrophage colony stimulating factor</i>
h	hora
HCl	ácido clorídrico
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio
IFN	interferon
Ig	Imunoglobulina
IL	interleucina
IF	índices fagocíticos

KCl	cloreto de potássio
kDa	kilo Dalton
K ₂ HPO ₄	fosfato de potássio dibásico
KH ₂ PO ₄	dihidrogenofosfato de potássio
m	metro
M	molar
MELISA	<i>magnetic enzyme immunosorbent assay</i>
mg	miligrama
min	minuto
mL	mililitro
mm	milímetro
mM	milimolar
µg	micrograma
µl	microlitro
µm	micrometro
µM	micromolar
MgSO ₄	sulfato de magnésio
MgCl ₂	cloreto de magnésio
nM	nanomolar
nm	nanômetro
NaCl	cloreto de sódio
Na ₂ HPO ₄	fosfato de sódio dibásico
ng	nanograma
NH ₄ Cl	cloreto de amônio
(NH ₄) ₂ SO ₄	sulfato de amônio

nM	nanomolar
NO	óxido nítrico
OPD	<i>o</i> -phenylenediamine
Pb	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
PBS	tampão salino fosfato
PCR	<i>polimerase chain reaction</i>
PCM	Paracoccidioidomicose
pH	concentração de hidrogênio iônico
PMN	polimorfonuclear
PMSF	fluoreto de fenilmetanosulfonato
p/v	peso/volume
q.s.p.	quantidade suficiente para
rIL	receptor de interleucina
rpm	rotação por minuto
SDS	dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SFB	soro fetal bovino
TEMED	<i>N,N,N,N'</i> – tetrametilenodiamina
TGF	transforming growth factor
TNF	tumoral necrosis factor
Tris	tris-hidroximetil-aminometano
U	unidade enzimática
UFC	unidade formadora de colônia
UV	ultravioleta
V	volts

v/v

volume a volume

W

watts

SUMÁRIO

Dedicatória	viii
Agradecimentos	ix
Abreviaturas	xi
Lista de Figuras	xviii
Resumo	xix
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> e Paracoccidioidomicose	2
1.1.1. Aspectos gerais	2
1.2. Infecção e relação parasita-hospedeiro	3
1.3 Peptídeos Microbianos e resposta celular ao fungo <i>P. brasiliensis</i>	10
2. OBJETIVO	14
3. MATERIAIS E MÉTODOS	16
3.1 Soluções principais e rotineiras	17
3.2. Reagentes	19
3.3. Meio para cultivo de fungos	19
3.3.1. Meio YPD modificado	19
3.3.2. Meio YPD ágar	19
3.4. Isolados de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	19
3.4.1. Manutenção dos Isolados	19
3.4.2. Produção de Exoantígeno	20
3.5. Purificação da gp43	20
3.6. Meio para cultivo de células de mamíferos	21

3.6.1. Meio RPMI	21
3.6.2. Meio RPMI suplementado (R-10)	21
3.7. Animais	21
3.8. Cultura de macrófagos derivados de medula óssea	21
3.9. Síntese e purificação dos peptídeos	22
3.10. Análises gráficas dos parâmetros antigênicos e estruturais da seqüência da gp43	23
3.11. Dosagem de Proteínas	24
3.12. SDS-PAGE	24
3.13. Ensaio de fagocitose	25
3.14. Índices fagocíticos (IF)	26
3.15. Produção de Óxido Nítrico (NO)	26
3.16. Produção de Peróxido de Hidrogênio	27
3.17. Dosagem de TNF- α em sobrenadante de cultura de células	28
3.18. Granuloma induzido por BCG	29
3.19. Análise Estatística	29
4. RESULTADOS	30
4.1. Inibição da fagocitose de partículas de zymosan por macrófagos derivados de medula óssea	31

4.2. Influência dos peptídeos da gp43 na atividade fagocítica de macrófagos derivados de medula óssea	32
4.3. Participação dos peptídeos P4 e P23 na liberação de NO e H ₂ O ₂ por macrófagos derivados da medula óssea	37
4.4. Análise da participação de P4 e P23 na produção de TNF- α	40
4.5. Teste de edema da pata (FPT)	42
5. DISCUSSÃO	44
6. CONCLUSÕES	52
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54
8. ABSTRACT	73
9. ANEXOS	75

Lista de Figuras

- Figura 1** – Influência da gp43 nos índices fagocíticos (IF) de partículas zymosan por macrófagos derivados de medula óssea de camundongos fêmeos Balb/c 32
- Figura 2** – Influência dos 14 peptídeos seqüenciais derivados da molécula gp43 nos índices fagocíticos (IF) de partículas zymosan por macrófagos derivados de medula de camundongos Balb/c. 34
- Figura 3** – Análises dos gráficos de fragmentos dos peptídeos P4 e P23 da gp43, em (A) o *box* em vermelho destaca P4 e em (B) P23 35
- Figura 4** – Influência dos peptídeos P4 e P23 nos índices fagocíticos (IF) de partículas zymosan por macrófagos derivados de medula de camundongos Balb/c 36
- Figura 5** – Influência dos peptídeos P4 (A) e P23 (B) na liberação de NO por macrófagos derivados da medula óssea desafiados com partículas de zymosan 38
- Figura 6** – Influência dos peptídeos derivados da gp43 na liberação de H₂O₂ por macrófagos derivados da medula óssea desafiados com partículas de zymosan 39
- Figura 7** – Concentração de TNF- α no sobrenadante de cultura dos ensaios de fagocitose 41
- Figura 8** - Efeito do tratamento com P4 (A) e P23 (B) na evolução de edemas induzidos por infecção com BCG nas patas de camundongos 42 e 43

Resumo

Paracoccidioidomicose (PCM) é uma doença granulomatosa sistêmica causada pelo fungo dimórfico térmico *Paracoccidioides brasiliensis*. O principal antígeno desse fungo é uma glicoproteína de 43-KDa. Gp43 possui diferentes funções: participa do mecanismo de evasão durante a instalação da infecção primária e estimula formação de granuloma *in vitro*, apresentando epítomos reconhecidos por células T que induzem resposta protetora contra o *P. brasiliensis*. Aqui, investigamos quais epítomos da gp43 poderiam diminuir a função fagocítica de macrófagos e a reação inflamatória correspondente. Diferentes peptídeos da gp43 foram adicionados a culturas de macrófagos derivados de medula óssea. Posteriormente, foram desafiados com zymosan e os índices fagocíticos foram determinados. A expressão dos peptídeos na superfície da molécula foi determinada por análises gráficas usando o módulo Protean; DNASTar Inc. Dois peptídeos que diminuíram índices fagocíticos e estavam expressos na superfície da gp43, P4 e P23, foram selecionados para ensaios posteriores. Mostramos que ambos, P4 e P23 inibiram a liberação de NO por macrófagos estimulados com zymosan enquanto aumentaram liberação de H₂O₂. A liberação de TNF- α no sobrenadante de cultura de testes fagocíticos *in vitro* também foi inibida na presença dos peptídeos. Ensaios *in vivo* com *Mycobacterium bovis* - bacillus Calmette-Guérin (BCG) demonstraram que estes peptídeos também apresentaram propriedades antiinflamatórias não-específicas a PCM.

1. Introdução

1.1. *Paracoccidioides brasiliensis* e paracoccidioidomicose

1.1.1. Aspectos gerais

A Paracoccidioidomicose (PCM) manifesta-se como uma micose profunda e sistêmica, de caráter granulomatoso, que compromete especialmente os tecidos pulmonares e mucocutâneo, o sistema linfático e por extensão qualquer outro órgão, podendo levar o paciente ao óbito (Brummer *et al.*, 1993). *Paracoccidioides brasiliensis* é um fungo dimórfico responsável pela paracoccidioidomicose (PCM), a qual causa no homem uma micose sistêmica que pode ser letal se não tratada.

A PCM encontra-se geograficamente limitada aos países da América Latina, sendo prevalente no Brasil, Argentina, Venezuela e Colômbia, onde é endêmica em áreas rurais. No Brasil, as áreas de maior incidência são as regiões Sudeste e Sul. Os estados que apresentam maior frequência de diagnósticos de PCM são Paraná, São Paulo, Minas Gerais e Rio Grande do Sul (Coutinho *et al.*, 2002). Estima-se que a incidência anual da doença ativa seja de 1 a 3 indivíduos por 100.000 habitantes em áreas endêmicas (San-Blas *et al.*, 2002).

Os casos de PCM diagnosticados em locais não endêmicos, como Estados Unidos, Europa, África e Ásia, sugerem que os pacientes foram supostamente infectados durante o período que residiram ou trabalharam em países endêmicos, já que em alguma época das suas vidas estiveram nesses países (Lacaz *et al.*, 1994).

O habitat natural do fungo ainda não está bem definido, mas a partir das características do meio ecológico onde estão as áreas endêmicas, associados a dados laboratoriais, acredita-se que o local seja úmido, com temperatura variando de 18 a 24°C e com altos índices pluviométricos variantes de 800 a 2000 mm por ano, altitude média 47 – 1300 m, predomínio de florestas e árvores nativas, invernos curtos e verões ensolarados (Bagagli *et al.*, 1998).

1.2. Infecção e relação parasita-hospedeiro

A infecção pelo *P. brasiliensis* ocorre por inalação de conídeos. A instalação da doença depende tanto da virulência do agente infeccioso como da resposta imunológica do indivíduo. Para o desenvolvimento da doença, é imprescindível que os conídeos alojados nos alvéolos pulmonares passem à fase leveduriforme. A mudança da fase infectante para a patogênica depende do aumento de temperatura (Lacaz *et al.*, 1994). Após instalação do fungo no pulmão, ocorre a formação de lesões que podem regredir com destruição do fungo, regredir com fungo latente ou quiescente que pode voltar a se desenvolver posteriormente ou progredir imediatamente com o desenvolvimento dos sinais e sintomas da PCM.

A doença ativa tem caráter granulomatoso e manifesta-se nas formas aguda (juvenil ou linfática) ou crônica (adulta ou pulmonar). Ambas as formas estão associadas com extensas seqüelas mediadas por infecções sistêmicas, incluindo lesões e depressão da resposta imune celular (Franco, 1987; Brummer *et al.*, 1993). O tipo juvenil é mais grave e de pior prognóstico (Londero & Melo, 1983). Nesta forma da doença o fungo progride rapidamente através do sistema

retículo-endotelial de adultos jovens e crianças de ambos os sexos, sendo responsável por cerca de 3 a 5 % dos casos de PCM descritos. A forma aguda é marcada pelo envolvimento do sistema fagocítico mononuclear, com resposta imune celular deprimida e aumento da resposta específica de anticorpos (Benard *et al.*, 1996; Benard *et al.*, 1997; Franco, 1987; Mota *et al.*, 1985). Estudos histopatológicos de pacientes com a forma aguda da doença mostraram a presença de processo inflamatório inespecífico, com granulomas frouxos, pouco organizados, contendo numerosos fungos viáveis em seu interior (Franco, 1987). A forma crônica é a mais comum, acomete mais de 90% de todos os casos e prevalece em homens de 30 – 60 anos. Esta forma da doença tem progressão lenta, geralmente após longo período de latência de focos quiescentes. Acomete principalmente os pulmões, mas pode ser multifocal, disseminando-se para qualquer órgão, especialmente para tecidos mucocutâneos. Nos tecidos de pacientes infectados observa-se a formação de granulomas epitelióides compactos contendo poucos fungos viáveis em seu interior (Franco, 1987; Londero & Melo, 1980). A disseminação ocorre pela via hematogênica e/ou linfática.

Apesar da PCM-infecção ocorrer igualmente entre os sexos, a doença ativa é detectada com freqüência 13 vezes superior no sexo masculino (Brummer *et al.*, 1993). Esse fato tem sido relacionado à proteção por hormônios femininos, uma vez que 17 β -estradiol, mas não testosterona, inibe *in vitro* a transformação de micélio em levedura (Aristizabal *et al.*, 1998). O mecanismo envolvido nesse processo inibitório seria o bloqueio da síntese de proteínas durante a transformação dimórfica, tendo sido demonstrada presença de receptores para estrógeno no citoplasma do fungo (Loose *et al.*, 1983; Restrepo *et al.*, 1984;

Stover *et al.*, 1986; Salazar *et al.*, 1988; Clemons *et al.*, 1989). Em experimentos *in vivo* realizados com camundongos fêmeos não se observou no fluído de lavado bronco-alveolar a transição de conídeos em leveduras, resultado diferente do obtido em camundongos machos (Aristizabal *et al.*, 1998).

Além do sexo, outras características do indivíduo, como idade, estado nutricional, patrimônio genético e integridade da resposta imunológica (Franco, 1987) aliados aos diferentes graus de virulência fúngica (Kashino *et al.*, 1985) são importantes fatores para o estabelecimento do fungo e gravidade da doença. As diferenças de susceptibilidade à PCM foram parcialmente mimetizadas em modelo experimental de camundongos geneticamente selecionados (Calich & Kashino., 1998). Animais da linhagem A/Sn são mais resistentes à infecção intraperitoneal e intratraqueal com o isolado Pb18 de *P. brasiliensis*, enquanto camundongos B10.A são mais susceptíveis e Balb/C são intermediários (Calich *et al.*, 1985; Calich & Kashino, 1998; Cano *et al.*, 1995). O padrão de citocinas secretadas por linfonodos totais (infecção i.p.) ou pelos pulmões (infecção i.t.) de camundongos A/Sn infectados com Pb18 tem predomínio de IL-2 e IFN- γ (Th1) nas fases iniciais, enquanto camundongos susceptíveis secretam preferencialmente IL-4, IL-5 e IL-10 (Th2) (Calich & Kashino, 1998; Calich *et al.*, 1998).

A principal defesa do hospedeiro contra o *P. brasiliensis* é a resposta mediada por células, evidenciada pela formação de granulomas. O granuloma típico observado na PCM é composto de células gigantes e epitelióides, podendo ser observados polimorfonucleares (PMN) próximos aos fungos. Ao redor das células epitelióides há um halo de células mononucleares (Franco, 1987; Londero *et al.*, 1980). Os pacientes com formas menos graves da doença apresentam

resposta imune celular preservada, resultando na formação de granulomas compactos, diretamente associados com a diminuição do número de células fúngicas. Por outro lado, pacientes que apresentam a forma mais grave da doença freqüentemente são observados granulomas frouxos e aumento das células fúngicas viáveis (Moscardi-Bacchi *et al.*, 1994). Contudo o conceito, origem e a função biológica da inflamação granulomatosa na Paracoccidioidomicose ainda é muito controversa.

O desenvolvimento da PCM depende de interações entre componentes do fungo e do hospedeiro. O fungo *P. brasiliensis* apresenta estrutura complexa de proteínas, glicoproteínas, polissacarídeos, lipídeos e polipeptídeos que reúnem condições físico-químicas e biológicas suficientes para atuarem como antígenos. O principal componente antigênico descrito em *P. brasiliensis* é a gp43, uma glicoproteína de 43 kDa reconhecida por anticorpos de todos os pacientes com a doença ativa (Puccia *et al.*, 1986; Puccia & Travassos, 1991; Camargo *et al.*, 1994). Esta molécula é secretada continuamente por leveduras do *P. brasiliensis* em crescimento exponencial; no entanto, a secreção diminui na fase estacionária (Stambuk *et al.*, 1998; Camargo *et al.*, 1989). A glicoproteína foi localizada no citoplasma, na parede celular e em lamomas de células leveduriformes e micelianas de *P. brasiliensis* (Stratus *et al.*, 1996). A gp43 possui uma única cadeia oligossacarídica *high mannose* N-ligada (Almeida *et al.*, 1996; Cisalpino *et al.*, 1996), que permite sua ligação a receptores para manose de macrófagos (Almeida *et al.*, 1996) e auxilia na proteção contra proteólise *in vitro* (Puccia & Travassos 1991).

A glicoproteína de 43 kDa é uma molécula importante para imunidade humoral, permitindo o diagnóstico sorológico da PCM, como também para imunidade celular, protetora em camundongos (Travassos *et al.*, 1994).

Em nosso laboratório mostrou-se que esta glicoproteína tem um potencial fator de virulência no modelo intratesticular já que se liga a laminina murina com alta afinidade e com isso aumenta a capacidade do fungo de invadir e destruir tecidos (Vicentini *et al.*, 1994). Além disso, *in vivo*, anticorpos monoclonais anti-gp43 foram capazes de modular a infecção experimental exacerbada do *P. brasiliensis* recoberto com laminina (Gesztési *et al.*, 1996). A gp43 possivelmente atua também como adesina já que a aderência de *P. brasiliensis* a células epiteliais do hospedeiro também é substancialmente reduzida na presença de anti-gp43 (Hanna *et al.*, 2000). Recentemente foi demonstrado que gp43 interage com fibronectina, outro componente de matriz extracelular (Mendes-Giannini *et al.*, 2006).

A gp43 também participa da resposta imune celular em humanos (Benard *et al.*, 1997) e em animais infectados experimentalmente (Rodrigues & Travassos, 1994). Foi mostrado recentemente que um peptídeo de 15 aminoácidos da gp43 (P10) é o responsável pela ativação de célula T CD4⁺ em animais imunizados (Taborda *et al.*, 1998). Camundongos Balb/c imunizados com a gp43, P10 ou com o gene da gp43 (Pinto *et al.*, 2000) e infectados com *P. brasiliensis* apresentaram poucos granulomas pulmonares epitelióides, com poucas células viáveis no seu interior e ausência de lesões no fígado e baço. As respostas humoral e celular dos camundongos foram específicas e duradouras, e a proteção foi mediada pela produção de IFN- γ . O gene PbGP43 apresenta importante polimorfismo no éxon 2, porém é conservado na região que codifica P10 (Morais *et al.*, 2000).

Recentemente em nosso laboratório foi demonstrada outra relevante função da gp43 na interação fungo-macróforo. Os resultados indicaram que a gp43 diminuiu, de maneira dose dependente, tanto a fagocitose do fungo *P. brasiliensis* quanto de partículas de zymosan, inibindo também a liberação de mediadores envolvidos na atividade microbicida de macróforos como intermediários reativos de oxigênio e nitrogênio. Estes dados sugerem que a gp43 pode estar envolvida nos mecanismos de evasão do fungo na fase inicial de seu estabelecimento no hospedeiro (Popi *et al.*, 2002).

Outros antígenos do *P. brasiliensis* têm sido descritos, entretanto poucos foram purificados e caracterizados. A gp70 destaca-se por ser uma glicoproteína reconhecida por 96% dos soros de pacientes com PCM (Salina *et al.*, 1998), por induzir resposta linfoproliferativa quando testada com linfócitos de indivíduos com a doença (Benard *et al.*, 1997) e ser capaz de modular as funções de macróforos peritoneais murinos (Grosso *et al.*, 2003). Outra glicoproteína do fungo de 75 KDa também foi caracterizada recentemente. A gp75 apresenta atividade de fosfatase ácida e possivelmente está envolvida com crescimento do *P. brasiliensis*, já que na presença de anticorpos monoclonais contra gp75 há inibição do crescimento fúngico (Xander, *et al.*, 2007). Além da gp70 e gp75, outros antígenos de 87 kDa (Gómez *et al.*, 1997), 27 kDa (McEwen *et al.*, 1996), 58 kDa (Figueroa *et al.*, 1995), também foram caracterizados.

O diagnóstico confirmatório da PCM depende da demonstração do agente etiológico em materiais biológicos como: pus de linfonodos, escarros, aspirado brônquico ou lavado broncoalveolar, material granulomatoso da base de úlceras, líquido céfalo-raquidiano, medula óssea, além de amostras de biópsias. Na maioria dos casos o diagnóstico é realizado através de métodos diretos e

indiretos (diagnóstico sorológico). Os métodos diretos incluem exames microscópicos de espécimes biológicos do paciente, cultivo em meio de cultura próprio para o isolamento do fungo e inoculação em animais de experimentação (Lacaz, 1994). Os testes sorológicos têm valor diagnóstico em associação ao micológico e, principalmente, valor prognóstico no acompanhamento dos pacientes. As técnicas mais utilizadas atualmente são imunodifusão (Camargo *et al.*, 1989), contraímunoelctroforese (Conti-Diaz *et al.*, 1973) e fixação de complemento (Fava-Netto *et al.*, 1976; Moses, 1916). Outros testes como imunofluorescência indireta, enzimaímunoensaio (EIA) (Franco *et al.*, 1973; Restrepo & Moncada, 1972; Silva & Kaplan, 1965), MELISA (*magnetic enzyme immunosorbent assay*), hemaglutinação passiva, eritroímunoensaio (Camargo *et al.*, 1984), *immunoblotting* (Camargo *et al.*, 1989) e enzimaímunoensaio de captura (Camargo *et al.*, 1994) também podem ser utilizados para o diagnóstico da PCM. Além disso, atualmente diversos métodos que utilizam técnicas de PCR têm sido propostos visando à identificação do fungo em material biológico (Sandhu *et al.*, 1997; Goldani & Sugar 1998; Diez *et al.*, 1999; Gomes *et al.*, 2000).

O tratamento contra a PCM inicia-se com controle nutricional do paciente, repouso e a diminuição do uso de álcool e de tabaco, os quais podem agravar a doença. Este tratamento é usualmente longo, ocorrendo em muitos casos de um a dois anos de terapia. Atualmente o sulfametoxazol e o itraconazol são os anti-fúngicos de escolha para tratamento da forma leve e moderada, sendo que o último é indicado para pacientes com baixa adesão ao tratamento devido alto custo do medicamento. Anfotericina B que é recomendada no início do tratamento dos casos mais avançados (Mendes *et al.*, 1994; Valle e Costa, 2008). A doença

pode ser fatal se o paciente não fizer uso da medicação apropriada ou não seguir corretamente a terapia medicamentosa.

Os critérios de cura de PCM são divididos como cura clínica, cura micológica, cura imunológica e a cura radiológica. A cura clínica é quando o indivíduo apresenta o desaparecimento de sinais e sintomas presentes antes do tratamento, o que contempla também o retorno do peso aos níveis normais. A cura micológico é caracterizada pela negatificação dos exames nos quais os fungo foi identificado. A ausência de anticorpos circulantes contra antígenos de *P. brasiliensis* é critério de cura imunológica da PCM, baseado na negatificação da reação de imunodifusão ou sua manutenção em níveis baixos estáveis. O desaparecimento ou melhora (evolução para padrão de fibrose) das alterações radiológicas definem a cura radiológica. (Valle e Costa, 2008)

A manutenção do tratamento deve se estender por um ano após a negatificação dos testes sorológicos e o paciente deve ser reavaliado constantemente. A remissão e as sequelas de fibrose pulmonar são freqüentes na PCM (Brummer *et al.*, 1993).

1.3. Peptídeos Microbianos e resposta celular ao fungo *P. brasiliensis*

Peptídeos naturais bioativos são peptídeos derivados de proteínas que exercem ação sobre respostas fisiológicas. Esses peptídeos podem proteger organismos contra infecções, e são encontrados em espécies de diferentes vertebrados e invertebrados. Frequentemente caracterizados por pequena seqüência de aminoácidos, peptídeos naturais bioativos podem ser codificados

nas proteínas ou encontrados livres, requerendo ou não, respectivamente, hidrólises enzimáticas para serem liberados (Daffre S, *et al.* 2008).

Recentemente, começou a ser evidenciado que alguns peptídeos endógenos podem atuar como moduladores imunes. A produção de peptídeos com função moduladora, que são denominados peptídeos microbianos (AMPs), pode ser dependente de efeitos inflamatórios (Yang *et al.* 2002; Zasloff, 2002) e vasculares (Chavakis *et al.* 2004) derivados da resposta imune do hospedeiro a infecções (Brown *et al.* 2006).

A produção desses peptídeos ativos pode ser constitutiva ou induzida, dependendo da espécie, tipo celular, linhagem celular e/ou estágio de diferenciação celular (Islam *et al.* 2001). Os AMPs estimulam amplos efeitos na inflamação, imunidade inata e imunidade adaptativa, interagindo com células da imunidade inata (neutrófilos e células epiteliais) e células que fazem ligação da resposta imune inata e adaptativa (Yang *et al.* 2004; Bowdish *et al.* 2005; Selsted *et al.* 2005). Assim, esses peptídeos podem ativar, inibir ou aumentar as funções da imunidade celular.

Macrófagos são considerados as principais células de defesa contra o fungo. *In vitro*, o fungo *P. brasiliensis* multiplica-se intracelularmente após a ingestão por macrófagos pulmonares e peritoneais não ativados, os quais são destruídos liberando numerosas células leveduriformes (Brummer *et al.*, 1989). Entretanto, macrófagos ativados por IFN- γ são fungicidas (Brummer *et al.*, 1988). A indução da produção de IFN- γ leva à ativação de macrófagos que matam o fungo aparentemente pela produção de NO (Nascimento *et al.*, 2002). PMNs humanos ou murinos exercem efeito fungistático e fungicida contra o *P. brasiliensis*, os quais aumentam sob ativação do IFN- γ e GM-CSF (*granulocyte*

macrophage colony stimulating factor) (Kurita *et al.*, 2000). Monócitos do sangue periférico de pacientes com PCM, após pré-ativação com IFN- γ , são capazes de eliminar leveduras de isolado virulento ou não virulento do fungo (Calvi *et al.*, 2003). O fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) é uma citocina produzida por monócitos ou macrófagos envolvida no recrutamento e ativação de células inflamatórias e na formação do granuloma (Kindler *et al.*, 1989). IFN- γ ativa macrófagos a secretar TNF- α , o qual inibe a replicação do fungo (Souto *et al.*, 2000). Recentemente, Carmo *et al.* (2006) demonstraram que H₂O₂ liberada por monócitos ativados por TNF- α teve efeito fungicida sobre *P. brasiliensis*. Outro mecanismo efetor é o óxido nítrico (NO) liberado por macrófagos ativados, que leva à morte do fungo. A indução da NO sintase é dependente do sinergismo de ação entre IFN- γ e TNF- α e de fatores produzidos pelo próprio fungo (Nascimento *et al.*, 2002). Macrófagos peritoneais de camundongos das linhagens A/Sn e B10.A, respectivamente susceptíveis e resistentes a PCM, apresentam diferenças relevantes na secreção de citocinas. Macrófagos peritoneais de camundongos B10.A secretam altos níveis de TGF- β e baixos níveis de TNF- α , citocina que inibe a replicação do fungo. Em contraste, macrófagos de animais A/Sn liberam altos níveis de TNF- α e produzem baixas quantidades de TGF- β . A depleção *in vivo* de IFN- γ não só aboliu a resistência de camundongos A/Sn, mas também diminuiu a resistência relativa de animais B10.A. A administração de rIL-12 aumentou significativamente a resistência em camundongos susceptíveis (Calich *et al.* 1998)

Como citado anteriormente, linhagens de camundongos resistentes e susceptíveis a PCM possuem diferenças relevantes nas populações de

macrófagos e secreção de citocinas. Assim, macrófagos são importantes na resposta imune direta contra *P. brasiliensis*, já que estão relacionados com a resolução ou progressão da doença. Contudo, em nosso laboratório, foi demonstrado que gp43, principal componente antigênico do fungo é capaz de inibir funções de macrófagos como fagocitose e produção de NO e H₂O₂, atuando no mecanismo de evasão do fungo durante o estabelecimento da fase inicial da infecção (Popi, *et al.*, 2002). Considerando os papéis moleculares da gp43, que promove proteção, já que esta molécula possui epitopos importantes para apresentação de antígenos para células T, e também participa da capacidade de evasão do fungo por induzir a inibição da fagocitose, o presente trabalho teve como objetivo investigar e caracterizar epitopos da gp43 capazes de diminuir funções de macrófagos e da correspondente resposta inflamatória.

2. Objetivo

2. Objetivo

Baseado nos papéis moleculares da gp43, o presente trabalho teve como objetivo investigar e caracterizar epítomos da gp43 capazes de diminuir função fagocítica de macrófagos e a resposta inflamatória.

3. Materiais e Métodos

3. Materiais e Métodos

3.1 Soluções

Todas as soluções para as circunstâncias mais específicas serão descritas no capítulo correspondente. As soluções aqui descritas foram preparadas com água bi-destilada ou com padrão Mili-Q.

- Solução estoque de tampão fosfato-salina (PBS): NaCl 2,7378 M, KCl 0,053 M, Na₂HPO₄ 0,1301 M e K₂HPO₄ 0,0229 M. A solução estoque foi diluída 20 vezes para o uso (PBS 1X).

- Tampão de amostra para SDS-PAGE: Tris-HCl 62 mM, pH 8,8, contendo 0,2% (p/v) de SDS, β-mercaptoetanol 50 mM, 0,005% (p/v) de azul de bromofenol e 10% (v/v) de glicerol.

- Solução estoque de acrilamida/bis 30% para gel de proteína: 30% de acrilamida, 0,8% de bis-acrilamida e água bi-destilada 100 mL q.s.p.

- Tampão para gel de proteína (separação) desnaturante: Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8, contendo 0,4% de SDS (p/v).

- Tampão para gel de proteína (empilhamento) desnaturante: Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8, contendo 0,4% de SDS (p/v).

- Tampão de corrida para SDS-PAGE: Tris 25 mM, glicina 190 mM, pH 8,3, e 0,1% de SDS (p/v).

- Corante de azul de Coomassie: 0,2% de Coomassie R250 (p/V) em 50% de metanol e 10% de ácido acético (v/v).

- Descorante forte para Coomassie: 50% de metanol, 10% de ácido acético e 40% de água destilada (v/v).

- Soluções da coloração da prata:

1ª - 50% de metanol (v/v), 12% de ácido acético (v/v) e 0,05% de formaldeído (v/v).

2ª - 50% de etanol (v/v).

3ª - 0,02% de tiosulfato de sódio (p/v).

4ª - 0,2% de nitrato de prata (p/v) e 0,07% de formaldeído (v/v).

5ª - 6% de carbonato de sódio (p/v), 0,0004% de tiosulfato de sódio (p/v) e 0,05% de formaldeído (v/v).

6ª - 50% de metanol (v/v) e 12% de ácido acético (v/v).

7ª - 50% de metanol (v/v).

Todas as soluções da coloração foram preparadas com água bi-destilada.

3.2. Reagentes

Os reagentes (qualidade P.A.), kits e anticorpos utilizados foram adquiridos da Merck (S/A), Synth, Amersham Biosciences, Sigma Chemical CO, BD e Zymed. Os meios de cultivo foram adquiridos da BioBrás S/A, Difco e Sigma.

3.3. Meio para cultivo de fungos

3.3.1. Meio YPD modificado: 0,5% de extrato de levedura, 0,5% de peptona de caseína, 1,5% de dextrose (pH 6,5).

3.3.2. Meio YPD ágar: 0,5% de extrato de levedura, 0,5% de peptona de caseína, 1,5% de dextrose (pH 6,5) e 1,5 de ágar.

3.4. Isolados de *Paracoccidioides brasiliensis*

3.4.1. Manutenção dos Isolados

O isolado virulento Pb18 (gentilmente cedido pela Dra. Vera L. Calich, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de São Paulo, Brasil) foi utilizado em todos os ensaios. A manutenção do isolado foi em meio YPD ágar.

3.4.2. Produção de Exoantígeno

Cultura de células leveduriformes de *P. brasiliensis* crescidas por 5 dias em meio YPD ágar foram transferidas para frascos Erlenmeyer, contendo 50 mL de YDP modificado, e cultivadas por 3 dias a 36° C. Cada pré-inóculo foi então transferido para um frasco Fernbach contendo 400 mL de meio líquido e o fungo foi cultivado nas mesmas condições por 7 dias. As células foram separadas do sobrenadante de cultura (exoantígeno bruto) por filtração em papel de filtro. O exoantígeno foi armazenado a -20 °C.

3.5. Purificação da gp43

A glicoproteína de 43kDa foi purificada a partir do sobrenadante de cultura líquida de *P. brasiliensis* da cepa Pb18, por meio de cromatografia de afinidade em coluna de Sepharose CnBr acoplada com MAbs anti-gp43 obtidos conforme descrito por Gesztesi *et al.* (1996). O exoantígeno foi aplicado lentamente à coluna de afinidade e, após a passagem de todo material, a coluna foi exaustivamente lavada com PBS em fluxo rápido para remoção de proteínas que não se ligaram ao anticorpo. Foi eluída com tampão glicina 50 mM contendo 150 mM de NaCl pH 2,8. Frações de 2 mL foram coletadas em tubos contendo 50 µL de tampão Tris-HCl 1M, pH 9,0. O eluato da coluna foi então concentrado em amicon Y10, dialisado contra PBS e submetido a eletroforese (SDS-PAGE), com subsequente coloração pela prata, com o propósito de monitorar sua real purificação.

3.6. Meio para cultivo de células de mamíferos

3.6.1. Meio RPMI: RPMI 1640 (Sigma) acrescido de ácido N-2-hiroxietilpiperazina-N-2-etanosulfônico 10 mM (HEPES - Sigma), bicarbonato de sódio 24 mM (Sigma) e 40 µg/mL de gamicina (Schering).

3.6.2. Meio RPMI suplementado (R-10): meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB, Cultilab, Campinas).

3.7. Animais

Camundongos isogênicos da linhagem Balb/c fêmeos com 2 a 3 meses de idade foram fornecidos pelo Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais (CEDEME) da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP). A manipulação e manutenção dos animais estiveram de acordo com procedimentos padrão (*NIH Guide for Care and Use of Laboratory Animals*).

3.8. Cultura de macrófagos derivados de medula óssea

Células não diferenciadas foram extraídas da medula óssea de camundongos Balb/c com 2 a 3 meses de idade. Para tanto, o fêmur destes animais foi extraído e deixado por três minutos em álcool iodado; após este período as epífises do fêmur foram cortadas e a medula foi lavada delicadamente utilizando uma seringa de 10 mL acoplada a uma agulha de insulina. A medula foi lavada com aproximadamente 3 mL de meio RPMI-1640 (Sigma) para cada fêmur e a extração das células de

medula pode ser observada pelas gotas turvas que saem do fêmur após as lavagens. As células foram recolhidas em tubos de 15 mL (Costar) em banho de gelo. Em seguida estas células foram lavadas e ressuspensas em 10 mL de meio de diferenciação que é composto por RPMI-1640 (Sigma) e suplementado com 30% de sobrenadante de cultura de células da linhagem L929 (grandes produtores de GM-CSF) e 20% de soro fetal bovino (Gibco BRL). Essas células foram colocadas em garrafas de cultura (Costar) e mantidas em atmosfera úmida com 5% de CO₂ a 37°C por 4 dias. Após esse período foram adicionados à cultura mais 10 mL de meio de diferenciação e as células mantidas por mais sete dias nas mesmas condições.

Ao final destes sete dias considera-se que as células estejam diferenciadas em macrófagos e prontas para o uso (Zamboni & Rabinovitch, 2003). Macrófagos diferenciados foram contados e plaqueados em 5×10^5 células/poço em placa de cultura de 24 poços.

3.9. Síntese e purificação dos peptídeos

Os peptídeos foram sintetizados por Juliano MA, Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), SP, Brasil, pela técnica 9-fluoroenilmetoxicarbonil descrita por Atherton e Sheppard. Para a síntese de peptídeos foi utilizado automatizado sintetizador múltiplo de peptídeos de fase sólida (sistema PSSM 8; Shimadzu, Tóquio, Japão).

3.10. Análises gráficas dos parâmetros antigênicos e estruturais da seqüência da gp43

Os métodos de índice antigênico de Jameson-Wolff, gráfico de hidropaticidade de Kyte-Doolittle, regiões anfipáticas de alfa hélice de Eisenberg, gráfico de probabilidade de superfície de Emini, e *motifs* de complexo maior de histocompatibilidade (MHC) II de Sette foram analisados graficamente usando o programa Protean (análise da seqüência de proteína) *biocomputing* de Lasergene do Windows, 1994 (DNASTAR Inc., Madison, Wis.). Os índices antigênicos de Jameson-Wolff mostram potencial antigênico determinado por reconhecimento de anticorpo através de métodos de combinações para predição estrutural da proteína, começando com valores de hidropaticidade (Hopp-Woods) e probabilidade de superfície (Emini); e finalmente, métodos para demonstrar a flexibilidade da estrutura ou cadeia. Parâmetros de flexibilidade e hidropatia ou acessibilidade solvente são combinados para determinar os índices antigênicos. No gráfico de hidropaticidade de Kyte Doolittle, a região hidropática da proteína é mostrada através de suas seqüências de aminoácidos. Valores positivos correspondem no gráfico, à estrutura hidrofílica, e os valores negativos correspondem a estruturas hidrofóbicas. Valores de hidropatia são determinados por todos os aminoácidos e calculados com base em uma janela definida. A janela que nós usamos foi calculada com 29 e 26 aminoácidos para P4 e P23, respectivamente.

Regiões anfipáticas em hélice definem a face polar e apolar. O momento hidrofóbico de Eisenberg *et al.* (1984) detecta periodicidade na hidropaticidade protéica. O método *motifs* de MHC II de Sette prediz os epítomos peptídicos que interagem com haplotipo d de proteínas do MHC II de camundongos. O método

de I-A^d é baseado em uma seqüência padrão de hexapeptídeos de resíduos de proteína ovoalbumina de galinha.

3.11. Dosagem de Proteínas

As determinações das concentrações protéicas foram realizadas segundo método proposto por Bradford (1976), que utiliza *Coomassie brilliant blue* (CBB) G-250 (Sigma) como reativo e albumina bovina (BSA) 1,0 mg/mL como padrão. A leitura da curva padrão foi realizada em comprimento de onda de 570 nm (EIA reader Titetek, Multiskan, MCC340).

3.12. SDS-PAGE

Os procedimentos para eletroforese vertical em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970) foram executados em equipamento Mini-Protean II (Bio-Rad) conforme descrito anteriormente (Lopes *et al.*, 1983). Para a proteína em estudo foi utilizado gel de separação linear com 10% de acrilamida, em tampão Tris-HCl 1,5M, pH 8,8, contendo 0,4% de SDS (p/v) e o gel de empilhamento com 3% de acrilamida em tampão Tris-HCl 0,5M, pH 6,8, contendo 0,4% (p/v) de SDS. As amostras em análise foram dissolvidas 1:5 em tampão de amostra (Tris-HCl 62 mM, pH 6,8, contendo 0,2% (p/v) de SDS, β-mercaptoetanol 50 mM, 0,005% (p/v) de azul de bromofenol e 10% (v/v) de glicerol, fervidas por 3 minutos e aplicadas nos sulcos do gel. Os eletrodos do aparelho foram mergulhados em tampão de corrida contendo Tris 25 mM, glicina

190 mM pH 8,3 e 0,1% de SDS (p/v). As corridas eletroforéticas foram realizadas com voltagem constante de 170V. Após o término da corrida, os géis foram corados pelo método da Prata (Ansorge, 1985).

3.13. Ensaio de fagocitose

Macrófagos derivados de medula óssea foram obtidos conforme descrito no item 3.8. Aproximadamente 5×10^5 macrófagos derivados de medula óssea foram distribuídas por poço em placas de 24 poços (Costar) contendo lamínulas de vidro, e após 1 hora de incubação a 37° C em 5 % de CO₂, o sobrenadante das culturas foi aspirado para a retirada das células não aderentes. A monocamada aderente à lamínula foi lavada com RPMI 1640 e posteriormente 1 mL do meio R-10 foi adicionado e as culturas foram incubadas por 1h e 30 minutos a 37°C em 5% de CO₂. Depois deste período, os macrófagos foram novamente lavados e usados nos ensaios de fagocitose.

10 mg/mL partículas de zymosan (Sigma) foram incubados a 37°C por 2 horas com a monocamada de macrófagos na presença ou ausência dos peptídeos P4 e P23. Depois do período de incubação, as preparações foram lavadas com PBS, para retirada das partículas de zymosan. As lamínulas foram retiradas, fixadas com glutaraldeído 2,5%, coradas com HEMA3 (Fisher, Pittsburgh, PA) e analisadas ao microscópio óptico. Concentrações diferentes de peptídeos (2,5 µg/mL, 5 µg/mL, 10 µg/mL) foram adicionados ao meio de cultura no tempo zero do experimento para avaliar sua influência na habilidade fagocítica

dos macrófagos medida pelo índice fagocítico. Cada tratamento foi realizado em triplicata e o experimento repetido duas vezes.

3.14. Índices fagocíticos (IF)

Uma média de 200 macrófagos foram contados para determinar o IF calculado pela porcentagem de células fagocíticas multiplicados pelo número de partículas internalizadas.

3.15. Produção de Óxido Nítrico (NO)

A produção de NO foi determinada utilizando reação de Griess, a qual avalia o acúmulo de nitrito no sobrenadante de cultura dos macrófagos. As culturas de macrófagos derivados de medula óssea foram previamente incubadas com zymosan na presença ou ausência de P4 e P23, conforme descrito no item 3.13. O sobrenadante das culturas foram recolhidos em tubos *Eppendoff* e centrifugado por 5 minutos a 1500 x.g., para retirada de partículas de zymosan não internalizadas. Alíquotas de 50 µL de cada amostra foram transferidas para microplacas de 96 poços (Costar) e incubadas com igual volume do reagente de Griess (1% de sulfanilamida, 0,1% de dihidroclorato de naftil-etil-enediamina, 2,5% de ácido fosfórico). A avaliação dos resultados foi realizada por leitura espectrofotométrica (EIA reader Titetek, Multiskan, MCC340) em comprimento de onda 540 nm. As concentrações de NO foram preditas usando curva padrão com concentração conhecida de NaNO₂ diluído em R-10. Todas as determinações

foram realizadas em triplicatas e os resultados expressos em μM de NO. O ensaio foi feito em triplicata e o experimento repetido duas vezes.

3.16. Produção de Peróxido de Hidrogênio

A produção de peróxido de hidrogênio foi mensurada utilizando-se o método descrito por Pick & Mizel (1981) e modificado por Russo et al. (1989); pela oxidação de vermelho fenol foi possível detectar a produção de H_2O_2 .

A solução de vermelho fenol (Sigma) para os ensaios de produção de H_2O_2 consistiu de 5,5 mM de dextrose, 0,56 mM de vermelho fenol e 8,5 U/mL *horseradish* peroxidase (Sigma) em PBS pH 7,4.

Os ensaios de fagocitose (descritos no item 3.13) foram realizados em tubos eppendorfs. Para isso, as células foram desaderidas por raspagem, usando cell scraper (Nunc). As soluções celulares contendo 2×10^6 cél/mL, foram incubadas por 1h e 30 minutos a 37°C em 5% de CO_2 . Depois deste período, as amostras foram centrifugadas durante 10 minutos à 4500 x.g., à 4°C , sendo o sobrenadante desprezado. O sedimento celular formado foi ressuspenso em 1,0 mL de solução de fenol vermelho, seqüencialmente diluído e transferido para placa de 96 poços.

A curva padrão de peróxido de hidrogênio foi construída a partir de concentrações molares conhecidas de 0,5, 1, 2 e 4 nmoles de H_2O_2 em $100\mu\text{L}$ de solução de fenol vermelho.

As placas permaneceram em estufa 37°C durante uma hora. Após esse período, a reação foi interrompida com $10\mu\text{L}$ de uma solução de NaOH 1N por

poço, e a absorvância foi determinada em leitor de ELISA com filtro de 620 nm, contra branco constituído por solução de fenol vermelho.

Os resultados obtidos em densidades ópticas (D.O.) foram transformados em nmoles de água oxigenada liberados por 2×10^5 macrófagos derivados de medula óssea, mediante equação de regressão linear com base na curva padrão.

3.17. Dosagem de TNF- α em sobrenadante de cultura de células

TNF- α foi medido em sobrenadante de cultura de testes fagocíticos *in vitro*. Macrófagos foram cultivados em placas de 24 poços em RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino e 5% de meio condicionado proveniente da cultura de células L929. Partículas de zymosan (Sigma) com ou sem peptídeos da gp43 em diferentes concentrações (1,25, 2,5 e 5,0 mg/mL) foram adicionados na cultura de macrófagos. Sobrenadante de cultura foi coletado e mantido a -70°C . Para determinação de TNF- α , microplacas (Nunc) foram sensibilizadas *overnight* à temperatura ambiente com mAbs anti-TNF- α (R&D System) como recomendado pelo fabricante. Placas foram lavadas 4 vezes com PBS contendo 0,05% de tween 20 (PBS-T), e ligação não específica foi evitada pela incubação das placas por 2 horas em temperatura ambiente com 200 μl por poço de PBS-BSA 3%. Placas foram lavadas quatro vezes com PBS-T e incubadas por 2 horas com 100 μL por poço de cada sobrenadante, ou com a respectiva curva padrão de citocina (R&D System). Placas foram depois lavadas 4 vezes com PBS-T e incubadas por 2 horas em temperatura ambiente com 10 μL por poço de anticorpo anti-TNF- α (R&D System). Posteriormente, placas foram lavadas 4 vezes com PBS-T e incubadas por 20 minutos à temperatura ambiente com streptavidina-*horseradish*

peroxidase. Reações foram interrompidas com H₂SO₄ 4N (50 µL/poço). Absorbância foi medida a 450 nm com um aparato leitor de microplacas (Labsystem Multiskan MN, UNH, Santa Fe, NM, USA).

3.18. Granuloma induzido por BCG

Para avaliar a possível influência dos peptídeos na resposta inflamatória foi avaliada pela inoculação de *Mycobacterium bovis* – bacillus Calmette-Guerin (BCG Instituto Butantã, São Paulo) à concentração de 100 mg/mL no tecido subcutâneo da região dorsal da pata de camundongos fêmeos. 10⁶ CFU de BCG com ou sem adição de P4, P23 ou peptídeos irrelevantes em diferentes concentrações (5 e 50 µg/mL) foram usados. Para avaliar o grau de inflamação, a espessura das patas foi medida com auxílio de paquímetro (Mitutoyo, Japan). Foi feita uma mensuração antes da inoculação de BCG (medida normal da pata) e uma mensuração após 2, 4, 8, 12 e 24 horas após a inoculação. As demais mensurações foram feitas em intervalos de 24 horas, sempre descontando o tamanho da pata normal (por 5 dias).

3.19. Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas pelo teste t-*Student* ou quando cabível pela análise de variância (ANOVA) e o teste Tukey-Kramer utilizando o programa INSTAT (GraphPad, San Diego CA).

4. Resultados

4. Resultados

4.1. Inibição da fagocitose de partículas de zymosan por macrófagos derivados de medula óssea

Gp43 induz diminuição dos índices fagocíticos (IF) de macrófagos peritoneais estimulados por *P. brasiliensis* ou zymosan (Popi *et al.*, 2002), devido ao bloqueio da endocitose de partículas de zymosan via receptor de manose (Speert *et al.*, 1985).

Testamos o mesmo modelo utilizando macrófagos derivados de medula óssea. Culturas de macrófagos foram desafiadas com partículas de zymosan (z) por 1h30min. Os resultados demonstraram que a presença de gp43 diminui os índices fagocíticos de partículas de zymosan por macrófagos derivados da medula óssea (Figura 1). Como macrófagos utilizados nos ensaios eram derivados da medula óssea, sugere que não ocorra participação de outras células na diminuição das funções fagocíticas dos macrófagos.

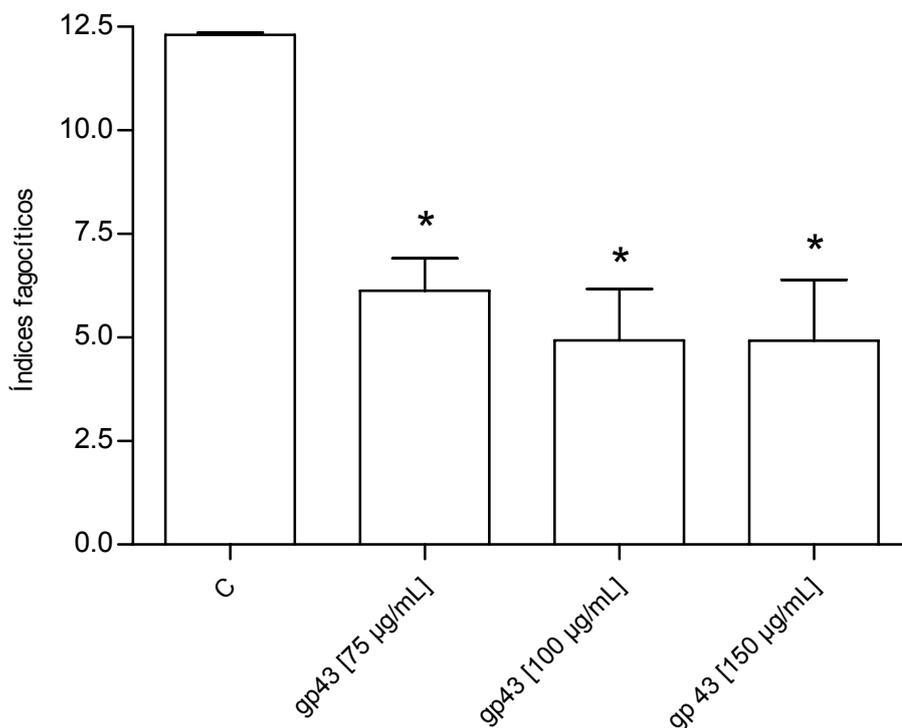


Figura 1. Influência da gp43 no índices fagocítico (IF) de partículas zymosan por macrófagos derivados de medula óssea de camundongos fêmeos Balb/c. Gp43 inibiu a fagocitose quando adicionada no meio de cultura nas concentrações 75, 100 e 150 µg/ml. As células foram coradas HEMA3 e as partículas fagocitadas foram contadas para determinar o IF com microscópio óptico (x 100). Significância (* $p < 0.05$) foi obtida nas células tratadas quando comparadas com grupo controle.

4.2. Influência dos peptídeos da gp43 na atividade fagocítica de macrófagos derivados de medula óssea

A gp43, dentro de uma série de 25 peptídeos que foram derivados da sua seqüência, tem um peptídeo de 15 aminoácidos, denominado P10, que induz a

proliferação de células do linfonodo de camundongos Balb/c sensíveis a gp43 (Taborda *et al.*, 1998). Neste trabalho investigamos quais peptídeos da gp43 desta série poderiam ser responsáveis pela diminuição dos índices fagocíticos de partículas de zymosan por macrófagos.

Para caracterizar regiões da gp43, diferentes peptídeos da gp43 foram testados nos ensaios de fagocitose (Figura 2). Exceto P8 e P20 todos os peptídeos apresentaram significativa redução no índice fagocítico. Como a gp43 inibe reação inflamatória em sua forma natural (Popi *et al.*, 2002), analisamos quais peptídeos que poderiam estar expressos na superfície da proteína e a hidrofobicidade média no gráfico Kyte-Doolittle, usando o programa Protean da Lasergene System (DNASTAR Inc.) (Figura 3). Apesar de P7 e P8 demonstrarem baixos índices fagocíticos (IF), esses peptídeos apresentam também baixas probabilidades de serem expressos na superfície. P4 e P23 apresentaram uma significativa inibição da fagocitose e alta probabilidade de serem expressos na superfície da gp43, portanto foram escolhidos para realização de experimentos posteriores.

Experimentos similares foram realizados usando diferentes concentrações de P4 e P23 recém sintetizados em *overlapping* para evitar a quebra de domínios entre as junções peptídicas (Figura 4). A inibição fagocítica foi observada em todas as concentrações testadas.

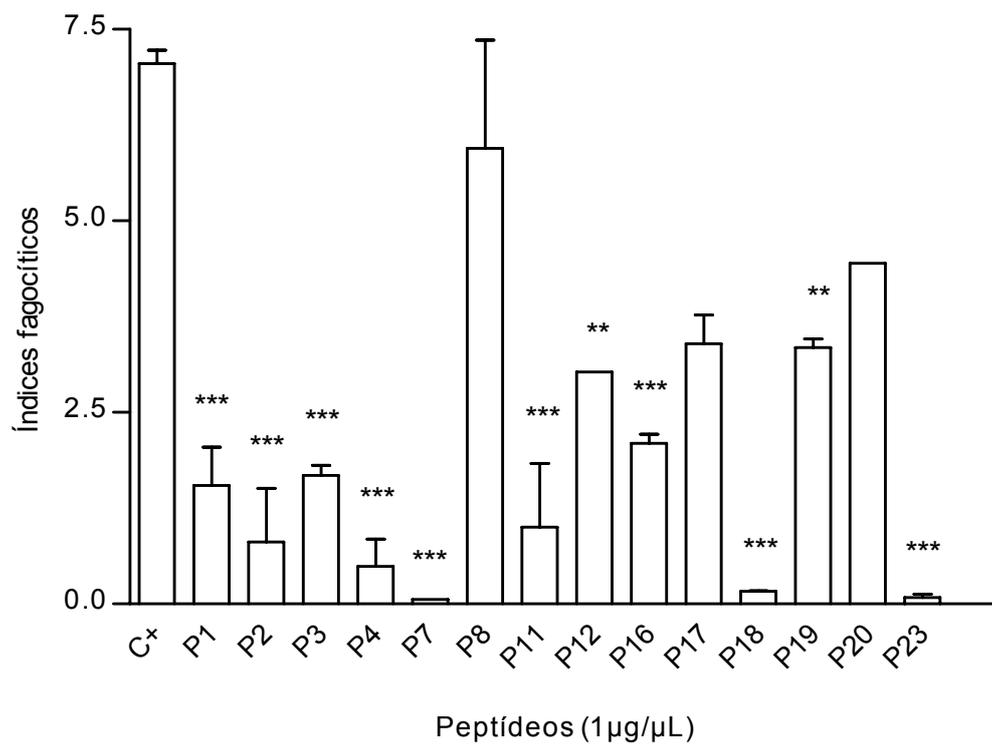
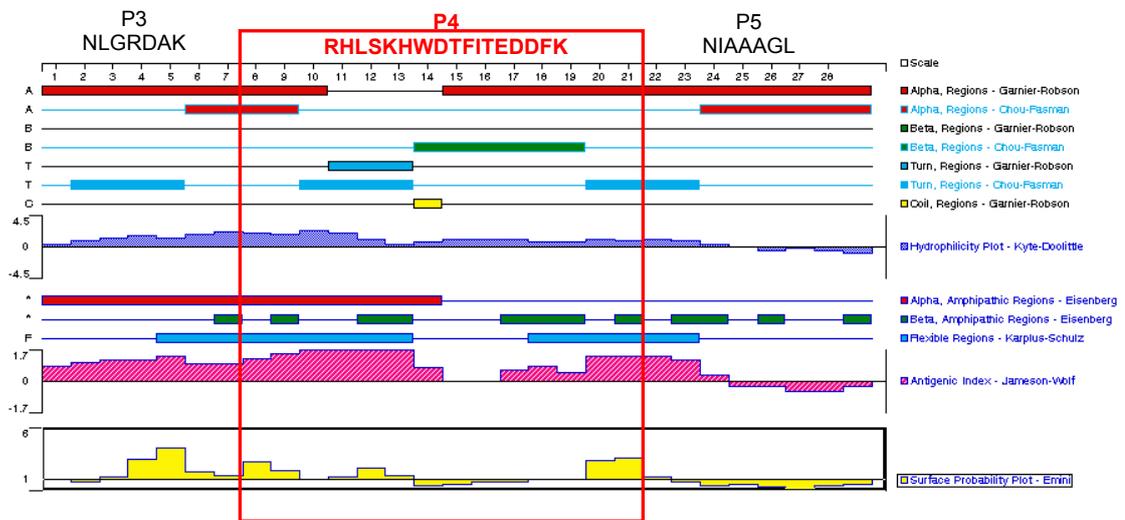


Figura 2. Influência dos 14 peptídeos seqüenciais derivados da molécula gp43 nos índices fagocíticos (IF) de partículas zymosan por macrófagos derivados de medula de camundongos Balb/c. Macrófagos foram desafiados com partículas zymosan por 1h30min. Peptídeos da gp43 inibiram a fagocitose quando adicionados no meio de cultura. As células foram coradas com HEMA3 e as partículas de zymosan foram contadas com microscópio óptico (x100) para determinar IF. Significância (**p < 0.01 e ***p < 0.0001) foi obtida quando as células tratadas foram comparadas aos grupos controles.

A



B

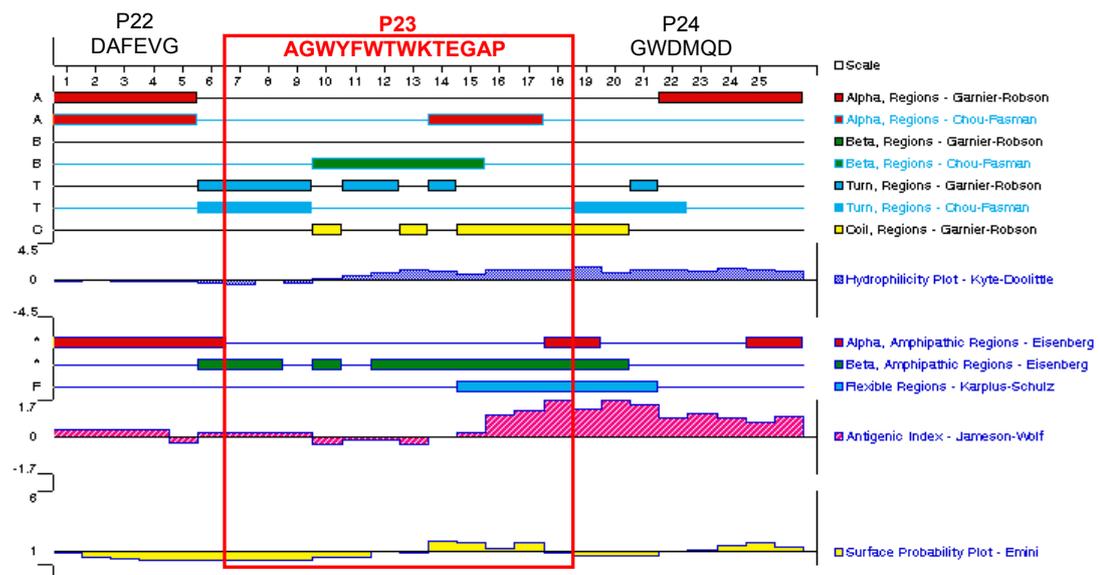


Figura 3. Análises dos gráficos de fragmentos dos peptídeos P4 e P23 da gp43, em (A) o *box* em vermelho destaca P4 e em (B) P23. (A) Índice antigênico Jameson-Wolff; (B) Campo de hidropaticidade Kyte-Doolittle (média para 11 seqüências de aminoácidos; hidropaticidade indicada pelo valor negativo); (C) Eisenberg alpha, regiões anfipáticas; (D) regiões I-Ad, *motifs* Sette MHC II; (E) Campo provável de superfície Emini. P4 e P23 têm seqüências que

possivelmente estão expostas na superfície da molécula da gp43.

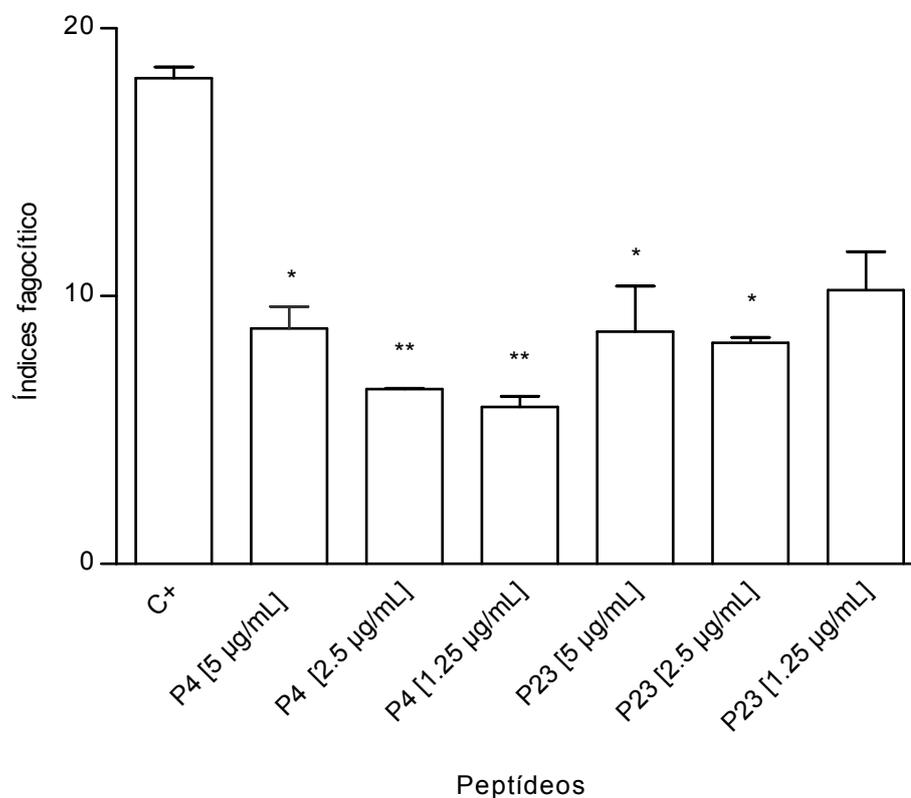


Figura 4. Influência dos peptídeos P4 e P23 nos índices fagocíticos (IF) de partículas zymosan por macrófagos derivados de medula de camundongos Balb/c. Macrófagos foram desafiados com partículas zymosan por 1h30min. Peptídeos P4 e P23 inibiram a fagocitose quando adicionados no meio de cultura. As células foram coradas com HEMA3 e as partículas de zymosan foram contadas com microscópio óptico (x100) para determinar IF. Significância (** $p < 0.01$ e *** $p < 0.0001$) foi obtida quando as células tratadas foram comparadas aos grupos controles

4.3. Participação dos peptídeos P4 e P23 na liberação de NO e H₂O₂ por macrófagos derivados da medula óssea

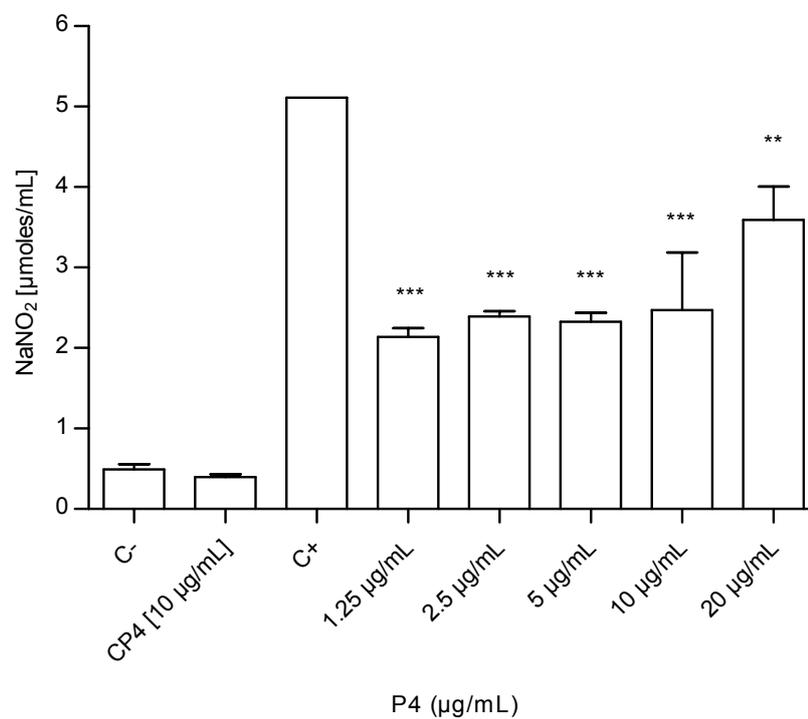
NO, H₂O₂, e outros metabólitos estão relacionados com a capacidade dos macrófagos de neutralizar antígenos (Speert *et al.*, 1985; Nascimento *et al.*, 2002).

Neste trabalho, observamos que ambos P4 e P23, em diferentes concentrações, diminuem significativamente liberação de NO em macrófagos derivados de medula óssea quando estimulados com partículas de zymosan (Figura 5). Esse resultado corrobora com dados apresentados por Popi *et al.*, 2002, que mostrou redução nos níveis de NO em macrófagos peritoneais de camundongos resistentes a PCM.

Em contraste, foi observado aumento na liberação de H₂O₂ por macrófagos derivados de medula óssea quando estimulados com partículas de zymosan na presença de P4 e P23, como demonstrado na figura 5. A adição de P4 ou P23 sem as partículas de zymosan não influenciam a liberação de NO e H₂O₂.

Esses achados apóiam a hipótese que a atividade fungicida parece ser independente da produção H₂O₂ (Brummer *et al.*, 1988; Bocca *et al.*, 1998). Mais ainda, mostram que a produção de NO é mais importante na resposta imune para o fungo *P. brasiliensis* (Bocca *et al.*, 1998; Gonzalez *et al.*, 2000).

A



B

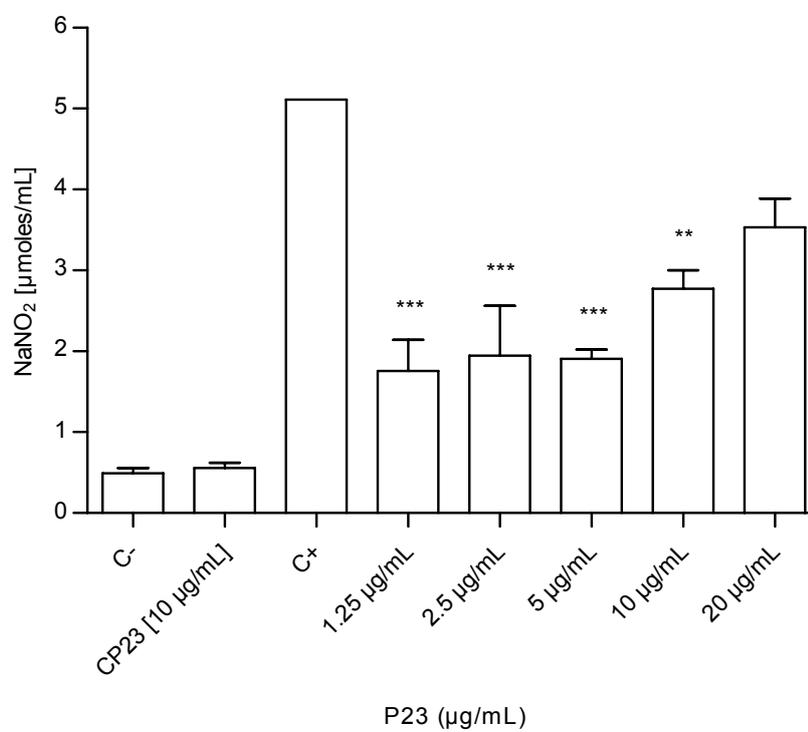


Figura 5. Influência dos peptídeos P4 (A) e P23 (B) na liberação de NO por

macrófagos derivados da medula óssea desafiados com partículas de zymosan. Foram analisadas culturas de macrófagos isolados (C-), macrófagos cultivados somente na presença de P4 ou P23 (CP4 ou CP23), desafiados somente com partículas de zymosan (C+), ou simultaneamente desafiados com partículas de zymosan e na presença de P4 ou P23 (nas concentrações de 1,25 µg/mL, 2,5 µg/mL, 10 µg/mL ou 20 µg/mL). Os sobrenadantes de cultura foram colhidos, analisados e quantificados de acordo com presença de nitrito por espectrofotometria leitura em 550 nm. $P^{**}<0.001$ e $p^{***}<0.0001$ quando comparados com o grupo controle.

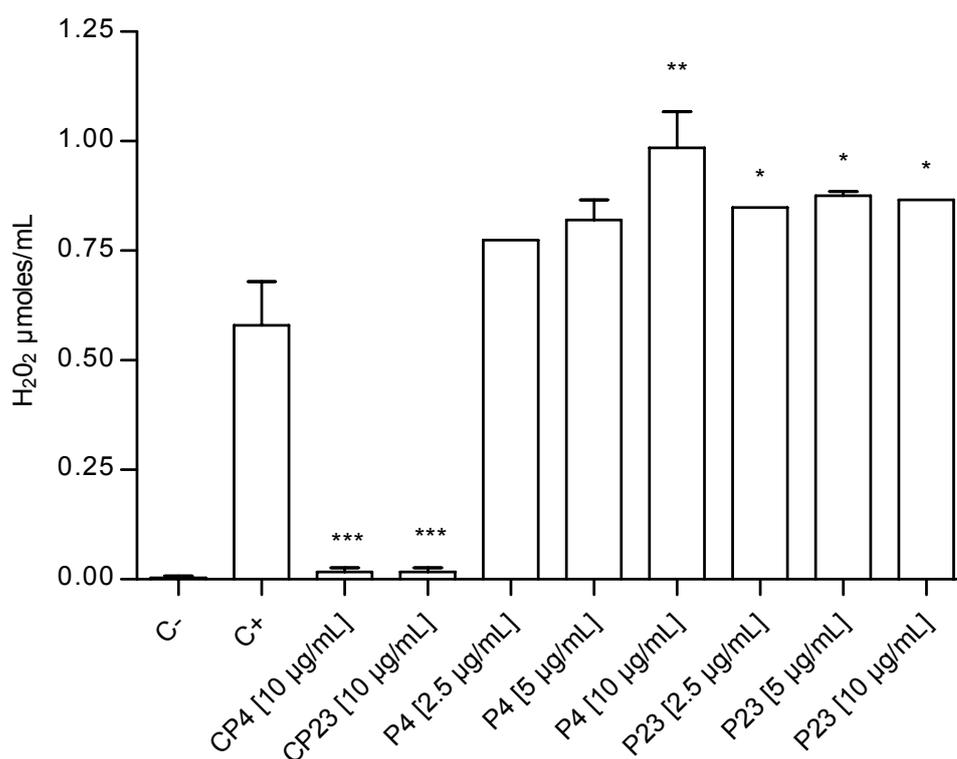


Figura 6. Influência dos peptídeos derivados da gp43 na liberação de H₂O₂ por macrófagos derivados da medula óssea desafiados com partículas de zymosan.

Foram analisadas as culturas de macrófagos isolados (C-), macrófagos cultivados somente na presença de P4 ou P23 (CP4 ou CP23), ou somente desafiados com partículas de zymosan (C+), ou simultaneamente desafiados com partículas de zymosan e na presença de P4 ou P23 (nas concentrações de 1,25 µg/mL, 2,5 µg/mL, 10 µg/mL ou 20 µg/mL). Os sobrenadantes de cultura foram colhidos, analisados e quantificados por microtitulação em placa com solução fenol vermelho, leitura em 660 nm. *p < 0.05 e P** < 0.001 quando comparados com o grupo controle.

4.4. Análise da participação de P4 e P23 na produção de TNF- α

TNF- α aparentemente confere resistência à *P. brasiliensis* por estimular formação de granuloma e produção de NO (Souto *et al.*, 2000). Para avaliar a influência de P4 e P23 na produção de TNF- α , foi feita dosagem desta citocina no sobrenadante de cultura proveniente de ensaios de fagocitoses. Houve discreta diminuição na liberação de TNF- α na presença de P4 e P23, quando comparadas ao controle (Figura 7). Como controle, outro peptídeo da gp43 que não apresentava as mesmas características de inibição dos fatores da reação inflamatória, também foi utilizado. A dosagem de TNF- α na presença do peptídeo controle mostrou-se aumentada quando comparado ao controle negativo, o que poderia ser explicado pela presença de partículas zymosan e peptídeos (dados não mostrados).

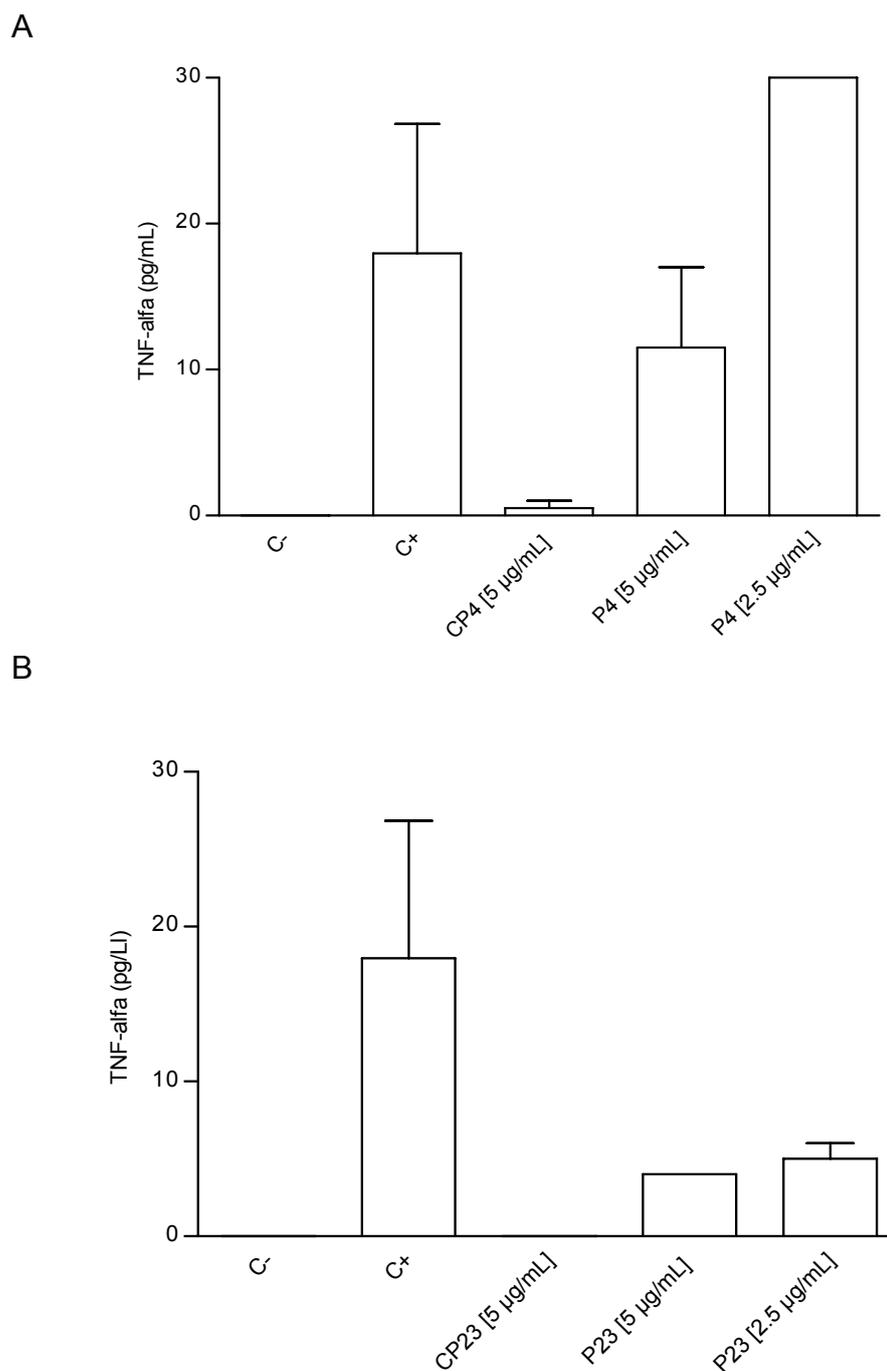
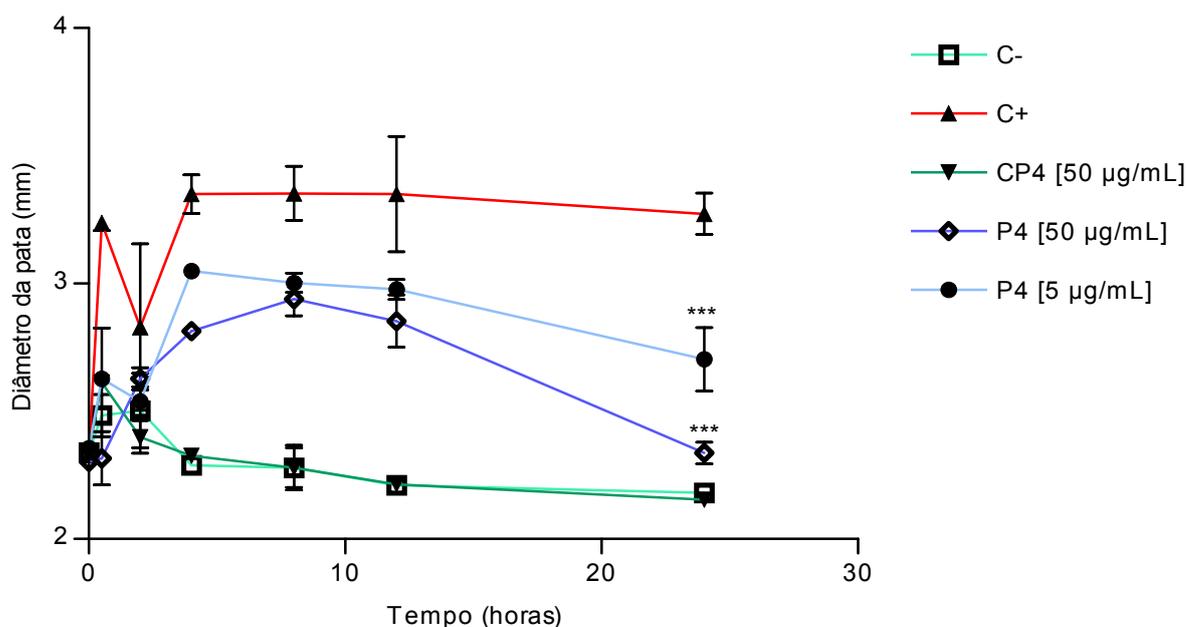


Figura 7. Concentração de TNF- α no sobrenadante de cultura dos ensaios de fagocitose. Macrófagos derivados de medula óssea foram desafiados com partículas de zymosan na presença de P4 (A) ou P23 (B). Resultados representativos de 2 experimentos independentes.

4.5. Teste de edema da pata (FPT)

Como resultados anteriores demonstraram que P4 e P23 tem efeitos inibitórios sobre marcadores de inflamação *in vitro*, testamos a capacidade desses peptídeos de diminuir inflamação *in vivo*. Para avaliar este processo foi utilizado o protocolo FTP com ou sem a co-injeção dos peptídeos. Os índices obtidos no FTP mostraram uma significativa diminuição nas primeiras 24 horas no edema das patas infectadas com BCG tratadas com P4 ou P23 (Figura 8). Depois de 24 horas os índices de FTP são equivalentes aos grupos controles e se mantém por até 5 dias, indicando possível participação dos peptídeos na redução da inflamação aguda.

A



B

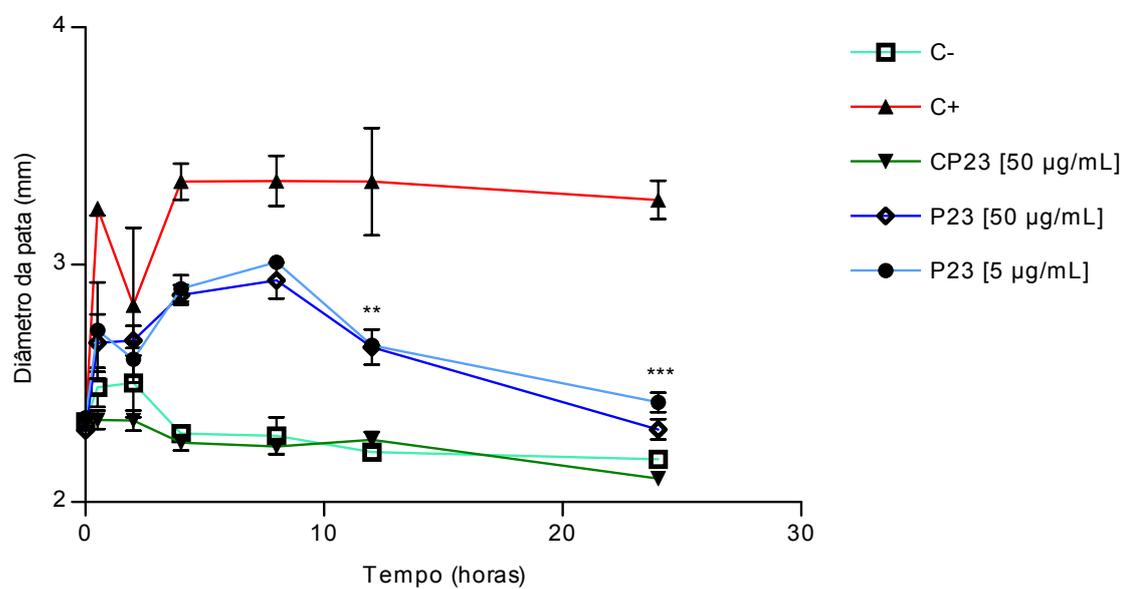


Figura 8. Efeito do tratamento com P4 (A) e P23 (B) na evolução de edemas induzidos por infecção com BCG nas patas de camundongos (n = 5). $P^{**} < 0.001$ e $p^{***} < 0.0001$ quando comparados ao grupo controles.

5. Discussão

Parasitismo é um fenômeno de co-evolução dependente por um lado de mecanismos que permitam invasão e adesão do parasita, e por outro lado resposta celular e humoral do sistema imune do hospedeiro. A interação parasita-hospedeiro pode levar a cura da doença através da eliminação do parasita, contudo o estabelecimento da doença de modo agudo ou crônico, pode levar o paciente infectado à morte. Dentre a pleora de mecanismos que suportam o parasitismo estão aqueles em que o parasita, por seleção evolucionária e adaptativa, é favorecido com propriedades capazes de desativar parcialmente a defesa do hospedeiro. Isto é chamado de mecanismo de escape ou evasão, já descrito para um grande número de parasitas. (Mendes-Giannini, *et al.*, 2000).

O mecanismo que promove estabelecimento do *P. brasiliensis* e subsequente infecção em humanos e animais experimentais é pouco estudado. Nosso grupo demonstrou que gp43 medeia um mecanismo de escape através da diminuição da função de macrófagos *in vitro* (Popi *et al.*, 2002). Estes dados sugerem que inibição da função de macrófagos poderia facilitar migração do parasita nos tecidos do hospedeiro, pelo menos na fase inicial da infecção, já que a fagocitose do fungo é mediada por receptores de manose na superfície de macrófagos (Almeida *et al.*, 1998; Speert *et al.*, 1985). Como já demonstrado, anticorpos policlonais específicos para alguns epítomos da gp43 induziram diminuição acentuada nos índices fagocíticos de macrófagos desafiados com *P. brasiliensis* (Almeida *et al.*, 1998). No entanto, um anticorpo monoclonal que

reconhece um epítipo peptídico da gp43 não interfere na interação macrófago-Pb (Almeida *et al.*, 1998). Estes dados mostram participação da gp43, a principal molécula antigênica secretada pelo fungo, na percepção do fungo por macrófagos (Almeida *et al.*, 1998).

Várias proteínas tem sido descritas como capazes de exercer múltiplas e diferentes funções, servindo como exemplo são as proteínas de matriz extracelular como fibronectina e laminina. Apesar de atuar como moléculas ligantes, elas também são capazes de alterar comportamento fenotípico de algumas células, bem como ajudar no desenvolvimento, diferenciação e migração (Mendes-Giannini *et al.*, 2000). Estas características não são fatores incomuns, já que podem ser observadas em uma variedade de moléculas, contudo a seqüência específica e a configuração responsável por cada uma dessas funções não tem sido freqüentemente demonstrada.

Várias funções vem sendo atribuídas à gp43. Como já demonstrado, a gp43 atua como ligante de fibronectina e laminina (Vicentini *et al.*, 1994; Mendes-Giannini *et al.*, 2006) e quando a ligação ocorre, há aumento na virulência e patogenicidade do fungo (Vicentini *et al.*, 1994).

Trabalhos já publicados demonstram que infecção subcutânea primária com *P. brasiliensis*, que expressa gp43 na superfície, levam a imunoproteção ou exacerbação da doença dependendo da rota de desafio (Arruda *et al.*, 2007). Isto sugere que gp43 poderia atuar no mecanismo de proteção do hospedeiro contra o fungo. O efeito protetor desta glicoproteína na infecção experimental em camundongos e humanos foi confirmado depois da imunização com peptídeo P10, parte da seqüência da gp43 (Taborda *et al.*, 1998). Este é um dos poucos

exemplos em que pequenas seqüências de uma molécula inteira são relacionadas com uma função muito específica.

Os resultados acima mencionados indicam que a molécula também pode atuar no mecanismo de evasão do fungo sugerindo que gp43 possua peptídeos capazes de induzir a contenção *Paracoccidioides brasiliensis* em vacúolos de macrófagos. Estas duas propriedades da gp43, primeiro evasão e posteriormente indução de proteção são divergentes, mas não contraditórias. Nós sugerimos que estas respostas distintas para mesma glicoproteína sejam devido a peptídeos distintos da gp43 que atuam em diferentes tempos da resposta imune. A capacidade de escape induzida pela molécula é não específica e provavelmente está envolvida com estabelecimento da doença. Somente quando a infecção é estabelecida, mecanismos imunes podem estabelecer efeitos protetores da molécula como observado depois da imunização com P10. Estes peptídeos podem ser chamados de peptídeos naturais bioativos encontrado em diferentes espécies de vertebrados e invertebrados que medeiam respostas fisiológicas e assim facilitam ou protegem organismos contra infecções. Eles são freqüentemente caracterizados por pequenas seqüências de aminoácidos e são encontrados livres ou codificados no interior de proteínas, assim sendo necessária hidrólise enzimática para liberação (Daffre *et al.*, 2008). Um exemplo de proteína que possui seqüências peptídicas com diferentes funções é cromogranina A. Esta proteína possui peptídeos que participam de processos homeostáticos distintos como regulação do metabolismo de cálcio e glicose, funções cardiovasculares, reações inflamatórias, alívio da dor, reparo tecidual, motilidade gastrointestinal e na resposta imune inata (Helle *et al.*, 2007).

Recentemente, é evidente que alguns peptídeos endógenos, geralmente chamados de peptídeos antimicrobianos (AMPs), possam também atuar como moduladores imunes e que produção deles pode depender da resposta imune do hospedeiro a infecções, envolvendo assim inflamação e efeitos vasculares (Daffre *et al.*, 2008). A produção de AMPs biologicamente ativos pode ser constitutiva ou induzível, e depende da espécie, tipo de tecido, linhagem celular e/ou estágio de diferenciação celular (Islam *et al.*, 2001). Estes peptídeos estimulam muitos efeitos importantes da inflamação, imunidade inata e adaptativa, interagindo com células que participam da resposta da resposta inata (neutrófilos e células epiteliais) e com células que fazem a ligação do sistema imune inato e adaptativo (monócitos, macrófagos e células dendríticas) (Daffre *et al.*, 2008). Isto sugere que estes peptídeos podem ativar, inibir ou aumentar as funções das células imunes. Então, nós consideramos a possibilidade que, como acontece com atividade protetora de P10, gp43 possa ter uma seqüência específica responsável pela diminuição das funções dos macrófagos.

A seleção dos peptídeos da gp43 foi realizada através do rastreamento da ação dos peptídeos por ensaios de fagocitose e análise da probabilidade de expressão dos peptídeos na superfície da molécula.

Como citado anteriormente, gp43 tem capacidade de diminuir a fagocitose de macrófagos peritoneais (Popi *et al.*, 2002). Demonstramos aqui que a gp43 e seus peptídeos P4 e P23 inibem a fagocitose de partículas de zymosan por macrófagos derivados da medula óssea. Análises da probabilidade de expressão desses peptídeos, que induziram diminuição nos índices fagocíticos, na superfície da gp43 contribuíram para seleção dos peptídeos P4 e P23 para ensaios posteriores. Uma vez que essas seqüências não estão originalmente em

overlapping, e considerando a possibilidade da perda de atividade por quebra de seqüência, nós optamos por sintetizar os peptídeos P4 e P23 com adição de 5 aminoácidos prévios e subseqüentes a seqüência da gp43 (NLGRDAKRHLSKHWDTFITEDDFKNIAAAGL e AFEVGAGWYFWTWKT EGAPGWD MQD). Contudo este detalhe não modificou a atividade dos peptídeos. Esses resultados sugerem fortemente que as moléculas P4 e P23 são capazes de modular *in vitro* fagocitose por macrófagos provenientes da medula óssea.

Há relatos que demonstram que liberação de NO por macrófagos ativado inibem a transformação do *P. brasiliensis* de conídeos para levedura, prevenindo o estabelecimento da doença (Bocca *et al.*, 1998; Gonzalez *et al.*, 2000; Borges-Walmsley *et al.*, 2002). Gp43 prejudica a fagocitose e destruição de Pb ao modular a liberação de reativos intermediários de oxigênio e nitrogênio, mediadores sabidamente envolvidos na atividade microbicida dos macrófagos (Almeida *et al.*, 1998; Popi *et al.*, 2002).

A produção espontânea de NO por macrófagos peritoniais desafiados com zymosan é inibida quando gp43 *in natura* é adicionada à cultura (Popi *et al.*, 2002). Os resultados obtidos em nosso trabalho demonstram efeito similar usando macrófagos derivados de medula óssea e os dois peptídeos, P4 e P23, derivados da gp43, enfatizando provável papel antiinflamatório desses peptídeos.

Nossos dados também indicam por ensaio similar, a atuação dos peptídeos na liberação de H₂O₂ por macrófagos derivados de medula óssea estimulados com zymosan. Esses achados suportam a concepção que a atividade fungicida parece ser independente da produção H₂O₂ (Nascimento *et al.*, 2002), reforçando a importância dos peptídeos P4 e P23 atuarem na produção de NO, já que esta é

a resposta mais importante para o fungo *P. brasiliensis* (Bocca *et al.*, 1998; Gonzalez *et al.*, 2000; Borges-Walmsley *et al.*, 2002).

AMPs podem também atuar na resposta imune adaptativa mas de forma contrária aos nossos resultados para P4 e P23. Os peptídeos antimicrobianos atuam principalmente modulando funções células dendríticas (CD) e respostas imunes antígenos-específicas, aumentando aspectos da imunidade adaptativa. Células dendríticas derivadas de monócitos primários humanos (CDs imaturas) tratadas com LL-37, que é um peptídeo antimicrobiano, foram reguladas positivamente em suas capacidades endocíticas, aumentaram a expressão de receptores fagocíticos e suas funções. CDs tratadas com LL-37 pré-incubadas com LPS (CD maduras) tiveram aumento da expressão de moléculas co-estimulatórias e aumentaram a secreção de IL-12, promovendo resposta Th1 *in vitro* (Davidson *et al.*, 2004).

A secreção de TNF- α , estimulada pela atuação INF- γ , é requerida para formação de granuloma bem formado necessário para determinar a resistência ou susceptibilidade dos camundongos a PCM (Souto *et al.*, 2000). Este fato é evidenciado por outros autores (Souto *et al.*, 2000; Deepe *et al.*, 2000), que demonstraram que camundongos *knockout* para p55, receptor de TNF- γ , são mais susceptíveis a PCM. Há evidências que relacionam a redução na produção de NO com a diminuição da formação de granulomas, levando ao aumento do número de células de leveduras viáveis (Borges-Walmsley *et al.*, 2002; Souto *et al.*, 2000). Nós observamos diminuição nos níveis de TNF- α no sobrenadante de cultura de macrófagos ativadas provenientes da medula óssea, na presença de P4 e P23, contudo essa redução na produção de TNF- α não é estatisticamente significativa.

Nosso laboratório também demonstrou em experimentos *in vivo*, que gp43 diminui edema de patas no modelo de infecção por BCG (dados não publicados). Esses dados corroboram com nossos resultados, que demonstraram diminuição nos edemas das patas camundongos quando BCG foi co-injetado com P4 e P23. Esta diminuição no edema foi evidente e significativa nas primeiras 24 horas depois da infecção e foi mantida durante 5 dias de observação. Esses dados sugerem que os peptídeos aparentemente atuam como antiinflamatório principalmente na fase aguda da resposta inflamatória e não são específicos ou limitados a infecção com PCM. Visto que P4 e P23 estão expostos na superfície da molécula, podemos sugerir que esses peptídeos tenham um papel central na função moduladora imune da gp43.

Em conclusão, nós identificamos os peptídeos P4 e P23, que são seqüências expressas na superfície da gp43 nativa e possuem efeitos inibitórios sobre resposta inflamatória. Esses peptídeos parecem atuar principalmente no início do processo inflamatório e não são específicos ou limitados a PCM. Mais ainda, provavelmente P4 e P23 são os peptídeos responsáveis pela função imunomoduladora da gp43. Assim nossos achados ampliam as perspectivas para caracterização dos mecanismos de proteção e escape do parasita no curso da infecção em nível molecular e podem levar a descrição de pequenas moléculas com aplicação na prática geral.

6. Conclusões

6. Conclusões

- Os peptídeos P4 e P23 expressos na superfície da molécula gp43 inibem a função fagocítica de macrófagos derivados de medula óssea;
- Na presença dos peptídeos P4 e P23, macrófagos derivados de medula óssea desafiados com zymosan diminuíram a produção de NO e aumentaram a liberação de H₂O₂, dados esses importantes já que NO é o principal mecanismo de defesa do hospedeiro contra *P. brasiliensis*;
- Houve diminuição na liberação de TNF- α por macrófagos derivados de medula óssea desafiados com zymosan, contudo esse aumento não foi significativo;
- Camundongos co-infectados com BCG e P4 ou P23 tiveram diminuição na resposta inflamatória aguda, sugerindo que os peptídeos selecionados da gp43 possuem ação antiinflamatória não específica apenas para PCM.

7. Referências Bibliográficas

7. Referências bibliográficas

Almeida I.C., Neville D.C., Mehlert A., Treumann A., Ferguson M.A., Previato J.O., Travassos L.R. (1996). Structure of the N-linked oligosaccharide of the main diagnostic antigen of the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Glycobiology*; 6(5):507-15. Erratum in: *Glycobiology* 1996 Dec;6(8):vii.

Almeida, S.R., Moraes, J.Z., Camargo, Z.P., Gesztesj, J.L., Marani, M., Lopes, J.L. (1998). Pattern of immune response to GP43 from *Paracoccidioides brasiliensis* in susceptible and resistant mice is influenced by antigen-presenting cells. *Cell Immunol*; 190:68-76.

Ansorge W. (1985). Fast and sensitive detection of protein and DNA bands by treatment with potassium permanganate. *J. Biochem. Biophys Methods.*; 11(1):13-20.

Aristizabal B.H., Clemons K.V., Stevens D.A., Restrepo A. (1998). Morphological transition of *Paracoccidioides brasiliensis* conidia to yeast cells: in vivo inhibition in females. *Infect Immun.*; 66(11):5587-91.

Arruda C., Kashino S.S., Fazioli R.A., Calich V.L.G. (2007) A primary subcutaneous infection with *Paracoccidioides brasiliensis* leads to immunoprotection or exacerbated disease depending on the route of challenge. *Microbes and Infection*; 9:308-316.

Bagagli E., Sano A., Coelho K.I., Alquati S., Miyaji M., de Camargo Z.P., Gomes G.M., Franco M., Montenegro M.R. (1998). Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillos (*Dasypus noveminctus*) captured in an endemic area of paracoccidioidomycosis. *Am J Trop Med Hyg.*; 58(4):505-12.

Benard G., Mendes-Giannini M.J., Juvenale M., Miranda E.T., Duarte A.J. (1997). Immunosuppression in paracoccidioidomycosis: T cell hyporesponsiveness to two *Paracoccidioides brasiliensis* glycoproteins that elicit strong humoral immune response. *J Infect Dis.*; 175(5):1263-7.

Benard G., Hong M.A., Del Negro G.M., Batista L., Shikanai-Yasuda M.A., Duarte A.J. (1996). Antigen-specific immunosuppression in paracoccidioidomycosis. *Am J Trop Med Hyg.*;54(1):7-12

Bocca A.L., Hayashi E.E., Pinheiro A.G, Furlanetto A.B., Campanelli A.P., Cunha F. Q., Figueiredo F. (1998). Treatment of *Paracoccidioides brasiliensis*-Infected Mice with a Nitric Oxide Inhibitor Prevents the Failure of Cell-Mediated Immune Response. *The Journal of Immunology*; 161: 3056-3063.

Borges-Walmsley M.I., Chen D., Shu X. and Walmsley A.R. (2002). The pathobiology of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Trends Microbiol*; 10(2):80-7. Review.

Bowdish, D.M.; Davidson, D.J.; Scott, M.G.; Hancock, R.E. (2005); *Antimicrob. Agents Chemother*; 49:1727-32.

Bradford M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.*;72:248-54.

Brown, K.L.; Hancock, R.E. (2006) Cationic host defense. (antimicrobial) peptides; *Curr. Opin. Immunol*; 18:24-30.

Brummer E., L. Hanson H., Stevens D. A. (1988). γ -interferon activation of macrophages for killing of *Paracoccidioides brasiliensis* and evidence for nonoxidative mechanisms. *Int. J. Immunopharmacol.*; 10:945.

Brummer E., Hanson L.H., Restrepo A., Stevens D.A. (1989). Intracellular multiplication of *Paracoccidioides brasiliensis* in macrophages: killing and restriction of multiplication by activated macrophages. *Infect Immun.*; 57(8):2289-94

Brummer E., Castaneda E., Restrepo A. (1993) Paracoccidioidomycosis: an update. *Clin Microbiol*; (2):89-117.

Calich,V.L.G., SingerVermes,L.M., Siqueira,A.M. & Burger,E. (1985). Susceptibility and Resistance of Inbred Mice to *Paracoccidioides brasiliensis*. British Journal of Experimental Pathology; 66, 585-594.

Calich VL, Kashino SS. (1998). Cytokines produced by susceptible and resistant mice in the course of *Paracoccidioides brasiliensis* infection.

Braz J Med Biol Res.;31(5):615-23. Review

Calich V.L., Vaz C.A., Burger E. (1998). Immunity to *Paracoccidioides brasiliensis* infection. Res Immunol.;149(4-5):407-17; discussion 499-500. Review.

Calvi S.A., Soares A.M., Peraçoli M.T., Franco M., Ruiz R.L .Jr., Marcondes-Machado J., Fecchio D., Mattos M.C., Mendes R.P. (2003). Study of bronchoalveolar lavage fluid in paracoccidioidomycosis: cytopathology and alveolar macrophage function in response to gamma interferon; comparison with blood monocytes. Microbes Infect; 5(15):1373-9

Camargo Z.P., Guesdon J.L., Drouhet E., Improvisi L. (1984). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in the paracoccidioidomycosis. Comparison with counterimmunoelectrophoresis and erythro-immunoassay.

Mycopathologia; 88(1):31-7

Camargo Z.P., Unterkircher C., Travassos L.R. (1989). Identification of antigenic polypeptides of *Paracoccidioides brasiliensis* by immunoblotting. J Med Vet Mycol.;27(6):407-12.

Camargo Z.P. & Cano L.E., Humoral immunity. In: Franco M, Lacaz CS, Restrepo-Moreno A, Del Negro G, eds. Paracoccydioidomycosis. London: Boca Raton, 1994. 187-197 p.

Cano L.E., Singer-Vermes L.M., Vaz C.A., Russo M., Calich V.L. (1995). Pulmonary paracoccidioidomycosis in resistant and susceptible mice: relationship among progression of infection, bronchoalveolar cell activation, cellular immune response, and specific isotype patterns. Infect Immun.; 63(5):1777-83.

Carmo J.P., Dias-Melicio L.A., Calvi S.A., Peraçoli M.T., Soares A.M. (2006). TNF-alpha activates human monocytes for *Paracoccidioides brasiliensis* killing by an H₂O₂-dependent mechanism. Med Mycol.;44(4):363-8.

Chavakis, T.; Cines, D.B.; Rhee, J.S.; Liang, O.D.; Schubert, U.; Hammes, H.P.; Higazi, A.A.; Nawroth, P.P.; Preissner, K.T.; Bdeir, K. (2004) Regulation of neovascularization by human neutrophil peptides (alpha-defensins): a link between inflammation and angiogenesis.; FASEB J18, 1306-8.

Cisalpino P.S., Puccia R., Yamauchi L.M., Cano M.I., da Silveira J.F., Travassos L.R. (1996). Cloning, characterization, and epitope expression of the major diagnostic antigen of *Paracoccidioides brasiliensis*. J Biol Chem.; 271(8):4553-60.

Clemons, K.V., Feldman, D., Stevens, D.A. (1989) Influence of oestradiol on protein expression and methionine utilization during morphogenesis of *Paracoccidioides brasiliensis*. J Gen Microbiol, 135, 1607-17.

Conti-Díaz I.A., Somma-Moreira R.E., Gezuele E., De Giménez A.C., Pena M.I., Mackinnon J.E. (1973). Immuno-electro-osmophoresis-immunodiffusion in paracoccidioidomycosis. Sabouraudia; 11(1):39-41. No abstract available.

Coutinho Z.F., Silva D., Lazera M., Petri V., Oliveira R.M., Sabroza P.C., Wanke B. (2002). Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980-1995). Cad Saude Publica;18(5):1441-54.

Daffre, S. ; Bulet, P. ; Spisni, A. ; Sabatier, L. E. ; Rodrigues, E. G. ; Travassos, L. R. . Bioactive natural peptides. In: Atta-ur Rahman, Editor. (Org.). Stored Natural Products Chemistry. : Elsevier, 2008, v. 35, p. -.

Davidson, D.J.; Currie, A.J.; Reid, G.S.; Bowdish, D.M.; MacDonald, K.L.; Ma, R.C.; Hancock, R.E.; Speert, D.P. (2004) The cationic antimicrobial peptide LL-37 modulates dendritic cell differentiation and dendritic cell-induced T cell polarization; J. Immunol; 172:1146-56.

De Mattos Grosso D., de Almeida S.R., Mariano M., Lopes J.D. (2003). Characterization of gp70 and anti-gp70 monoclonal antibodies in *Paracoccidioides brasiliensis* pathogenesis. *Infect Immun.*;71(11):6534-42.

Deepe, G.S. et al. (2000) Knockout mice as experimental models of virulence. *Med. Mycol.* 38, 87–98.

Diez S., Garcia E.A., Pino P.A., Botero S., Corredor G.G., Peralta L.A., Castano J.H., Restrepo A., McEwen J.G. (1999). PCR with *Paracoccidioides brasiliensis* specific primers: potential use in ecological studies. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*; 41(6):351-8.

Eisenberg D., Weiss R.M., Terwilliger T.C. (1984). The hydrophobic moment detects periodicity in protein hydrophobicity. *Proc Natl Acad Sci U S A.*; 81(1):140-4.

Fava Netto C. (1976). Paracoccidioidomycosis immunology. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*;18(1):42-53.

Figueroa J.I., Hamilton A.J., Allen M.H., Hay R.J. (1995). Isolation and partial characterization of a *Paracoccidioides brasiliensis* 58 kDa extracellular glycoprotein which is recognized by human immune sera. *Trans R Soc Trop Med Hyg.*; 89(5):566-72.

Franco, M.F., Fava Netto, C. & Chamma, L.G. (1973). Indirect immunofluorescent reaction for the serodiagnosis of South American blastomycosis. Standardization of the reaction and comparison of results with the complement fixation test. Rev Inst Med Trop Sao Paulo, 15, 393-8.

Franco M. (1987). Host-parasite relationships in paracoccidioidomycosis. J Med Vet Mycol;25(1):5-18.

Gesztesi, J.L., Puccia, R., Travassos, L.R., Vicentini, A.P., de Moraes, J.Z., Franco, M.F. & Lopes, J.D. (1996). Monoclonal antibodies against the 43,000 Da glycoprotein from *Paracoccidioides brasiliensis* modulate laminin-mediated fungal adhesion to epithelial cells and pathogenesis. Hybridoma; 15, 415-22.

Goldani L.Z., Sugar A.M. (1998). Short report: use of the polymerase chain reaction to detect *Paracoccidioides brasiliensis* in murine paracoccidioidomycosis. Am J Trop Med Hyg.;58(2):152-3.

Gomes G.M., Cisalpino P.S., Taborda C.P., de Camargo Z.P. (2000). PCR for diagnosis of paracoccidioidomycosis. J Clin Microbiol.; 38(9):3478-80.

Gomez B.L., Figueroa J.I., Hamilton A.J., Ortiz B., Robledo M.A., Hay R.J., Restrepo A. (1997). Use of monoclonal antibodies in diagnosis of paracoccidioidomycosis: new strategies for detection of circulating antigens. *J Clin Microbiol.*; 35(12):3278-83

Gonzalez A., de Gregori W., Velez D., Restrepo A., Cano L.E. (2000). Nitric oxide participation in the fungicidal mechanism of gamma interferon-activated murine macrophages against *Paracoccidioides brasiliensis* conidia. *Infect Immun.*; 68(5):2546-52.

Hanna S.A., Monteiro da Silva J.L., Giannini M.J. (2000). Adherence and intracellular parasitism of *Paracoccidioides brasiliensis* in Vero cells. *Microbes Infect.*; 2(8):877-84.

Helle K.B., Corti A., Metz-Boutigue M.H., Tota B. (2007). The endocrine role for chromogranin A: a prohormone for peptides with regulatory properties. *Cell Mol Life Sci.*;64(22):2863-86. Review.

Islam, D.; Bandholtz, L.; Nilsson, J.; Wigzell, H.; Christensson, B.; Agerberth, B.; Gudmundsson, G. (2001) Downregulation of bactericidal peptides in enteric infections: a novel immune escape mechanism with bacterial DNA as a potential regulator ; *Nat. Med*; 7:180-5.

Kashino,S.S., Calich,V.L.G., Burger,E. & SingerVermes,L.M. (1985). In vivo and In vitro characteristics of 6 *Paracoccidioides brasiliensis* strains. *Mycopathologia*; 92, 173-178.

Kindler V., Sappino A.P., Grau G.E., Piguet P.F., Vassalli P. (1989).The inducing role of tumor necrosis factor in the development of bactericidal granulomas during BCG infection, *Cell*; 56: 731-740.

Kurita N., Oarada M., Miyaji M., Ito E. (2000). Effect of cytokines on antifungal activity of human polymorphonuclear leucocytes against yeast cells of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Med Mycol.*; 38(2):177-82.

Lacaz C.S., (1994b). *Paracoccidioides brasiliensis*: morphology; evolutionary; maintenance during saphophytic life; biology, virulence, taxonomy. In: Franco M, Lacaz CS, Restrepo-Moreno A, Del Negro G, eds. *Paracoccydioidomycosis*. London: Boca Raton; 13-25 p.

Laemmli UK. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*; 15;227(5259):680-5.

Londero A.T., Severo L.C., Ramos C.D. (1980). Small forms and hyphae of *paracoccidioides brasiliensis* in human tissue. *Mycopathologia*; 29;72(1):17-9.

Londero A.T., Melo I.S. (1983). Paracoccidioidomycosis in childhood. A critical review. *Mycopathologia*; 22;82(1):49-55. Review.

Loose D.S., Stover E.P., Restrepo A., Stevens D.A., Feldman D. (1983) Estradiol binds to a receptor-like cytosol binding protein and initiates a biological response in *Paracoccidioides brasiliensis*. *Proc Natl Acad Sci U S A.*; 80(24):7659-63.

Lopes, J. D. & M. J. M. Alves. (1983). Production of monoclonal antibodies by somatic cells hybridizations, In C. M. Morel ed. *Genes and parasites. A laboratory manual*. Rio de Janeiro,. 386-398 p.

McEwen J.G., Ortiz B.L., Garcia A.M., Florez A.M., Botero S., Restrepo A. (1996). Molecular cloning, nucleotide sequencing, and characterization of a 27-kDa antigenic protein from *Paracoccidioides brasiliensis*. *Fungal Genet Biol.*; 20(2):125-31.

Mendes R.P. (1994), The gamut of clinical manifestation. In: Franco M, Lacaz CS, Restrepo-Moreno A, Del Negro G, eds. *Paracoccydioidomycosis*. London: Boca Raton, 233-252 p.

Mendes-Giannini MJ, Taylor ML, Bouchara JB, Burger E, Calich VL, Escalante ED, Hanna SA, Lenzi HL, Machado MP, Miyaji M, Monteiro Da Silva JL, Mota EM, Restrepo A, Restrepo S, Tronchin G, Vincenzi LR, Xidieh CF, Zenteno E. (2000).

Pathogenesis II: fungal responses to host responses: interaction of host cells with fungi. *Med Mycol, Suppl 1*:113-23. Review.

Mendes-Giannini MJ, Andreotti PF, Vincenzi LR, da Silva JL, Lenzi HL, Benard G, Zancoppe-Oliveira R, de Matos Guedes HL, Soares CP. (2006). Binding of extracellular matrix proteins to *Paracoccidioides brasiliensis*. *Microbes Infect*, 8(6):1550-9.

Morais F.V., Barros T.F., Fukada M.K., Cisalpino P.S., Puccia R. (2000). Polymorphism in the gene coding for the immunodominant antigen gp43 from the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Clin Microbiol.*; 38(11):3960-6.

Moscardi-Bacchi M., Brummer E., Stevens D.A. (1994). Support of *Paracoccidioides brasiliensis* multiplication by human monocytes or macrophages: inhibition by activated phagocytes. *J Med Microbiol.*; 40(3):159-64.

Moses, A. (1916). Fixação de complemento na blastomicose pp. 68-70. Mem. Inst. Oswaldo Cruz

Mota, N.G., Rezkallah-Iwasso, M.T., Peraçoli, M.T., Audi, R.C., Mendes, R.P., Marcondes, J., Marques, S.A., Dillon, N.L., Franco, M.F. (1985). Correlation between cell-mediated immunity and clinical forms of paracoccidioidomycosis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.*;79(6):765-72.

Nascimento F. R. F., Calich V. L. G., Rodríguez D., and Russo M. (2002). Dual Role for Nitric Oxide in Paracoccidioidomycosis: Essential for Resistance, but Overproduction Associated with Susceptibility. *The Journal of Immunology*. 168: 4593–4600.

Popi, F., Lopes, J.D., Mariano, M. (2002). GP43 from *Paracoccidioides brasiliensis* inhibits macrophage functions. An evasion mechanism of the fungus. *Cell Immunol*, 218(1-2):87-94.

Pick E., Mizel D. (1981). Rapid microassays for the measurement of superoxide and hydrogen peroxide production by macrophages in culture using an automatic enzyme immunoassay reader. *J Immunol Methods*.;46(2):211-26.

Pinto A.R., Puccia R., Diniz S.N., Franco M.F., Travassos L.R. (2000). DNA-based vaccination against murine paracoccidioidomycosis using the gp43 gene from *Paracoccidioides brasiliensis*. *Vaccine*; 1;18(26):3050-8.

Puccia R., Schenkman S., Gorin P.A., Travassos L.R. (1986). Exocellular components of *Paracoccidioides brasiliensis*: identification of a specific antigen. *Infect Immun.*; 53(1):199-206.

Puccia R., Travassos L.R. (1991a). 43-kilodalton glycoprotein from *Paracoccidioides brasiliensis*: immunochemical reactions with sera from patients

with paracoccidioidomycosis, histoplasmosis, or Jorge Lobo's disease. *J Clin Microbiol.*; 29(8):1610-5.

Puccia R., Travassos L.R. (1991b). The 43-kDa glycoprotein from the human pathogen *Paracoccidioides brasiliensis* and its deglycosylated form: excretion and susceptibility to proteolysis. *Arch Biochem Biophys.*;289(2):298-302.

Restrepo, A., Moncada, L.H. (1972). Indirect fluorescent-antibody and quantitative agar-gel immunodiffusion tests for the serological diagnosis of paracoccidioidomycosis. *Appl Microbiol.* 24(1):132-7.

Restrepo A., Salazar M.E., Cano L.E., Stover E.P., Feldman D., Stevens D.A. (1984). Estrogens inhibit mycelium-to-yeast transformation in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*: implications for resistance of females to paracoccidioidomycosis. *Infect Immun.*; 46(2):346-53.

Rodrigues E.G., Travassos L.R. (1994). Nature of the reactive epitopes in *Paracoccidioides brasiliensis* polysaccharide antigen. *J Med Vet Mycol.*;32(1):77-81.

Russo M., Teixeira H.C., Marcondes M.C., Barbuto J.A. (1989). Superoxide-independent hydrogen peroxide release by activated macrophages. *Braz J Med Biol Res.*;22(10):1271-3.

Salazar M.E., Restrepo A., Stevens D.A. (1988). Inhibition by estrogens of conidium-to-yeast conversion in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Infect Immun.*;56(3):711-3.

Salina M.A., Shikanai-Yasuda M.A., Mendes R.P., Barraviera B., Mendes Giannini M.J. (1998). Detection of circulating *Paracoccidioides brasiliensis* antigen in murine of paracoccidioidomycosis patients before and during treatment. *J Clin Microbiol.*; 36(6):1723-8.

San-Blas G., Nino-Vega G., Iturriaga T. (2002). *Paracoccidioides brasiliensis* and paracoccidioidomycosis: molecular approaches to morphogenesis, diagnosis, epidemiology, taxonomy and genetics. *Med Mycol.*;40(3):225-42.

Sandhu G.S., Aleff R.A., Kline B.C., da Silva Lacaz C. (1997). Molecular detection and identification of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Clin Microbiol.*; 35(7):1894-6.

Selsted, M.E.; Ouellette, A.J. (2005) Mammalian defensins in the antimicrobial immune response; *Nat. Immunol*; 6:551-7.

Silva, M.E., Kaplan, W. (1965). Specific fluorescein-labeled antiglobulins for the yeast form of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Am J Trop Med Hyg.* 14:290-4.

Souto J.T., Figueiredo F., Furlanetto A., Pfeffer K., Rossi M.A., Silva J.S. (2000) Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha determine resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* infection in mice. Am J Pathol.; 156(5):1811-20.

Speert D.P and Silverstein S.C. (1985). Phagocytosis of unopsonized zymosan by human monocyte-derived macrophages: maturation and inhibition by mannan. J Leukoc Biol. 38(5):655-8.

Stambuk, K., Puccia, R., de Almeida, M.L., Travassos, L.R., Schenkman, S. (1998). Secretion of the 43 kDa glycoprotein antigen by *Paracoccidioides brasiliensis*. J.Med.Vet.Mycol; 26(6); 367-73.

Stover, E.P., Schar, G., Clemons, K.V., Stevens, D.A., Feldman, D. (1986). Estradiol-binding proteins from mycelial and yeast-form cultures of *Paracoccidioides brasiliensis*. Infect Immun. 51(1):199-203.

Stratus, A.H., Freymuller, E., Travassos, L.R., Takahashi, H.K. (1996). Immunochemical and subcellular localization of the 43 kDa glycoprotein antigen of *Paracoccidioides brasiliensis* with monoclonal antibodies. J.med.vet.Mycol. 34(3): 181-6.

Taborda C.P., Juliano MA., Puccia R., Franco M. and Travassos L.R. (1998). Mapping of the T-Cell Epitope in the Major 43-Kilodalton Glycoprotein of

Paracoccidioides brasiliensis Which Induces a Th-1 Response Protective against Fungal Infection in BALB/c Mice. *Infect and immunity*. 66(2):786-793.

Travassos L.R. (1994). Immunochemistry of *Paracoccidioides brasiliensis* antigens. In: Franco M, Lacaz CS, Restrepo-Moreno A, Del Negro G, eds. *Paracoccydioidomycosis*. London: Boca Raton,. 67-82 p.

Valle, Antônio Carlos Francesconi do; Costa, Regina Lana Braga. Protocolo clínico para diagnóstico, tratamento e seguimento de pacientes portadores de *Paracoccidioidomycose*. Ministério da Saúde. Fio Cruz – Fundação Oswaldo Cruz – Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas. Disponível em: www.ipecc.fiocruz.br.pepesmicologiaParacocco. Acesso em: 02-08-2008.

Vicentini, A.P., Gesztesi,J.L., Franco,M.F., Desouza,W., deMoraes,J.Z., Travassos,L.R. & Lopes,J.D. (1994). Binding of *Paracoccidioides brasiliensis* to laminin through surface glycoprotein Gp43 leads to enhancement of fungal pathogenesis. *Infection and Immunity*; 62, 1465-1469.

Xander P., Vigna A.F., Feitosa L. dos S., Pugliese L., Bailão A.M., Soares C.M., Mortara R.A., Mariano M., Lopes J.D. (2007). A surface 75-kDa protein with acid phosphatase activity recognized by monoclonal antibodies that inhibit *Paracoccidioides brasiliensis* growth. *Microbes Infect*; 9(12-13):1484-92.

Yang, D.; Biragyn, A.; Kwak, L.W.; Oppenheim, J.J. (2002) Mammalian defensins in immunity: more than just microbicidal; Trends Immunol, (23) 291-6.

Yang, D.; Biragyn, A.; Hoover, D.M.; Lubkowski, J.; Oppenheim, J.J. (2004) Multiple roles of antimicrobial defensins, cathelicidins, and eosinophil-derived neurotoxin in host defense.; Annu. Rev. Immunol; 22:181-215.

Zamboni D.S., Rabinovitch M. (2003), Nitric oxide partially controls *Coxiella burnetti* phase II infection in mouse primary macrophages, Infect. Immun. 71:1225-1233.

Zasloff, M. (2002), Antimicrobial peptides of multicellular organisms; Nature; 415:389-95.

8. Abstract

Paracoccidioidomycosis (PCM) is a systemic granulomatous disease caused by *Paracoccidioides brasiliensis*, a thermal dimorphic fungus. Its major antigen is a 43-kDa glycoprotein. Gp43 embodies different functions: it participates in the evasion mechanisms during the installation of primary infection and stimulates granuloma-like formation *in vitro*, presenting T-cell epitopes that induce protective response against the fungus. Here, we investigated which epitopes from gp43 could inhibit both, macrophage functions and inflammatory reaction. Different gp43 peptides, spanning the entire sequence of the molecule, were added to cultures of bone marrow-derived macrophages. After challenge with zymosan, phagocytic indexes were measured. Peptides expressed on the molecule surface were determined by graphic analysis using the Protean module; DNASTAR Inc. Two peptides which decreased phagocytic index and were expressed in surface of molecule, P4 e P23, were selected for further studies. It was shown that both, P4 e P23 inhibited the release of NO by zymosan stimulated macrophages while enhancing release of H₂O₂. The release of TNF- α in culture supernatants from *in vitro* phagocytic tests was also inhibited in their presence. *In vivo* assays with *Mycobacterium bovis* - bacillus Calmette-Guérin (BCG) demonstrated that these peptides also presented non-specific anti-inflammatory property.

Key words: peptides, *Paracoccidioides brasiliensis*, GP43, macrophage, inflammation

Ms. Ref. No.: MICINF-D-08-00336

Title: Peptides from *Paracoccidioides brasiliensis* GP43 inhibit macrophage functions and inflammatory response
Microbes and Infection

Dear Professor José Daniel Lopes,

I am pleased to inform you that your paper "Peptides from *Paracoccidioides brasiliensis* GP43 inhibit macrophage functions and inflammatory response" has been accepted for publication in *Microbes and Infection*.

Below are comments from the editor and reviewers.

Thank you for submitting your work to *Microbes and Infection*.

Yours sincerely,

Géraldine Camus
Editorial Coordinator
Microbes and Infection

Comments from the editor and reviewers:

The authors have satisfactorily addressed most of the points raised in my initial review. The manuscript was unquestionably improved. I would highlight the fact that, in the current manuscript version, the effects of the peptides initially observed in indirectly-related systems were extended to models using Pb cells, which represents an important upgrade for the manuscript.

Elsevier Editorial System(tm) for Microbes and Infection
Manuscript Draft

Manuscript Number: MICINF-D-08-00065R1

Title: Peptides from *Paracoccidioides brasiliensis* GP43 inhibit macrophage functions and inflammatory response

Article Type: Original article

Keywords: peptides, *Paracoccidioides brasiliensis*, GP43, macrophage, inflammation

Corresponding Author: Dr José Daniel Lopes, Ph.D

Corresponding Author's Institution: Federal University of São Paulo

First Author: Adriana Yumi C Konno, Master

Order of Authors: Adriana Yumi C Konno, Master; Juliana T Maricato, PhD; Fabiana Toshie C Konno, PhD; Mario Mariano, PhD; José Daniel Lopes, Ph.D

Abstract: Paracoccidioidomycosis (PCM) is a systemic granulomatous disease caused by *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb), a thermal dimorphic fungus. Its major antigen is a 43-kDa glycoprotein. Gp43 embodies different functions: it participates in evasion mechanisms during the installation of primary infection, stimulates granuloma-like formation in vitro and presents T-cell epitopes that induce protective response against the fungus. Here, we investigated epitopes from gp43 inhibitory of both, macrophage functions and inflammatory reaction. Different gp43 peptides, spanning the entire sequence of the molecule, were added to cultures of bone marrow-derived macrophages. After challenge with zymosan or Pb cells, phagocytic indexes were measured. Peptides expressed on the molecule surface were determined by graphic analysis using the Protean module; DNAstar Inc. Two peptides which decreased phagocytic index and were expressed at the surface of the molecule, P4 and P23, were selected for further studies. It was shown that both inhibited the release of NO by zymosan stimulated macrophages while enhanced release of H₂O₂. The release of TNF- α in culture supernatants from in vitro phagocytic tests

showed different response depending of P4 concentration (data not shown). In vivo assays with *Mycobacterium bovis* - bacillus Calmette-Guérin (BCG) or Pb cells demonstrated that these peptides presented non-specific and specific anti-inflammatory properties.

Suggested Reviewers:

Opposed Reviewers:

Peptides from *Paracoccidioides brasiliensis* GP43 inhibit macrophage functions and inflammatory response

Adriana Y. C. Konno^a, Juliana Maricato^a, Fabiana T. C. Konno^a, Mário Mariano^a, José Daniel Lopes^a

^aUniversidade Federal de São Paulo - UNIFESP, Department of Microbiology, Immunology and Parasitology, Discipline of Immunology, São Paulo, Brazil

Running title: Gp43 peptides inhibit macrophage functions

CORRESPONDING AUTHOR:

José Daniel Lopes

Rua Botucatu 862, 4o floor, 04023-900, São Paulo, Brazil

Telephone: 55 11 55496073

FAX: 55 11 555723328

E-mail: jdlopes@unifesp.br

Abstract

Paracoccidioidomycosis (PCM) is a systemic granulomatous disease caused by *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb), a thermal dimorphic fungus. Its major antigen is a 43-kDa glycoprotein. Gp43 embodies different functions: it participates in evasion mechanisms during the installation of primary infection, stimulates granuloma-like formation *in vitro* and presents T-cell epitopes that induce protective response against the fungus. Here, we investigated epitopes from gp43 inhibitory of both, macrophage functions and inflammatory reaction. Different gp43 peptides, spanning the entire sequence of the molecule, were added to cultures of bone marrow-derived macrophages. After challenge with zymosan or Pb cells, phagocytic indexes were measured. Peptides expressed on the molecule surface were determined by graphic analysis using the Protean module; DNASTar Inc. Two peptides which decreased phagocytic index and were expressed at the surface of the molecule, P4 and P23, were selected for further studies. It was shown that both inhibited the release of NO by zymosan stimulated macrophages while enhanced release of H₂O₂. The release of TNF- α in culture supernatants from *in vitro* phagocytic tests showed different response depending of P4 concentration (data not shown). *In vivo* assays with *Mycobacterium bovis* - bacillus Calmette-Guérin (BCG) or Pb cells demonstrated that these peptides presented non-specific and specific anti-inflammatory properties.

Key words: peptides, *Paracoccidioides brasiliensis*, GP43, macrophage, inflammation

1. Introduction

Paracoccidioides brasiliensis is a thermal dimorphic fungus that causes a systemic granulomatous disease, Paracoccidioidomycosis (PMC), a mycosis prevalent in Latin America. The disease occurs mainly in males, whose infections probably begin by inhalation of fungal propagules which, once in the lungs, transform into the pathogenic yeast forms [1].

The main antigenic component of *P. brasiliensis* is a 43-kDa secreted high-mannose glycoprotein (gp43). It is recognized by 100% of patient's sera [2] being, like other fungal components, a ligand to concanavalin A. Gp43 plays different roles in the pathogenesis *P. brasiliensis*. On the one hand, the molecule participates in the installation mechanisms of primary infection by inhibiting both, phagocytosis and fungal intracellular killing [3]. On the other, depending on the route of immunization, the whole fungus, which express the molecule on its surface, may induce protection [4]. Gp43 also strongly stimulates *in vitro* granuloma-like formation by B-1 cells and macrophages [5]. One peptide named P10 (QTLIAIHTLAIRYAN), derived from its sequence, was shown to mediate specific T-cell activation, leading to protection against PCM in BALB/c mice without eliciting antibody production against the native antigen [6]. Such protection is characterized by a few well developed lung granulomas with either non viable yeast forms or by completely resolved lesions [7].

Considering that the whole gp43 molecule induces inhibition of phagocytosis, NO and H₂O₂ production by macrophages [3, 8], in the present study we investigated whether peptides derived from the molecule could be endowed with similar abilities, reducing macrophage functions and inflammatory response in an attempt to further understand the roles played by gp43 on the establishment and pathogenesis of the disease.

2. Material and methods

2.1. Abbreviations

Abbreviations for amino acids and nomenclature of peptide structures followed the recommendations of the IUPAC-IUB (Commission on Biochemical Nomenclature) [9].

2.2. Mice

Male or female BALB/c mice, 6–8 week-old, were obtained from CEDEME animal facility from Federal University of São Paulo (UNIFESP), SP, Brazil. Animals were sacrificed according to the Ethics Committee of UNIFESP.

2.3. Fungi and Purification of gp43

P. brasiliensis B-339, obtained from A. Restrepo-Moreno, Colombia, was grown in yeast extract-peptone-dextrose (YPD) liquid medium for 7 days at 36°C. For gp43 purification, the exoantigen was prepared as described [10] and passed through an Affi-gel 10 (Bio Rad Laboratories, Hercules, CA) column with bound anti-gp43 monoclonal antibody (mAb) 17c [11]. Gp43 was eluted with 0.1 M citric acid, pH 2.8, neutralized with 1 M Tris, pH 9.0, and further concentrated in a 10K Amicon apparatus (Amicon Division, Beverly, MA). Protein content was determined by the Bradford method [12] and every purification step was monitored by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis SDS-PAGE [13].

2.4. Peptide synthesis and purification

Peptides were kindly synthesized by Juliano MA, Federal University of São Paulo (UNIFESP), SP, Brazil, by the 9-fluoroenylmethoxycarbonyl technique [14] as

described by Atherton and Sheppard [15] with an automated benchtop simultaneous multiple solid-phase peptide synthesizer (PSSM 8 system; Shimadzu, Tokyo, Japan).

2.5. Graphic analyses of antigenicity and structural parameters of the gp43 sequence containing P4 and P23

The Jameson-Wolff antigenic index, the Kyte-Doolittle hydrophilicity plot, Eisenberg's alpha helix amphipathic regions, Emini's surface probability plot, and the Sette major histocompatibility complex (MHC)II motif method were graphically analyzed by using the Protean program (protein sequence analysis) of Lasergene biocomputing software for Windows, 1994 (DNASTAR Inc., Madison, Wis.). These protocols can predict potential antigenic determinants for antibody recognition by combining existing methods for protein structural predictions, starting with hydrophilicity values, the Emini method for surface probabilities, and methods for the prediction of backbone or chain flexibility. Flexibility parameters and hydrophobicity or solvent accessibility are combined to determine the antigenic index. In the Kyte-Doolittle hydrophilicity plot, the regional hydrophobicity of proteins is predicted from their amino acid sequences. Positive values correspond in this plot to hydrophilic structures, and negative values correspond to hydrophobic structures. Hydrophobicity values are assigned for all amino acids and are then averaged over a defined window. Amphipathic regions in helices define one polar and one apolar face. A majority of the known helper T-cell antigenic sites involve amphipathic helices. The hydrophobic moment of Eisenberg et al. [16] detects periodicity in protein hydrophobicity. The Sette MHC II motif method predicts peptide epitopes interacting with mouse MHC II haplotype d proteins. The method for I-Ad is based on a sequence pattern derived from hexapeptide residues of chicken.

2.6. Bone marrow-derived macrophages (BMM)

BMM were generated as previously described [17] from 6- to 8-week-old BALB/c mice. Cultures were kept at 37°C in the presence of 5% CO₂ in RPMI supplemented with 10% fetal bovine serum and 5% of conditioned medium from cultures of L929 cells, known to be high producers of GM-CSF. Differentiated macrophages were counted and plated at 5×10^5 cells/well onto a 24-well tissue culture plate.

2.7. Phagocytic test

Differentiated BMM were challenged with zymosan particles (Sigma[®], 2 mg/ml) or 10^6 Pb cells after incubation at 37°C for 1h30min or for 8 hours, respectively. Cells were then rinsed with PBS for removal of non-internalized zymosan, fixed for 1 h in a 2.5% glutaraldehyde solution and stained with HEMA3 (Fisher, Pittsburgh, PA) or Giemsa [3]. Different concentrations of gp43 (75, 100 and 150 µg/ml) and peptides (1µg/µl for the initial experiments and 2,5 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml for P4 and P23 experiments) were added to the culture medium at time zero of the experiments to evaluate their influence on the phagocytic ability of macrophages as measured by a Phagocytic Index (PI) [3].

2.8. Phagocytic index (PI)

An average of 200 macrophages were counted to determine the PIs calculated as the percent of phagocytic cells multiplied by the mean number of internalized particles [3].

2.9. NO release in the culture medium

Differentiated BMM were challenged with zymosan particles. Influence of peptides on PI was evaluated by adding different concentrations of P4, P23 or other irrelevant peptide to the culture medium at time zero of the experiments. After incubation for 1h30min, culture supernatants were harvested. Four aliquots (50 μ l) of each sample were transferred to wells of 96-well flat bottom microtiter plate. A serial dilution of NaNO₂ solution (5–60 μ mol) was prepared for standardization. A sample of 50 μ l of Greiss reagent solution (1% sulfanilamide, 0.1% naphthylethylenediamine dihydrochloride in 2.5% phosphoric acid) was added to wells containing sample aliquots and NaNO₂ standard solutions. Thereafter, the plates were read in a microtiter plate reader (MR 4000, Dynatech, Chantilly) at 550 nm absorbance. The amount of NO₂ in the culture samples was estimated through a reference NaNO₂ standard curve [3].

2.10. Hydrogen peroxide (H₂O₂) release by macrophages

Differentiated BMM were adjusted to 2×10^6 cells/ml in a Phenol Red solution (PBS, 5 mM dextrose, 50 μ g of horseradish type II, and 0.28 mM Phenol Red). Peritoneal cell suspensions (100 μ l) were dispensed in 96-well flat bottom microtiter plate (Costar). Different concentrations of P4 or P23 (2.5 μ g/ml, 5 μ g/ml, 10 μ g/ml) were added to the wells, plates were incubated at 37°C for 1 h and the reaction stopped by the addition of 10 μ l of 1 N NaOH solution. A standard curve for the determination of H₂O₂ concentration in the experimental tests was constructed using H₂O₂ solutions ranging from 0.5 to 4 nmol. Absorbance was measured at 620nm in a microtiter plate reader (MR 4000, Dynatech, Chantilly). Results were expressed as H₂O₂ nmoles per 2×10^6 cells [3].

2.11. Influence of peptides on the inflammatory response

The possible influence of peptides on the inflammatory response was evaluated by inoculation of *Mycobacterium bovis* - bacillus Calmette-Guérin (BCG, Butantan Institute, São Paulo, Brazil) at a concentration of 100 mg/ml or Pb cells on the subcutaneous tissue of the dorsal region of the foot-pad of female mice or male mice, respective. Five groups of five female or male BALB/c mice (8 to 10 weeks old), were used. 10^6 CFU of BCG or 2×10^6 Pb cells with or without the addition of P4, P23 or irrelevant peptides at different concentrations (5 and 50 μ g/ml) were used. The kinetics of the inflammatory response was evaluated by dial thickness gauge (Mitutoyo) at different time intervals (30 minutes, 2, 4, 8, 12, 24 hours and every 24 hours for 7 days) [18].

3. Results

3.1. Phagocytosis of Zymosan by BMM

Gp43 induces a dose-dependent decrease in the PIs of peritoneal macrophages using zymosan particles [19]. Here we confirmed this property using BMM. Cultured BMM were challenged with zymosan particles for 1h30min. Results show that addition of gp43 to the culture medium significantly inhibits the PIs of zymosan particles (Fig. 1A). This observation is relevant since cultures of BMM are not contaminated with other cell types such as B-1 cells which may present similar phagocytic properties.

3.2. Influence of peptides from gp43 on the phagocytic activity of BMM

To characterize which regions of gp43 were responsible for the inhibition effects, different gp43 peptide sequences were tested in phagocytic assays using BMM (Fig.1B). A reduction in the PI was always observed except for P8 and P20. Since gp43 inhibits the inflammatory reaction in its natural form [3], we checked which peptides could be exposed at the surface of the protein, as the Kyte-Doolittle plot deals with polar and non-polar sequences, the former having higher probability of being exposed (Figure 2). So, peptides P7 and P18 produced the smallest PI indexes, but their probability of being at the protein surface was low. Contrarywise, P4 and P23 showed significant inhibition of phagocytosis with high probability to be at the gp43 surface. These data justified the use of these peptides in further experiments. To avoid affinity differences between single peptides and the whole gp43 molecule, peptides were always used at concentrations of approximately one hundred fold higher than the concentration used for complete protein.

Similar experiments were performed using different concentrations of newly-synthesized extended P4 (with 5 more amino acids from P3 and P5 at its beginning and end, respectively) and P23 (with 5 more amino acids from P22 and P24). These extended peptides intended to avoid splitting possible binding domains laying between two peptide junctions thus diminishing their activity with challenged with zymosan (Fig. 3A) or Pb cells (Fig. 3B). Phagocytosis inhibition was similar and observed with all concentrations tested.

3.3. Influence of P4 and P23 on the liberation of NO and H₂O₂ by BMM

NO, H₂O₂ and other free metabolites are related with the killing capacity of macrophages [20]. Popi *et al.* [3] demonstrated that gp43 down-regulated NO liberation by peritoneal macrophages from PCM resistant mice. We observed that both, P4 and P23, at different concentrations, also significantly down-regulated NO liberation by BMM stimulated with zymosan particles (Fig. 4A and 4B). Conversely, H₂O₂ liberation by BMM stimulated with zymosan particles was enhanced when treated with P4 or P23, as shown in Fig 4C. Addition of P4 or P23 alone, in the absence of zymosan, had no influence on both, NO and H₂O₂ release (Fig. 4).

3.4. Footpad Swelling Test (FPT)

Considering the inhibitory effect of P4 or P23 observed *in vitro*, we investigated whether these peptides had any effect on the kinetics of inflammation elicited by BCG or Pb cells inoculation into the subcutaneous tissue of the animals. Fig. 5 shows a significant decrease in FPT swelling indexes with addition of P4 or P23 in the first 24 hours after inoculation either with BCG (Fig. 5A and B) or Pb cells (Fig. 5C and D). After 24 hours FTP indexes were equivalent to control groups and

were so maintained until the end of the assay (7 days). These data indicate that both peptides are endowed with anti-inflammatory activity at least in the initial phase of the inflammatory response.

4. Discussion

The mechanisms which govern Pb establishment and subsequent infection in humans and experimental animals are poorly understood. Our group has demonstrated that Gp43 mediates an escape mechanism by down regulating macrophage functions *in vitro* [3]. These data allowed us to hypothesize that inhibition of macrophage functions might facilitate the homing of parasite in host's tissue, at least in the initial phase of infection, since phagocytosis of Pb is mediated by mannose receptors on macrophage surface [8, 19]. This finding was further demonstrated when polyclonal antibodies directed to some gp43 epitopes induced a marked decrease on the phagocytic indexes of macrophages challenged with Pb [8]. However, a mAb which recognizes a peptidic epitope of gp43 did not interfere with the interaction macrophage–Pb [8]. These data attest the participation of gp43, the main antigenic molecule secreted by the fungus, on its uptake by macrophages [8]. Several proteins have been described as able to exert multiple and different functions, the best example of which are those from the extracellular matrix such as laminin and fibronectin. Besides acting as binding molecules, they are also able to alter phenotypic behavior of some cells, as well as to help in their development, differentiation and migration [23]. While these characteristics are not an uncommon feature, since they can be shown for a variety of molecules, their specific sequences or configurations responsible for each of those functions have not been frequently pinpointed.

The various attributes so far described for gp43 allows its adding to that list. It has been characterized as a ligand to both, laminin and fibronectin [24, 25] and, when bound to the former, it was able to increase the virulence and pathogenicity of *P.*

brasiliensis [24]. This finding was not unique since similar consequences had already been described for *Trichomonas vaginalis* and *Tritrichomonas foetus* [26].

As far as PCM is concerned, gp43 might also have a role in the protection mechanisms against the fungus. Previous work demonstrated that the primary subcutaneous infection with *P. brasiliensis*, which expresses gp43 on its surface, led to immune protection or exacerbated disease depending on the route of challenge [27]. The protective effect of this glycoprotein against experimental infection in mice and humans was confirmed after immunization with peptide P10, part of the sequence of gp43 [6]. This has been one of those few examples in which a short sequence of the whole molecule was correlated with one very specific function.

The above mentioned results indicating that the molecule can also act as evasion mechanism of the fungus suggest that gp43 might have peptides able to shelter Pb in macrophage vacuoles. These two properties of gp43, evasion first and induction of protection after, are divergent but not contradictory. We hypothesize that these distinct responses for the same glycoprotein are due to discriminated peptides of gp43 acting at different times of the immune response. The escape property induced by the molecule is non-specific and probably involved with the establishment of the disease. Once infection is established, immune mechanisms can support the protective effect of the molecule as observed after P10 immunization. These peptides can be enrolled among Bioactive Natural Peptides found in different vertebrate and invertebrate species which mediate a number of physiological responses that lead to protection or facilitation of the organisms against infections. They are often characterized by short amino acid sequences and found either free or encrypted in proteins, thus requiring enzymatic hydrolysis for their release [28].

Recently, it has become evident that some endogenous peptides, generally named Antimicrobial Peptides (AMPs), can also act as immune modulators and that their production may depend on the host immune response to infections, involving inflammation and vascular effects [28]. Production of biologically active AMPs may be constitutive or inducible, and dependent on the species, tissue type, cellular lineages and/or differentiation stage of the cells [29]. Those peptides stimulate a broad range of effects relevant to inflammation, innate immunity and adaptive immunity, interacting with innate immune cells (neutrophils and epithelial cells) and with cells that bridge the innate and adaptive immune system (monocytes, macrophages, dendritic cells) [28]. This suggests that these peptides can activate, inhibit or increase immune cellular functions. So, we considered the possibility that, as happens with the protective activity of P10, gp43 might have specific sequences responsible for its down regulatory activity on macrophage functions.

Herein we demonstrated that gp43 and its derived peptides P4 and P23 inhibit phagocytosis of zymosan particles by BMM. The choice of the peptides was carried out by measuring their activity in phagocytosis assays. Analyses of the probability of these peptides responsible for smaller rates of PIs being expressed at the surface of the molecule helped in their selection. Since these sequences were not originally overlapping, and considering the possibility of losses in activity for broken sequences, the chosen peptides P4 and P23 were synthesized with addition of 5 previous and subsequent amino acids of the gp43 sequence (*NLGRDAKRHLSKHWDTFITEDDFKNIAAAGL* and *AFEVGAGWYFWTWKTEGAPGWDMD*). This detail, however, did not modify their activity. Our observations indicated that the addition of P4 and P23 peptides to BMM cultures modulated phagocytosis *in vitro* of both, BCG or *P. brasiliensis* cells.

NO liberation by activated macrophages inhibits the transformation of *P. brasiliensis* conidia to yeast, preventing the establishment of the disease [30]. Gp43 impairs macrophage phagocytosis and destruction of Pb by modulating the liberation of intermediary reactive molecules of oxygen and nitrogen, mediators involved in their microbicidal activity [3,8]. NO production by peritoneal macrophage challenged with zymosan particles is inhibited when gp43 *in natura* is added to culture [3]. Results here presented showed similar effects using BMMs and either P4 or P23 peptides. The absence of a dose dependent curve and the fact that higher concentrations of peptides induce less NO production are probably due to the circumstance that we always worked outside that dose-response range. Studies are now being conducted to better explain these findings. Our data also indicate that H₂O₂ release by similar assays was stimulated by those peptides, supporting the idea that the fungicide activity is independent of H₂O₂ production [20]. This finding reinforces the importance of P4 and P23 on NO production, assumed as the most important response against *P. brasiliensis* [1,30]. There is evidence correlating reduced NO production with diminution of granuloma formation, leading to increased numbers of viable yeast cells [1,21]. Despite being measured, no difference was seen for TNF- α levels (data not shown). Thus, our experiments with NO could not be correlated with levels TNF- α in culture. This parallel expect phenomenon (TNF- α increase), however, justifies further experiments.

Our laboratory also showed that gp43 inhibits footpad edema in the BCG mouse model [unpublished data]. Our findings corroborated these results by showing edema diminution in mice footpads when BCG or Pb cells were co-injected with P4 or P23. This decrease in edema was noticeable and significant in the first 24 hours after injection and maintained for seven days of observation. These data indicate that the

peptides apparently can act as anti-inflammatory agents mainly in the acute phase of the inflammatory response and are not specific to PCM infection. Since they are exposed at the molecule surface, it can be assumed that they play a central role in the immune modulating functions of gp43. Our findings open a new approach to characterize mechanisms of protection or escape of parasites in the course of infection at molecular levels and may lead to the description of small molecules with application in the general practice.

5. ACKNOWLEDGEMENTS

We are thankful to Prof. L.R. Travassos for gp43 peptides, Prof. L.V. Rizzo for TNF- α measurements, and Creuza R. Oliveira for technical assistance.

References:

1. M.I. Borges-Walmsley, D. Chen, X. Shu and A.R. Walmsley, The pathobiology of *Paracoccidioides brasiliensis*. Trends Microbiol. 10 (2002) :80-7.
2. Z. P.Camargo, C. P Taborda, E. G.Rodrigues, and L. R. Travassos, The use of cell-free antigens of *Paracoccidioides brasiliensis* in serological tests, J. Med. Vet. Mycol. 29 (1991) 31-8.
3. A.F. Popi, J.D. Lopes, M. Mariano, GP43 from *Paracoccidioides brasiliensis* inhibits macrophage functions. An evasion mechanism of the fungus. Cell Immunol, 218 (2002) 87-94.
4. V.L. Calich, S.S. Kashino, Cytokines produced by susceptible and resistant mice in the course of *Paracoccidioides brasiliensis* infection, *Braz J Med Biol Res.* 31 (1998) 615-23.
5. A.F. Vigna, S.R Almeida, P. Xander, E. Freymuller, M. Mariano , J.D. Lopes, Granuloma formation in vitro requires B-1 cells and is modulated by *Paracoccidioides brasiliensis* gp43 antigen, *Microbes Infect.* 8 (2006) 589-97.
6. C.P. Taborda, M.A. Juliano, R. Puccia, M. Franco, L.R.Travassos, Mapping of the T-Cell Epitope in the Major 43-Kilodalton Glycoprotein of *Paracoccidioides brasiliensis* Which Induces a Th-1 Response Protective against Fungal Infection in BALB/c Mice, *Infected and immunity.* 66 (1998) 786-793.
7. S.R. Almeida, J.Z. Moraes, Z.P. Camargo, J.L. Gesztesi, M. Marani J.L. Lopes, Pattern of immune response to GP43 from *Paracoccidioides*

- brasiliensis* in susceptible and resistant mice is influenced by antigen-presenting cells, *Cell Immunol.* 190 (1998) 68-76.
8. S.R. Almeida, C.S. Unterkircher, Z.P. Camargo, Involvement of the major glycoprotein (gp43) of *Paracoccidioides brasiliensis* in attachment to macrophages, *Med Mycol.* 36 (1998) 405-11.
 9. IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature, Symbols for amino-acid derivatives and peptides. Recommendations, *J Biol Chem.* 247 (1972) 977-83.
 10. Z.P. Camargo, R.G. Baruzzi, S.M. Maeda, M.C. Floriano, Antigenic relationship between *Loboa lobo* and *Paracoccidioides brasiliensis* as shown by serological methods, *Med. Mycol.* 36 (1998) 413-417.
 11. J.L. Gesztesi, R. Puccia, L.R. Travassos, A.P. Vicentini, J.Z. Moraes de, M.F. Franco, J.D. Lopes, Monoclonal antibodies against the 43,000 Da glycoprotein from *Paracoccidioides brasiliensis* modulate laminin-mediated fungal adhesion to epithelial cells and pathogenesis, *Hybridoma.* 15 (1996) 415-422.
 12. M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal Biochem.* 72 (1976) 248-54.
 13. U.K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature.* 227 (1970) 680-685.
 14. I.Y. Hirata, M.H.S. Cezari, C. R. Nakaie, P. Boschkov, A.S. Ito, M.A. Juliano, and L. Juliano, Internally quenched fluorogenic protease substrates: solid phase synthesis and fluorescence spectroscopy of

- peptides containing ortho-amino benzoyl/dinitrophenyl groups as donor-acceptor pairs, *Lett. Pept. Sci.* 1 (1994) 299–308.
15. B. Atherton, R.C. Sheppard (Eds.), *Solid phase peptide synthesis: a practical approach*. Oxford University Press, Oxford, England, 1989.
 16. D. Eisenberg, R. M. Weiss, T.C. Terwilligen, The hydrophobic moment detects periodicity in protein hydrophobicity, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 81 (1984) 140–144.
 17. D.S. Zamboni, M. Rabinovitch, Nitric oxide partially controls *Coxiella burnetti* phase II infection in mouse primary macrophages, *Infect. Immun.* 71 (2003) 1225-1233.
 18. M.R. Kreuger, D.R. Tames, M. Mariano, Expression of NO-synthase in cells of foreign-body and BCG-induced granulomata in mice: influence of L-NAME on the evolution of the lesion, *Immunology.* 95 (1998) 278-82.
 19. D.P. Speert, S.C. Silverstein, Phagocytosis of unopsonized zymosan by human monocyte-derived macrophages: maturation and inhibition by mannan, *J Leukoc Biol.* 38 (1985) 655-8.
 20. F.R.F. Nascimento, V.L.G. Calich, D. Rodríguez, M. Russo, Dual Role for Nitric Oxide in Paracoccidioidomycosis: Essential for Resistance, but Overproduction Associated with Susceptibility, *The Journal of Immunology.* 168 (2002) 4593–4600.
 21. J. T. Souto, F. Figueiredo, A. Furlanetto, K. Pfeffer, M. A. Rossi, J. S. Silva, Interferon- γ and tumor necrosis factor $-\alpha$ determine resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* infection in mice, *Am. J. Pathol.* 156 (2000) 1811-1820.

22. M.J. Mendes-Giannini, M.L. Taylor, J.B. Bouchara, E. Burger, V.L. Calich, E.D. Escalante, S.A. Hanna, H.L. Lenzi, M.P. Machado, M. Miyaji, J.L. Monteiro Da Silva, E.M. Mota, A. Restrepo, S. Restrepo, G. Tronchin, L.R. Vincenzi, C.F. Xidieh, E. Zenteno, Pathogenesis II: fungal responses to host responses: interaction of host cells with fungi, *Med Mycol.* 38 (2000) 113-23.
23. W.F. Liu, C.S. Chen, Cellular and multicellular form and function, *Adv Drug Deliv Rev.* 59(2007) 1319-28.
24. A.P. Vicentini, J.L. Gesztes, M.F. Franco, W. de Souza, J.Z. de Moraes, L.R. Travassos, J.D. Lopes, Binding of *Paracoccidioides brasiliensis* to laminin through surface glycoprotein gp43 leads to enhancement of fungal pathogenesis, *Infect. Immun.* 62 (1994) 4–7.
25. M.J. Mendes-Giannini, P.F. Andreotti, L.R. Vincenzi, J.L. Da Silva, H.L. Lenzi, G. Benard, R. Zancoppe-Oliveira, H. De Matos Guedes, C.P. Soares Binding of extracellular matrix proteins to *Paracoccidioides brasiliensis*. *Microbes Infect.* 8 (2006) 1550-9.
26. F. Casta e Silva Filho, W. de Souza, J.D. Lopes, Presence of laminin-binding proteins in trichomonads and their role in adhesion, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 85 (1988) 8042-6.
27. C. Arruda, S.S. Kashino, R.A. Fazioli, V.L.G. Calich A primary subcutaneous infection with *Paracoccidioides brasiliensis* leads to immunoprotection or exacerbated disease depending on the route of challenge, *Microbes and Infection.* 9 (2007) 308-316.

28. S. Daffre, P. Bulet, A. Spisni, L. Ehret-Sabatier, E.G. Rodrigues, L.R. Travassos (Eds), Bioactive Natural Peptides. In: Atta-ur Rahman, Editor. (Org.). Stored Natural Products Chemistry; Elsevier, 2008, v.35, p.-.
29. D. Islam, L. Bandholtz., J. Nilsson, H. Wigzell, B. Christensson, B. Agerberth, G. Gudmundsson, Downregulation of bactericidal peptides in enteric infections: a novel immune escape mechanism with bacterial DNA as a potential regulator, Nat. Med. 7(2001) 180-5.
30. A. González, W. De Gregori, D. Vélez, A. Restrepo and L.E. Cano, Nitric Oxide participation in the fungicidal mechanism of Gamma-IFN-activated murine macrophages against *Paracoccidioides brasiliensis* conidia, Infect. Immun. 68(5) (2000) 2546 – 2552.

Legends to Figures

Fig. 1. Influence of gp43 and 14 peptides spanning the whole sequence of the native gp43 molecule on the phagocytic indexes (PI) of zymosan by BMM from BALB/c mice. (A) Gp43 inhibited phagocytosis when added to the culture medium on concentrations of 75, 100, and 150 µg/ml. (B) Peptides derived from gp43 inhibited phagocytosis when added to the culture medium. Cells were stained with HEMA3 and counted to determine PIs with an optical microscope (x100). Significance (*p < 0.05, **p < 0.01 and ***p < 0.0001) was obtained when treated cells were compared with control group.

Fig. 2. Graphic analysis of a 28 and 25-amino-acid fragments (represented by the scale at the bottom) from the gp43 sequence containing P4 (A) and P23 (B). (a) Jameson-Wolff antigenic index; (b) Kyte-Doolittle hydrophilicity plot (averaged to 11 amino acid sequences; negative values indicate hydrophobicity); (c) Eisenberg alpha, amphipathic regions; (d) I-Ad regions, Sette MHC II motifs; (e) Emini surface probability plot. Sequences of P4 and P23 are supposed to be exposed at the surface of gp43 molecule.

Fig. 3. Influence of peptides P4 and P23 on the PIs of zymosan or Pb yeast cells by BMM from BALB/c mice. Macrophages were challenged with zymosan for 1h30min (A) or Pb cells for 8 h (B). Peptides P4 and P23 inhibited phagocytosis when added to the culture medium. Cells stained with HEMA3 or GIEMSA were counted to determine PI with an optical microscope (x100). Significance (**p < 0.01 and ***p < 0.0001) was obtained when treated cells were compared with control group.

Fig. 4. Influence of gp43 peptides on NO and H₂O₂ release by BMM from BALB/c mice challenged with zymosan. Macrophages were simultaneously challenged with zymosan, P4 or both or zymosan, P23 or both. Macrophages were not stimulated in control group. Peptides P4 and P23 inhibited the release of NO (A and B, respectively). (C) Peptides enhanced the release of H₂O₂. Culture supernatants were harvested and the amount of nitrite analyzed in a microtiter plate reader at 550 nm absorbance for determination of NO, and the culture supernatants were harvested and measured at 620 nm absorbance to determine the amount of H₂O₂ released. *p < 0.05, P** < 0.001 and p***<0.0001 when values were compared with control group.

Fig. 5. Effect of treatment with P4 and P23 on the evolution of BCG-induced edemas (A and B) or Pb cells (C and D) in the footpad of mice (n=5 per group). P** < 0.001 and p***<0.001 when values were compared with control group.

Figure 1
[Click here to download high resolution image](#)

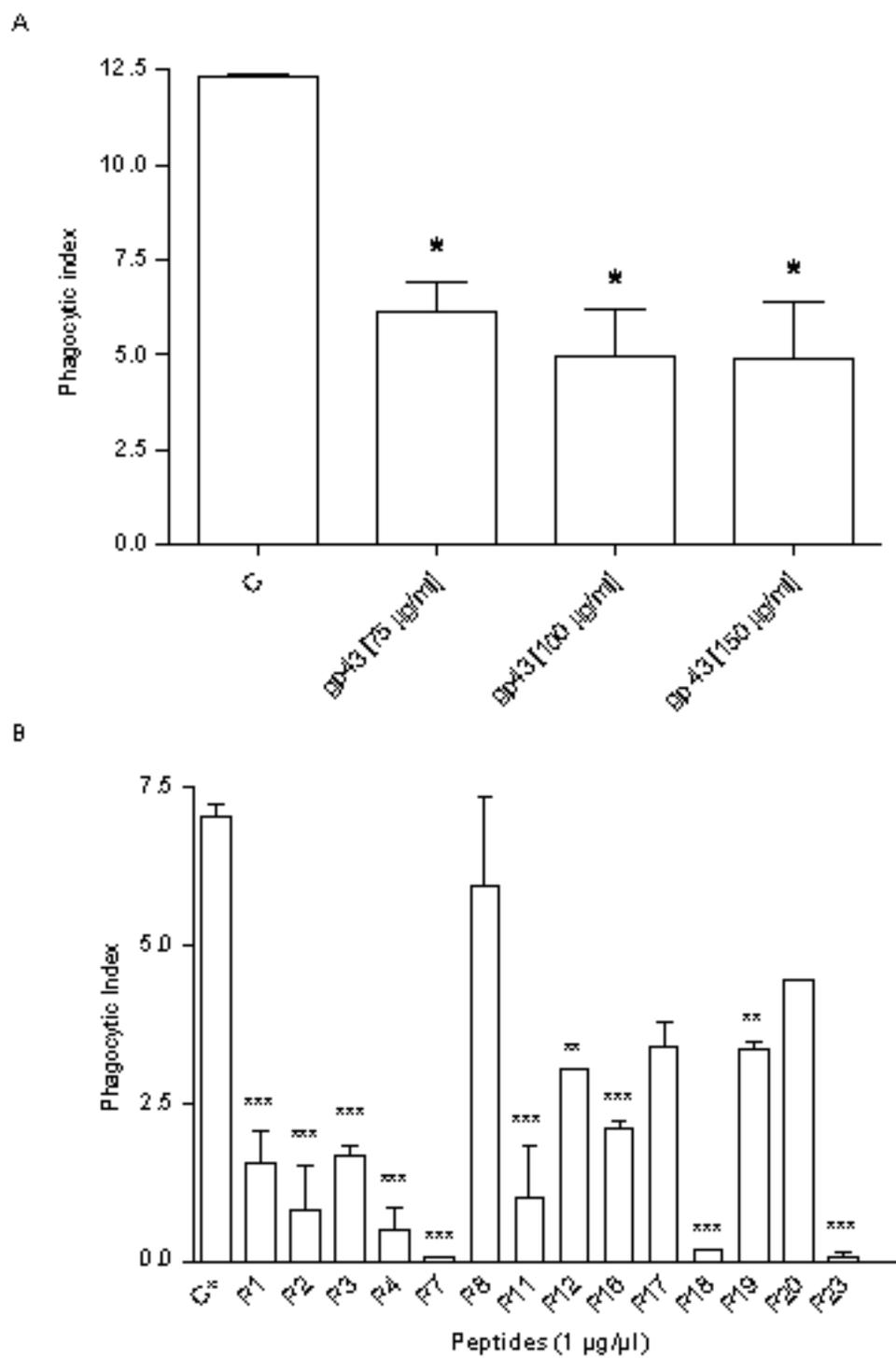


Figure 2
[Click here to download high resolution image](#)

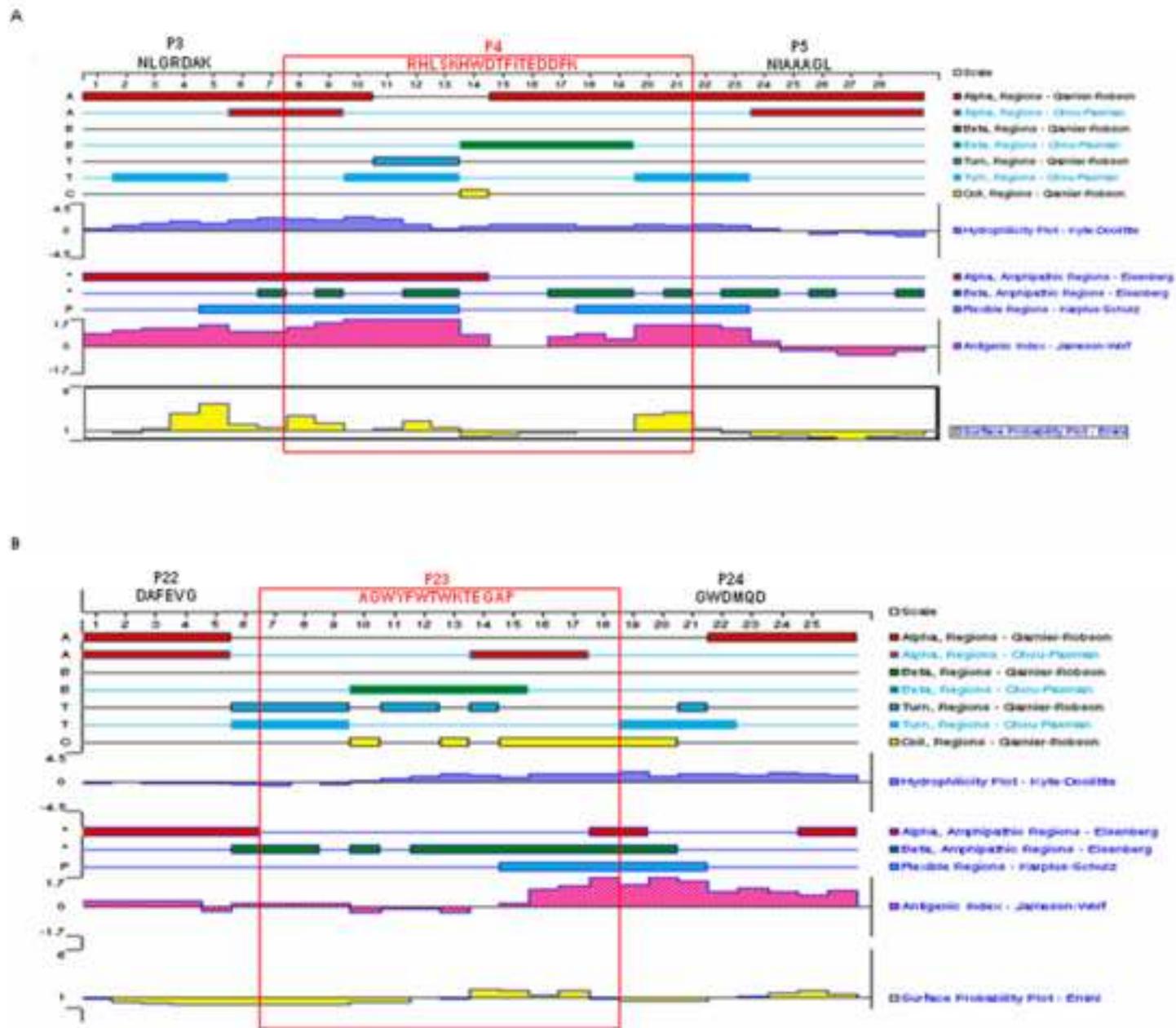
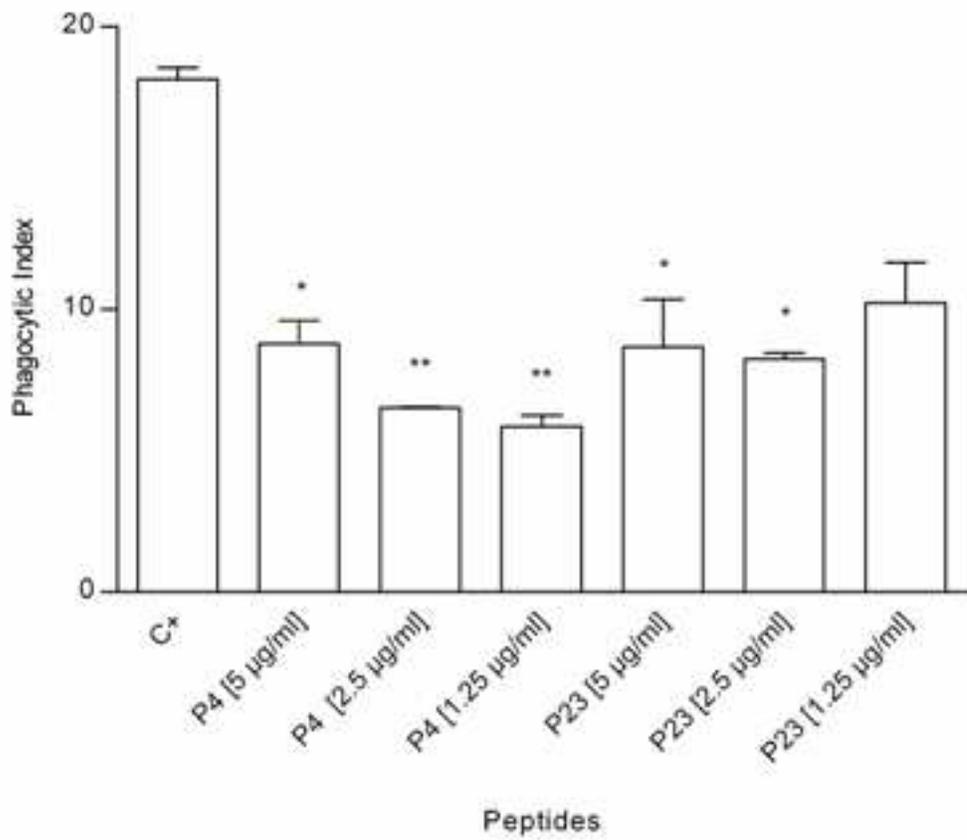


Figure 3
[Click here to download high resolution image](#)

A



B

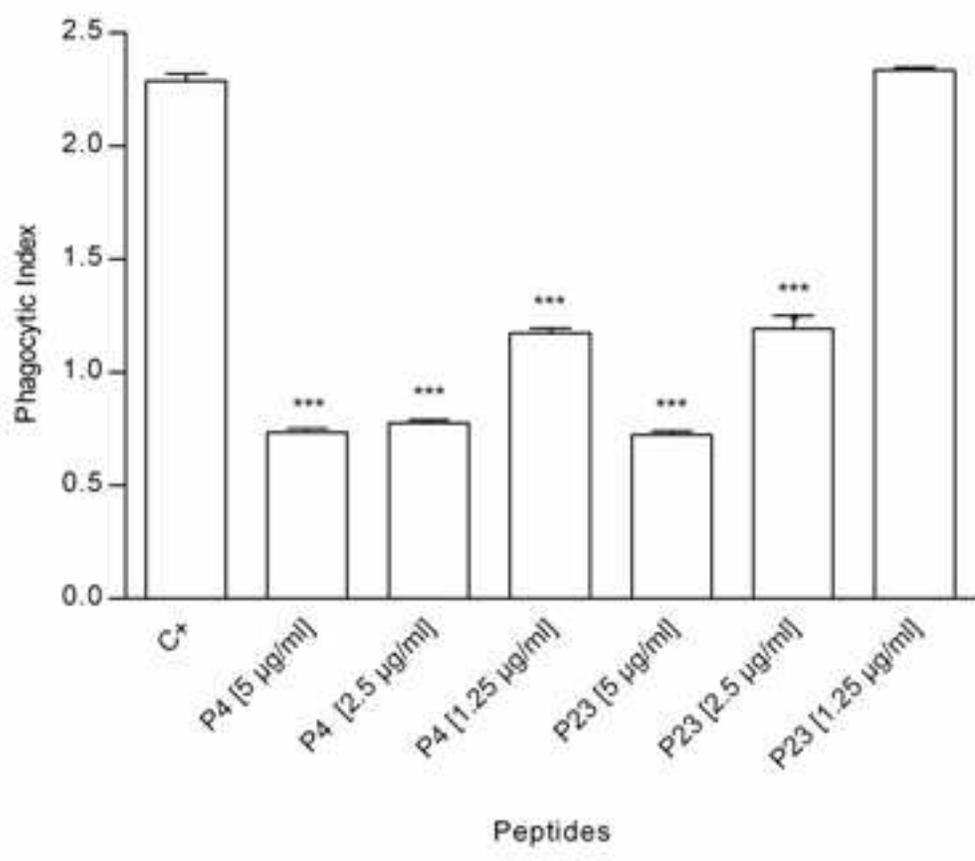


Figure 4
[Click here to download high resolution image](#)

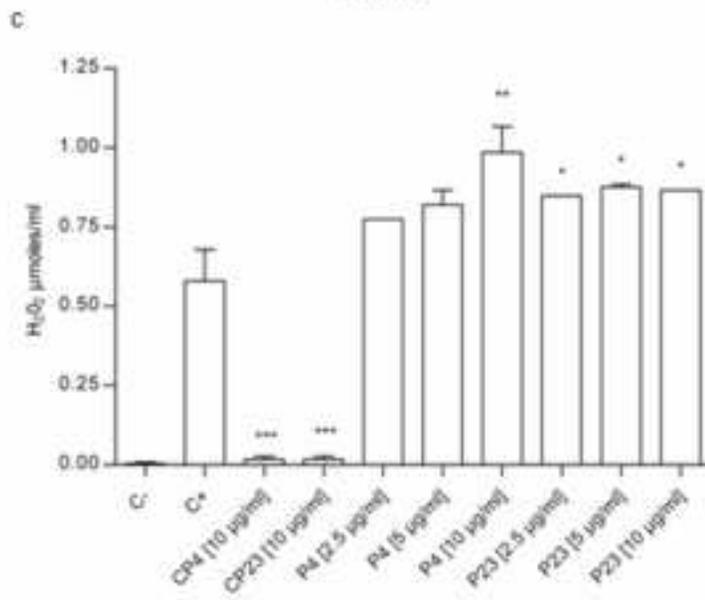
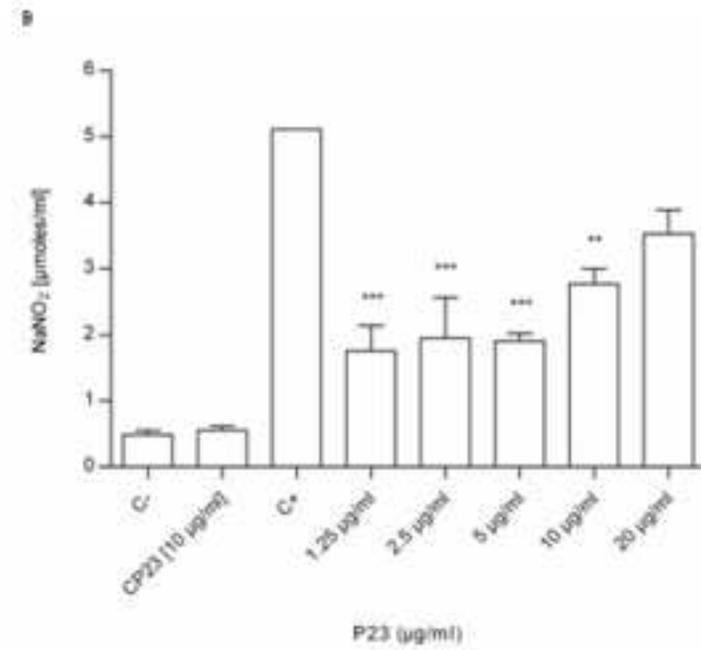
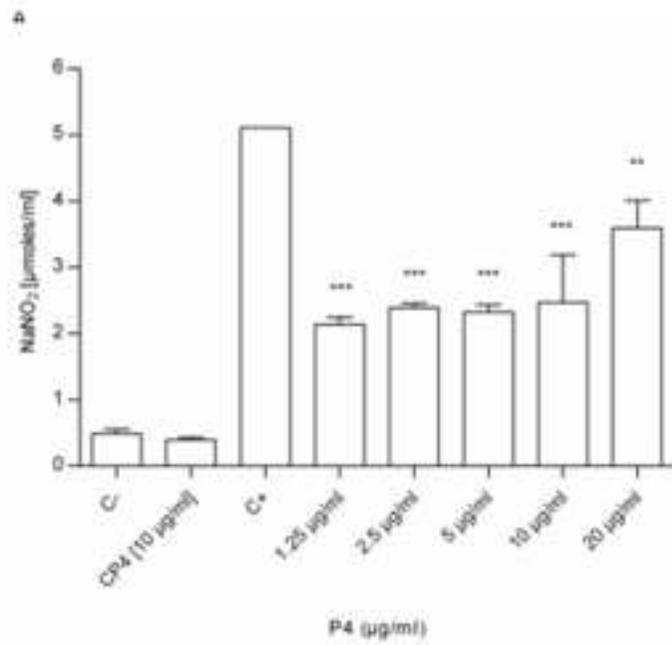
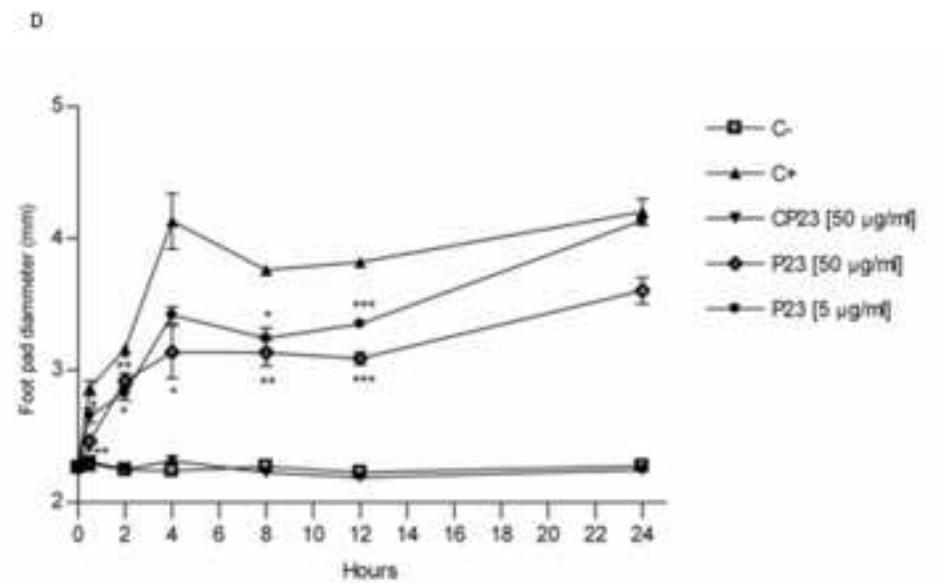
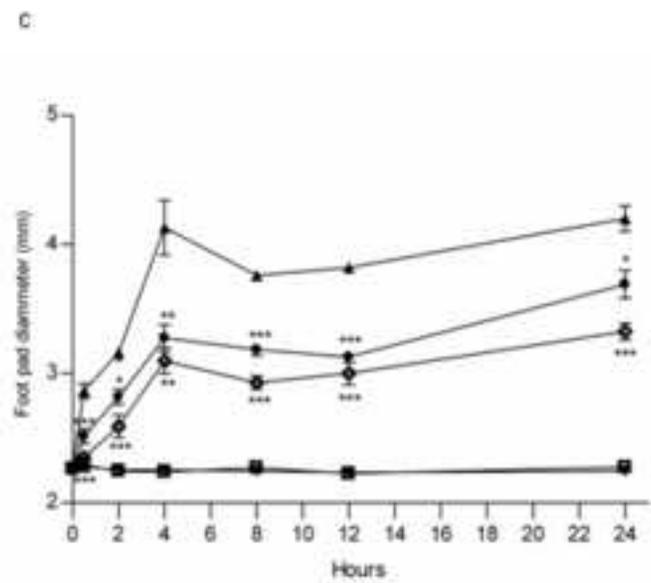
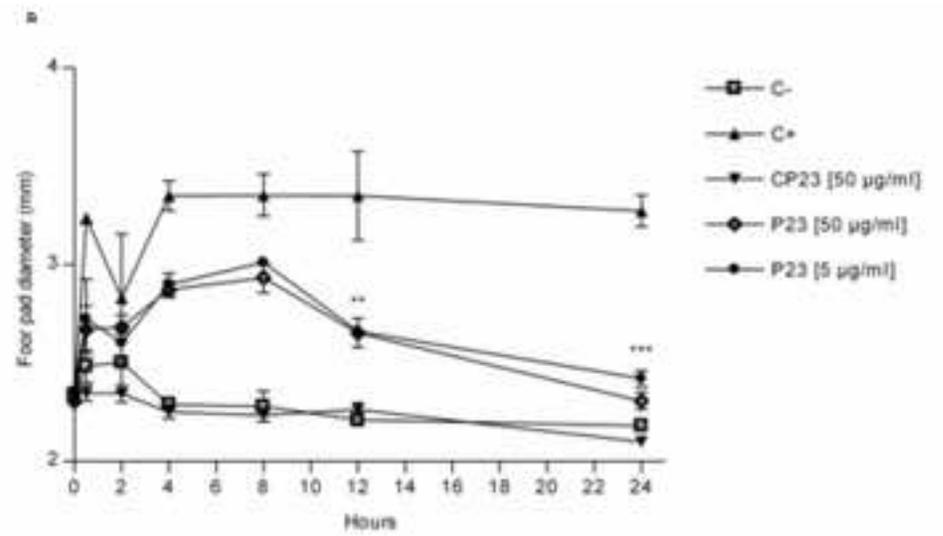
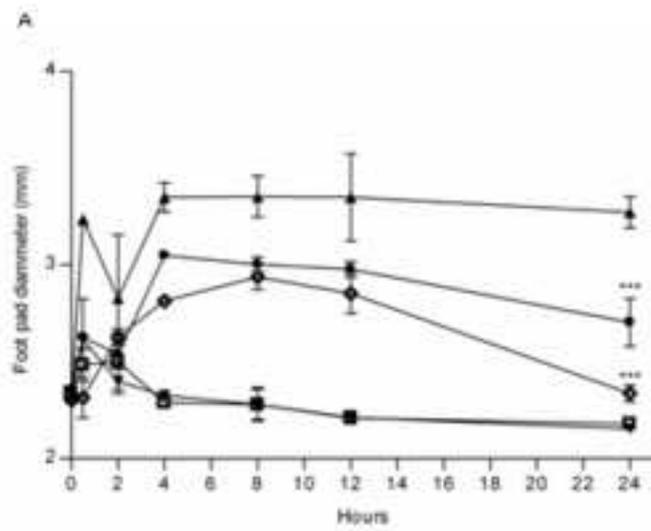


Figure 5
[Click here to download high resolution image](#)



Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)