

**ÉRIKA SEKI KIOSHIMA**

**Caracterização de marcadores de virulência em**  
***Paracoccidioides brasiliensis***

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

**São Paulo  
2009**

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

**ÉRIKA SEKI KIOSHIMA**

**Caracterização de marcadores de virulência em**  
***Paracoccidioides brasiliensis***

**Orientador: Prof. Dr. José Daniel Lopes**

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

**São Paulo  
2009**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO  
ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA  
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA, IMUNOLOGIA E  
PARASITOLOGIA  
DISCIPLINA DE IMUNOLOGIA**

**Chefe de Departamento:**

**Profa. Dra. Clara Lúcia Barbieri Mestriner**

**Coordenador do Curso de Pós-Graduação:**

**Prof. Dr. Renato Arruda Mortara**

**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) e Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES).**

### Ficha Catalográfica

Kioshima, Érika Seki

**Caracterização de marcadores de virulência em *Paracoccidioides brasiliensis*.** / Érika Seki Kioshima – São Paulo, 2009.

*xviii*,160f

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

Título em inglês; Characterization of markers of virulence in *Paracoccidioides brasiliensis*.

1. *Paracoccidioides brasiliensis* 2. Virulência 3. Peptídeos 4. *Phage display*  
5. Biomarcador

*A Deus, por iluminar meu caminho e estar  
sempre ao meu lado principalmente nos  
momentos mais difíceis desta longa jornada.*

*Ao meu anjo da guarda, **Leandro**, que mesmo de longe sempre compartilhou minhas conquistas, alegrias e tristezas. Meu amigo, meu companheiro, meu amor.*

*Aos meus queridos e amados pais **Edson** e **Lauraci**, que com muito amor, carinho e dignidade, me ensinaram a valorizar cada momento da vida e a nunca desistir de um sonho. Obrigada por serem meu porto seguro.*

*Aos meus amores **Rafael**, **Kamila** e **Gabriel**. Agradeço todos os dias por tê-los em minha vida e por sempre poder contar com cada um de vocês.*



## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. **José Daniel Lopes**, pela orientação, ensinamentos, amizade, confiança e contribuição para meu crescimento científico. Registro minha admiração, meu reconhecimento e minha gratidão.

Às Profas. da Disciplina de Imunologia, Dra. Célia Regina Whitaker Carneiro, Dra. Ieda Maria Longo Maugéri e Dra. Zulma Fernandes Peixinho por todo auxílio e contribuição para minha formação científica. Aos professores Dr. Mario Mariano e Dr. Alexandre Salgado Basso, pela significativa contribuição na confecção do manuscrito. Aos Profs. Dra. Miriam Galvonas Jasiulionis e Dr. Joel Machado Jr pelo apoio a este trabalho.

Ao Prof. Dr. Gustavo Henrique Goldman, por me receber em seu laboratório, pela contribuição e apoio a este trabalho. À Prof. Dra. Márcia Eliana da Silva Ferreira, por todo empenho e apoio nos experimentos de *Microarray*, pela acolhida e companheirismo nos dias em que passei em Ribeirão Preto.

À Profa. Dra. Sônia Rozental, por abrir as portas do seu laboratório e pela ajuda com os experimentos de microscopia.

Ao Prof. Renato Arruda Mortara, pelo valioso auxílio nos experimentos de microscopia confocal.

À Profa. Dra. Luisa Lina Villa e sua técnica Maria Cristina, pelo indispensável auxílio no seqüenciamento.

À querida Profa. Dra. Terezinha Inez Estivalet Svidzinski, a grande responsável pelos meus primeiros passos na vida acadêmica: - Minha mãe “adotiva” e grande amiga, muito obrigada!

À Profa. Dra. Rosana Puccia, pela amizade e compreensão.

Aos funcionários da Disciplina de Imunologia: Aparecido Mendes, Rafael Barbosa, Maria Cláudia Prospero, Ivone Mozat, Zélia Pereira, Gisélia Lopes. À D. Creusa Marina e Eraldina do Nascimento, por “sempre” poder contar com a ajuda delas na preparação dos meus meios de cultura. Ao Geová dos Santos, por cuidar com tanto carinho e profissionalismo dos “meus” camundongos. À amiga Creusa Rosa, pelo carinho e amizade. À Mércia, secretária da Pós-Graduação, pelo auxílio constante.

A todos os professores do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia (UNIFESP), pelo muito que contribuíram à minha formação.

Aos meus queridos amigos Patrícia Xander Batista e Wagner Luiz Batista, por toda a amizade de longa data, por sempre poder contar com eles, não apenas na pesquisa, mas na minha vida pessoal.

Aos amigos Dr. Ronni Rômulo Novaes e Brito e Dr. Luciano dos Santos Feitosa por toda amizade, companheirismo e longas conversas a caminho do bandeirão.

À futura Dra. Juliana Terzi Maricato, por toda a amizade, carinho, conselho e aos bons os momentos que compartilhamos.

À amiga “clandestina” Elizabeth Cristina Perez Hurtado e sua família, pelo apoio, companheirismo e convivência.

Aos amigos do laboratório: Bruno Vivanco, Fabiana Aliperti, Fabiana Toshie, Lívia Pugliesi, Marcela Antonio, Márcia Guerreschi, Edsel Nunes, Jaqueline Pozzibon e Nadijane Ferreira. Em especial às minhas filhas postças, morena (Camila Caldini) e loira (Nádia Lucena), por compartilhar minhas angústias “*phageanas*”.

Aos amigos egressos da Pós-graduação: Dra. Vanessa Atayde, Ms. Carlos Fedeli, Ms. Adriana Konno, Ms. Aline Morgado de Araújo, Dra. Beatriz Helena Pizarro de Lorenzo, Ms. Carolina Hager, Dra. Daniela de Mattos Grosso, Dra. Fernanda Staquicini, Guilherme Kyiohara, Dra. Priscila Fraga Penteado Mendes, Dra. Renata Ananias e Renata Fantini.

Aos amigos e colegas da Disciplina de Imunologia: Dra. Ana Flávia Popi, Dra. Helena Cruz Oliveira, Ricardo Russo, Maiko Palos, Maria Fernanda Laurindo, Felipe Thies, Dra. Fabiana Mello, Dra. Fernanda Molognoni, Ms. Camila de Souza, Ms. André Bacci, Janaína Serikawa, Ms. Carolina L’abbate, Dra. Carla Squaiella e Ms. Juliana Mussalem.

Aos colegas do Departamento: Rodrigo Berzaghi, Geisa Ferreira Fernandez, Crisitane Amaral, Alisson Matsuo, Antonio Augusto Rocha, Luiz (Luizão), pelo valioso “socorro” em procedimentos e materiais. Aos amigos Charles Covarrubias Flores, Fernando Real, Josie Haydee Lima Ferreira e Mariane Bandeira, pelas longas conversas e pelos bons momentos que passamos juntos.

Às amigas, Silvia Helena Marques (Silvinha), Flávia Hebelers Barbosa, Kátia Cândido Carvalho, Carla Guimarães Ferreira, por todo carinho, convívio e bons momentos.

À FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – e à CAPES, que financiaram este trabalho.

*“Não tenho nenhum talento especial,  
apenas uma ardente curiosidade”*

*Albert Einstein*

## RESUMO

A paracoccidioidomicose (PCM) é uma doença sistêmica de caráter granulomatoso, prevalente na América do Sul, causada pelo fungo termodimórfico *Paracoccidioides brasiliensis*. O fungo apresenta estrutura complexa de proteínas e glicoproteínas e dentre esses componentes, alguns estão envolvidos na patogenicidade da doença. A recuperação da virulência de isolados por meio de passagem *in vivo* foi realizada com sucesso em nosso laboratório. Os isolados Pb18 atenuado e virulento foram analisados sob diversos ângulos para confirmação dessa modificação. Os resultados de curva de sobrevivência, recuperação de CFU de órgão e histologia, mostraram claramente as diferenças no padrão de patogenicidade desses dois isolados. Outras características também foram avaliadas como morfometria, padrão de crescimento e ultraestrutura celular. Análises de expressão gênica diferencial apontaram um perfil de regulação positiva para genes relacionados ao metabolismo de proteínas, de lipídeos e aminoácidos. Algumas moléculas anteriormente descritas como putativos fatores de virulência foram moduladas positivamente, entre as quais podemos citar a calmodulina, proteína *kex-like* e hsp70. Entretanto, ainda pouco se sabe sobre estes fatores virulência para maioria dos fungos dimórficos, entre eles o *P. brasiliensis*. Várias técnicas têm sido utilizadas, sem sucesso, para caracterização destas moléculas. Utilizando a metodologia de *Phage display*, foram selecionados três fagos que se ligam preferencialmente ao isolado Pb18 virulento. Por meio de ensaio de ligação, o fago p04 foi capaz de distinguir graus de virulência de outros quatro isolados. As imagens obtidas por microscopia confocal mostraram que o pep04, acoplado a 6-FAM, foi internalizado somente por leveduras do isolado virulento. Imagens seriadas indicam marcação do meio intracelular, frequentemente associada ou co-localizada à marcação por DAPI. Estes resultados demonstraram que ambos, pep04 e p04, podem ser considerados biomarcadores de virulência na PCM. Para avaliar as consequências das interações destes biomarcadores com células fúngicas, foram realizados ensaios *in vitro* e *in vivo*. O fago p04 foi suficiente para impedir a implantação e disseminação do fungo. Além disso, foi capaz de reduzir o número de CFUs recuperadas de animais tratados com este fago, quando comparado ao controle (fago sem inserto). Experimentos *in vitro* utilizando o pep04 demonstraram a atividade fungicida deste peptídeo contra,

apenas, o isolado virulento. Desta foram, estes biomarcadores poderão ser utilizados tanto no diagnóstico, quanto na prática clínica como adjuvante terapêutico.

## ABSTRACT

Paracoccidioidomycosis (PCM) is a human systemic granulomatous disease, prevalent in South America, caused by a thermodimorphic fungus, *Paracoccidioides brasiliensis*. This fungus presents complex antigenic structure and some of these components have been related with its pathogenicity, of which little is known. The virulence recovery of isolates by passage *in vivo* was performed in our laboratory. Attenuated and virulent Pb18 isolates were analyzed from various angles to confirm this change. The results of the survival curve, the number of CFUs and histology, showed clear differences in pathogenicity pattern of these isolates. Other features were also evaluated as morphology, growth curve and cell ultrastructure. Analysis of differential gene expression profile showed positive regulation genes related to metabolisms of proteins, lipids and amino acids. Some molecules, previously described as putative virulence factors, were positive regulated, among which calmodulin, kex-like protein and Hsp70. However, the number of defined virulence factors for dimorphic fungal pathogens, up to now, is relatively small. Several techniques have unsuccessfully been employed to characterize these elusive antigenic structures. Using phage display methodology, three peptide-displaying phages that bound preferentially to virulent isolates of *P. brasiliensis* were selected. By binding assay, p04 phage distinguished predefined degrees of virulence of isolates. Using confocal microscopy, the homologue synthetic peptide (pep04), labeled with 6-FAM, was internalized by only virulent isolate yeast cells. Sequential optical section imaging indicated that the labeling was within the intracellular milieu and frequently close or overlapping DAPI staining. These results showed that both, phage p04 and pep04, can be considered as biomarkers of virulence in PCM since both bound to virulent *P. brasiliensis*. To evaluate the consequences of interactions between the biomarkers and fungal cells, *in vitro* and *in vivo* experiments were performed. The latter demonstrated that p04 phage was sufficient to prevent the implantation of the fungus in the lungs and its migration to spleen and liver. In addition, this phage reduced colony-forming units in the lungs of mice infected with *P. brasiliensis* as compared to controls. *In vitro* experiments showed that pep04 exhibited fungicidal activity only against virulent *P. brasiliensis*, leaving unaltered the growth of the attenuated isolate. Therefore, these biomarkers may be useful tools for

prognosis in PCM and may be possibly used in the routine clinical practice as therapeutic drug adjuvants.

## LISTA DE ABREVIATURAS

°C	grau Celsius
6-FAM	6-carboxifluoresceína
APS	persulfato de amônio
ATP	adenosina-trifosfato
bp	pares de base
BSA	soro albumina bovina
CBB	<i>Coomassie Brilliant Blue</i>
cDNA	DNA complementar
CFU	<i>Colony-Forming Unit</i>
CX7C	cisteína, sete aminoácidos aleatórios, cisteína
D.O.	densidade óptica
DAB	diaminobenzidina
DAPI	4',6'-diamidine-2-phenylindole
dATP	desoxiadenosina-trifosfato
dCTP	desoxicitidina-trifosfato
DEPC	dimetil pirocarbonato
dGTP	desoxiguanosina-trifosfato
DIC	<i>Differential Interference Contrast</i>
DMSO	dimetilsufoxido
dNTP	desoxiribonucleotídeo-trifosfato
dTTP	desoxitimidina-trifosfato
EDTA	ácido etilenodiamino tetracético
ELISA	<i>Enzyme linked Immunosorbent assay</i>
Fd-tet	bacteriófago sem inserto
gp	glicoproteína
h	hora
ICAM-1	<i>Intercellular adhesion molecule-1</i>
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
kan	<i>kanamicin</i>
kDa	kilo Dalton



kV	<i>kilovolts</i>
M	molar
mAb	Anticorpo monoclonal
MHC	complexo de histocompatibilidade principal
min	minuto
mL	mililitro
mM	milimolar
MOPS	ácido 3-N-Morpholino propanesulfônico
mRNA	RNA mensageiro
MTT	<i>3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide</i>
N	normal (normalidade)
p/v	peso a volume
PA	para análise/grau analítico
PBS	Tampão salino fosfato
PCM	paracoccidiodomicose
PCR	reação da polimerização em cadeia
PEG/NaCl	polietilenoglicol acrescido de cloreto de sódio
pepIR	peptídeo irrelevante
PGFE	<i>Pulsed Field Gel Electrophoresis</i>
PMSF	fluoreto de fenilmetanosulfonato
RNA	ácido ribonucleico
RNase	ribonuclease
rpm	rotação por minuto
RT-PCR	<i>Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction</i>
SD	desvio padrão
SDS	dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida – SDS
sec	segundos
SSC	Tampão salina citrato de sódio
TBE	tampão tris-borato-EDTA
TC	tampão cacodilato de sódio
TEMED	<i>N,N,N,N'</i> - tetrametilenodiamina
TIGR	<i>The Institute for Genomic Research</i>

TLR	<i>toll-like receptor</i>
Tris	tris-hidroximetil-aminometano
TU	<i>Transducing unit</i>
U	unidade enzimática
UTR	região não-traduzida
UV	ultravioleta
V	Volts
v/v	volume a volume
W	watts
μm	micrometro
μM	micromolar

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Diferenças ultra-estruturais dos isolados Pb18 virulento e atenuado de <i>P. brasiliensis</i> .....	60
<b>Tabela 2</b> – Alinhamento das sequências obtidas no segundo ciclo de seleção.....	82
<b>Tabela 3</b> – Alinhamento das sequências obtidas no terceiro ciclo de seleção.....	83
<b>Tabela 4</b> – Enriquecimento das sequências dos clones ligantes selecionados no segundo e no terceiro ciclo de seleção do Pb18 virulento.....	84
<b>Tabela 5</b> – Enriquecimento dos motivos de três aminoácidos das sequências dos clones ligantes selecionados no segundo e no terceiro ciclo de seleção do Pb18 virulento.....	84

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Curva de sobrevivência.....	48
<b>Figura 2</b> – Unidades formadoras de colônias (CFU) recuperadas do pulmão, baço e fígado dos animais infectados com isolados de Pb18 atenuado e virulento.....	50
<b>Figura 3</b> – Cortes histológicos de pulmão e fígado de animais infectados por 30 dias com os diferentes isolados de Pb18 (atenuado e virulento).....	51
<b>Figura 4</b> – Cortes histológicos de pulmão e fígado de animais infectados com isolado Pb18 virulento de <i>P. brasiliensis</i> , após 60 dias.....	52
<b>Figura 5</b> – Curva de crescimento em caldo Fava-Netto.....	54
<b>Figura 6</b> – Análise Morfométrica.....	55
<b>Figura 7</b> – Aspectos Morfológicos.....	56
<b>Figura 8</b> – Micrografias de microscopia eletrônica de transmissão de <i>P. brasiliensis</i> isolado Pb18 atenuado cultivado em meio Fava-Netto por 7 dias, a 36 °C.....	58
<b>Figura 9</b> – Micrografias de microscopia eletrônica de transmissão de <i>P. brasiliensis</i> , isolado Pb18 virulento, cultivado em meio Fava-Netto por 7 dias, a 36 °C.....	59
<b>Figura 10</b> – Gel de SDS-PAGE 10% dos exoantígenos produzido pelos dois isolados de <i>P. brasiliensis</i> .....	61
<b>Figura 11</b> – Gel de agarose com brometo de etídeo.....	63
<b>Figura 12</b> – Agrupamento hierárquico dos genes diferencialmente expressos.....	64
<b>Figura 13</b> – Classificação dos grupos Funcionais.....	65
<b>Figura 14</b> – Agrupamento hierárquico de genes envolvidos no metabolismo celular..	68
<b>Figura 15</b> – Agrupamento hierárquico de genes envolvidos no metabolismo de proteínas.....	71
<b>Figura 16</b> – Agrupamento hierárquico de genes envolvidos na virulência e no stress.	72
<b>Figura 17</b> – RT-PCR quantitativo em tempo real (SyberGreen®) dos genes selecionados por <i>Microarray</i> modulados positivamente no isolado Pb18 virulento.....	75
<b>Figura 18</b> – Desenho esquemático do ensaio de eliminação de fagos ligantes do isolado Pb18 atenuado e seleção dos fagos ligantes do isolado Pb18 virulento.....	77
<b>Figura 19</b> – Ciclos de seleção.....	79
<b>Figura 20</b> – Sequenciamento.....	81
<b>Figura 21</b> – Ensaio de ligação dos fagos a células leveduriformes dos isolados virulento ou atenuado de <i>P. brasiliensis</i> .....	86

<b>Figura 22</b> – Ligação dose dependente.....	87
<b>Figura 23</b> – Ensaio de inibição competitiva.....	89
<b>Figura 24</b> – Análise da ligação dos fagos selecionados à gp43.....	91
<b>Figura 25</b> – Análise da ligação dos fagos selecionados à gp43 por ELISA <i>phage</i> .....	92
<b>Figura 26</b> – p04 como marcadores de virulência.....	94
<b>Figura 27</b> – Microscopia de Fluorescência.....	96
<b>Figura 28</b> – Associação do pep04 com DNA de leveduras do isolado virulento de <i>P. brasiliensis</i> .....	98
<b>Figura 29</b> – Associação do pep04 com DNA de leveduras do isolado virulento de <i>P. brasiliensis</i> (II).....	99
<b>Figura 30</b> – A atividade antifúngica <i>in vitro</i> de peptídeos selecionados.....	101
<b>Figura 31</b> – Atividade fungicida direcionada.....	102
<b>Figura 32</b> – Ensaio de citotoxicidade.....	104
<b>Figura 33</b> – O fago p04 impede a implantação de infecção.....	106
<b>Figura 34</b> – Análise do efeito do tratamento com fagos p04 e fd-tet em camundongos infectados por <i>P. brasiliensis</i> .....	108

## SUMÁRIO

Dedicatória	v
Agradecimentos	vii
Epígrafe	ix
Resumo	x
Abstract	xii
Lista de Abreviaturas	xiv
Lista de Tabelas	xvii
Lista de Figuras	xviii
1. INTRODUÇÃO	01
1.1. <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	02
1.2. Paracoccidioidomicose	04
1.3. Relação parasito-hospedeiro	07
1.4. Virulência de <i>P. brasiliensis</i>	09
1.4.1. Heterogenicidade de isolados	09
1.4.2. Análises Moleculares	13
1.4.3. Putativos Fatores de Virulência	13
1.5. Técnica de <i>Phage Display</i>	16
2. OBJETIVOS	19
3. MATERIAIS E MÉTODOS	21
3.1. Soluções principais	22
3.2. Reagentes	23
3.3. Meios de Cultura	23
3.3.1. Meios para cultivo de fungos	23
3.3.2. Meios para cultivo de bactérias	24
3.4. Preparação dos isolados	24
3.4.1. Animais	24
3.4.2. Isolados Fúngicos	25
3.4.3. Recuperação e manutenção da virulência	25
3.5. Diferenças entre os isolados Pb18 de <i>P. brasiliensis</i>	26
3.5.1. Curva de sobrevivência (i.v.)	26
3.5.2. Curva de sobrevivência (i.t.)	26
3.5.3. CFU e Histologia	26
3.5.4. Determinação da Curva de Crescimento	27
3.5.5. Avaliação <i>in vitro</i> das características morfológicas	27

3.5.6. Microscopia Eletrônica de Transmissão	28
3.5.6.1. Preparação de leveduras para ultra-microtomia	28
3.5.6.2. Análise da ultra-estrutura dos isolados	28
3.5.7. Produção de exoantígeno de <i>P. brasiliensis</i>	29
3.5.8. Dosagem de proteínas	29
3.5.9. SDS-PAGE	29
3.6. Ensaio de <i>Microarray</i>	30
3.6.1. Extração de RNA total	30
3.6.2. Purificação do RNA	31
3.6.3. Tratamento do RNA com DNase I	31
3.6.4. Hibridizações de <i>Microarray</i> e análise de dados	32
3.6.5. RT-PCR quantitativo em tempo real	33
3.6.5.1. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados no sistema Syber Green®	34
3.7. <i>Phage display</i>	34
3.7.1. Biblioteca de <i>Phage display</i>	34
3.7.2. BRASIL - seleção de fagos específicos	35
3.7.2.1. Ciclos de seleção	35
3.7.3. Cultivo da bactéria <i>E. coli K91kan</i>	36
3.7.4. Precipitação dos fagos	36
3.7.5. Titulação dos fagos	36
3.7.6. Seleção de clones, Reação em cadeia da polimerase (PCR)	37
3.7.7. Sequenciamento	37
3.7.8. Análise dos peptídeos selecionados	38
3.7.9. Ensaio de ligação	38
3.7.10. Validação dos resultados obtidos por <i>Phage display</i>	38
3.7.10.1. Síntese de peptídeos sintéticos	38
3.7.10.2. Ensaio de ligação à gp43	39
3.7.10.2.1. Ensaio de Ligação <i>in vitro</i>	39
3.7.10.2.2. Ensaio de Inibição competitiva	39
3.7.10.2.3. Enzimaimunoensaio (EIA)	40
3.7.10.2.3.1. Obtenção de Anticorpos	40
3.7.10.2.3.2. ELISA <i>phage</i>	41
3.7.10.3. Avaliação <i>in vitro</i> da atividade dos peptídeos	42
3.7.10.4. Ensaio de ligação do fago p04 a diversos isolados	42
3.7.10.5. Microscopia de Fluorescência e Confocal	42

3.7.10.6. Ensaio de citotoxicidade por MTT	44
3.7.10.7. Ensaio de Inibição competitiva	44
3.7.10.8. Tratamento com fagos	45
4. RESULTADOS	46
4.1. Avaliação da virulência dos isolados Pb18	47
4.1.1. Curva de Sobrevida	47
4.1.2. Contagem de unidades formadoras de colônias (CFU)	47
4.1.3. Histopatologia	49
4.2. Diferenças entre os isolados Pb18 virulento e Pb18 atenuado	53
4.2.1. Curva de crescimento	53
4.2.2. Diferenças morfológicas	53
4.2.3. Diferenças ultraestruturais	57
4.2.4. Secreção de proteínas	60
4.2.5. <i>Microarray</i>	62
4.2.5.1. Preparação das células	62
4.2.5.2. Obtenção do RNA	62
4.2.5.3. Análise dos dados de <i>Microarrays</i>	63
4.2.5.3.1. Aspectos mais relevantes das vias metabólica	66
4.2.5.3.1.1. Metabolismo Celular	66
4.2.5.3.1.1.1. Metabolismo de carboidratos	66
4.2.5.3.1.1.2. Metabolismo de lipídeos	67
4.2.5.3.1.1.3. Metabolismo de aminoácidos	67
4.2.5.3.1.2. Metabolismo de Proteínas	69
4.2.5.3.1.3. Virulência e <i>Stress</i>	70
4.2.5.4. Análises da Expressão gênica	73
4.3. Análise da Parede Celular por <i>Phage display</i>	76
4.3.1. Seleção de clones, reação em cadeia da polimerase (PCR)	78
4.3.2. Sequenciamento das amostras	78
4.3.3. Análise das sequências peptídicas obtidas	80
4.3.4. Ensaio de ligação	85
4.3.5. Ligação dose-dependente	85
4.3.6. Ensaio de inibição competitiva	88
4.3.7. Ensaio de ligação a gp43	90
4.3.8. Ensaio de ligação: p04 e outros isolados	93
4.3.9. Microscopia de Fluorescência	95
4.3.10. Microscopia Confocal	97



4.3.11. A atividade antifúngica <i>in vitro</i> de peptídeos selecionados	100
4.3.11.1. Especificidade da atividade fungicida de pep04	100
4.3.11.2. Ensaio de citotoxicidade dos peptídeos	103
4.3.11.3. O fago p04 impede a implantação de infecção	105
4.3.11.4. Tratamento com fago p04	107
5. DISCUSSÃO	109
6. CONCLUSÕES	119
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	121
8. ANEXOS	138

## **1. INTRODUÇÃO**

---

---

### **1.1 *Paracoccidioides brasiliensis***

*Paracoccidioides brasiliensis* é o agente etiológico de micose sistêmica de caráter granulomatoso denominada paracoccidioidomicose (PCM). Esta doença quando não diagnosticada e tratada adequadamente pode ser letal. O primeiro pesquisador a descrever a PCM foi Adolpho Lutz (1908), relatando a presença do fungo em lesões de dois pacientes. Somente 22 anos depois da primeira descrição, em 1930, Floriano Paulo de Almeida, após uma série de estudos sistemáticos, estabeleceu o novo gênero *Paracoccidioides* dentro do reino fungi e adotou o nome da espécie *brasiliensis*, anteriormente criado por Alfonso Splendore (1912) (revisado por Lacaz, 1994a). Por um longo tempo, o *P. brasiliensis* foi considerado um fungo imperfeito devido às falhas na identificação da sua fase telomórfica ou sexual. Com advento das técnicas moleculares, este fungo foi taxonomicamente classificado como *Eukaryota* do reino *Fungi*, filo *Ascomycota*, subfilo *Pezizomycotina*, classe *Eurotyomycetes*, ordem *Onygenales*, família *Onygenaceae*, gênero *Paracoccidioides* e espécie *brasiliensis* (Taxonomy ID: 121759, NCBI/ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/taxonomyhome.html/>). Recentemente, uma *clade* distinta tem sido proposta como uma nova família (*Onygenales*, *Ajellomycetaceae*) que engloba o grupo monofilético *Ajellomyces*, que inclui o gênero anamórfico *Blastomyces*, *Emmonsia*, *Histoplasma* e *Paracoccidioides* (Herr *et al.*, 2004; revisado por Bagagli *et al.*, 2008).

Análises filogenéticas de várias sequências codificadoras de proteínas nucleares de *P. brasiliensis* foram utilizadas para diferenciar três grupos genéticos, sugerindo que este fungo consista de, no mínimo, três espécies distintas identificadas como S1 (espécie 1 originária do Brasil, Argentina, Paraguai, Peru e Venezuela), PS2 (espécie filogenética 2 originária do Brasil e Venezuela) e PS3 (espécie filogenética 3 originária da Colômbia). Também foi observado que, enquanto as espécies S1 e PS2 sofreram recombinação sexual, a reprodução de PS3 foi clonal (Matute *et al.*, 2006a). Análises da inteína PRP8 (Theodoro *et al.*, 2008) e de um isolado atípico de *P. brasiliensis* (Takayama *et al.*, 2009) apontaram para classificação do isolado Pb01 como uma nova espécie de *Paracoccidioides*. Mais recentemente, Teixeira e colaboradores (2009), por meio de análises filogenéticas mais complexas, recomendaram a descrição formal de um grupo de

isolados *Pb01-like* como uma nova espécie denominada *Paracoccidioides lutzii*, em homenagem a Adolpho Lutz.

*P. brasiliensis* é fungo termo-dimórfico que cresce à temperatura ambiente (25°C) na forma de colônias brancas aderidas ao meio, com aparência de “pelos de rato branco”. Ao microscópio ótico, as células se apresentam na forma de micélio com longos filamentos septados com presença de conídeos terminais e/ou intercalares (San-Blas & San-Blas, 1982; Lacaz, 1994b). Quando cultivado a 37°C, o fungo produz colônias do tipo cerebriforme e, microscopicamente, as células apresentam múltiplos brotamentos, são multinucleadas e seu tamanho varia entre 4 e 30µm (Lacaz, 1994b; Brummer *et al.*, 1993). Os conídeos produzidos na fase de saprofítica podem se transformar em células leveduriformes multinucleadas quando incubados a 37°C (McEwen *et al.*, 1987).

Apesar da alta prevalência da doença nas áreas endêmicas, o fungo foi isolado apenas, esporadicamente, do solo dessas regiões, seja no Brasil (Silva-Vergara *et al.*, 1998; Theodoro *et al.*, 2005), na Argentina (Negróni 1966) ou na Venezuela (De Albornoz, 1971). Infecções naturais foram descritas em alguns animais selvagens e domésticos (Johnson & Lang, 1977; Garcia *et al.*, 1992; Terçarioli *et al.*, 2007, Richini-Pereira *et al.*, 2008). Há também relatos do isolamento de fezes de morcego (Grose & Tramsitt, 1965), de pinguins (Gesuele, 1989) e de ração de cachorro (Ferreira *et al.*, 1990). No entanto, os animais que apresentam a maior incidência da infecção por *P. brasiliensis* são tatus, principalmente das espécies *Dasypus novemcinctus* (Bagagli *et al.*, 1998; Bagagli, *et al.*, 2003; Restrepo *et al.*, 2000, Richini-Pereira *et al.*, 2008) e *Cabassou centralis* (Corredor *et al.*, 2005). Estes dados sugerem que o tatu possa ser um reservatório natural importante do fungo (Grose & Tramsitt, 1965). Infecção por *P. brasiliensis* em cachorros foi demonstrada por estudos sorológicos (Ono *et al.*, 2001; Faria *et al.*, 2005; Silveira *et al.*, 2006), análise histopatológica e PCR (Ricci *et al.*, 2004). Entretanto, o *habitat* natural do fungo ainda não está definido.

Quanto aos aspectos genéticos do *P. brasiliensis*, o tamanho inicial do genoma foi estimado entre 23 à 31Mb (Montoya *et al.*, 1997; Montoya *et al.*, 1999; Cano *et al.*, 1998; Feitosa *et al.*, 2003; Almeida *et al.*, 2007), com a presença de 4 ou 5 bandas cromossômicas variando entre 2 à 10Mb de tamanho (Feitosa *et al.*, 2003). No entanto, experimentos de microfluorometria utilizando marcação com 4',6'-diamidino-2-fenilindol (DAPI) obtiveram valores duas vezes maior que os obtidos por

PGFE (*Pulsed Field Gel Electrophoresis*) (Cano *et al.*, 1998). Desta forma, a ploidia deste fungo ainda não está totalmente esclarecida, existindo evidências tanto de haploidia ou aneuploidia (Almeida *et al.*, 2007), quanto de diploidia. (Cisalpino *et al.*, 1996; Morais *et al.*, 2000). Portanto, a forma de reprodução sexuada ainda não foi demonstrada.

Grande quantidade de dados transcricionais têm sido obtidas através do empenho de pesquisadores que trabalham com *P. brasiliensis*. (Felipe *et al.*, 2005; Nunes, *et al.*, 2005; Ferreira *et al.*, 2006 Almeida *et al.*, 2007). Goldman e colaboradores (2003) identificaram 4.692 genes expressos pelo fungo na fase de levedura e também analisaram por RT-PCR quantitativo a expressão de alguns deles durante a transição dimórfica levedura-micélio. A partir do sequenciamento de ESTs (*expressed sequence tag*) de ambas as fases, Felipe e colaboradores (2005) encontraram 6.022 genes expressos, os quais provavelmente representam 80% do genoma estimado do *P. brasiliensis*. Recentemente, o genoma completo de três isolados de *P. brasiliensis* foi disponibilizado (URL: [http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/paracoccidioides\\_brasiliensis/MultiHome.html](http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/paracoccidioides_brasiliensis/MultiHome.html)), graças aos esforços do *Broad Institute* com o suporte do *Dimorphic Fungal Genomes Consortium*, que desenvolveram um projeto de comparação genômica de fungos dimórficos patogênicos (Puccia *et al.*, 2008).

Neste estudo foram escolhidas duas espécies distintas e simpátricas (S1 e PS2), e um isolado distinto e bem estudado, o Pb01. Este isolado foi obtido de um indivíduo adulto, do sexo masculino, com a forma aguda da PCM. Até o momento este foi o isolado mais profundamente estudado em nível molecular. O isolado Pb03 é um dos isolados melhor estudados do grupo PS2. Os estudos têm sido na área molecular, filogenética e de virulência. Já o isolado Pb18 é o representante do principal grupo filogenético, S1. A maioria dos estudos citados na literatura de *P. brasiliensis* utilizou este isolado.

### 1.2 Paracoccidioidomicose

A PCM é restrita à América Latina (Brummer *et al.*, 1993; Wanke & Londero, 1994), sendo prevalente na Argentina, Brasil, Colômbia e Venezuela, onde é endêmica em áreas rurais. O Brasil é o país com o maior número de casos

reportados e os estados de São Paulo, Paraná, Minas Gerais, e Rio Grande do Sul apresentam as áreas de maior prevalência e mortalidade da doença, principalmente nas regiões não metropolitanas (Wanke & Londero, 1994; Coutinho *et al.*, 2002). Nas áreas classificadas como altamente endêmicas, a taxa de incidência anual é estimada em 3 casos por 100.000 habitantes (Restrepo, 2001; revisado por Coutinho *et al.*, 2002). Não há referências da doença no Chile, Suriname, Guiana, Nicarágua e Belize (Wanke & Londero, 1994; Restrepo *et al.*, 2008). Alguns casos de PCM foram detectados nos Estados Unidos, Europa, África e Ásia, porém, estes pacientes já haviam residido ou trabalhado em países endêmicos, onde supostamente foram infectados (revisado em Lacaz, 1994a). Os locais com maior incidência da PCM apresentam características climáticas comuns como temperaturas amenas (18 a 24°C), chuvas abundantes, invernos curtos e verões ensolarados (Bagagli *et al.*, 1998).

A porta de entrada do *P. brasiliensis* em humanos ainda não foi esclarecida, mas se acredita que os conídios produzidos pelo micélio saprofítico, provavelmente os propágulos infecciosos, são inalados (McEwen *et al.*, 1987). Nos pulmões, o fungo pode ser rapidamente destruído ou transformar-se na forma de leveduras patogênicas, formando o foco inicial da infecção. As lesões primárias podem regredir com destruição total do fungo; regredir, porém com manutenção de fungos viáveis, formando focos latentes ou quiescentes que podem posteriormente ser reativados; ou progredir rapidamente com o desenvolvimento dos sinais e sintomas da PCM (Montenegro & Franco, 1994). A infecção pode atingir outros órgãos e sistemas pela via linfática e vasos sanguíneos.

Embora exista grande variedade de formas clínicas da Paracoccidioidomicose de um indivíduo para outro, duas manifestações principais estão bem estabelecidas: a forma aguda ou subaguda (juvenil) e a forma crônica (adulto) (Franco *et al.*, 1987). A forma aguda afeta principalmente crianças e adolescentes de ambos os sexos, progride rapidamente por disseminação linfática e/ou hematogênica e tem alta taxa de mortalidade por comprometer o sistema retículo-endotelial (baço, fígado, linfonodos e medula óssea) (Benard *et al.*, 1994). A forma crônica ocorre em 90% dos casos, principalmente em indivíduos do sexo masculino, entre 30 e 60 anos, tem progressão lenta acometendo principalmente os pulmões, mas pode ser multifocal, disseminando-se para qualquer órgão, especialmente para tecidos mucocutâneos. A íntima relação da doença com o estado imune do paciente é demonstrada pela

frequente dificuldade em classificar as apresentações clínicas da micose em pacientes com AIDS (Benard *et al.*, 2000).

Os dados epidemiológicos mostraram que o desenvolvimento da doença ocorre com maior frequência em indivíduos do sexo masculino, sendo a proporção homem/mulher de 13:1 no Brasil em áreas endêmicas (Brummer *et al.*, 1993; Wanke & Londero, 1994) e de 78:1 na Colômbia (Restrepo 1994). Trabalhos experimentais demonstraram que a transformação *in vitro* dos conídeos para forma de leveduras é inibida por hormônios femininos (estrógenos) (Salazar *et al.*, 1988; Aristizabal *et al.*, 1998), mas não pela testosterona (Loose, *et al.*, 1983; Clemons *et al.*, 1989). Em contraste, teste de hipersensibilidade tardia (DTH) em indivíduos sadios de áreas endêmicas, não apontou diferenças baseadas no sexo. Assim, especula-se que ambos os sexos adquiram infecções subclínicas na mesma taxa (Restrepo *et al.*, 2008), mas a progressão da doença é muito mais frequente no sexo masculino.

A PCM, principalmente na sua forma pulmonar, deve ser diferenciada de outras micoses e da tuberculose e, por isso, o diagnóstico laboratorial por cultura, sorologia ou histopatologia é fundamental para a correta identificação do agente. O diagnóstico confirmatório da PCM depende da demonstração do agente etiológico em materiais biológicos (escarros, aspirado brônquico ou lavado broncoalveolar, material granulomatoso da base de úlceras). Na maioria dos casos, o fungo pode ser observado em preparações à fresco com KOH (hidróxido de potássio) ou em material de biópsia (90% dos casos). No exame micológico direto, ao microscópio ótico, podem ser observadas pequenas cadeias de blastoconídeos ou células com simples brotamento. Preparações histopatológicas coradas revelam leveduras com mutibrotamentos, especialmente no interior de granulomas. Embora nem sempre seja possível o isolamento do agente, este pode ser feito por semeadura e cultura do material biológico a 25-30°C e análise morfológica das colônias e das células (revisão em Restrepo *et al.*, 2008).

Testes sorológicos também são empregados para auxiliar o diagnóstico, monitorar a evolução da doença e a resposta ao tratamento desta micose (Mendes-Giannini *et al.*, 1994; Camargo & Cano, 1994, Camargo, 2008). Imunodifusão radial usando filtrado de cultura da fase leveduriforme é o mais frequentemente utilizado. Apresenta alta sensibilidade e especificidade (Restrepo, 1966; Camargo *et al.*, 1989). Métodos sensíveis como *immunoblotting*, para detecção de anticorpos específicos (Mendes-Giannini, 1989), e ELISA de competição, para pesquisa de

antígeno na circulação (Gómez *et al.*, 1997; Marques *et al.*, 2003), têm sido desenvolvidos para monitoramento dos pacientes. Métodos moleculares que utilizam PCR também foram propostos para facilitar o diagnóstico definitivo do fungo (Sandhu *et al.*, 1997; Goldani & Sugar, 1998; Diez *et al.*, 1999; Gomes *et al.*, 2000; San-Blas *et al.*, 2005).

A Anfotericina B foi à primeira droga a ser utilizada no tratamento da PCM, em 1958. Embora apresente algumas limitações como à administração apenas pela via endovenosa e alta nefrotoxicidade, este antifúngico é ainda a droga de escolha em tratamentos ineficientes devido à resistência às drogas (Shikanai-Yasuda *et al.*, 2006). Recentemente, Amaral e colaboradores (2009) utilizando a tecnologia de nanopartículas desenvolveram uma formulação de anfotericina B, que não apresentou nefro nem hepatotoxicidade para camundongos, indicando novos caminhos para terapia. A descoberta dos azólicos foi um avanço no tratamento da PCM. Os imidazólicos (cetoconazol) e triazólicos (fluconazol e particularmente o itraconazol) têm sido as drogas de escolha, por apresentarem menos efeitos colaterais (Restrepo *et al.*, 2008). Em geral, o tratamento é longo e, em alguns casos, atinge até 2 anos de terapia. Embora os antifúngicos possam impedir a progressão da PCM, recidivas e sequelas, como fibroses pulmonares são comuns após o término do tratamento (revisado por Borges-Walmsley *et al.*, 2002).

### 1.3. Relação Parasita-Hospedeiro

A ampla diversidade de formas clínicas é resultado de muitos fatores inerentes tanto à resposta do hospedeiro quanto à virulência do parasita, que juntos determinam a gravidade da doença (Musatti *et al.*, 1976; Biagione *et al.*, 1984; Franco, 1987; Mota *et al.*, 1985; Brummer *et al.*, 1993). Os estudos de imunopatologia da PCM têm tentado entender os mecanismos envolvidos nesta variedade de interações. Como em outras micoses profundas, a imunidade celular na PCM parece desempenhar papel fundamental nos mecanismos imunológicos de proteção do hospedeiro (Brummer *et al.*, 1993; Borges-Walmsley *et al.*, 2002). Pacientes com a forma crônica apresentam imunidade celular preservada e baixos níveis de anticorpos específicos, enquanto que indivíduos com a forma aguda mostram altos níveis de anticorpos específicos, ativação policlonal de células B e



depressão da resposta imune celular (Musatti *et al.*, 1976; Franco *et al.*, 1993; Benard *et al.*, 1997).

A infecção induz a formação de granulomas, os quais parecem impedir a disseminação do parasita para tecidos saudáveis. O granuloma formado na PCM tem no seu centro uma ou mais células fúngicas e é composto por células gigantes e epitelióides. Polimorfonucleares (PMNs) podem ser observados na região central próximos ao fungo e, ao redor das células epitelióides, existe um halo de células mononucleares (Montenegro & Franco, 1994). Entretanto, os mecanismos pelos quais ocorre a migração celular que formam e mantêm os granulomas ao redor do fungo ainda não são bem conhecidos. Em pacientes com a forma menos grave da doença, a resposta imune do hospedeiro induz à formação de granulomas compactos com número reduzido de fungos no seu interior, enquanto pacientes com a forma disseminada da doença apresentam granulomas frouxos ou em menor quantidade com grande número de células fúngicas viáveis nas lesões (Montenegro & Franco, 1994).

Há um consenso na literatura de que formas agudas ou subagudas da doença estão associadas à modulação negativa do padrão de citocinas Th1 e expressão dominante da imunidade Th2, com altos níveis de citocinas IL-4, IL-5, IL-10 e TGF- $\beta$ , maior quantidade de anticorpos IgG4, IgE e IgA, com eosinofilia e baixa produção de INF- $\gamma$ . Por outro lado, pacientes com forma menos grave apresentam padrão de citocinas típico da resposta Th1, alta produção de TNF- $\alpha$  e INF- $\gamma$  e níveis basais de IL-4, IL-5 e IL-10 (Benard *et al.*, 2001; Oliveira *et al.*, 2002; Mamoni & Blotta, 2005; Mamoni & Blotta, 2006; Restrepo, *et al.* 2008).

Macrófagos pulmonares e células dendríticas são provavelmente as primeiras células a interagir com o fungo. No entanto, os macrófagos parecem participar da disseminação e/ou da contenção da infecção (Revisão em Benard *et al.*, 2008). Estudos *in vitro* mostraram que o *P. brasiliensis* é capaz de se multiplicar dentro de macrófagos peritoneais e pulmonares (Brummer *et al.*, 1989; Cano *et al.*, 1992) e, portanto, poderiam transportar o fungo pela via linfática. Entretanto, macrófagos ativados por IFN- $\gamma$  são fungicidas (Brummer *et al.*, 1988). O TNF- $\alpha$ , produzido por macrófagos ativados por INF- $\gamma$ , está envolvido no recrutamento e ativação de células inflamatórias e na formação do granuloma (Kindler *et al.*, 1989; Vigna *et al.*, 2006). Além disso, TNF- $\alpha$  e INF- $\gamma$  podem participar da resistência ao *P. brasiliensis* por

mecanismos que incluem aumento da expressão de moléculas MHC (classe I e II), moléculas coestimuladoras (CD80 e CD86) e *burst* oxidativo em macrófagos. Os PMNs exercem efeito fungistático e fungicida sobre *P. brasiliensis*, atividade que aumenta quando ativada pelas citocinas IFN- $\gamma$ , GM-CSF e IL-1 $\beta$  (McEwen *et al.*, 1987; Kurita *et al.*, 1999; Kurita *et al.*, 2000).

Camundongos isogênicos foram utilizados pela primeira vez como modelo experimental da PCM por Calich e colaboradores (1985), estes animais possibilitaram a correlação entre as formas clínicas e padrão da resposta imune. Neste modelo, camundongos da linhagem A/Sn foram resistentes à infecção intraperitoneal enquanto camundongos B10.A foram susceptíveis e BALB/c intermediários, quando infectados com o isolado Pb18 de *P. brasiliensis* (Calich *et al.*, 1985). Animais resistentes (A/Sn) inoculados pela via intratraqueal desenvolveram infecção pulmonar crônica benigna. Por outro lado, infecção similar nos camundongos susceptíveis (B10.A) resultou em doença crônica progressiva, disseminação do fungo para fígado e baço, maior taxa de mortalidade, discreta reação de DTH, pouca ou nenhuma ativação das células do lavado broncoalveolar (Cano *et al.*, 1995).

O termodimorfismo celular do *P. brasiliensis* é essencial para o estabelecimento da PCM (Restrepo & Jiménez, 1980; San Blas, 1982), uma vez que isolados que não se diferenciam em leveduras são incapazes de causar a doença (Moraes Borba & Shaffer, 2002). A associação entre morfogênese e virulência tem sido descrita em vários fungos dimórficos (*B. dermatitidis*, *C. immitis*, *H. capsulatum*, *P. brasiliensis*, *P. marneffeii* e *S. schenkii*) (Medoff *et al.*, 1987; San-Blas & Niño-Vega, 2001; Broges-Walmsley *et al.*, 2002; Rooney & Klein, 2002). Os mecanismos do controle da morfogênese são complexos e envolvem alterações na estrutura da parede celular, processos metabólicos e cascatas de sinalização (revisado por San-Blas *et al.*, 2002). Durante a transição dimórfica, *P. brasiliensis* modifica os polímeros de glucana da parede celular de  $\beta$ -glucana, predominante na fase de micélio, para  $\alpha$ -glucana, encontrada em maior quantidade na fase de levedura (San-Blas & San-Blas, 1994). Esse processo pode ser considerado como mecanismo de escape do fungo, já que  $\beta$ -glucanas podem induzir resposta pró-inflamatória e antimicrobiana através de receptores *Toll-like* (TLR) e dectina-1 (Brown & Gordon, 2003).

## **1.4. Virulência de *P. brasiliensis***

### **1.4.1. Heterogenicidade de isolados**

A heterogeneidade entre os diferentes isolados de *P. brasiliensis* tem sido descrita por vários autores. Variações quanto às características de virulência, velocidade de crescimento, composição bioquímica, imunogenicidade, perfil de isoenzimas, cariótipo já foram descritas (Zacharias *et al.*, 1986, Burger *et al.*, 1996; Calcagno *et al.*, 1998; Molinari-Madlum *et al.*, 1999; Svidzinski *et al.*, 1999; Feitosa, *et al.*, 2003; Carvalho *et al.*, 2005). É possível que tal diversidade esteja correlacionada às diversas manifestações clínicas (Franco, 1986).

Graus variados de virulência já foram descritos em diferentes isolados. Kashino e col. (1985) estudaram as características *in vitro* e *in vivo* de seis isolados considerando Pb18, um isolado virulento, e Pb265, como avirulento, mas não foram demonstradas diferenças no padrão de crescimento *in vitro* entre os dois isolados. Em 1989, Singer-Vermes e colaboradores avaliaram sete isolados quanto à sua virulência (dose letal – DL<sub>50</sub>, histopatologia e resposta humoral), considerando Pb18 como altamente virulento, e Pb265, como pouco virulento ou avirulento. Este dados corroboraram os obtidos anteriormente por Zacharias e col (1986) utilizando infecção endovenosa em camundongos não isogênicos.

Em 1991, Sano e colaboradores avaliaram seis isolados correlacionando a patogenicidade e a capacidade de crescimento *in vitro* sob diferentes atmosferas de oxigênio. Os isolados mais virulentos foram os que apresentaram maior capacidade de crescimento em ambiente de microaerofilia, fato que poderia estar correlacionado à facilidade de sobreviver no interior de granulomas. Estes mesmos isolados foram analisados quanto à correlação entre virulência e morfologia da colônia miceliana. Aos isolados virulentos foram atribuídas colônias com padrão cotonoso (Sano, *et al.*, 1997). Este mesmo padrão foi observado quando dez isolados de *P. brasiliensis* foram avaliados em relação à patogenicidade e associação com morfologia miceliana e padrão genético por amplificação genômica do DNA polimórfico (RAPD). Amostras com baixa virulência apresentaram morfologia glabra/cerebriforme e alta similaridade genética (98,7%). O mesmo foi observado com isolados de alta virulência que compartilharam 96% de semelhança genética e colônias cotonosas (Kurokawa *et al.*, 2005).

O estudo do perfil de isoenzimas de 10 isolados de *P. brasiliensis*, apontaram pelo menos sete enzimas que exibiram padrões eletroforéticos capazes de diferenciar amostras do fungo (Svidzinski & Camargo 1995). Em estudo detalhado, Svidzinski e colaboradores (1999) avaliaram o comportamento de 30 amostras de *P. brasiliensis* de pacientes portadores de diferentes formas clínicas de PCM e observaram variabilidade fenotípica tanto na morfometria, número de brotamentos, capacidade de conversão de micélio-levedura e velocidade de crescimento.

Dez isolados de *P. brasiliensis* obtidos de tatus foram classificados de acordo com seu perfil de virulência, pelo número de CFU/g de tecido. Os resultados obtidos sugerem que os isolados de tatus apresentaram um perfil mais virulento que isolados de pacientes, sendo o isolado T10B1 classificado como de virulência muito elevada (Hebeler-Barbosa *et al.*, 2003) Carvalho e colaboradores (2005) demonstraram claramente que dois isolados de *P. brasiliensis*, Pb12 e Pb18, após diversas passagens consecutivas em animais, diminuíram a sobrevivência de camundongos infectados pela via endovenosa. Portanto, os autores evidenciaram o aumento da patogenicidade do mesmo isolado após inoculação em animais de experimentação. Este fenômeno de restauração da virulência pela passagem dos animais e o de atenuação da virulência pelo contínuo cultivo *in vitro*, foi reportado por outros autores (Castaneda *et al.*, 1987; Zacharias *et al.*, 1986; Brummer *et al.*, 1990; Svidzinski *et al.*, 1999).

### 1.4.2. Análises moleculares

Vários autores têm realizado estudos moleculares por meio de metodologias alternativas, uma vez que o *P. brasiliensis* têm sido refratário às análises de genética clássica, fato que tem atrasado estudos moleculares mais precisos. Análises do genoma permitiram a identificação de prováveis fatores de virulência. Goldman e colaboradores (2003) analisaram *in silico* 4.692 genes do banco de ESTs comparando com genes relacionados à virulência e patogenicidade de *C. albicans*. Entre os prováveis fatores de virulência foram encontrados genes relacionados ao metabolismo (isocitrato liase e malato sintase), à biossíntese da parede celular ( $\beta$ -Glucosiltransferase e quitina-sintase) e à sinalização intracelular (fatores das vias AMPc e MAPK). Neste mesmo trabalho, foram realizadas análises de expressão

gênica, durante a transição micélio-levedura. Os genes codificadores de proteínas de choque térmico (*HSP70*, *HSP82* e *HSP104*, de poliubiquitina (*UBI1*) e de uma delta-9-desaturase (*OLE1*) apresentaram aumento na expressão do mRNA.

Atráves das técnicas de *Suppression Subtraction Hybridization* (SSH) e *Macroarray* foram identificados 20 genes preferencialmente expressos na fase patogênica, incluindo o *AGS1* ( $\alpha$ -1,3-glucana sintase) e *TSA1* (antioxidante tiol específico) (Marques *et al.*, 2003). Nunes e colaboradores (2005) estabeleceram um *biochip* que possibilitou a análise de aproximadamente 4700 genes. Alguns destes estavam abundantemente expressos ao final da transição para levedura, entre os quais o gene *METR*, que codifica um fator de transcrição que ativa genes envolvidos na assimilação de sulfato, o gene da álcool desidrogenase III e o gene da 4-hidroxifenil-piruvato desidrogenase (4-HPPD), que está envolvido no catabolismo de aminoácidos. A inibição de 4-HPPD pela droga NTBC (2-2-nitro-4-4-trifluorometil benzoil-ciclohexano-1,3-diona) inibiu a transição micélio-levedura *in vitro*.

Na análise *in silico* feita por Felipe *et al.* (2003) os genes que codificam Hsp70, Hsp60, Hsp104 e calmodulina tiveram expressão significativamente aumentada na fase leveduriforme do Pb01. Já em 2005, foram identificados cerca de 30 ortólogos anteriormente descritos como genes de virulência ou essenciais para *C. albicans*, *C. neoformans*, e *Aspergillus fumigatus*, sendo subdivididos em genes relacionados ao metabolismo, à parede celular ou à transdução de sinais (Felipe *et al.*, 2005). Mais recentemente, Parente e colaboradores (2008) descreveram 43 genes envolvidos nos processos iniciais da transição micélio-levedura.

Fonseca e colaboradores (2001) identificaram seis antígenos preferencialmente sintetizados na fase de levedura do fungo: catalase, frutose 1,6-bifosfato aldolase (aldolase), gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GADPH), malato desidrogenase e triosefosfato isomerase. As enzimas catalase, aldolase, triosefosfato isomerase e GADPH foram posteriormente clonadas e sequenciadas (Moreira *et al.*, 2004; Carneiro *et al.*, 2005; Pereira *et al.*, 2004; Barbosa *et al.*, 2004). GADPH foi encontrada na parede celular do *P. brasiliensis*, a molécula recombinante ligou-se a laminina, fibronectina e colágeno tipo I e anticorpos policlonais anti-GADPH inibiram a adesão do fungo à linhagem de pneumócitos A549, demonstrando assim a importância biológica da molécula (Barbosa *et al.*, 2006).

Outros modelos que mimetizam o ambiente no interior do hospedeiro foram utilizados nos estudos de transcriptoma. Estudo de *cDNA-representational difference*

*analysis* (cDNA-RDA) realizado por Bailão e colaboradores (2006), identificou genes relacionados à aquisição de ferro, síntese de melanina e defesa celular regulados positivamente no modelo de infecção em camundongo. As leveduras incubadas com sangue humano modularam genes principalmente relacionados à síntese e remodelamento da parede celular. Utilizando análise de *Microarray*, foram identificados 152 genes diferencialmente expressos em leveduras após a internalização por macrófagos murinos peritoneais *in vitro*. Foram validados três genes por RT-PCR: *metG*, relacionado a produção de metionina e dois genes relacionados ao stress oxidativo *SOD3* e *HSP60* (Tavares *et al.*, 2007). Mais recentemente, três membros da família das catalases (*PbCatA*, *PbCatP* e *PbCatC*) (Chagas *et al.*, 2008) e genes relacionados ao ciclo do glioxilato foram regulados positivamente após passagem em macrófagos murinos (Derengowski *et al.*, 2008).

Em *P. brasiliensis* pouco se conhece sobre sinalização no controle das mudanças morfológicas. Alguns componentes das vias de sinalização como os da via AMP cíclico (cAMP) (Chen *et al.*, 2007),  $Ca^{2+}$ /calmodulina–calcineurina (Carvalho *et al.*, 2003) e MAP-quinase foram encontrados em *P. brasiliensis* através de análise de transcriptoma e anotação reversa (Goldman *et al.*, 2003; Felipe *et al.*, 2005; Fernandes *et al.*, 2005). Dois genes da família de ras, *RAS1* e *RAS2*, também foram identificados por análises de *Southern blot*. Estes genes estão, possivelmente, envolvidos no processo de morfogênese e diferenciação, resposta ao choque térmico e interações parasita-hospedeiro (Fernandes *et al.*, 2008). Outras proteínas induzidas durante a transição de fase de fungos dimórficos e que também estão envolvidas com a termotolerância são as proteínas de estresse (Hsps) (Goldani *et al.*, 1994). Entre os genes já caracterizados estão *HSP70* (Silva *et al.*, 1999; Theodoro *et al.*, 2008), *HSP60* (Izaac *et al.*, 2001), *CLPB* (Jesuino *et al.*, 2002), *PbLON* (Barros & Puccia, 2001), *PbMDJ1* (Batista *et al.*, 2006) e *PbHSP90* (Nicola *et al.*, 2008). Recentemente Correia e colaboradores (2009) identificaram uma sequência que parece ser um marcador molecular de isolados virulentos, denominada de Ceja-1.

#### **1.4.3. Prováveis fatores de virulência**

Os primeiros estudos sobre virulência afirmavam que esta característica era intrínseca do patógeno. Este conceito foi redefinido, incorporando os fatores

relacionados à interação com hospedeiro. Vários mecanismos e moléculas, prováveis fatores virulência, têm sido considerados importantes na patogenicidade de micoses invasivas, incluindo dimorfismo, termotolerância, adesão, componentes da parede celular, produção de enzimas como as proteinases, lipases, fosfolipase além de outras (Hogan *et al.*, 1996, San-Blas *et al.*, 2000; Van Burik & Magee, 2001).

O principal e melhor caracterizado antígeno de *P. brasiliensis* é uma glicoproteína de 43kDa secretada denominada gp43 (Puccia *et al.*, 1986). Anticorpos específicos para este antígeno são encontrados em praticamente 100% dos soros de pacientes com PCM (Puccia *et al.*, 1986; Puccia & Travassos, 1991a; Camargo *et al.*, 1994). Esta glicoproteína é do tipo *high manose* e tem uma única cadeia oligossacarídica N-ligada (Puccia & Travassos, 1991b; Cisalpino *et al.*, 1996, Almeida *et al.*, 1996), a qual interage com receptores para manose em macrófagos murinos (Almeida *et al.*, 1998; Popi *et al.*, 2002). O gene *PbGP43* foi o primeiro caracterizado em *P. brasiliensis* e sua sequência apresenta grande similaridade com exo-1,3- $\beta$ -glucanases fúngicas. Contudo, um dos sítios catalíticos conservados de atividade de glucanase apresentou a substituição do resíduo E para K, de NEP para NKP, o que provavelmente induziu a perda da atividade enzimática da gp43 (Cisalpino *et al.*, 1996). Estudos moleculares de 17 isolados do fungo mostraram polimorfismo no gene que codifica gp43 (Morais *et al.*, 2000).

A gp43 é potencial fator de virulência, uma vez que, pode se ligar à laminina murina, resultando no aumento da patogenicidade da célula leveduriforme (Vicentini *et al.*, 1994). O fungo pode também se ligar a outros componentes da matriz extracelular (Mendes-Giannini, *et al.*, 2000). Este mesmo grupo mostrou a interação da gp43 com fibronectina humana, sugerindo que essa glicoproteína realmente pode ter papel importante na adesão do fungo a diferentes componentes da matriz extracelular do hospedeiro (Mendes-Giannini *et al.*, 2006). Outros estudos mostraram papel da gp43 como adesina, já que a molécula participou diretamente da interação do fungo a pneumócitos da linhagem A549 e às células *Vero* (Hanna *et al.*, 2000; Mendes-Giannini *et al.*, 2004). Apesar desses estudos, alguns trabalhos têm sugerido que a molécula possa ter participação nos mecanismos de evasão do fungo. Popi e colaboradores (2002) mostraram que gp43 inibiu a fagocitose de *P. brasiliensis* vivo ou morto pelo calor, de partículas de zimosan e, além disso, inibiu a

produção de NO e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de macrófagos peritoneais murinos. Mais recentemente, o mesmo efeito foi demonstrado em macrófagos derivados de medula óssea e os epítomos das moléculas responsáveis por esse efeito foram identificados (Konno *et al.*, 2009). Em experimentos com células dendríticas imaturas, gp43 inibiu a expressão de MHC, CD80 e CD54 (Ferreira *et al.*, 2004).

Outros antígenos do *P. brasiliensis* têm sido descritos, mas poucos foram purificados e caracterizados. A gp70 é uma glicoproteína de 70 kDa secretada pelo fungo, reconhecida por 96% dos soros de pacientes com PCM (Salina *et al.*, 1998) e indutora de resposta linfoproliferativa, quando testada com linfócitos de indivíduos com a doença ativa (Benard *et al.*, 1997). A proteína nativa purificada é capaz de modular as funções de macrófagos peritoneais murinos e anticorpos monoclonais anti-gp70 conferem proteção em animais infectados experimentalmente com o fungo (Mattos Grosso *et al.*, 2003).

Uma serina-tiol protease extracelular, também caracterizada, é um provável fator de virulência por hidrolisar componentes da membrana basal, como fibronectina, laminina, colágeno IV e proteoglicanas. Esta ação enzimática pode aumentar a capacidade de disseminação fúngica, agindo, provavelmente, em conjunto com gp43 (Carmona *et al.*, 1995; Puccia *et al.*, 1998). Adicionalmente, foi observado que polissacarídeos neutros do fungo foram capazes de estabilizar a atividade hidrolítica da enzima provavelmente previne sua autólise antes de atingir o substrato *in vivo* (Matsuo *et al.*, 2006).

Paracoccina, uma proteína secretada pelo fungo, mostrou capacidade de ligação à laminina murina e induziu alta produção de TNF- $\alpha$  e NO por macrófagos peritoneais murinos (Coltri *et al.*, 2006). Outros antígenos com distintas massas moleculares também foram identificados e caracterizados. Dentre eles, destaca-se uma proteína de 87 kDa, encontrada no soro de pacientes com PCM (Gómez *et al.*, 1997) e com N-terminal apresentando homologia para Hsp70 de vários fungos, incluindo *P. brasiliensis* (Díez *et al.*, 2002). Proteínas antigênicas com massa molecular de 27 e 58 kDa também foram caracterizadas (McEwen *et al.*, 1996; Figueroa *et al.*, 1995). Além dessas, análises de gel-bidimensional auxiliaram na identificação de uma proteína de 54kDa com propriedades de adesão a fibronectina e homóloga a uma enolase de *P. brasiliensis* (Donofrio *et al.*, 2009)



### **1.5. Técnica de *Phage Display***

Várias técnicas têm sido fundamentais na busca de marcadores moleculares com potencial aplicação no diagnóstico, na terapêutica e no desenvolvimento de fármacos, vacinas e outros insumos, entre elas a técnica de *Phage display*. Esta foi uma das primeiras técnicas desenvolvidas para o estudo de interações proteína-ligante (Smith & Scott, 1985). Este método apresenta peptídeos ou proteínas recombinantes acoplados à superfície de bacteriófagos. Estes podem interagir com células, tecidos, proteínas imobilizadas permitindo a seleção de pares ligante-receptor. Entre as vantagens desta técnica estão a relação entre genótipo e fenótipo, a enorme diversidade de variante de proteínas colocadas dentro de uma única biblioteca e a flexibilidade da seleção, que pode ser realizada *in vitro* ou *in vivo* (Mullen *et al.*, 2006)

Nesta técnica, geralmente, os peptídeos identificados apresentam atividade biológica relacionada com a natureza da molécula em estudo, por exemplo, no caso de um receptor de superfície, o peptídeo assemelha-se a uma proteína ligante do receptor (Giordano *et al.*, 2001, Jouault *et al.*, 2001), competindo pela ligação ao receptor. A seleção de peptídeos ligantes de anticorpos permite não apenas a identificação do antígeno reconhecido, mas também o mapeamento do epítopo, poupando o pesquisador meses de trabalho para identificar qual região do antígeno é reconhecida pela imunoglobulina.

O processo de seleção de peptídeos ligantes mais recomendado é aquele realizado diretamente na superfície da célula. Entretanto, a realização desse processo em células apresenta alguns empecilhos como o reconhecimento de clones inespecíficos e o elevado número de lavagens requeridas. Além disso, células e ligantes em potencial podem ser perdidos durante as repetidas lavagens que, além de trabalhosas, são ineficientes (Giordano *et al.*, 2001).

Para melhorar o processo de seleção de fagos ligantes a células vivas, uma nova metodologia foi desenvolvida, que consiste na separação de células e fagos através de uma única centrifugação. Este método de varredura, seleção e identificação de receptores de superfície celular foi designado BRASIL - *Biopanning and Rapid Analysis of Selective Interactive Ligants* – e é baseado em centrifugações diferenciais de uma suspensão de células anteriormente incubadas com fagos que

expressam em sua superfície seqüências peptídicas aleatórias (Giordano *et al.*, 2001)

Os estudos de doenças infecciosas têm sido beneficiado pela tecnologia de *Phage display*, principalmente na identificação de adesinas microbiana que são vitais para colonização. Hertveldt e colaboradores (2003) utilizaram esta metodologia para analisar a interação entre proteínas do *S. cerevisiae*, para isso construíram uma biblioteca de fagos com o próprio genoma deste fungo. Este estudo sugeriu que a biblioteca genômica pode ser utilizada para varrer e mapear as interações de qualquer proteína codificada no genoma da levedura, auxiliando nos estudos das funções celulares das proteínas. Já Jouault e col. (2001) isolaram peptídeos que mimetizam componentes da parede celular de *C. albicans*, visando de desenvolver um modelo de vacina.

Beenhouwer e col. (2002) buscaram mimotopos de alta afinidade para glicoronoxilomamana (GXM), um componente polissacarídico da cápsula de *C. neoformans*. Ao imunizar camundongos com GXM conjugado ao toxóide tetânico observou-se que, baseado no epitopo reconhecido, poderia ser desenvolvida resposta humoral protetora ou não protetora. Utilizando anticorpo monoclonal (mAb) anti-GXM mais protetor (2H1) e técnica de *Phage display*, foi possível isolar o peptídeo PA1. A partir de modificações na porção terminal do motivo de PA1 e um novo *screening* utilizando uma sub-biblioteca de seis aminoácidos aleatórios foram obtidos peptídeos de alta afinidade por 2H1, possíveis candidatos a vacina contra este fungo. Mais recentemente, Lionakis e col (2005) selecionaram peptídeos que se ligavam à superfície de conídeos e hifas de *Aspergillus fumigatus*, tanto *in vitro*, quanto em cortes histológicos de pulmões de camundongos com aspergilose pulmonar invasiva. Portanto a grande vantagem desta técnica é a rapidez com que seus resultados podem ser levados à clínica, seja como alvos diagnósticos (Mintz *et al.*, 2002), como agentes carreadores de drogas (Arap, *et al.*, 1998, Ellerby *et al.*, 1999) ou vetores para terapia gênica (Trepel *et al.*, 2000, Muller *et al.*, 2003).

Assim, várias técnicas têm sido empregadas na busca de biomarcadores de virulência, uma vez que a caracterização de moléculas e o entendimento dos processos biológicos, nas quais estão envolvidas, poderiam contribuir para o entendimento da biologia de *P. brasiliensis* e, conseqüentemente, da sua patogenicidade. Entretanto, as moléculas até então estudadas são, na verdade,

presuntivos fatores de virulência (Hogan *et al.*1996). Casadevall (2003) propõe que os fatores de virulência, em *C. neoformans*, poderiam apresentar “duplo-uso”: fatores inerentes ao meio ambiente contribuiriam para exercer pressões seletivas, atribuindo características ou funções que originariamente não estavam envolvidas com a patogenicidade do fungo. No entanto, mesmo com o empenho de diversos grupos e da grande quantidade de informações geradas sobre o *P. brasiliensis*, ainda estamos longe de concluir este imenso questionamento representado pela biologia deste patógeno.

## **2. OBJETIVOS**

---

---

## **2.1. Geral**

Comparar os isolados de *P. brasiliensis* Pb18 atenuado e Pb18 virulento identificando e caracterizando biomarcadores de virulência.

## **2.2. Específicos**

- Recuperar a virulência do isolado Pb18 atenuado. Avaliar os perfis de patogenicidade dos isolados (atenuado e virulento).
- Comparar as mudanças morfológicas, fisiológicas e de expressão gênica após a passagem do isolado em animal.
- Identificar, isolar e caracterizar biomarcadores de virulência de *P. brasiliensis*.
- Definir a atividade biológica dos biomarcadores selecionados e sua importância na patogenicidade do fungo.

### ***3. MATERIAIS E MÉTODOS***

---

### **3.1. Soluções principais**

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 2,7378M, KCl 0,053 M, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,1301M e K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,0229M. A solução estoque foi diluída 20 vezes para o uso (PBS 1X).
- **PBS-Tween-G:** 0,25% de gelatina (p/v), 0,05% de Tween-20 (v/v) em PBS 1X concentrado.
- **Tampão de amostra para SDS-PAGE:** Tris-HCl 62 mM, pH 8,8, contendo 0,2% (p/v) de SDS, β-mercaptanol 50mM, 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):** Tris-HCl 1,5M, pH 8,8, contendo 0,4% de SDS (p/v).
- **Tampão para gel de proteína (empacotamento):** Tris-HCl 0,5M, pH 6,8, contendo 0,4% de SDS (p/v).
- **Tampão de corrida para SDS-PAGE:** Tris 25mM, glicina 190mM, pH 8,3, e 0,1% de SDS (p/v).
- **Tampão de transferência:** Tris-HCl 25 mM, glicina 192 mM e 20% de metanol (v/v).
- **Soluções da coloração da prata:**
  - 1<sup>a</sup> - 50% de metanol (v/v), 12% de ácido acético (v/v) e 0,05% de formaldeído (v/v).
  - 2<sup>a</sup> - 50% de etanol (v/v).
  - 3<sup>a</sup> - 0,02% de tiosulfato de sódio (p/v).
  - 4<sup>a</sup> - 0,2% de nitrato de prata (p/v) e 0,07% de formaldeído (v/v).
  - 5<sup>a</sup> - 6% de carbonato de sódio (p/v), 0,0004% de tiosulfato de sódio (p/v) e 0,05% de formaldeído (v/v).
  - 6<sup>a</sup> - 50% de metanol (v/v) e 12% de ácido acético (v/v).
  - 7<sup>a</sup> - 50% de metanol (v/v).

- **Suplemento para meio *Terrific Broth*:** 2,31% de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 12,54% de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ . Após dissolver por completo esta solução foi filtrada (filtro de  $0,22\mu\text{m}$ ).
- **Suplemento para meio Mínimo:** Este suplemento foi composto de 4 soluções as quais foram autoclavadas separadamente e, após atingir temperatura ambiente, as 3 últimas soluções foram adicionadas à primeira e estocada à temperatura ambiente. Solução 1: 32,3mL de 40% (p/v) de glicose; solução 2: 25mL de 0,4M  $\text{MgSO}_4$  (acondicionada em garrafa de plástico); solução 3: 3mL de 0,1M  $\text{CaCl}_2$  (acondicionada em tubo de polipropileno) e solução 4: 10mL de 1% de tiamina.HCl (vitamina B1, acondicionada em tubo de polipropileno).
- **TBE 5x:** 5,4% de Tris-base, 2,75% de ácido bórico, 1,86% de EDTA (pH 8,0) (Sambrook 1987).
- **SSC 20x** - 0,15 M de cloreto de sódio, 0,015M de citrato de sódio, pH 7,0-8,0.
- **Solução de Denharts** - Ficoll (Tipo 400) 1%, polivinilpirrolidona 1% e BSA 1%.

### 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 Biosciences*. Os meios de cultivo foram adquiridos da Difco<sup>TM</sup> e Sigma.

### 3.3. Meios de cultura

Os meios descritos a seguir foram preparados com água bidestilada e autoclavados por 15 min a  $120^\circ\text{C}$ . Aos meios sólidos foram adicionados 1,5% de ágar.

#### 3.3.1. Meios para cultivo de fungos

- **Meio Fava Netto enriquecido com asparagina e tiamina:** 0,3% de proteose peptona, 1% de peptona, 0,5% de extrato de carne, 0,5% de extrato de levedura, 0,5% de NaCl, 4% de dextrose, 0,14% de asparagina e 0,01% de tiamina, pH 7,3.



- **Meio BHI (infusão de cérebro e coração) enriquecido:** 3,7% de DIFCO™ Beef Heart for Infusion. Quando a temperatura do meio atingia cerca de 60°C era adicionado 4% de soro equino, 5% de sobrenadante de cultura de *P. brasiliensis* B-339, como fator de crescimento (Castañeda *et.al.* 1998) e ampicilina-estreptomicina (100µg/mL e 100UI/mL, respectivamente).

### **3.3.2. Meios para cultivo de bactérias**

- **Meio LB (Luria Bertani):** 1% de triptona, 0,5% de extrato de levedura e 1% de NaCl, pH 7.
- **Meio LB kan/tet:** meio LB acrescido 40µg/mL de tetraciclina e 100µg/mL de kanamicina. As soluções de antibióticos foram adicionadas em meio com ágar antes de solidificar (temperatura menor que 60°C). As placas prontas para uso foram mantidas a 4°C protegidas da luz.
- **Meio LB kan placas:** meio LB acrescido de 1,5% de ágar e depois de autoclavado adicionou-se 100µg/mL de kanamicina.
- **Meio TB (Terrific Broth):** 1,2% de triptona, 2,4% de extrato de levedura, 0,4% de glicerol.
- **TB sup/kan:** meio TB acrescido de 10% de suplemento TB e 50µg/mL de kanamicina.
- **Meio Mínimo (MM):** 0,9% de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> anidro, 1,66% de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> anidro, 0,2% NH<sub>4</sub>Cl. O meio foi colocado em garrafas de vidro e autoclavado; após atingir a temperatura ambiente foram adicionados 0,88µl/mL de suplemento para meio mínimo e 100µg/mL de kanamicina.

## **3.4. Preparação dos isolados**

### **3.4.1. Animais**

Foram utilizados camundongos isogênicos com idade entre 6 e 8 semanas, da linhagem B10.A, machos. Estes animais foram obtidos do biotério da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) e mantidos na disciplina de

Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) desta mesma Universidade, com água e comida *ad libitum*.

### **3.4.2. Isolados Fúngicos**

Dois isolados de *P. brasiliensis* (T10B1 e T4B17) foram originalmente obtidos de tatus que habitam áreas endêmicas para PCM (Botucatu, São Paulo), como descrito previamente por Bagagli (1998). Mg16 foi recentemente isolado da região de fundo de sulco anterior do maxilar inferior de uma paciente, no Laboratório de Micologia Médica da Universidade Estadual de Maringá. Pb339 foi obtido da coleção de fungos do Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de São Paulo. Os isolados Pb18 atenuado ou virulento para camundongos susceptíveis da linhagem B10.A também foram utilizados neste estudo. Para obtenção e manutenção da virulência do isolado Pb18 foram realizadas diversas passagens em camundongos da linhagem B10.A como descrito a seguir. O isolado Pb18 atenuado tem sido mantido em laboratório em cultura *in vitro*, por aproximadamente 5 a 6 anos. Todos os isolados foram mantidos por repique semanal em meio semissólido de Fava-Netto (Netto *et al.* 1969) a 35°C. Para os experimentos a seguir foram, sempre, utilizadas culturas de 5 dias.

### **3.4.3. Recuperação e manutenção da virulência**

As células fúngicas do isolado Pb18 com 5 dias de crescimento em meio semissólido de Fava Netto, foram separadas em PBS, sendo utilizadas as isoladas ou com poucos brotamentos para infecção. A viabilidade das células foi determinada com azul de Trypan (0,4%) em câmara de Neubauer e para cada animal foram utilizadas  $1 \times 10^6$  células viáveis em 50µl de PBS para infecção intratraqueal (i.t). Após período de 30 a 60 dias os animais foram sacrificados e dos seus órgãos (baço, fígado e pulmão) recuperadas as células fúngicas. Este procedimento foi repetido cerca de 5 vezes, até a obtenção do isolado Pb18 virulento.

### **3.5. Diferenças entre os isolados Pb18 de *P. brasiliensis***

#### **3.5.1. Curva de sobrevivência (i.v)**

Os isolados Pb18 virulento, Pb18 pouco virulento e Pb265 de *Paracoccidioides brasiliensis* foram inoculados via intravenosa (i.v) ( $5 \times 10^6$  células leveduriformes viáveis em 100 $\mu$ l de PBS estéril) na veia lateral da cauda de camundongos B10.A machos (6 por isolado). O grupo controle recebeu apenas 100 $\mu$ l PBS. Para isso os camundongos foram aquecidos com o auxílio de uma lâmpada de infravermelho para dilatação da veia, imobilizados e injetados.

#### **3.5.2. Curva de sobrevivência (i.t.)**

As células fúngicas dos isolados Pb18 (atenuado e virulento) com 5 dias de crescimento foram separadas em PBS, sendo utilizadas as isoladas ou com poucos brotamentos para infecção. A viabilidade das células foi determinada com azul de Trypan (0,4%) em câmara de Neubauer e para cada animal foram utilizadas  $1 \times 10^6$  células viáveis em 50 $\mu$ l de PBS para infecção intratraqueal (i.t). Após o preparo das leveduras, camundongos da linhagem B10.A machos (6 animais por grupo) foram anestesiados via intraperitoneal com cloridrato de xilazina (10mg/Kg) associado com cloridrato de cetamina (50mg/Kg). Após a anestesia foi realizado corte asséptico na altura da traquéia. Em seguida foi inoculado via intratraqueal (i.t) ( $10^6$  células leveduriformes viáveis em 50 $\mu$ L de PBS estéril). O grupo controle recebeu apenas 50 $\mu$ L PBS.

#### **3.5.3. CFU e Histologia**

Os isolados Pb18 virulento e atenuado de *P. brasiliensis* foram inoculados via intratraqueal (i.t) ( $10^6$  células leveduriformes viáveis em 50 $\mu$ L de PBS estéril) em camundongos B10.A machos (6 por isolado) após anestesia intraperitoneal (i.p), conforme descrito acima. Transcorridos 30, 60 e 90 dias após a infecção pulmão, baço e fígado de cada animal foi removido, uma parte foi fixado em 10% de formaldeído, e embebido em parafina para análise histopatológica. Os cortes foram

marcados com hematoxilina-eosina (H&E) e examinados ao microscópio acoplado a câmera para obtenção das imagens. O restante de cada órgão foi macerado e devidamente diluído para plaqueamento em meio BHI enriquecido para determinação de unidades formadora de colônia (CFUs) em cada um dos órgãos dos animais infectados com isolado atenuado ou virulento.

#### **3.5.4. Determinação da Curva de Crescimento**

A determinação do crescimento foi realizado como descrito por Kashino *et al.* em 1985. Inicialmente foram separados trinta tubos contendo 6mL de meio de cultura Fava Netto caldo no qual foi inoculado 0,1mL de suspensão de *P. brasiliensis* ajustada na concentração de  $20.0 \times 10^6$  FU (unidades fúngicas – célula mãe mais os brotamentos) leveduras/ml. Este procedimento foi repetido para cada um dos isolados Pb18 de *P. brasiliensis* (atenuado ou virulento). A cada dois dias, as células fúngicas de três tubos eram coletadas até completar 12 dias após a inoculação. O crescimento total de cada tubo foi removido, lavado três vezes em PBS, devidamente diluído, e número de células totais e viáveis foi determinado.

#### **3.5.5. Avaliação *in vitro* das características morfométricas**

A avaliação morfométrica foi realizada de acordo com Svidzinski *et al.* (1999). Culturas de 5 dias foram inoculadas tanto em meio de Fava-Netto líquido quanto sólido, em triplicata. Após cerca de 5 dias uma alíquota de cada frasco foi retirada e observada a morfologia e diâmetro das células mães de cada um dos isolados de *P. brasiliensis*. A determinação do tamanho celular das leveduras foi realizada em microscópio Olympus CBB acoplado a câmera fotográfica que obteve as imagens para posterior determinação dos principais eixos transversais e longitudinais de 100 células leveduriformes viáveis para cada alíquota obtida.

### **3.5.6. Microscopia eletrônica de transmissão**

Os procedimentos de ultramicrotomia e análise de ultra-estrutura dos isolados Pb18 atenuado e virulento de *P. brasiliensis* foram realizados no Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, sob orientação da Professora Dra. Sonia Rozental, chefe do Laboratório de Biologia Celular de Fungos.

#### **3.5.6.1. Preparação de leveduras para ultra-microtomia**

Leveduras (isolado Pb18 atenuado ou virulento de *P. brasiliensis*) obtidas de culturas em fase logarítmica de crescimento foram lavadas em tampão cacodilato de sódio (TC) 0.1 M, pH 7,2 e fixadas em Karnovsky (glutaraldeído 2.5%, v/v, e paraformaldeído 4%, p/v, em TC) durante 3½ h, à temperatura ambiente, sob agitação constante. As células permaneceram no fixador a 4 °C até o momento do processamento. O precipitado de leveduras foi lavado em TC e em seguida adicionada solução de ferrocianeto ( $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$ ) 0.8% (v/v) acrescida de tetróxido de ósmio 1% (v/v) em TC durante 2 h à temperatura ambiente, sob agitação constante em seguida as amostras foram lavadas em água ultra-pura (3x, 10 min). Para a desidratação as amostras foram submetidas a concentrações crescentes de etanol (Merck) 70, 90 e 100 % durante 30 min cada. Os fragmentos celulares foram infiltrados com Spurr (Embed-it™. Low Viscosity Epoxy Kit. Polysciences Inc.) com aumento progressivo da razão de resina para etanol absoluto (3:1, 2:1, 1:1, cada etapa com duração de 24h). Para infiltração com resina pura, foram realizadas 2 trocas de 2 - 3 h e, posteriormente, os fragmentos foram transferidos para cápsulas contendo resina. As cápsulas permaneceram na estufa a 65 °C durante 48 h para polimerização da resina. Secções ultrafinas (70–120 nm) obtidas no ultramicrótomo Leica (Germany) foram coletadas em grades de níquel.

#### **3.5.6.2. Análise da ultra-estrutura dos isolados.**

As secções ultrafinas foram coradas por acetato de uranila e citrato de chumbo e observadas em TEM tipo JEOL 1200 EX, operando a 80 kV.

### **3.5.7. Produção de exoantígeno de *P. brasiliensis***

Após 5 dias de cultura em meio ágar Fava Netto, as células fúngicas de Pb18 foram transferidas para erlenmeyer contendo 50mL de caldo de meio Fava Netto caldo enriquecido com tiamina e asparagina. Este foi mantido em agitação por 3 dias a 37°C, sendo então transferido para um frasco tipo Fernbach contendo 500mL do mesmo meio e mantido por mais 7 dias, nas mesmas condições. Após este período as células foram mortas com timerosal 0,4g/L e o sobrenadante (exoantígeno bruto) coletado após filtração em papel de filtro. O exoantígeno foi concentrado e realizada dosagem das proteínas e monitoramento por SDS-PAGE.

### **3.5.8. Dosagem de proteínas**

As determinações protéicas foram realizadas segundo método de Bradford, (1976), que utiliza Coomassie Brilliant Blue (CBB) G-250 (Sigma) como reativo e albumina bovina (BSA) 1,0mg/mL como padrão.

### **3.5.9. SDS-PAGE**

Eletroforese vertical em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970) foi realizada em equipamento Mini-Protean II (Bio-Rad) conforme descrito anteriormente (Lopes *et al.*, 1985). 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 62mM, pH 6,8, contendo 0,2% (p/v) de SDS,  $\beta$ -mercaptoetanol 50mM, 0,005% (p/v) de azul de bromofenol e 10% (v/v) de glicerol), submetidas a 100° C por 3 minutos e aplicadas nos sulcos do gel. Os eletrodos do aparelho foram mergulhados em tampão de corrida contendo Tris 25mM, glicina 190mM 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 ou foram corados pelo método da Prata (Ansorge, 1985) ou por *Coomassie blue*.

### **3.6. Ensaios de *Microarray***

Os procedimentos de produção de cDNA, marcação da fita, hibridação com as *expressed sequence tags* (ESTs) fixadas em lâminas e análises dos resultados de microarranjos foram realizados na Universidade de São Paulo, campus Ribeirão Preto, sob orientação da Professor Gustavo Goldman.

#### **3.6.1. Extração de RNA total**

Camundongos da linhagem B10.A, machos, de 6 a 8 semanas de idade, foram infectados por via intratraqueal com  $1 \times 10^6$  células leveduriformes do isolado Pb18 de *P. brasiliensis*. Após 45 dias de infecção os animais foram sacrificados e macerados pulmão, baço e fígado para a recuperação, em meio BHI, de células leveduriformes consideradas como virulentas. O isolado Pb18 pouco virulento também foi cultivado em meio BHI, na tentativa de eliminar as variáveis por mudança de meio de cultivo. Após 10 dias de cultivo em meio BHI ágar, a mesma quantidade de células dos dois isolados de *P. brasiliensis* foi inoculada em 500ml de meio BHI caldo a 37°C, sob agitação, por 6 dias. Após o cultivo as células leveduriformes foram lavadas três vezes com PBS estéril e congeladas a -70°C.

O RNA total foi extraído pelo método do Trizol® (Invitrogen), com modificações. A uma parte de células leveduriformes de *P. brasiliensis* foi adicionado a três partes de trizol e uma parte pérolas de vidro, previamente lavadas com água MiliQ tratada com 0,1% de dimetil pirocarbonato (DEPC). As células foram lisadas mecanicamente por agitação em vortex por 10 minutos. Após decantar naturalmente o sobrenadante foi recolhido e recebeu 200µl de clorofórmio PA para cada 1ml de trizol utilizado na etapa anterior e agitou-se gentilmente a mistura por 15 segundos. Em seguida, a mistura foi centrifugada por 15 min a 4000 rpm e o sobrenadante transferido para outro tubo, ao qual foi adicionado 1ml de isopropanol PA para cada 1ml de trizol utilizado na primeira etapa. Esta mistura foi armazenada por 16 horas a -80°C. Após o descongelamento a 25°C, centrifugou-se por 10 minutos a 4000 rpm e o

sobrenadante foi desprezado. Ao pellet foi adicionado 200µl de etanol 70% PA para cada ml de trizol utilizado na primeira etapa e centrifugado a 1200 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o pellet foi secado a 37°C. Em seguida, pellet seco foi ressuscitado em 250µl de água MiliQ tratada com 0,1% de DEPC e quantificado por espectrofotômetro (NanoDrop®). Para verificar a integridade do RNA, 20µg do RNA de cada isolado foi fracionado em gel de agarose (1,2%) e 2,2 M formaldeído, marcado com brometo de etídeo e visualizado em luz UV. A presença das bandas intactas de RNA ribossomal 28S e 18S foram utilizadas como critério para verificar se o RNA estava intacto.

### **3.6.2. Purificação do RNA**

O RNA utilizado nos ensaio de *Microarray* foi purificado através de um kit, Rneasy® (Quiagen), segundo as instruções do fabricante. Resumidamente, 150µg de RNA total foi ressuscitado em 100µl de H<sub>2</sub>O RNase free e adicionado de 350µl de tampão RLT®, agitando-se em seguida em vortex por 30 segundos. Foram então adicionados 250µl de etanol PA e após agitação o material foi transferido para a coluna de purificação; esta foi centrifugada por 10 minutos a 8000g e o *void* foi novamente passado na coluna, para melhor rendimento. Após nova centrifugação, a coluna foi lavada, duas vezes, com tampão RPE® e eluída, duas vezes, com 30µl de H<sub>2</sub>O livre de RNase aquecida (70°C). O RNA purificado foi novamente dosado, distribuído em alíquotas de 30µg e armazenados a -80°C.

### **3.6.3. Tratamento do RNA com DNase I**

A reação para eliminação de DNA das preparações de RNA foi feita em um volume final de 10µL: 2-5 µg de RNA total, 1.1–3 unidades de DNase I (Fermentas) e 1µL de tampão (200 mM de Tris, pH 8,3, 500 mM de KCl e 20mM de MgCl<sub>2</sub>) foram incubados à temperatura ambiente por 15min. Em seguida, foi adicionado 1µL de EDTA (25 mM) e o material incubado por 10min a 65° C.



#### **3.6.4. Hibridizações de *Microarray* e análise de dados**

O array consiste de insertos de cDNA de EST's (*expressed sequence tag*) representativas de 4,692 genes expressos que foram classificados funcionalmente por similariedade com genes conhecidos (Goldman *et al.*, 2003). Estes insertos foram amplificados com oligonucleotídeos iniciadores direto e reverso de M13, e o produto de amplificação foi purificado com o sistema QIAquick 96 PCR (QIAGEN), seco em sistema de *speed vac*, ressuspenso em 50% de dimetil sulfoxido na concentração final de 100 a 200µg/ml e fixado em laminas de vidro de 25 a 75mm cobertas com CMT-GAPS utilizando plataforma *Affymetrix 427*, de acordo com instruções do fabricante.

As amostras de RNA extraídas e purificadas como descrito acima foram marcadas pela incorporação de dCTP marcados com Cy3 e Cy5, como descrito *Bowtell & Sambrook*. Resumidamente, 30µg do RNA total *P. brasiliensis* foram ressuspenso em 13,2µl de água adicionada de 4µl of oligo(dT)<sub>12-18</sub> e aquecidos a 65°C por 10 min. O tubo foi rapidamente resfriado em gelo e adicionado de mistura de 6µl tampão de SuperScript 5X (Invitrogen), 1,8µl de MgCl<sub>2</sub>, 2,5 mM dNTPs, 2,4µl de ditiotreitol (0.1M) e 2µl de *Superscript II* (200 U/µl) (Invitrogen). A reação foi incubada por 2 horas a 42°C. A primeira fita de cDNA foi purificada, concentrada em Microcon YM-50 (Millipore) e ajustada para o volume final de 30µl. Cinco microlitros da solução de *random primer*, 8µl do fragmento de Klenow (0,8U/µl) e 5µl da solução de dNTPs (1,2mM dATP, 1,2mM dTTP, 1,2mM dGTP, and 0,6mM dCTP) foram adicionados ao sistema. Finalmente a fluorescência foi incorporada pela adição de 1µl de dCTP marcado com Cy3 ou Cy5 (1mM) (*Amersham Biosciences*). A reação foi incubada a 37°C por 2 h, e o cDNA marcado foi purificado em Microcon YM-50 (três lavagens). Ao cDNA marcado foram adicionados 100µl do tampão de Hibridização 1X contendo, SSC (5X), solução de Denhardt's (5X), 0,21 mg/ml DNA de esperma de salmão, 0,01% de dodecil-sulfato de sódio (SDS) e 42% formamida). Os *Arrays* foram hibridizados por 16 horas a 42°C na estação de hibridização Gene-Tac (*Genomic Solutions, Inc., Ann Arbor, MI*) e lavados duas vezes (42°C) em 0,5X SSC e 0,01% SDS, que foram seguidos por duas lavagens em 0,06X SSC e 0,01% SDS e duas lavagens finais em 0,06X SSC. Todos os passos de lavagem consistiram de um fluxo de tampão por 1min seguido de 5min de incubação. As

lamínas foram secas e a detecção da fluorescência foi realizada por scanner de array GMS 418 (*Affymetrix Inc.*, Santa Clara, CA). As imagens foram analisadas pelo programa TIGR Spotfinder (v.2.2.4).

### **3.6.5. RT-PCR quantitativo em tempo real**

A quantificação da expressão dos genes selecionados para validação dos resultados obtidos nas análises de *Microarrays* foi realizada com protocolo de detecção do sistema Syber Green<sup>®</sup> (*Applied Biosystems*), seguindo as instruções do fabricante. Este sistema utiliza um fluoróforo que intercala nas moléculas de cDNA dupla fita no momento da polimerização. Para a síntese de cDNA foram utilizados 10µg de RNA total (livre de DNA), 100µM de oligodT e 200U de transcriptase reversa (SuperScript – Invitrogen), para um volume final de 20µL, os quais foram diluídos para 50µL ao final da reação. Para cada reação de quantificação foram adicionados 2µM de cada oligonucleotídeo específico, 5µL da Master Mix do sistema Sybr Green<sup>®</sup> (*Applied Biosystems*) e 1µL de cDNA. As condições de ciclagem foram: um ciclo de 50°C por 2min, outro de 95°C por 1 min e 40 ciclos alternados de 95°C por 15seg e 60°C por 1min em aparelho *ABI Prim 7000 “Sequence Detector System”*. O normatizador utilizado nestas análises foi o gene da subunidade alfa da tubulina de *P. brasiliensis* ( $\alpha$ -TUB). Ao final da reação foi realizado um ciclo adicional de 95°C por 15seg, 60°C por 20seg e 95°C por 15seg, para determinação da curva de dissociação. A fluorescência dos sistemas foi monitorada durante as etapas de anelamento a 60°C e analisadas com relação aos seus correspondentes ciclos. Reações de padronização foram feitas para todos os conjuntos de oligonucleotídeos iniciadores. Diluições do cDNA pré-definidas foram utilizadas para obtenção das curvas padrão de cada conjunto de oligonucleotídeo iniciadores comparados sempre contra o normatizador.

Os resultados foram visualizados utilizando o programa “*Sequence Detector Software*” e então exportados para o programa Microsoft Excel, no qual os ciclos lineares (Ct) foram analisados em relação ao logaritmo da quantidade inicial de moléculas alvos. A equação da reta foi determinada através de análise de regressão linear. O valor do R<sup>2</sup> para cada conjunto dos oligonucleotídeos também foi calculado.

**3.6.5.1. Olígonucleotídeos iniciadores utilizados no sistema Syber Green®**

Oligos	Direção	Sequência
<b>4-HPPD</b>	Senso	5'-ACCATGTCCACTGGTATGTCGGAA-3'
	Anti-senso	5'-AACTGCGACAAATCATCCAGCGAC-3'
<b>SETP24</b>	Senso	5'-AACCATCAAGCTATGGGTGACGGA-3'
	Anti-senso	5'-CAACGGCAAGATGGCAATTGGGTA-3'
<b>CAM</b>	Senso	5'-ATCTCTCGCTATGGCCGACTCTTT-3'
	Anti-senso	5'-TTTGTCCCAAAGACCGCATCACAG-3'
<b>ARG1</b>	Senso	5'-CAAGTCCATACGCCTTCAACCGAA-3'
	Anti-senso	5'-AGCAGCATGGATTCCCTTGAGGAT-3'
<b>EF3</b>	Senso	5'-ATACAGAGCAGACCGTCATTGGCT-3'
	Anti-senso	5'-AACCGAACTCAATCAGACGCTCCT-3'
<b>HSP70</b>	Senso	5'-TTCGACTTGGGTGGTGGTACCTTT-3'
	Anti-senso	5'-AGGCGTTATCGAAATCCTCACCA-3'
<b>KEX</b>	Senso	5'-CGCCGTGGTGATTTAAGTGTGGAA-3'
	Anti-senso	5'-TGTCCTTGACGATGACGGTCCATT-3'
<b>GPD6</b>	Senso	5'-TCGACGTCAGTCCAACCTACCTTT-3'
	Anti-senso	5'-TTCGACTGTAGCTGCACTATGCCT-3'
<b>RPL22</b>	Senso	5'-TTCACAATGGCTCCTCAAACCTGCC-3'
	Anti-senso	5'-TCGAAGCGGAGACATCGAAGATT-3'
<b>ACDH</b>	Senso	5'-AGCACCGATCTTGCTGTCTCTGAA-3'
	Anti-senso	5'-AAACTTTATGCGTCCCAGGTTGCG-3'
<b><math>\alpha</math>-TUB</b>	Senso	5' CGGCTAATGGAAAATACATGGC 3'
	Anti-senso	5' GTCTTGGCCTTGAGAGATGCAA 3'

**3.7. Phage Display**

**3.7.1. Biblioteca de Phage display**

A biblioteca de fagos utilizada neste trabalho (CX7C) consiste de 7 aminoácidos aleatórios dispostos entre duas cisteínas dando origem a um peptídeo cíclico. A biblioteca foi produzida nos laboratórios do Dr. Wadih Arap e Renata Pasqualini (UT-MD Anderson Cancer Center, USA) e Dr. Erkki Koivunen (Universidade de Helsinki, Finlândia), utilizando-se o vetor fUSE5 e metodologia desenvolvida por George Smith (Smith & Scott, 1993) com algumas modificações para melhor eficiência e maior número de clones finais (Koivunen *et al.*, 1993; Koivunen *et al.*, 1999a; Koivunen *et al.*, 1999b)

### **3.7.2. BRASIL - seleção de fagos específicos.**

A seleção de fagos ligantes de células leveduriformes do isolado virulento *P. brasiliensis* (Pb18 com a virulência recuperada) foi realizada em duas etapas: eliminação de fagos ligantes de Pb18 atenuado e seleção de fagos ligantes ao isolado Pb18 virulento.

#### **3.7.2.1. Ciclos de seleção**

Inicialmente a biblioteca de fagos ( $10^9$  TU) foi incubada com  $10^8$  células de Pb18 atenuado em PBS-BSA1%, com o objetivo de excluir fagos ligantes a este isolado. Após 4 horas de incubação em gelo, as células fúngicas e os fagos não ligados foram separados por centrifugação (15000rpm/10min) sobre óleo ftálico (dibutil-ftalato:ciclohexano [9:1 (v/v)]) (Giordano *et al.*, 2001). Após centrifugação, a fase aquosa - que permanece na parte superior do tubo e que contém os fagos não ligados ao isolado atenuado- foi incubada com células leveduriformes do isolado virulento. Nesta etapa, todo volume da fase aquosa foi incubado com  $10^8$  células leveduriformes de Pb18 virulento. Após 4 horas de incubação em gelo, as células fúngicas e os fagos não ligados foram separados por centrifugação (15000rpm/10min) sobre óleo ftálico (dibutil-ftalato:ciclohexano [9:1 (v/v)]) (Giordano *et al.*, 2001).

Os fagos ligados ao isolado virulento foram recuperados transferindo o fundo do tubo com o *pellet* para outro tubo de 1,5 ml contendo 200µl de cultura fresca de *E. coli* K91kan. Em seguida, foram adicionados 800µl do meio LB low/tet e incubado por 1h a 37°C (sob agitação) para induzir o gene TetR-tetR. O volume total foi transferido para um tubo contendo 18mL de LB kan/tet e incubado por 18h, a 37°C e 265rpm, para amplificação dos fagos selecionados como ligantes do isolado virulento. No dia seguinte os fagos foram precipitados com PEG/NaCl e ressuspensos em PBS. Estes fagos foram titulados como descrito a seguir. Os fagos obtidos foram utilizados no segundo ciclo de seleção. Aproximadamente  $10^9$ TU dos fagos do primeiro ciclo foram incubados com  $10^6$  células de isolado Pb18 atenuado, como descrito anteriormente. Os fagos que permaneceram na fase aquosa (não ligados ao isolado atenuado) foram incubados com  $10^6$  leveduras do

isolado virulento e recuperados por infecção em *E. coli* K91, amplificados, precipitados e titulados para realização do terceiro ciclo.

### **3.7.3. Cultivo da bactéria *E. coli* K91kan**

Uma colônia da cepa *Escherichia coli* K91kan, cultura de 7 a 15 dias, foi previamente semeada em LB kan *overnight*, 250-300rpm, a 37°C. No dia seguinte, 100µl da cultura foi transferida para 10mL TB sup/kan e incubada a 37°C sob agitação (250-300rpm) até a densidade ótica (O.D. de 600nm) atingir 1,5 - 2.2.

### **3.7.4. Precipitação dos fagos**

Os fagos foram precipitados e concentrados utilizando polietilenoglicol e cloreto de sódio (PEG/NaCl). Após a infecção das bactérias e incubação por 18 horas a 37°C, 265 rpm, a cultura de bactérias infectadas pelos fagos foi centrifugada a 3,600xg por 10 minutos e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo contendo 15% (v/v) da solução de PEG/NaCl. Após 4 horas de incubação em gelo, o tubo foi centrifugado a 10.000xg por 30 minutos a 4°C. O *pellet* foi ressuscitado em 1ml de PBS e novamente foi adicionado 15% da solução de PEG/NaCl e incubado por 1 hora em gelo. Após o período de incubação, o tubo foi centrifugado a 10.000xg por 20 minutos a 4°C e o sobrenadante descartado. O *pellet* foi novamente centrifugado por mais 10 minutos assim garantindo que todo o PEG/NaCl foi removido do *pellet*. O precipitado de fagos foi ressuscitado em 50µl de PBS e centrifugado 10.000 x g por 5 minutos para remover todos os contaminantes bacterianos.

### **3.7.5. Titulação dos fagos**

O título de fagos é indicado por unidades de transdução (TU). Para titular, os fagos foram diluídos em LB 1000 vezes (1µl em 1ml) e submetidos a uma diluição seriada 1/10 vezes iniciado do tubo 1. Foram utilizados 10µl de cada uma das diluições para infectar 200µl de cultura fresca de *E. coli* K91kan durante 20 minutos. Em seguida, foram adicionados a cada diluição 790µl de meio LBlow/tet para induzir

o gene de resistência a tetraciclina e incubados por mais 45 minutos a 37°C, sob agitação. Após a incubação foram plaqueados 100µl de cada diluição, em triplicata, e cultivado *overnight* a 37°C. No dia seguinte, as placas contendo entre 50-200 colônias foram selecionadas para a contagem. Multiplicando o número de colônias encontradas pela diluição obteve-se o título correspondente.

### **3.7.6. Seleção de clones, Reação em cadeia da polimerase (PCR)**

Ao final da fase de seleção, parte dos fagos obtidos foi semeada em placas de meio LB kan/tet. As colônias de *E. coli* obtidas (infectadas com fagos) foram selecionadas aleatoriamente e ressuspendidas em 100µL de PBS, em placa de 96 poços com fundo em U. A região do DNA contendo o inserto foi amplificada a partir de 2µl dessa suspensão, por reação de PCR, utilizando-se oligonucleotídeos iniciadores específicos (5'-CATGCC CGGGTA CCTTTC TATTCT C-3' e 5'-TAATAC GACTCAC TATAGG GCAAGC TGATAA ACCGAT ACAATT-3') e termociclagem de 35 ciclos (desnaturação a 94°C, 15 segundos; anelamento a 60°C, 30 segundos e, extensão a 72°C, por 1 minuto).

### **3.7.7. Sequenciamento**

O método utilizado para o sequenciamento dos produtos de PCR foi o automático, realizado no aparelho ABI Prism<sup>®</sup>3100 *Genetic Analyzer* com o kit comercial *Big Dye Terminator 3.1 (Applied Biosystems)*.

Para reação de seqüência utilizou-se 0,5µl do produto de PCR, 1,6pmol do oligonucleotídeo iniciador específico senso (5'-TAATAC GACTCAC TATAGG GCAAGC TGATAA ACCGAT ACAATT-3'), 1,5µl do Big Dye Mix, 1µl de tampão de sequenciamento (5 vezes) e completou-se o volume para 10µl com água ultrapura, padrão MiliQ. O programa utilizado de termociclagem foi de 25 ciclos sendo, desnaturação 96°C 10 segundos, anelamento 50°C 5 segundos e extensão 60°C por 4 minutos.

O DNA foi precipitado (15 minutos a 25°C) pela adição de 40µL de etanol 80% (Merck) e após centrifugação (1 hora, 4000rpm, 25°C) o material foi lavado com 150µL de etanol 70% (Merck) e em seguida centrifugado por 30 minutos, 4000rpm,

25°C. Antes de serem levadas ao sequenciador as amostras foram ressuspensas em 10µL formamida *HiDi* (*Applied Biosystem*), desnaturadas a 90°C por 2 a 5 minutos, e imediatamente colocadas em gelo.

### **3.7.8. Análise dos peptídeos selecionados**

Os peptídeos selecionados foram analisados quanto ao seu enriquecimento de motivos pelo programa Clustal W, que realiza o alinhamento e organização dos peptídeos por motivos iguais ou semelhantes. Este programa utiliza como parâmetro aminoácidos semelhante por carga, agrupando motivos hidrofóbicos, hidrofílicos e anfipáticos. Após esta etapa os peptídeos selecionados foram utilizados para análise comparativa com proteínas conhecidas em bancos de dados (*National Center for Biotechnology Information* [NCBI] BLAST).

### **3.7.9. Ensaio de ligação**

Para validar a interação entre este possível par peptídeo-receptor foram realizados os ensaios de ligação *in vitro* dos fagos às células leveduriformes do isolado virulento de *P. brasiliensis*.

O fago selecionado ou o Fd-tet (fago controle, sem inserto) foi incubado com as células leveduriformes do isolado virulento ou do isolado pouco virulento. Após 4 horas de incubação em gelo e centrifugação (15000rpm/10min) sobre óleo ftálico (dibutil-ftalato:ciclohexano [9:1 v/v]) (Giordano, 2001), os fagos ligados às células leveduriformes foram recuperados através da infecção em *E.coli* K91kan. Diluições em série foram plaqueadas em meio LBkan/tet para quantificação do número de fagos aderidos às células leveduriformes do isolado virulento.

### **3.7.10. Validação dos resultados obtidos por *Phage display***

#### **3.7.10.1. Síntese de peptídeos sintéticos**

A síntese e purificação dos peptídeos foram realizadas no Departamento de Biofísica da Universidade Federal de São Paulo. As sequências de aminoácidos dos

peptídeos pep04 (CGSYGFNAC), pep05 (CGLRLESTC), pep06 (CSLERLGFC), peptídeo irrelevante (CGSTSAYGC), pep04 linear (AGSYGFNAA) e peptídeo truncado (CSFAGYNGC) foram utilizadas para síntese dos peptídeos pela tecnologia de fase sólida utilizando a estratégia automatizada do sintetizador PSSM8 (Shimadzu, Tokyo, Japan). Todos os peptídeos foram obtidos na forma amida com grupamento C-terminal *carboxyl*; foram ainda desprotegidos e clivados da resina por tratamento com reagente K (80% de ácido trifluoroacético, 2.5% triisopropilsilano, 2.5% etanoditiol, 5.0% anisol, 5.0% água, e 5.0% fenol). Os peptídeos resultantes foram analisados por cromatografia líquida de alta performance (Shimadzu, Tokyo, Japan). Em seguida, foram ciclizados formando pontes dissulfeto entre as cisteínas das extremidades e novamente purificados. A qualidade dos peptídeos foi realizada por espectrofotometria de massa (Micromass, Manchester, United Kingdom).

#### **3.7.10.2. Ensaio de ligação à gp43**

Para avaliar a interação entre peptídeo e a glicoproteína de 43kDa foram realizados ensaios de ligação *in vitro*, EIA e ensaio de inibição competitiva entre fago e anticorpo.

##### **3.7.10.2.1. Ensaio de Ligação *in vitro***

Os fagos p04 (que apresenta em sua superfície o pep04), p05 (apresenta pep05) e p06 (apresenta pep06) ou o Fd-tet (fago controle, sem inserto) foram incubados em placas de 96 poços previamente sensibilizadas com gp43 e bloqueadas com PBS-BSA 3%. Após 2 horas de incubação a 4°C, os poços foram lavados com PBS estéril e os fagos ligantes foram recuperados através da infecção em *E.coli* K91kan. Em seguida, diluições em série foram plaqueadas em meio LBkan/tet para quantificação do número de fagos aderidos à glicoproteína.

##### **3.7.10.2.2. Ensaio de Inibição competitiva**

Os anticorpos monoclonais purificados (17C e G2F12 – Mab não relacionado à PCM) nas concentrações 1,6 a 400µg/mL foram incubados com 10<sup>6</sup> células fúngicas do isolado Pb18 virulento em PBS-BSA 2%. Após 3 hora de incubação em gelo sob agitação, as células foram lavadas três vezes, por centrifugação, incubadas



com fago p04 ( $10^9$  TU) a 4°C por 3 horas. Após centrifugação (12.000rpm por 15 minutos, 25°C) o tubo foi congelado a -70°C e o *pellet* de células contendo fagos ligados foi removido e quantificado por infecção de *E. coli* K91kan. Após 1 hora de incubação a 37°C, sob agitação, cada alíquota infectada foi plaqueada meio Luria Bertani (LB) contendo 20µg/mL de tetraciclina e incubado a 37°C por 18 horas. Cada concentração foi realizada em triplicata.

### **3.7.10.2.3. Enzimaimunoensaio (EIA)**

A ligação do anticorpo monoclonal (17C) anti-gp43 de *P. brasiliensis* aos fagos p04, p05 e p06 foi realizada por enzimaimunoensaio (EIA).

#### **3.7.10.2.3.1. Obtenção de Anticorpos**

##### **➤ Congelamento e Descongelamento de Células de Mamíferos**

O congelamento dos hibridomas foi realizado em meio completo contendo 20% de soro fetal bovino e 10% de Dimetil-sulfóxido (DMSO – Merck S.A. Indústrias Químicas, RJ). As células foram transferidas para tubos cônicos de 15 mL (Costar Corp., Cambridge, MA) e centrifugadas a 200 x g por 6 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspendidas em meio de congelamento. Cada alíquota de 1 mL contendo de 1 a 2 x10<sup>6</sup> células foi estocada por 24 horas a -70° C e posteriormente transferida para nitrogênio líquido.

O descongelamento das células foi efetuado em banho-maria a 37° C, transferindo-se imediatamente as células para tubos cônicos de 15 mL e diluindo-se gota a gota em 9 mL de meio R-10. As células foram centrifugadas a 200 x g por 6 minutos. Após o descarte do sobrenadante, as células foram ressuspendidas em 5 mL de meio completo e transferidas para garrafas de cultura de 25 cm<sup>2</sup> (Costar).

##### **➤ Obtenção e Purificação dos MAbs**

Para obtenção de grande quantidade dos anticorpos monoclonais 17C, cerca de 2 x 10<sup>6</sup> células de hibridomas, suspensas em 0,5 mL de RPMI, foram injetadas na cavidade peritoneal de camundongos BALB/c, previamente tratados com óleo

mineral, para produção de ascites. Após 7-10 dias, o líquido ascítico foi coletado, centrifugado e ao sobrenadante foi adicionado fluoreto de fenilmetilsulfonyl (PMSF), em concentração final de 1mM. O líquido ascítico foi armazenado à -20°C.

➤ **Purificação dos Anticorpos Monoclonais**

Anticorpos 17C (anti-gp43) foram purificados por afinidade em coluna de Sepharose<sup>®</sup> acoplada a proteína A (*Pharmacia*). A coluna foi primeiramente equilibrada em tampão fosfato 0,04 M com aproximadamente 30mL e o líquido ascítico diluído 1:15 (2 mL de ascite e 28 mL de tampão) no mesmo tampão. A ascite diluída foi aplicada lentamente em circuito fechado à coluna de afinidade e após a passagem de todo o material a ser purificado. A coluna foi exaustivamente lavada com tampão fosfato em fluxo rápido para remoção de proteínas irrelevantes. Os anticorpos foram eluídos com tampão glicina 0,15 M contendo 0,5 M de NaCl, pH 2,8. Frações de 2mL foram coletadas em tubos contendo 50 µL de tampão Tris-HCl 1M, pH 9,0. O eluato da coluna foi então dialisado exaustivamente contra PBS e analisado por SDS-PAGE, após determinação do conteúdo protéico em espectrofotômetro a 280nm.

**3.7.10.2.3.2. ELISA phage**

Placas de polivinil (Costar) foram sensibilizadas com fagos ( $10^9$ TU), diluído em PBS (1 hora a 37°C). Depois do bloqueio dos sítios remanescentes com leite desnatado 5% (Molico), as placas foram incubadas com diluições seriadas do anticorpo monoclonal purificado (50 µL/poço), por 2h a 37°C. Após a lavagem das placas com PBS-Tween-G, acrescentou-se 50µL/poço de anti-IgG murina conjugada à peroxidase (Biorad) (1 hora a 37°C). As placas foram novamente lavadas e a revelação foi feita com 50µL/poço o-fenilenodiamina (OPD, 1µg/mL, Sigma) dissolvida em tampão citrato-fosfato 100 mM pH 5,8, contendo 0,05% (v/v) de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Perhidrol, Merck). A reação foi interrompida após o aparecimento de cor com 50µL/poço de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4N. Os resultados foram avaliados por leitura espectrofotométrica (EIA reader Titertek, Multiskan, MCC340) em comprimento de onda 492nm.

### **3.7.10.3. Avaliação *in vitro* da atividade dos peptídeos sintéticos sobre *P. brasiliensis***

A atividade antifúngica dos peptídeos sintéticos contra *P. brasiliensis in vitro* foi observada pela inibição de CFUs (unidade formadora de colônias) após o tratamento com peptídeos sintéticos e plaqueamento em meio enriquecido BHI-agar. Células fúngicas crescidas por 5 dias em meio sólido Fava-Netto foram coletadas em tubos de 15 mL (Costar) contendo 5 mL de PBS estéril. As partículas maiores foram separadas por sedimentação e a porção superior, contendo células isoladas ou com poucos brotamentos, foi utilizada. As células foram lavadas 3 vezes com o mesmo tampão e contadas em câmara de Neubauer. A viabilidade das células foi determinada com *trypan blue*. Aproximadamente  $10^2$  células leveduriformes de *P. brasiliensis* foram dispensadas por poço em placas de cultura de células de 96 poços (Costar). Peptídeos sintéticos foram adicionados aos poços contendo os fungos. O meio BHI enriquecido foi adicionado para que cada poço tivesse volume final de 200 $\mu$ L. A placa foi incubada a 37°C sob agitação de 100rpm por 24 horas. A análise das células viáveis após incubação com peptídeos foi realizada por plaqueamento de todo conteúdo de cada poço em placas contendo meio BHI sólido e após 10 – 15 dias em estufa a 37°C e as colônias de cada placa foram contadas.

### **3.7.10.4. Ensaio de ligação do fago p04 a diversos isolados**

Os fagos p04 e Fd-tet ( $10^9$  TU) foram incubados com  $10^6$  células dos isolados de *P. brasiliensis* (Pb18 atenuado, Pb18 virulento, Pb339, Mg16, T10B1 e T4B17) em PBS BSA 1%. Após 4 horas de incubação em gelo, as células fúngicas e os fagos não ligados foram separados por centrifugação (15000rpm/15min) (Giordano *et al.*, 2001) sobre óleo ftálico (dibutil-ftalato:ciclohexano (9:1 v/v)). Os fagos ligados ao isolado virulento foram recuperados transferindo o fundo do tubo com *pellet* para outro tubo de 1,5 ml contendo 200 $\mu$ l de cultura fresca de *E. coli* K91kan. Em seguida, foi adicionado 800 $\mu$ l do meio LB low/tet e incubado por 1 h a 37°C (sob agitação) para induzir o gene TetR-tetR e plaqueadas diluições.

### **3.7.10.5. Microscopia de Fluorescência e Confocal**

A marcação para microscopia de fluorescência e confocal foi realizada conforme descrito por Batista (2006) com modificações. Células dos isolados Pb18 atenuado e virulento (cultura de 5 dias) foram separadas em PBS ( $3 \times 10^6$  leveduras viáveis) e fixadas em metanol gelado por 30 minutos a 4°C, após incubação o excesso de metanol foi retirado por meio de três lavagens com PBS. Em seguida foi realizado bloqueio com PBS acrescido de 3% de albumina bovina (PBS-BSA 3%) por 16 horas de incubação a 4°C. No dia seguinte após cinco lavagens, de 5 minutos, foram adicionados os peptídeos, pep04 ou pepIR, marcados com 6-carboxifluoresceína (6FAM). As células foram incubadas com os peptídeos por uma hora, a temperatura ambiente, sob abrigo da luz. Após a incubação as leveduras foram lavadas seis vezes, de cinco minutos, com PBS e após a última lavagem foram ressuspensas em 50µl. Para montagem da lâmina foram utilizados 10µl de cada suspensão as quais foram submetidas à secagem parcial para adição de glicerol 80% e sobreposição da lamínula selada por esmalte transparente. As laminas prontas foram armazenadas a 4°C. A marcação foi analisada por microscopia de fluorescência (microscópio NIKON Eclipse E800, Japan) utilizando objetivas de 40x e 100x.

Para a microscopia Confocal, as amostras foram preparadas como descrito acima, com imunomarcação adicional com o mAb 5E7C (anti-gp75 de *P. brasiliensis*) (Xander, 2005), com anticorpo secundário conjugado à Alexa 610, anti-mouse-IgG-Alexa 610 (Invitrogen) nas diluições de 1:200, em PBS-BSA 3% para volume final de 200µL. Para a marcação nuclear foi adicionado DAPI (4',6'-diamidino-2-phenylindole di-lactate, Invitrogen) 20µM. As imagens foram adquiridas em microscópio Zeiss Axiovert acoplado ao sistema da BioRad 1024UV, utilizando a objetiva de imersão (63X 1.4 NA DIC) (Barros 1997). As imagens obtidas em série (plano Z) foram processadas com programa ImageJ e renderizadas com a ferramenta Volume J (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

### **3.7.10.6. Ensaio de citotoxicidade por MTT (3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide thiazole blue)**

O ensaio colorimétrico de MTT tem como princípio a redução do sal MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil bromo tetrazólio, Sigma®) pela desidrogenase mitocondrial de células vivas, para o produto de reação MTT-formazana de cor azul escuro. Este método colorimétrico foi utilizado na determinação da citotoxicidade dos peptídeos para células aderentes totais de peritônio. Aproximadamente  $10^6$  células totais de peritônio foram plaqueadas, em placa de cultura de 96 poços em meio R-10. Após 1 hora de incubação a 37°C, em estufa de CO<sub>2</sub>, o sobrenadante foi retirado e novo meio contendo variadas concentrações dos peptídeos foi adicionado (0.0 a 1000µg/ml) ou, o diluente DMSO [20% (v/v)]. Estas células permaneceram em cultura por 96 horas e após esse período, foram adicionados 20µL de MTT à cada poço e incubada por 90 minutos em estufa de CO<sub>2</sub> (5%) a 37°C. Em seguida, todo o conteúdo de cada poço foi removido e adicionado 100µL de isopropanol (P.A – Merck). Após 15 minutos, a temperatura ambiente, foi realizada leitura no comprimento de onda 570nm.

### **3.7.10.7. Ensaio de Inibição competitiva**

Os peptídeos cíclicos sintéticos (pep04 e pep06) nas concentrações 10; 1; 0,1; 0,01; 0,001 e 0 mM, foram incubados com  $10^6$  células fúngicas do isolado Pb18 virulento em PBS-BSA 2%. Após 3 hora de incubação em gelo sob agitação, as células foram lavadas três vezes, por centrifugação, incubadas com respectivos fagos homólogos ( $10^9$  TU) a 4°C por 3 horas. Após centrifugação (12.000rpm por 15 minutos, 25°C) o tubo foi congelado a -70°C e o *pellet* de células contendo fagos ligados foi removido e quantificado por infecção de *E. coli* K91kan. Após 1 hora de incubação a 37°C, sob agitação, cada alíquota infectada foi plaqueada meio Luria Bertani (LB) contendo 20µg/mL de tetraciclina e incubado a 37°C por 18 horas. Cada concentração foi realizada em triplicata.

### **3.7.10.8. Bloqueio da Implantação da Infecção**

Cerca de  $10^6$  células leveduriformes foram incubadas com 1mg/ml do pep04, pepIR ou PBS por uma hora. Em seguida, foi determinado a viabilidade dos fungos presentes na suspensão, pelo corante *Trypan Blue* em câmara de Neubauer, sempre superior a 90%. Então a suspensão contendo o fungo previamente incubado com fago foi inoculada pela via endovenosa (100 $\mu$ l de PBS) em camundongos B.10<sup>a</sup> (cinco animais por grupo). O grupo controle recebeu apenas PBS. O sacrifício dos animais ocorreu depois de 3 ou 45 dias da infecção, e a determinação do número de células viáveis recuperadas do pulmão, baço e fígado foi realizado por CFU.

### **3.7.10.9. Tratamento com fagos**

Para avaliar a atividade *in vivo* do biomarcador selecionado, o fago p04 foi utilizado no tratamento de camundongos BALB/c, linhagem considerada de susceptibilidade intermediária ao *P. brasiliensis*. O isolado Pb18 virulento foi inoculado via intratraqueal (i.t) ( $10^6$  células leveduriformes viáveis em 50 $\mu$ L de PBS estéril) em camundongos machos (10 por grupo) após anestesia intraperitoneal (i.p) conforme descrito anteriormente no item 3.5.2. Após 24 horas da inoculação iniciou-se o tratamento em dois grupos. Um dos grupos recebeu por via endovenosa (i.v)  $10^9$  TU do fago p04; o outro recebeu o fd-tet ( $10^9$  TU), fago sem inserto. O tratamento foi realizado por 7 dias consecutivos. Após 7 dias da última injeção de tratamento os camundongos foram sacrificados e a quantidade de CFU do pulmão de cada camundongo foi determinada por grama de órgão.

## **4. RESULTADOS**

---

---

## **Parte I**

### **4.1. Avaliação da virulência dos isolados Pb18**

#### **4.1.1. Curva de Sobrevida**

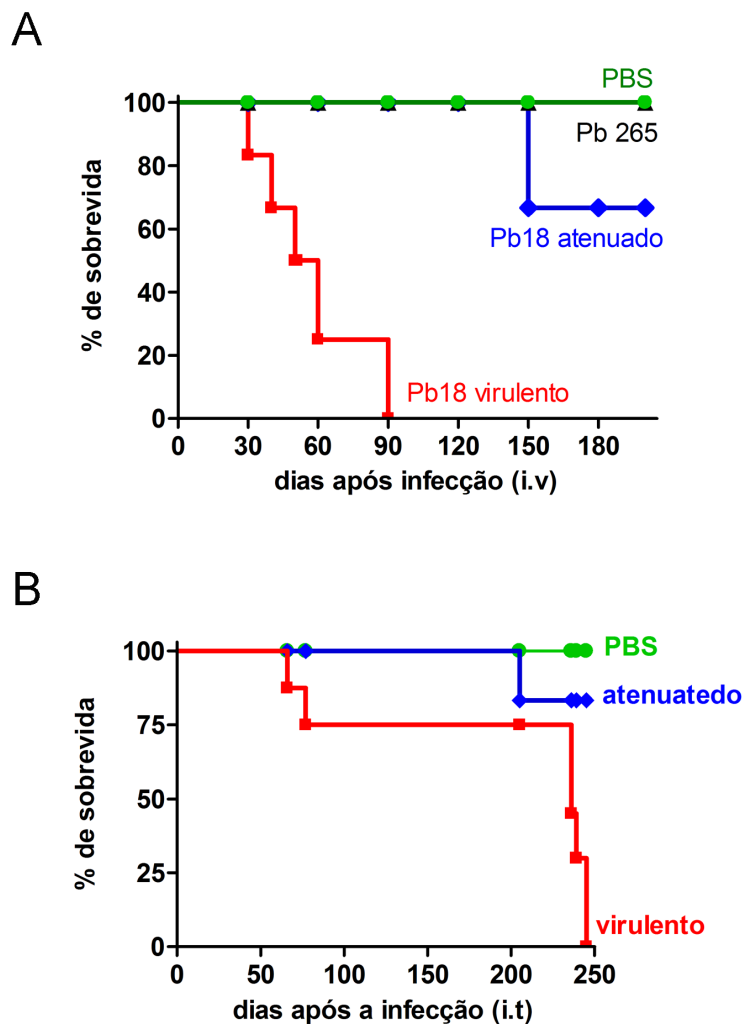
A recuperação da virulência do isolado Pb18, mantido sob cultivo *in vitro* por cerca de 5 a 6 anos, foi realizada depois de sucessivas passagens em animais. Experimentos para confirmação dessa modificação foram necessários. Dois protocolos de curvas de sobrevida foram utilizados. O primeiro, descrito por Carvalho e col. (2005), utiliza a via endovenosa, acessada pela veia lateral da cauda, no qual uma maior quantidade de células leveduriformes são injetadas e chegarão até os pulmões. O segundo, por meio da via intratraqueal, o qual mimetizar a via de infecção natural (Cano *et al.* 1995).

Independentemente do protocolo utilizado, foi possível observar que, após passagem em animais, houve recuperação da virulência do isolado Pb18 (Pb18 virulento) e confirmar o perfil pouco virulento do isolado Pb18 atenuado (mantido *in vitro*). Como mostra Figura 1A, todo grupo que foi infectado com Pb18 virulento intravenosamente, morreu após 90 dias. Os outros dois grupos (Pb18 atenuado e Pb265) se comportaram de forma semelhante ao grupo controle, que recebeu apenas PBS. No protocolo de infecção intratraqueal (i.t.) os animais apresentaram sobrevida maior que no de infecção endovenosa. Após 250 dias de infecção (i.t), todos os animais infectados com isolado virulento haviam morrido; no mesmo período, para o grupo infectado com o isolado Pb18 atenuado apenas 20% foi a óbito (Figura 1B). No grupo controle, que recebeu apenas PBS, 100% dos camundongos sobreviveram.

#### **4.1.2. Contagem de unidades formadoras de colônias (CFU)**

Para avaliar a evolução da doença, camundongos B10.A infectados com isolados Pb18 atenuado e Pb18 virulento foram monitorados por contagem de CFUs no pulmão, baço e fígado por vários períodos pós-infecção (30, 60, 90 dias). Os resultados obtidos validaram aqueles encontrados nos experimentos de sobrevida.





**Figura 1 – Curva de sobrevivida – A.** Grupos de seis camundongos machos, da linhagem B10A, foram inoculados endovenosamente (i.v) com  $5 \times 10^6$  células leveduriformes de diferentes isolados de *P. brasiliensis* (como indicado), ou com PBS (controle). **B.** Grupos de seis camundongos machos, da linhagem B10.A, foram inoculados intratraquealmente (i.t) com  $1 \times 10^6$  células leveduriformes de diferentes isolados de *P. brasiliensis* (como indicado), ou com PBS (controle). Por ambas as vias de administração os camundongos que receberam o isolado Pb18 virulento morreram 90 (i.v) ou 250 (i.t) dias após a infecção. Os grupos de isolado Pb18 atenuado ou Pb265 apresentaram o mesmo comportamento que o grupo controle. ■ – isolado Pb18 virulento; ◆ – Pb18 atenuado; ● – PBS; ▲ – Pb265. Estes gráficos são representativos de três experimentos independentes para cada via de administração.

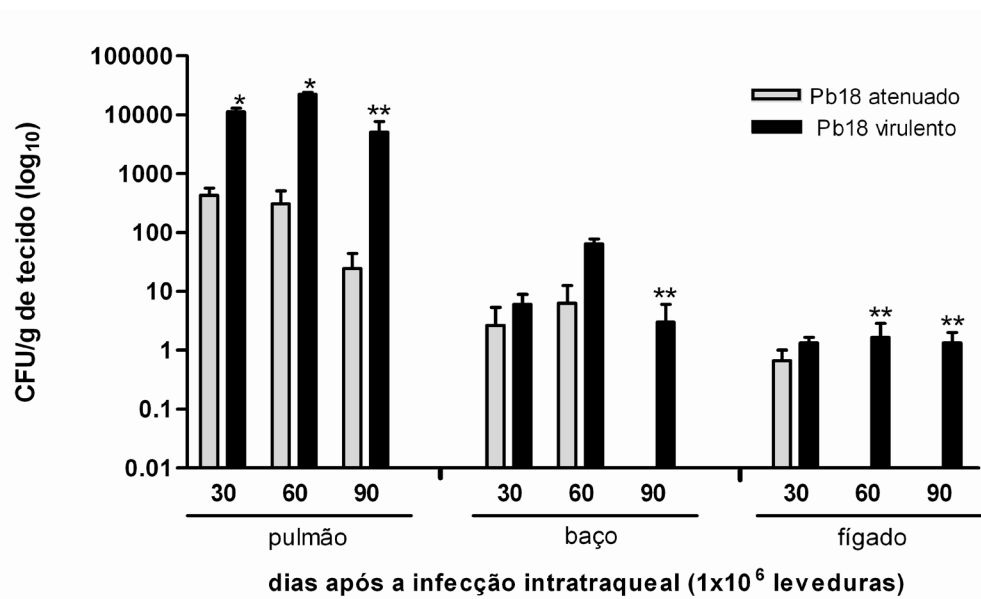
A Figura 2 mostra que o número de células leveduriformes viáveis recuperadas do sítio de inoculação, o pulmão, dos animais infectados com isolado virulento manteve-se praticamente inalterada ao longo da infecção. Ao contrário, para camundongos infectados com isolado Pb18 atenuado, o número de CFUs parece reduzir, significativamente, com a progressão da doença.

Como esperado para camundongos susceptíveis infectados com isolado virulento, a disseminação das leveduras para outros órgãos-alvo, como baço e fígado, foi sempre observada durante o experimento. Já para o grupo de animais infectados com isolado atenuado, a disseminação para o baço foi observada somente após 30 e 60 dias e, para o fígado, pode ser detectada apenas no grupo sacrificado após 30 dias da infecção.

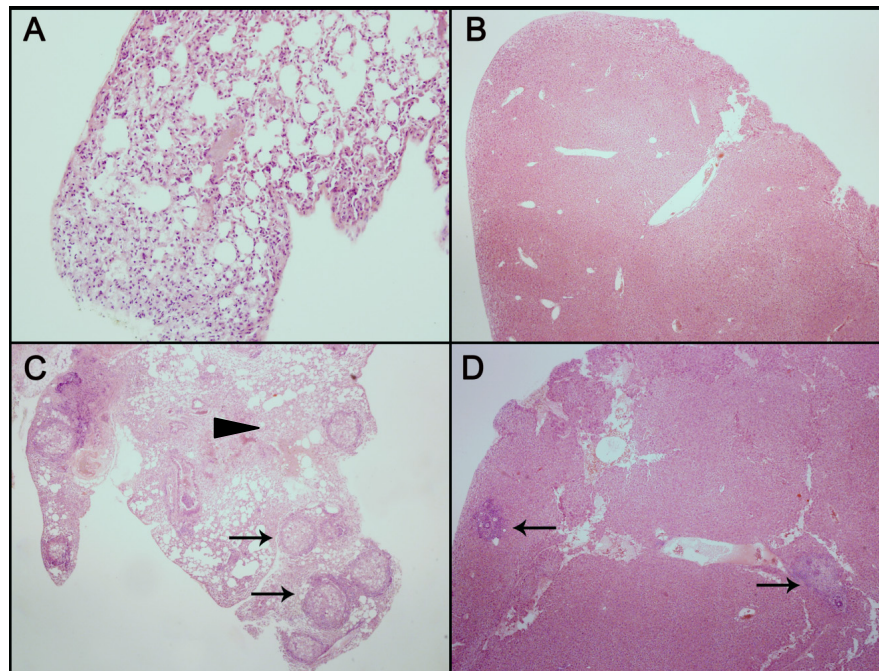
#### **4.1.3. Histopatologia**

Diferenças no padrão de virulência entre os dois isolados também foram observadas nas análises histopatológicas. A infecção foi acompanhada por 30 e 60 dias e, como esperado, os resultados corroboraram os dados da contagem de células viáveis (CFUs). Camundongos infectados com isolado atenuado não apresentaram lesões granulomatosas após 30 dias de infecção, tanto no pulmão (Fig. 3A), quanto no fígado (Fig. 3B) ou, no baço (dados não mostrados). No pulmão foi observada apenas presença de células inflamatórias, sem estruturas organizadas. Já os camundongos infectados com isolado virulento revelaram granulomas isolados, com infiltrado inflamatório celular, nos pulmões (Fig. 3C) e no fígado (Fig. 3D) após 30 dias. Neste mesmo período, as análises demonstraram que ainda foi possível detectar áreas com estrutura pulmonar conservada.

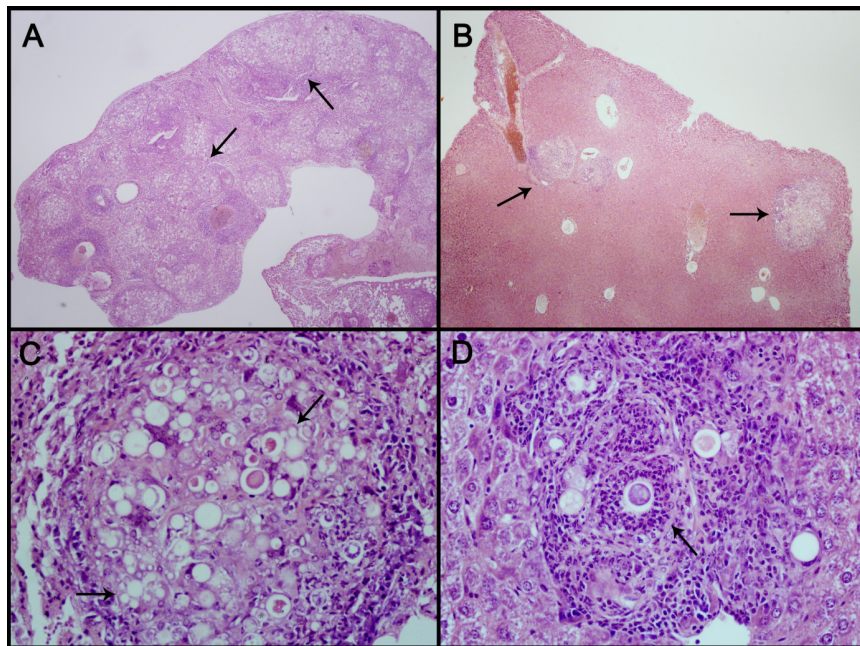
Após 60 dias de infecção, camundongos infectados com isolado Pb18 virulento apresentaram grandes e confluentes granulomas envolvendo extensas áreas de pulmão (Fig.4A) e fígado (Fig.4B). Os granulomas presentes no pulmão continham numerosas leveduras com brotamentos e infiltrado celular inflamatório considerável (Fig.4C). No corte histológico do fígado foram observados agregados neutrofilicos e células leveduriformes (Fig.4D). Estes resultados demonstraram claramente o potencial patogênico do isolado Pb18 virulento.



**Figura 2 – Unidades formadoras de colônias (CFU) recuperadas do pulmão, baço e fígado dos animais infectados com isolados de Pb18 atenuado e virulento.** Grupos de seis camundongos machos, da linhagem B10.A, foram inoculados (i.t.) com  $10^6$  células leveduriformes dos isolados de *P. brasiliensis* (atenuado ou virulento, como indicado). Após 30, 60 ou 90 dias de infecção os grupos foram sacrificados e os macerados dos órgãos (pulmão, baço e fígado) foram plaqueados em meio BHI suplementado. A quantidade de CFUs foi determinada por até 90 dias. As barras indicam a média  $\pm$  do desvio padrão das CFUs (log<sub>10</sub>). ANOVA seguido pelo teste Tukey-Kramer (\*  $P < 0.05$ ) e (\*\*  $P < 0.01$ ) relativa ao isolado Pb18 atenuado.



**Figura 3 - Cortes histológicos de pulmão e fígado de animais infectados por 30 dias com os diferentes isolados de Pb18 (atenuado e virulento).** Os cortes histológicos foram corados por hematoxilina e eosina (H&E) e observados ao microscópio ótico. As imagens foram adquiridas com objetiva de 100X. **A.** Secção pulmonar de camundongo infectado com isolado atenuado. Não foram observados granulomas definidos. **B.** Secção Hepática de camundongo infectado 30 dias pelo isolado atenuado. Fígado aparentemente normal, sem granulomas ou infiltrado inflamatório. **C.** Secção pulmonar de camundongo infectado com isolado virulento. Houve granulomas bem organizados e grande número de leveduras viáveis (setas) e regiões de pulmão preservado (ponta de seta); **D.** secção hepática de camundongo infectado com isolado virulento, mostrando granulomas isolados (setas).



**Figura 4 - Cortes histológicos de pulmão e fígado de animais infectados com isolado Pb18 virulento de *P. brasiliensis*, após 60 dias.** Os cortes histológicos foram corados por hematoxilina e eosina (H&E) e observados ao microscópio ótico. As imagens foram adquiridas na objetivas de 100X e 400X. **A.** Secção pulmonar, mostrando grandes e confluentes granulomas envolvendo extensas áreas de pulmão (setas) (100X) e **B.** Secção do fígado mostrando granulomas isolados (setas) (100X). Não foram observados granulomas bem definidos. **C e D.** Histopatologia (H&E, 400X) 60 dias depois da infecção. **C.** Secção do pulmão, numerosas leveduras com brotamentos (setas) e infiltrado celular inflamatório e **D.** Secção do fígado, células de levedura e agregados neutrofilicos (seta).

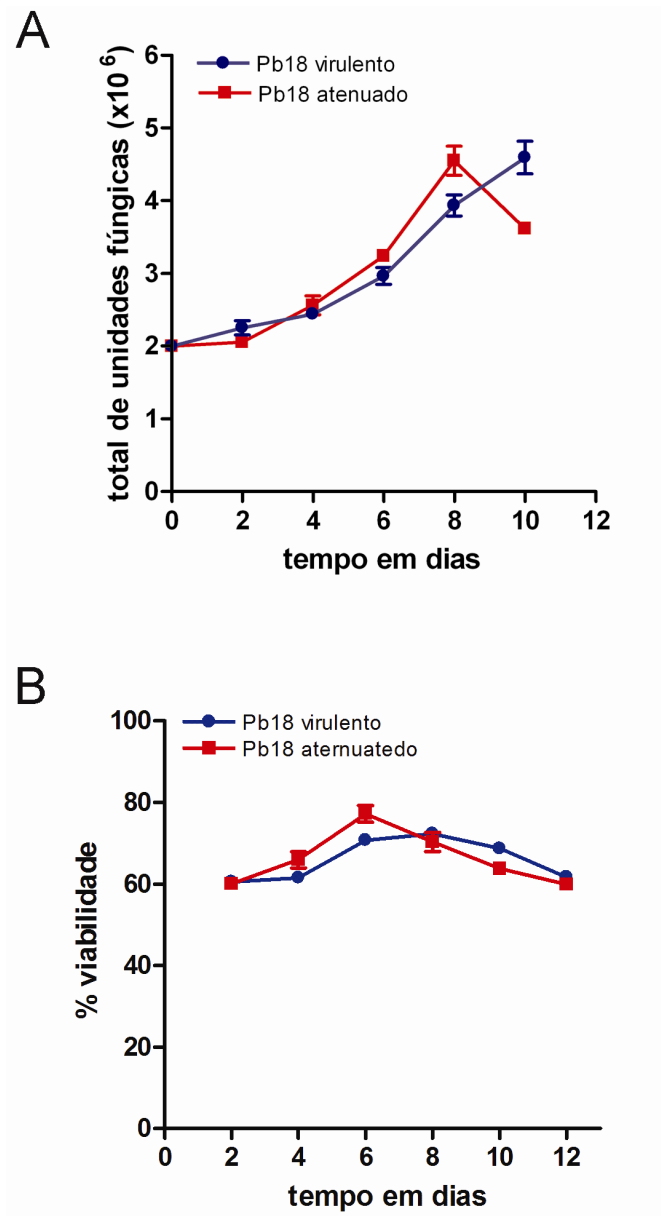
## **4.2. Diferenças entre os isolados Pb18 virulento e Pb18 atenuado**

### **4.2.1. Curva de crescimento**

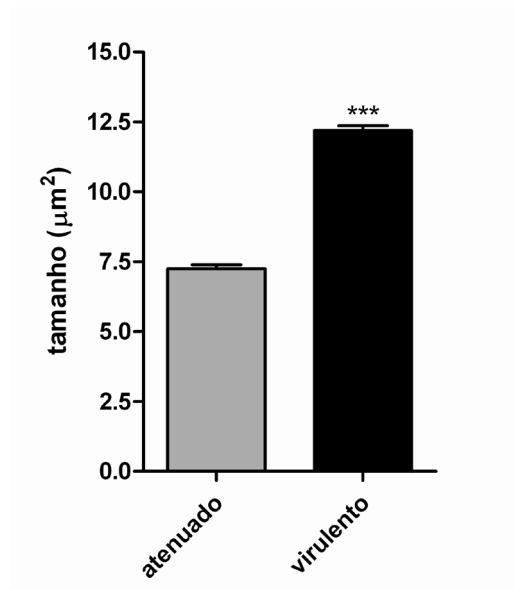
A determinação do crescimento foi realizada como descrito por Kashino e colaboradores (1985). A curva de crescimento mostra a contagem de células totais (Fig. 5A) e viáveis (Fig. 5B) dos isolados Pb18 atenuado e virulento acompanhados por um período de 12 dias. O padrão obtido para os dois isolados foi semelhante e o platô foi observado após 8 dias de cultura (Fig. 5A). A maior porcentagem de células viáveis foi obtida após o sexto dia de cultivo em caldo Fava-Netto (Fig. 5B). Observou-se a manutenção de alta porcentagem de viabilidade dos isolados.

### **4.2.2. Diferenças morfológicas**

As diferenças entre os isolados Pb18 (virulento e atenuado) não ficaram restritas apenas ao grau de virulência, mas também às dimensões morfologia e outras características morfológicas. A Figura 6 mostra que os isolados apresentaram diferenças significativas quanto ao tamanho das células leveduriformes ( $P < 0,001$ ). O diâmetro das células do isolado virulento, determinado pela análise de no mínimo 100 células de cada isolado, exibiu dimensão mínima de  $9,01\mu\text{m}$ , máxima de  $15,9\mu\text{m}$  com média de  $12,3\mu\text{m}$  ( $\text{SD}\pm 2$ ). Os mesmos parâmetros foram medidos no isolado atenuado e se observou mínima de  $4,01\mu\text{m}$ , máxima de  $10,9\mu\text{m}$  com média de  $7,2\mu\text{m}$  ( $\text{SD}\pm 1,8$ ) ( $P < 0,001$ ). Assim, as células do isolado atenuado apresentaram aproximadamente metade do diâmetro das leveduras do isolado virulento. As análises morfológicas nas leveduras de *P. brasiliensis* demonstraram que, enquanto o isolado atenuado exibiu pequenas e isodiamétricas células multibrotantes (Fig.7A), o Pb18 altamente virulento, após a passagem em animais, exibiu células ovais e alongadas. Ainda, no Pb18 virulento leveduras aparecem mais isoladas ou, quando unidas, formaram estruturas alongadas unidas pelas extremidades. (Fig. 7B)

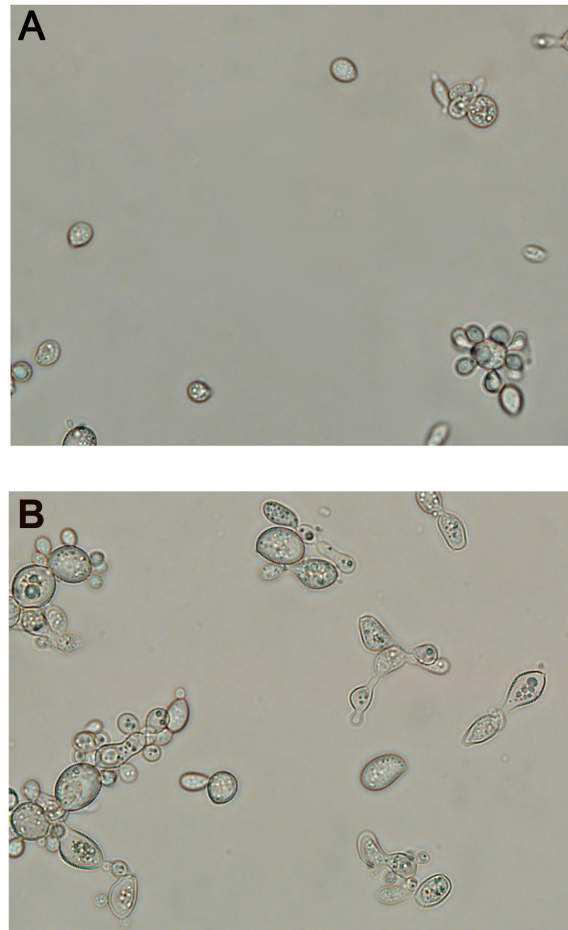


**Figura 5 - Curva de crescimento em caldo Fava-Netto.** As células leveduriformes dos dois isolados Pb18 (atenuado e virulento) foram avaliadas quanto ao seu crescimento *in vitro* em meio líquido. Foram inoculados  $2 \times 10^6$  células em 6ml de meio Fava-Netto e a cada 2 dias foi feita avaliação. **A.** contagem de células totais, mostrou um platô após 8 dias de cultivo *in vitro*. **B.** contagem de células viáveis, por corante *Trypan blue*, mostra que o pico da porcentagem de células viáveis acontece no sexto dia. Observou-se manutenção de alta porcentagem de viabilidade dos isolados.



**Figura 6 – Análise Morfométrica.** Análise do diâmetro das leveduras dos isolados de *P. brasiliensis* (Pb18 atenuado e Pb18virulento) após cinco dias de incubação, a 37°C, em caldo Fava-Netto. Os resultados obtidos após a análise de 100 células de cada isolado mostraram que isolado Pb18 virulento apresentou tamanho mínimo de 9,01μm, máximo de 15,9μm, média de 12,3μm (SD ± 2). Os mesmos parâmetros obtidos a partir do isolado atenuado foram, mínimo de 4,01μm, máximo de 10,9μm, com média de 7,2μm (SD±1,8) Teste *t-Student* (\*\*\*)  $P < 0,001$ .



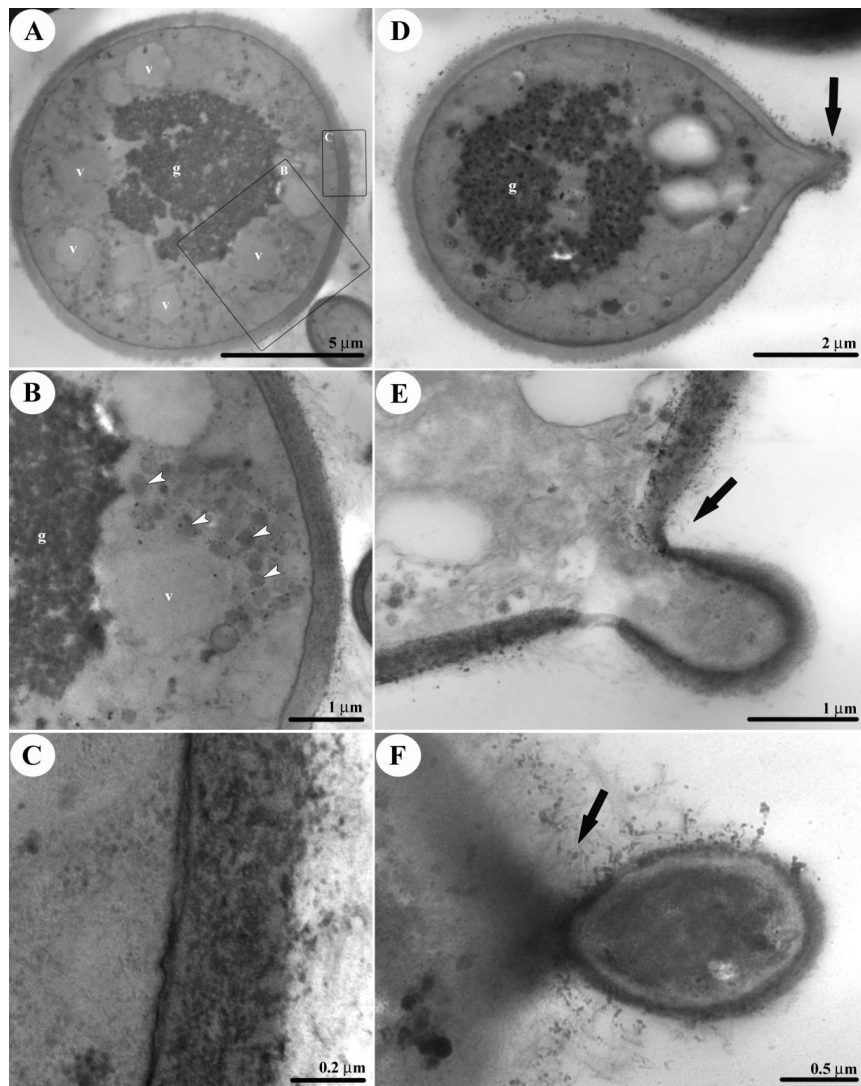


**Figura 7 – Aspectos Morfológicos** – As leveduras dos isolados de *P. brasiliensis* (Pb18 atenuado e Pb18virulento) foram incubadas por cinco dias a 37°C, em caldo Fava-Netto. **A.** O isolado Pb18 atenuado observado ao microscópio óptico apresentou estrutura mais característica de *P. brasiliensis*, com célula mãe acompanhada de pequenos e multibrotamentos (roda de leme). **B.** Já o isolado Pb18 recém isolado de camundongos apresentou tanto as células mãe como os brotamentos alongados.

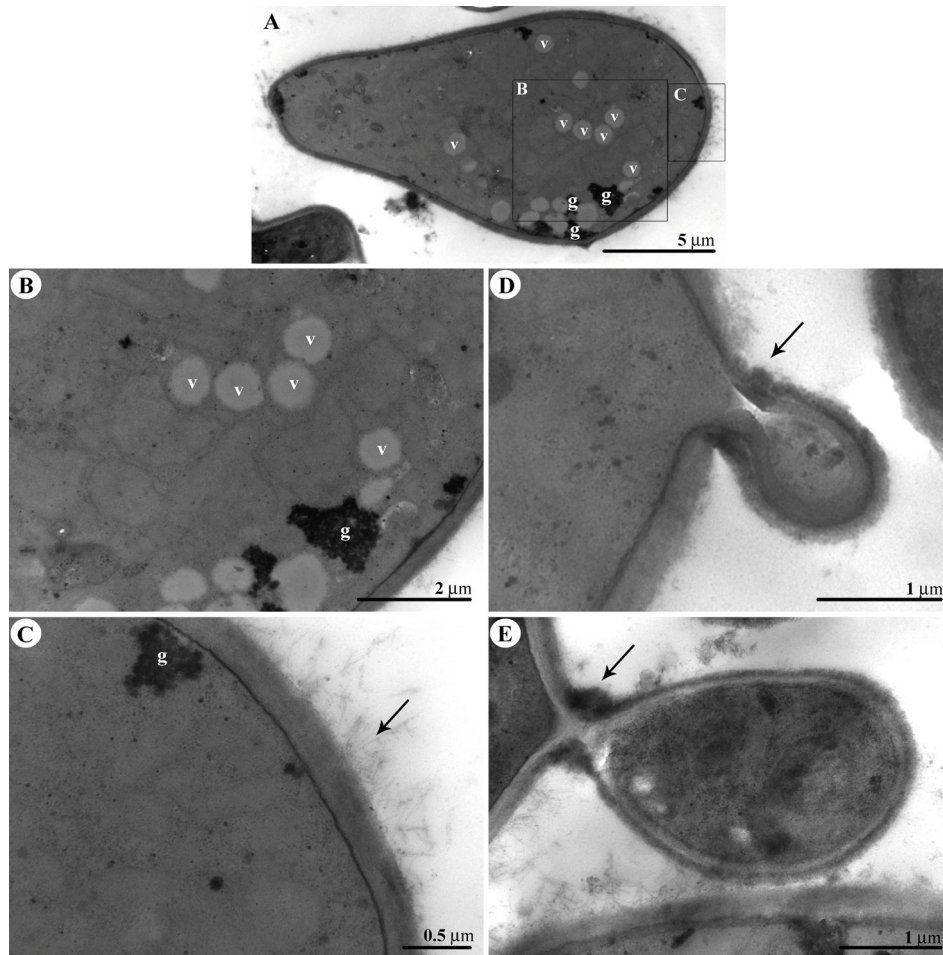
### **4.2.3. Diferenças ultraestruturais**

As micrografias de microscopia eletrônica de transmissão de *P. brasiliensis* 18 virulento cultivado em meio Fava-Netto por 7 dias, a 36°C, mostraram parede celular compacta e eletrodensa e membrana citoplasmática contínua. A célula apresentou citoplasma homogêneo e eletrodense, vacúolos eletroluscentes (v) e grânulos eletrodensos (g) (Fig.8A e em detalhe nas Figs.8B e 8C). Adicionalmente, foram observadas presença de fibrilas recobrimdo a parede celular de *P. brasiliensis* (Fig. 8C). Interessantemente, foi possível verificar a deposição de material de parede celular na região de constrição do brotamento (Figs. 8D e 8E), que parece ser maior quando a célula está em estágio mais avançado do processo de brotamento (Fig 8E).

As micrografias do isolado atenuado, nas mesmas condições de cultivo, mostraram parede celular compacta e eletrodensa e membrana citoplasmática contínua. A célula apresentou citoplasma homogêneo e eletrodense, vacúolos eletroluscentes (v) e grânulos eletrodensos (g) (Fig.9A e em detalhe na Fig. 9B). Adicionalmente, observou-se a presença de partículas eletrodensas na parede celular (Fig.9C) e fibrilas maiores e mais abundantes recobrimdo a parede celular. As Figuras 9D e 9F mostram, em sequência, a formação de um blastoconídeo de *P. brasiliensis*. Observou-se a ausência de material de parede celular denso na região de constrição do brotamento. A tabela 1 demonstra, de maneira resumida, as características observadas.



**Figura 8 - Micrografias de microscopia eletrônica de transmissão de *P. brasiliensis* isolado Pb18 atenuado cultivado em meio Fava-Netto por 7 dias, a 36 °C.** Observou-se parece celular compacta e eletrodensa e membrana citoplasmática contínua. A célula apresentou citoplasma homogêneo e eletro-denso, vacúolos eletroluscentes (v) e grânulos eletrodensos (g) (Fig.8A e, em detalhe, na Fig.8B). Adicionalmente, observou-se a presença de partículas eletrodensas na parede celular (Fig.8C) e fibrilas recobrimdo a parede celular de *P. brasiliensis*. As Figs. 8D-F mostraram, em seqüência, a formação de um blastoconídeo de *P. brasiliensis*. Observou-se ausência de material de parede celular denso na região de constrição do brotamento.



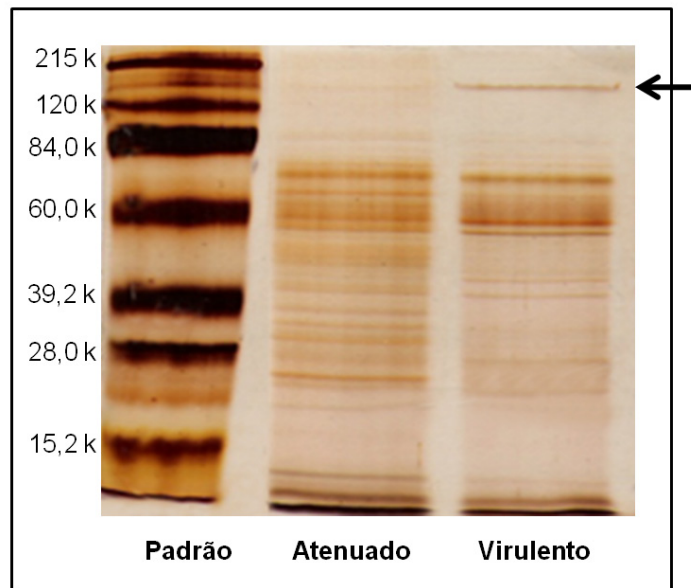
**Figura 9 - Micrografias de microscopia eletrônica de transmissão de *P. brasiliensis*, isolado Pb18 virulento, cultivado em meio Fava-Netto por 7 dias, a 36 °C.** Observou-se parece celular compacta e eletrodensa e membrana citoplasmática contínua. A célula apresentou citoplasma homogêneo e eletrodenso, vacúolos eletroluscentes (v) e grânulos eletrodensos (g) (Fig.9A e em detalhe na Fig.9B e 9C). Adicionalmente, foi possível verificar a presença de fibrilas recobrendo a parede celular de *P. brasiliensis* (seta, Fig.9C). Interessantemente houve a deposição de material de parede celular na região de constrição do brotamento de *P. brasiliensis* (setas, Fig.9D e 9E), e parece ser maior quando a célula está em estágio mais avançado do processo de brotamento (seta, Fig.9E).

	Pb18 virulento	Pb18 atenuado
<b>Fibrilas da parede celular</b>	Menores e menos frequentes	Maiores e abundantes
<b>Parede celular</b>	Compacta e eletrodensa	Compacta e eletrodensa. Presença de partículas eletrodensas na parede celular
<b>Membrana citoplasmática</b>	Contínua e uniforme	Contínua e uniforme
<b>Citoplasma</b>	Homogêneo e eletrodense	Homogêneo e eletrodense
<b>Vacúolos</b>	Pequenos e eletroluscentes	Grandes e eletroluscentes
<b>Grânulos</b>	Espalhados por todo o citoplasma	Concentrados na região central da célula

**Tabela 1** - Diferenças ultra-estruturais dos isolados Pb18 virulento e atenuado de *P. brasiliensis*

#### 4.2.4. Secreção de proteínas

Células leveduriformes dos isolados virulento e atenuado foram cultivadas em meio Fava-Netto líquido por 10 dias. As proteínas secretadas no sobrenadante de cultura foram analisadas em gel de SDS-PAGE 10%, corado pela prata. A figura 10 mostra diferenças qualitativas no padrão de secreção de proteínas nos respectivos exoantígenos (sobrenadante de cultura de 7 dias dos isolados) dos isolado atenuado e virulento. Foi possível notar a presença de uma banda de aproximadamente 215kDa. Esta ou estas proteínas que migraram com este perfil parecem ser mais abundante no isolado virulento, uma vez que aparentemente a quantidade de proteína adicionada a cada poço do gel foi a mesma (5µg).



**Figura 10 – Gel de SDS-PAGE 10% dos sobrenadantes de cultura produzido pelos dois isolados de *P. brasiliensis*.** 5 $\mu$ g de proteína total de sobrenadante de cultura de 7 dias dos isolados Pb18 atenuado ou Pb18 virulento foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida 10%. A seta indica a banda, de aproximadamente 215kDa, presente em maior quantidade no isolado virulento.

#### **4.2.5. *Microarray***

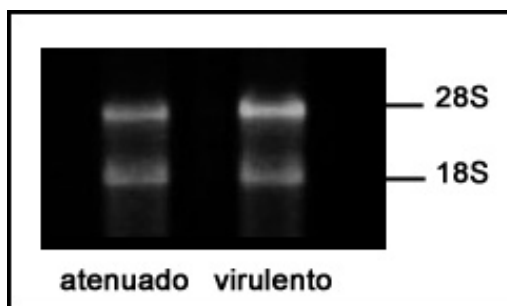
Considerando as diferenças fenotípicas claramente demonstradas e levando em consideração os distintos padrões de patogenicidade dos isolados, análises de microarranjos de sequências genômicas expressas (*Microarray*) foram realizadas para comparar o perfil de expressão gênica desses isolados. Em colaboração com grupo do Prof. Dr. Gustavo Goldman, da Universidade de São Paulo *campus* Ribeirão Preto, foram realizados os ensaios de *Microarray* para compreender melhor a patogenicidade do *P. brasiliensis*.

##### **4.2.5.1. Preparação das células**

Como já descrito em Materiais e Métodos, células leveduriformes dos dois isolados foram previamente preparadas com o objetivo de diminuir os interferentes externos nas análises de expressão gênica. Resumidamente, os camundongos da linhagem B10.A foram infectados com isolado Pb18 virulento de *P. brasiliensis* (i.t. -  $10^6$  leveduras). Após 45 dias de infecção, os animais foram sacrificados e as células leveduriformes recuperadas foram consideradas virulentas. O isolado Pb18 pouco virulento também foi cultivado em meio BHI, na tentativa de minimizar variações. Após 10 dias de cultivo em meio BHI ágar, a mesma quantidade de células dos dois isolados de *P. brasiliensis* foi inoculada em 500ml de BHI caldo e então incubada a 37°C, sob agitação, por 6 dias.

##### **4.2.5.2. Obtenção do RNA**

Depois do cultivo dos isolados, o RNA total foi extraído pelo método de trizol e pérolas de vidro, dosado e a qualidade das amostras obtidas foi avaliada por gel de agarose. A Figura 11, demonstra a presença das duas bandas do RNA, mostrando a integridade do material que foi utilizado para produção do cDNA marcado de maneira indireta como descrito em Materiais e Métodos.



**Figura 11** – Gel de agarose a 1% corado com brometo de etídeo no qual as bandas que representam as subunidades 18S e 28S do rRNA são visualizadas, demonstrando a integridade do material utilizado nos ensaios de *Microarray*

#### 4.2.5.3. Análise dos dados de *Microarray*

Cento e oitenta e sete genes foram modulados no isolado Pb18 virulento de *P. brasiliensis* em relação ao isolado atenuado. As análises mostraram que a maioria dos genes (130) apresentou-se regulados positivamente no isolado virulento, e apenas 57 regulados negativamente.

A Figura 12 mostra agrupamento hierárquico dos genes identificados como diferencialmente expressos, estes foram selecionados utilizando o programa TIGR Spotfinder (v.2.2.4). Em seguida foram estabelecidos os grupos funcionais, mostrados na Figura 14, de acordo com *The Institute for Genomic Research* (TIGR; Rockville, Md. [[http://www.tigr.org/docs/tiger-scripts/egad\\_scripts/role\\_report.sp](http://www.tigr.org/docs/tiger-scripts/egad_scripts/role_report.sp)]). Nesta análise, foram obtidos oito grupos funcionais. As proteínas não conhecidas indicam sequências novas, sem similaridade à proteína ou DNA nos bancos de dados analisados. Proteínas hipotéticas, as quais representaram 11%, e referem-se às sequências que demonstraram similaridade às proteínas ou DNA sem função pré-estabelecida.



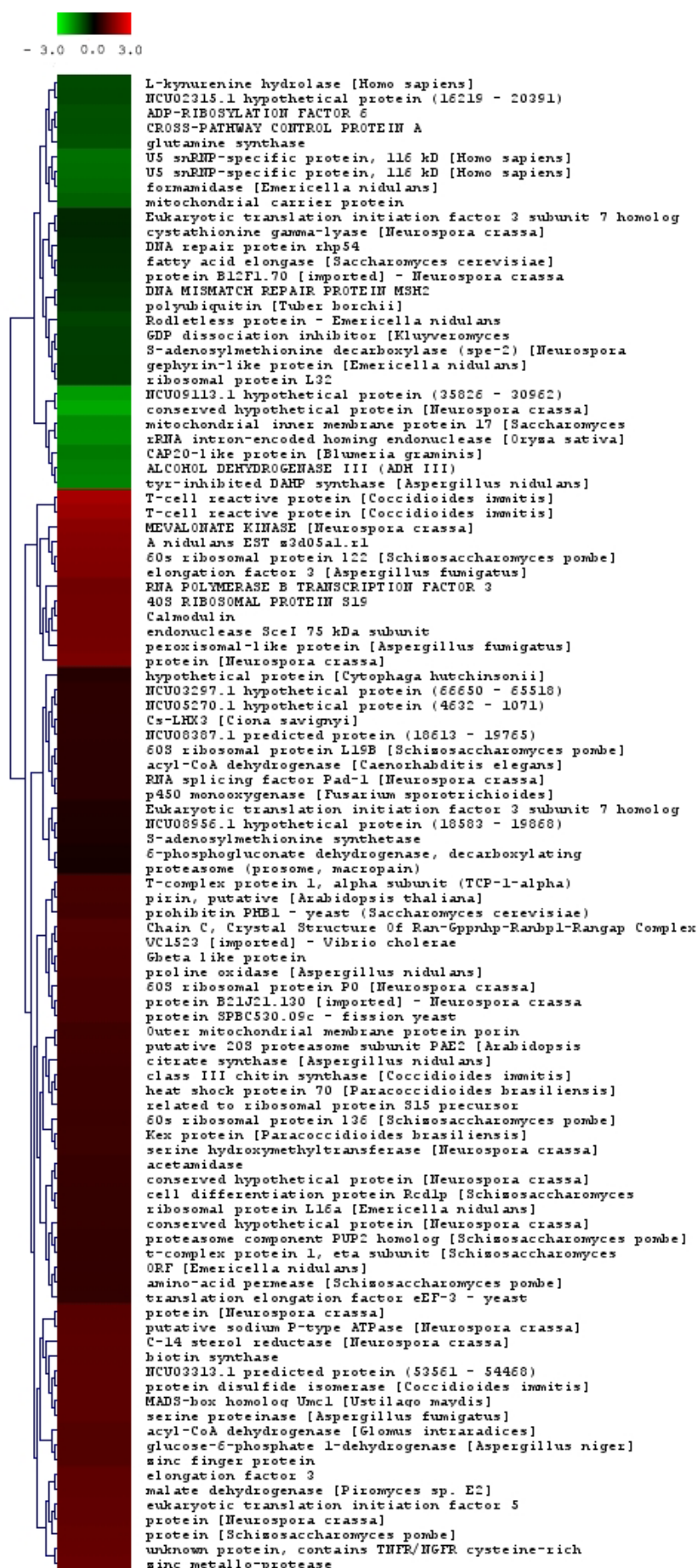
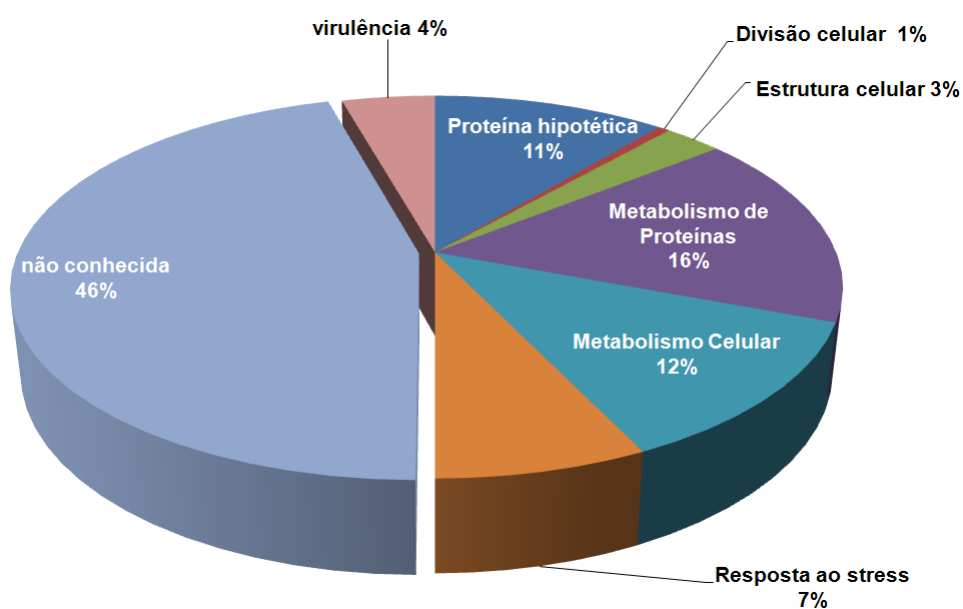


Figura 12 – Agrupamento hierárquico dos genes diferencialmente expressos - Perfil de expressão dos genes de *P. brasiliensis* regulados após passagem em animal. As cores mostradas na figura indicam a razão de log<sub>2</sub> (Cy5/Cy3), na qual Cy3 (verde) foi o valor de referência (pouco virulento)



**Figura 13 – Classificação dos grupos Funcionais** – Distribuição das ESTs de *P. brasiliensis* reguladas no isolado Pb18 virulento comparado ao isolado Pb18 atenuado. A classificação dos grupos funcionais foi baseada na desenvolvida pelo *The Institute for Genomic Research* (TIGR; Rockville, Md. [[http://www.tigr.org/docs/tiger-scripts/egad\\_scripts/role\\_report.sp](http://www.tigr.org/docs/tiger-scripts/egad_scripts/role_report.sp)])

#### **4.2.5.3.1. Aspectos mais relevantes das vias metabólicas positivamente reguladas no isolado virulento.**

A análise direta dos genes modulados através dos experimentos de hibridações de *microarray* mostrou a regulação positiva e negativa de vários genes envolvidos em vários processos celulares. Alguns desses genes foram selecionados e então organizados em agrupamentos hierárquicos mostrados nas Figuras de 14 a 16.

##### **4.2.5.3.1.1. Metabolismo Celular**

Neste grupo foram encontrados genes relacionados ao metabolismo de carboidratos e de aminoácidos. Os resultados sugerem que o isolado virulento que consegue se implantar e estabelecer a infecção com formação de granulomas e disseminação extrapulmonar, apresentou-se como uma célula metabolicamente mais ativa por provavelmente necessitar de mais energia para sobreviver no ambiente hostil no interior do hospedeiro. Estes genes apresentaram-se, em sua maioria, regulados positivamente e serão descritos a seguir.

##### **4.2.5.3.1.1.1. Metabolismo de carboidratos**

Entre os genes modulados na recuperação da virulência, por passagem em camundongos, estão genes envolvidos no metabolismo de carboidratos. Entre eles podemos citar malato desidrogenase (*MDH*), prolina oxidase (*POX*) e glicose-6-fosfato-1-desidrogenase (*G6PD*). O metabólito gerado pela *MDH* exerce função crucial em várias vias metabólicas como ciclo do ácido tricarboxílico, síntese de aminoácidos, gliconeogênese, manutenção do equilíbrio de oxidação/redução, e facilita as trocas de metabólitos entre citoplasma e organelas (Goward & Nicholls, 1994). *POX* e *G6PD* são enzimas que foram moduladas positivamente no isolado Pb18 virulento. A *POX*, ao converter prolina em pirrolina-5-carboxilato (P5C), gera ATP no interior da mitocôndria. Este P5C no citosol é reconvertido em prolina, pela P5C-redutase, utilizando NADPH como cofator. O NADH gerado é utilizado pela

G6PD no ciclo das pentoses para gerar energia, na forma de ATP (Phang *et al.*, 2008).

#### **4.2.5.3.1.1.2. Metabolismo de lipídeos**

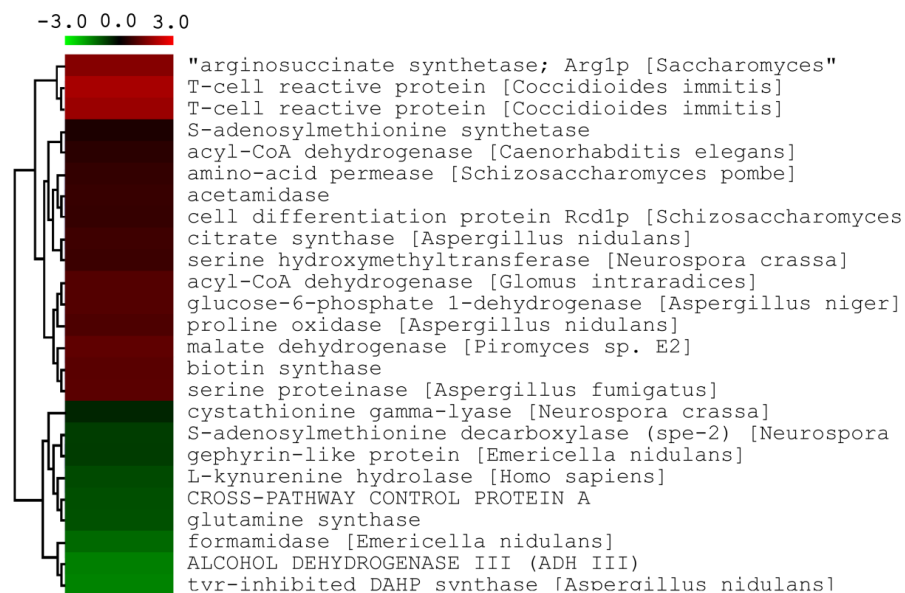
Entre os genes regulados positivamente envolvidos no metabolismo de lipídeos, podemos citar C-14 estero redutase (*ERG24*), acil-CoA desidrogenase (*ACDH*) e mevalonato quinase (*MK*). O gene *ERG24* de leveduras codifica a C-14 redutase, enzima necessária para completa desmetilação do lanosterol (Shah *et al.*, 2007). Estudos de clonagem e interrupção deste gene têm mostrado que este é essencial para viabilidade das leveduras (Lorenz *et al.*, 1992; Marcireau *et al.*, 1992). A *acd* é uma família de enzimas, que catalisam a  $\alpha,\beta$ -dehidrogenação de ésteres de acil-CoA e transferem elétrons para flavoproteínas transportadoras de elétrons (ETF) através do mesmo mecanismo, mas o tamanho e a configuração da cadeia de hidrocarbonetos do substrato são diferentes para cada enzima. Os mecanismos de ação e as propriedades têm sido amplamente estudados e por isso foi selecionado este gene para validação por *Real Time*. Bago e colaboradores (2002) têm proposto que no fungo *G. intraradices* a acil-CoA desidrogenase está principalmente envolvida na produção de acil-CoA para oxidação no ciclo do ácido tricarboxílico (TCA).

#### **4.2.5.3.1.1.3. Metabolismo de aminoácidos**

Entre os genes envolvidos no metabolismo de aminoácidos que foram modulados positivamente podemos citar o 4-hidrofenoil-piruvato desidrogenase (4-HPPD) homólogo ao gene da proteína reativa de células T do *Coccidioides immitis*, além de algumas enzimas como biotina sintase (*BIO2*), serina hidroximetil transferase e argininossucinato sintetase (*ASS*).

A biotina sintase cataliza a inserção do átomo de enxofre entre dois átomos de carbono do detiobiotina para formar a biotina no último passo da via de biossíntese da biotina (Mühlenhoff *et al.*, 2007). Este produto final desempenha funções essenciais como coenzima nas reações de carboxilação catalizadas por enzima e

decarboxilação, na biossíntese de ácidos graxos, gluconeogenese e metabolismo de aminoácidos (Hong *et al.*, 2006). Para validação dos resultados obtidos na análise de *Microarray* foram selecionados os genes codificadores 4-HPPD e ARG1.



**Figura 14 – Agrupamento hierárquico de genes envolvidos no metabolismo celular** - Perfil de expressão dos genes envolvidos no metabolismo celular (metabolismo de carboidratos, aminoácidos, lipídeos) de *P. brasiliensis* regulados após passagem em animal. As cores mostradas na figura indicam a razão de  $\log_2$  (Cy5/Cy3), na qual Cy3 (verde) é o valor de referência (isolado atenuado).

A argininosuccinato sintetase (ARG1) é uma das enzimas que participa do ciclo da ornitina catalizando o penúltimo passo da biossíntese da arginina. Esta, por sua vez, é o principal precursor da síntese de uréia (Wagemaker *et al.*, 2007). Estudos recentes têm mostrado que após a fagocitose, *C. albicans* rapidamente regula positivamente a expressão de genes da biossíntese de arginina. A arginina, uréia e CO<sub>2</sub> induzem a transição levedura-hifa através da formação de tubo germinativo, mecanismo importante para o escape da resposta imune do hospedeiro (Ghosh *et al.*, 2009). O gene *arg1* também está envolvido na patogenicidade do fungo *Fusarium oxysporum* (Namiki *et al.*, 2001).

HPPD é uma enzima associada ao ferro que está envolvida no segundo passo do catabolismo de aminoácidos aromáticos (fenilalanina e tirosina), ou seja, na conversão do 4-hidroxil-fenil-piruvato à homogenisato e dióxido de carbono na presença de oxigênio e íon ferroso. Também está associada à biossíntese de *plastoquinons* e tocoferóis, ou seja, carreadores de elétrons e *scavengers* de oxigênio reativo (Borowski *et al.*, 2004). Recentemente, Nunes e colaboradores (2005) detectaram aumento da expressão deste gene no processo de transição micélio-levedura em *P. brasiliensis* e a inibição desta via, por inibidores sintéticos NTCB, foi capaz de inibir a transição. Portanto, este gene parece ser realmente importante no processo de patogenicidade deste fungo.

#### **4.2.5.3.1.2. Metabolismo de Proteínas**

Como mostrado na Figura 15, foram encontrados 16% dos genes envolvidos com metabolismo de proteínas, entre os quais a maioria estava envolvida nos processos de biossíntese, sendo identificadas proteínas ribossomais ou as que fazem parte da maquinaria para síntese protéica. Podemos citar proteínas que compõem as porções 40S e 60S e fatores como de alongação, iniciação e terminação. Para validação dos resultados obtidos por *Microarray*, foram selecionadas dois genes codificadores de proteínas deste grupo, o fator alongação 3 (*EF-3*) e proteína ribossomal 60S L22 (*RPL22*), além de uma protease denominada CAAX prenil protease (*STEP24*), que apresenta um motivo zinco metaloprotease (HEXXH), indispensável para atividade da enzima. Ste24p e proteínas relacionadas definem uma subfamília que

provavelmente apresenta atividade zinco metaloproteinase intracelular e associada à membrana (Fujimura-Kamada *et al.*, 1997).

#### **4.2.5.3.1.3. Virulência e Stress**

Neste grupo encontramos genes envolvidos nos processo de patogenicidade, como calmodulina e proteína *kexin-like*; e ainda relacionados ao *stress*, como proteínas de choque térmico entre outras. Foram selecionados três genes deste grupo a serem validados: Calmodulina (*CAM*), Proteína *kexin-like* (*KEX*) e proteína de choque térmico de 70 kDa (*HSP70*).

A calmodulina pertence a uma grande família de proteínas ligadas ao cálcio (Kretsinger *et al.*, 1980) que participam de diversos processos celulares. Estudos com espécies de *Candida sp.* têm mostrado que esta proteína atua na formação do tubo germinativo, estágio intermediário entre levedura e hifa (Paranjape *et al.*, 1990). Carvalho e colaboradores (2003) demonstraram que a via de sinalização  $Ca^{2+}$ /calmodulina foi possivelmente importante no termodimorfismo de *P. brasiliensis*.

Proteínas *kexin-like* são proteinases pertencentes à família das subtilase, que estão envolvidas no processamento de pró-proteínas para sua forma ativa. Em fungos, proteínas *kexin-like* estão envolvidas em vários processos celulares importantes, incluindo reprodução e dimorfismo. Análises de expressão heteróloga do gene *kex2* de *P. brasiliensis* em *Saccharomyces cerevisiae* indicaram que os genes apresentam funções homólogas (Torres *et al.*, 2008).

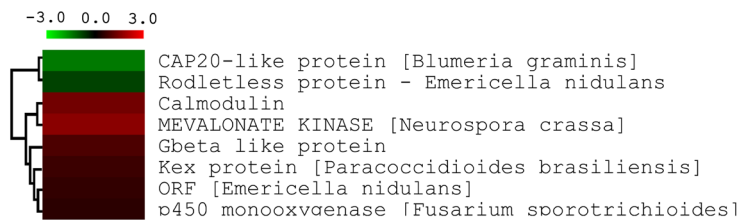
Proteínas de choque térmico, também conhecidas como chaperonas moleculares, incluem a de 70kDa (*hsp70*). Estas moléculas apresentam estrutura altamente conservada entre diversos organismos e desempenham importante papel no dobramento e no transporte de proteínas sintetizadas na célula (Burnie *et al.*, 2006). Análise da quantidade de mRNA do genes *HSP70*, por RT-PCR, durante a transição micélio-levedura em *P. brasiliensis* mostram aumento dos níveis de expressão desse genes, entre outros genes de chaperonas moduladas (Goldman *et al.*, 2003). Ainda, recentemente Theodoro e colaboradores (2008) reafirmaram que a transcrição de *HSP70* pode estar associada com a tolerância térmica em *P. brasiliensis*.



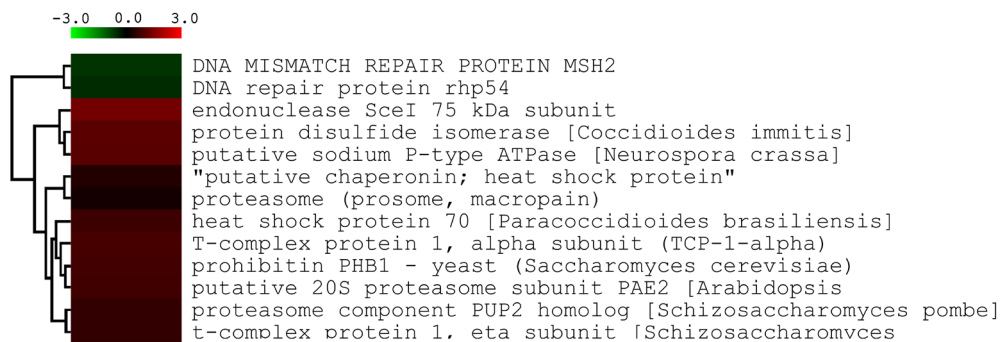
**Figura 15 – Agrupamento hierárquico de genes envolvidos no metabolismo de proteínas-** Perfil de expressão dos genes envolvidos no metabolismo de proteínas (biossíntese, dobramento) de *P. brasiliensis* regulados após passagem em animal. As cores mostradas na figura indicam a razão de  $\log_2$  (Cy5/Cy3), na qual Cy3 (verde) é o valor de referência (isolado atenuado).



A



B



**Figura 16 – Agrupamento hierárquico de genes envolvidos na virulência e no stress** - Perfil de expressão dos genes envolvidos na virulência e em mecanismo de *stress* (chaperonas, proteínas do proteassomo) de *P. brasiliensis* regulados após passagem em animal. As cores mostradas na figura indicam a razão de  $\log_2$  (Cy5/Cy3), na qual Cy3 (verde) é o valor de referência (isolado atenuado).

#### **4.2.5.4. Análises de Expressão gênica**

A validação foi realizada através da técnica de RT-PCR quantitativo em tempo real, que consiste no monitoramento da fluorescência liberada durante a reação de PCR, o que permite quantificar um produto específico presente em na fase logarítmica da reação (Tyagi *et al.*, 1998; Bonnet *et al.*, 1999). O Sistema de Sybr Green<sup>®</sup>, utiliza um agente intercalante de DNA fluorescente, que vai sendo incorporado as novas fitas de DNA formadas.

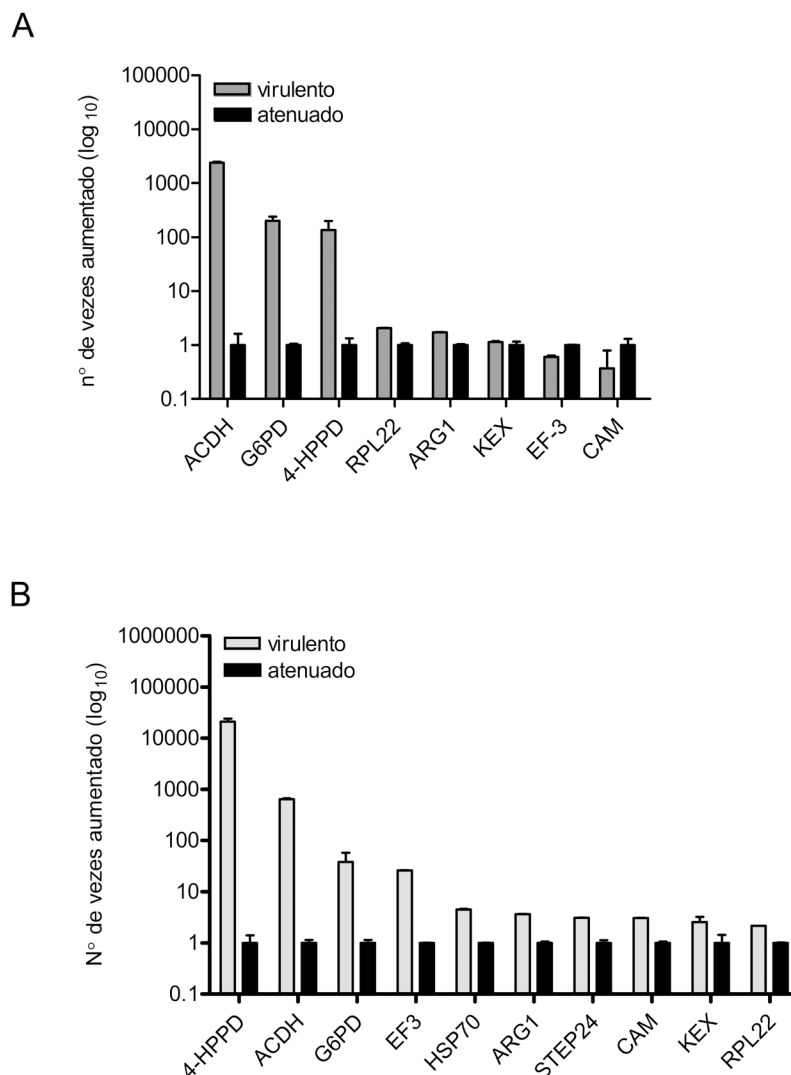
Experimentos de RT-PCR quantitativo em tempo real foram realizados para validar os resultados obtidos nas análises de *Microarray*. Foram selecionados dez genes para determinação dos níveis de transcrição nos isolados de *P. brasiliensis*, comparando virulento e atenuado. Os genes selecionados foram: *4-HPPD*, *CAM*, *HSP70*, *STEP24*, *KEX*, *ACDH*, *G6PD*, *EF-3*, *ARG1* e *RPL22*.

Inicialmente foram feitas as curvas eficiência para cada conjunto de oligonucleotídeo iniciador, sempre comparado à curva do normalizador (Sistema *Sybr Green – Applied Biosystems*), como detalhado em Materiais e Métodos. O gene da subunidade alfa da tubulina de *P. brasiliensis* ( $\alpha$ -TUB) foi usado como normalizador (referência interna) devido à sua expressão constitutiva. As curvas quantitativas serviram de base para o cálculo da eficiência da reação, sempre comparado ao normalizador.

Após a padronização das curvas de eficiência, foi realizado RT-PCR com as mesmas amostras de RNA que foram utilizadas na hibridação em lâminas de *Microarray*, para demonstrar a credibilidade da técnica. Nunes e colaboradores em 2005, através de teste estatístico, já haviam demonstrado o nível de confiança desta técnica. Como mostrado na figura 17A dos oito genes testados, dois apresentaram discrepância como os dados obtidos por *Microarray*.

Foram obtidas mais três amostras de RNA de extrações diferentes para validação dos resultados. Para isso, todo procedimento de obtenção de células virulentas e atenuadas foi repetido três vezes em experimentos independentes. Os resultados obtidos nos três experimentos foram similares e, portanto, a Figura 17B mostra resultados representativos dos três experimentos. Como pode ser observado, os níveis de mRNA do 4-HPPD do isolado Pb18 virulento aumentaram 21320X quando comparado ao isolado atenuado. Este gene já havia se mostrado regulado positivamente (15X) na transição micélio-levedura (Nunes, 2005).

Genes envolvidos no metabolismo celular, especialmente envolvidos na produção de energia e síntese protéica, como o *ACDH*, *G6PD* e *EF3* também se apresentaram altamente regulados no isolado virulento, 639X, 38X e 26X, respectivamente. Estes resultados nos permitiram admitir que o isolado virulento sofre adaptação do seu metabolismo celular para resistir ao ambiente hostil que encontra no interior do hospedeiro. O isolado atenuado apresentou-se mais como uma célula pouco ativa, mantendo os níveis basais de metabolismo celular.



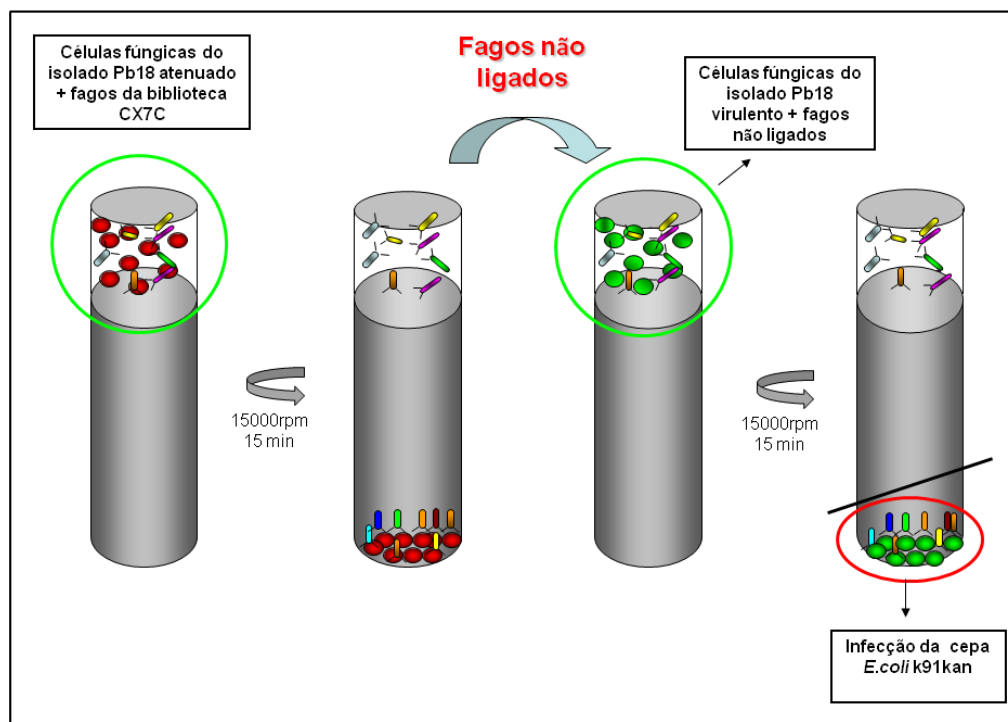
**Figura 17 – RT-PCR quantitativo em tempo real (SyberGreen®) dos genes selecionados por *Microarray* modulados positivamente no isolado Pb18 virulento.** A figura mostra o número de vezes em que o mRNA está aumentado quando comparado ao isolado atenuado (valor=1). **A. validação dos resultados obtidos nas hibridizações de *Microarray*,** os mRNA utilizados neste ensaio foram os mesmos da hibridização. **B. Genes regulados positivamente.** Gráfico representativo de três extrações de RNA independentes, seguindo o mesmo protocolo de preparação dos isolados. Genes: *4-HPPD* - 4-hidrofênol-piruvato desidrogenase; *CAM* - calmodulina, *HSP70* – proteína de choque térmico de 70kDa, *STEP24* - prenil protease, *KEX* – proteína *kexin* - like, *ACDH* - acil-CoA desidrogenase, *G6PD* - glicose-6-fosfato-1-desidrogenase, *EF-3* - fator alongação 3, *ARG1* - argininosuccinato sintetase e *RPL22* - proteína ribossomal 60S L22.

## Parte II

### 4.3. Análise da Parede Celular por *Phage display*

A parede celular é a primeira estrutura fúngica a interagir com ambiente e o hospedeiro, portanto análises das proteínas expressas ou temporariamente presentes na parede celular do isolado Pb18 virulento, poderia trazer informações relevantes sobre os mecanismos de patogenicidade deste isolado. Uma das técnicas utilizadas para varrer a superfície de células em busca de pares ligantes é a tecnologia de *Phage display*. Um dos protocolos mais específico e seletivo dessa tecnologia é a técnica BRASIL (*Biopanning and Rapid Analysis of Selective Interactive Ligands*), foi proposta por Giordano e colaboradores em 2001 tendo sido padronizada para células de mamíferos. Assim, algumas modificações foram necessárias para adaptá-la às células fúngicas. Para obtenção de resultados confiáveis e fidedignos, foram alterados os padrões de velocidade e temperatura de centrifugação para 15000rpm e 25°C, respectivamente.

Como mostrado na Figura 18, as células fúngicas do isolado atenuado foram incubadas com os fagos da biblioteca CX7C em solução aquosa (PBS-BSA 3%). Após a incubação, os fagos que não se ligaram as leveduras foram separados por meio de centrifugação sobre óleo ftálico (12.000rpm/15min). Depois da centrifugação, a fase aquosa (superior), contendo os fagos não ligantes, foi transferida para outro tubo contendo células fúngicas de Pb18 virulento. Seguiu-se incubação e nova centrifugação. Nessa etapa, o *pellet* de células fúngicas associados ao fagos foi removido e os fagos recuperados por infecção em *E. coli* K91kan, a qual foi cultivadas em meio LB kan/tet. Os fagos secretados para o meio durante cultivo foram concentrados por precipitação com PEG/NaCl e utilizados para sucessivos ciclos de seleção. Três ciclos de seleção foram realizados. Uma alíquota representativa da cultura de *E. coli* infectada com fagos ligantes foi plaqueada para quantificar o número de fagos ligantes ao isolado P18 virulento a cada ciclo de seleção. Como mostra a Figura 19A ocorreu enriquecimento no número de fagos que se ligam com maior afinidade ao isolado Pb18 virulento.



**Figura 18 – Desenho esquemático do ensaio de eliminação de fagos ligantes do isolado Pb18 atenuado e seleção dos fagos ligantes do isolado Pb18 virulento.** Os círculos vermelhos indicam as células do isolado atenuado, já os verdes, indicam leveduras do isolado virulento. O modelo ainda exemplifica a separação dos fagos selecionados em óleo ftálico, no qual os fagos livres permanecem na fase aquosa e aqueles que se ligaram às leveduras formam um botão no fundo do tubo.

#### **4.3.1. Seleção de clones, reação em cadeia da polimerase (PCR)**

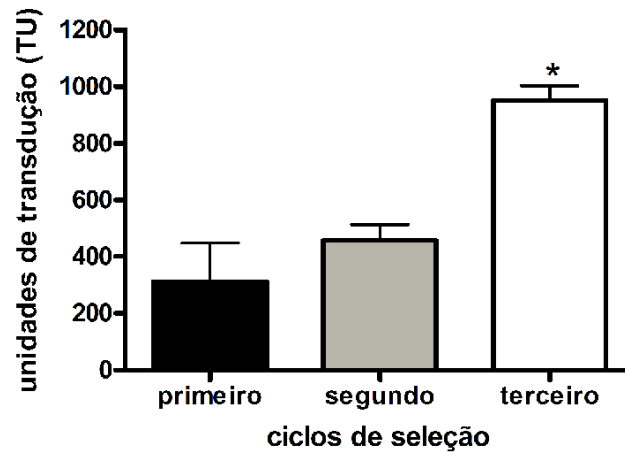
Os clones aleatoriamente selecionados, do segundo e terceiro ciclo de seleção, foram coletados do plaqueamento para a quantificação dos respectivos ciclos de seleção. Considerando que o fago, ao infectar a bactéria *E. coli* K91kan através da estrutura de *F pilus*, insere seu genoma no da bactéria e a transforma, cada bactéria pode ser infectada apenas por um fago. Portanto, de cada colônia de bactéria coletada, obtém-se um clone que representa um fago. As colônias foram coletadas em placas de 96 poços de fundo em U contendo solução de PBS estéril. Estas placas foram armazenadas à -20°C para as etapas posteriores.

Os clones selecionados foram submetidos à reação em cadeia da polimerase (PCR) e seus produtos foram analisados por corrida eletroforética em gel de agarose 2%, como mostra a Figura 19B. Como é possível observar no gel de agarose, as amostras foram corretamente amplificadas e com auxílio do padrão de peso molecular, DNA *low mass*<sup>®</sup> (*Invitrogen*), foi possível determinar a quantidade de DNA presente neste produto da reação de PCR.

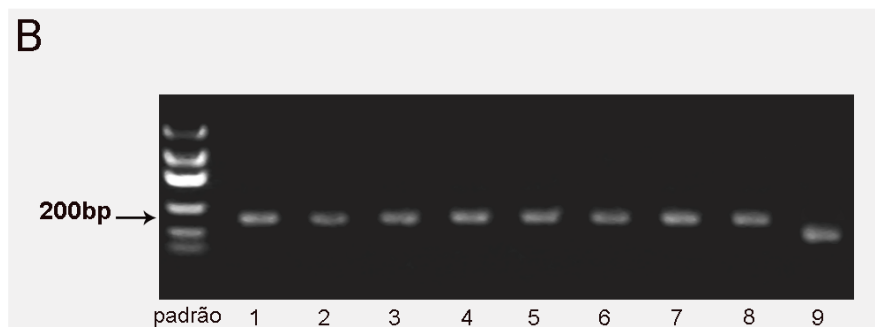
#### **4.3.2. Sequenciamento das amostras**

Aproximadamente 96 amostras do segundo ciclo de seleção e 96 do terceiro ciclo foram submetidas ao sequenciamento. Foram obtidas 85 sequências de peptídeos do segundo ciclo e 87 sequências do terceiro ciclo.

A



B



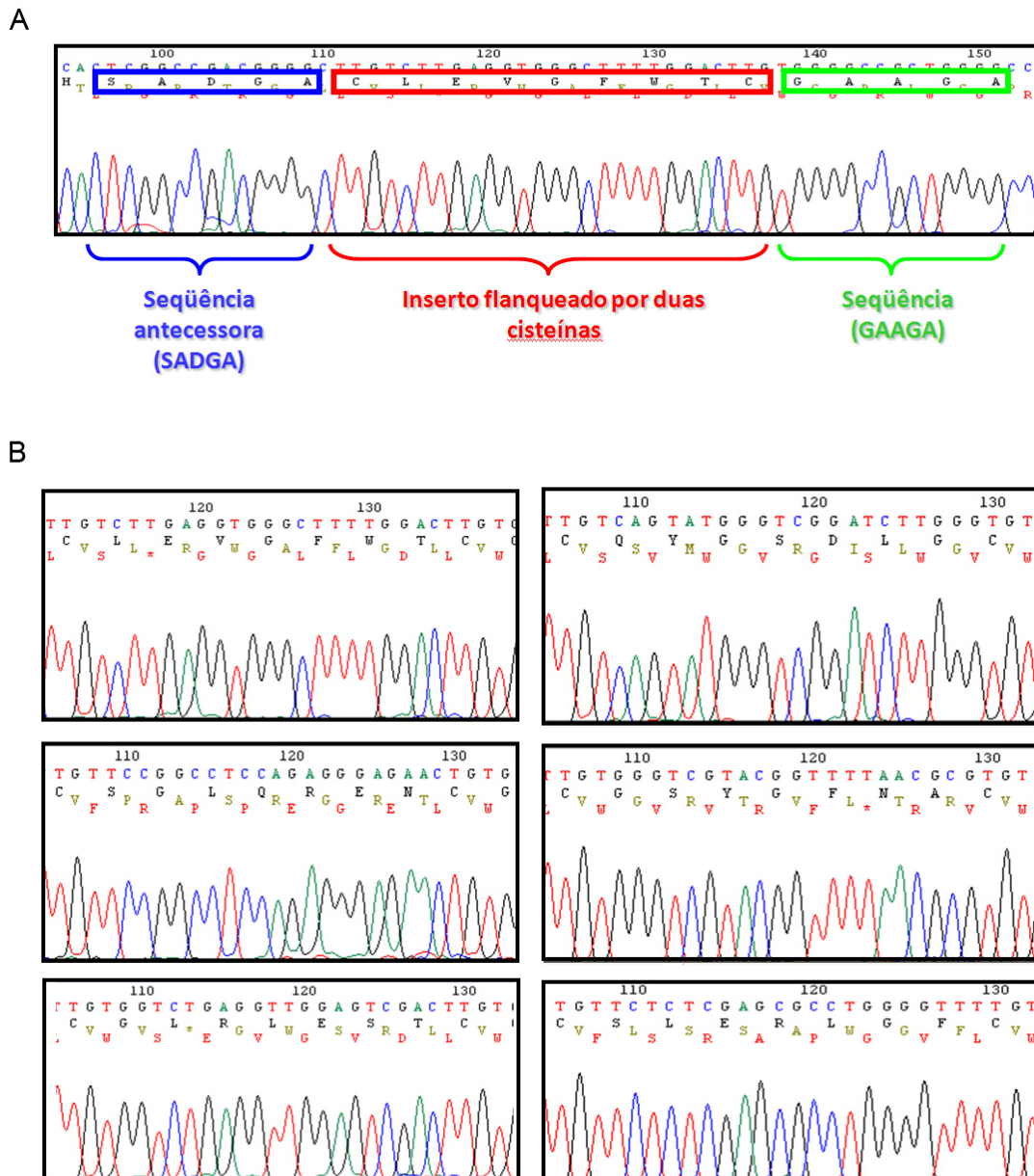
**Figura 19 – A. Ciclos de seleção.** Utilizando a metodologia BRASIL, modificada para fungos, foi obtido enriquecimento significativo de fagos específicos para o isolado Pb18 virulento após o terceiro ciclo de seleção. ANOVA seguido pelo teste Tukey-Kramer (\*  $P < 0,05$ ) **B. Gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo.** Padrão – DNA low mass (Invitrogen®); 1 a 8 – Produto de PCR do material genômico de oito clones representativos dos duzentos selecionados aleatoriamente para seqüenciamento. 9 – Produto de PCR do fd-tet (amplificação sem o inserto). Os insertos obtidos após reação de PCR foram de aproximadamente 200bp.



### **4.3.3. Análise das sequências peptídicas obtidas**

A Figura 20 mostra a localização do inserto flanqueado pelas cisteínas dentro da região sequenciada do genoma do bacteriófago. Sabendo que o inserto é precedido pela sequência traduzida SADGA e seguido pela sequência GAAGA, quando se encontra em ORF (fase de leitura aberta da polimerase). A Figura 21B mostra a qualidade do sequenciamento dos clones selecionados para ensaios de validação da técnica de *Phage display*.

Após a localização de todos os insertos, foi realizada a primeira análise mostrada nas Tabelas 2 e 3. A análise do programa Clustal W permitiu alinhar as seqüências obtidas do experimento. Estas seqüências analisadas são as dos peptídeos cíclicos apresentados fundidos à proteína pIII do bacteriófago. Inicialmente foram analisadas as repetições das seqüências de nove aminoácidos. Apenas três apresentaram repetições no segundo ciclo de seleção. Entretanto, algumas seqüências (CYRLTGLWC, CLDSASRGC, CGLRLESTC, CWLFSVSAC), que não apareceram no sequenciamento dos clones do segundo ciclo, mostraram-se com repetições, no terceiro ciclo. Dois outros clones receberam maior destaque, como mostra a Tabela 4, por apresentarem enriquecimento considerável: o clone CSLERLGFC, que no segundo ciclo apareceu uma única vez e no terceiro se repetiu por sete vezes, e o CGSYGFNAC, que se repetiu três vezes no segundo e mais três, no terceiro ciclo de seleção. Em seguida, os motivos de três aminoácidos foram analisados com o objetivo de encontrar maior enriquecimento do segundo ciclo de seleção para o terceiro. A Tabela 5 permite visualizar melhor os motivos e suas repetições.



**Figura 20 – Sequenciamento.** **A.** Desenho esquemático da região do bacteriófago que contém o inserto e as fases de leitura para localização da seqüência codificadora do peptídeo expresso na superfície do fago fundido à proteína pIII. **B.** Amostras dos clones selecionados para os ensaios de validação. Estas foram sequenciadas após a amplificação e precipitação. A figura mostra a confirmação das seqüências e a qualidade do sequenciamento.

Seq_B2	---SWSIHGL--	7	seq_B9	---ARTTVEI--	7
seq_D10	-----IRGFEV	6	seq_E11	---VRAQRTR--	7
seq_B4	-LRGEVLT----	7	seq_B7	---LERISAE--	7
seq_D9	---GQVLTGM--	7	seq_C5	---SLERLGF--	7
seq_C10	--DPQRLWG---	7	seq_A2	---RGSFAFS--	7
seq_G4	----NLWDGHR-	7	seq_E9	---GGGSFSA--	7
seq_H2	----FLLRGMR-	7	seq_B8	---FGRGQGA--	7
seq_B11	-GGQRVLR-----	7	seq_C12	--SGRGKGG---	7
seq_E5	--HDRVLWA---	7	seq_F9	---RGWAEMS--	7
seq_B10	-----LLRAPGS	7	seq_C1	---YGRKTIS--	7
seq_E4	-----LLYARGA	7	seq_A9	---LLGRRLD--	7
seq_C8	----ELVYWR-A	7	seq_C7	---LPRRYFA--	7
seq_H7	----RLLLDPA-	7	seq_D6	---LSGRMVN--	7
seq_H10	--PTPLLLV---	7	seq_A1	---THDRGAA--	7
seq_D4	---SAVARLH--	7	seq_A5	---GTQNGGA--	7
seq_G6	----RVALLQW-	7	seq_E6	---AWPTS GP--	7
seq_C6	--GQRAVAL---	7	seq_F2	-DLALPLS-----	7
seq_G11	-----VFAALG-	6	seq_C4	PWTLSPV-----	7
seq_H5	----AVFASYA-	7	seq_F7	---LSPVSLS--	7
seq_A6	---KAVFGNR--	7	seq_H11	-AALSPAS-----	7
seq_G8	---RLAVPGR--	7	seq_C9	----TPASVGP-	7
seq_C11	----AGVGRL-	7	seq_A3	---IYCCLGP--	7
seq_G7	----FGFFGRT-	7	seq_A4	---IYCCLGP--	7
seq_F5	----LEVGFWT-	7	seq_H3	---IYSSSGR--	7
seq_G5	----LEVGFWT-	7	seq_A10	---QYGSDLG--	7
seq_F1	--SVPEVGH---	7	seq_F12	---QYGSQRR--	7
seq_F4	--GRLGVGH---	7	seq_E7	---VYTSMAG--	7
seq_B1	--WD-GITGL--	7	seq_B3	---HLAGLGP--	7
seq_G1	--WS-GSCGC--	7	seq_E3	---TNGAGLL--	7
seq_H9	--YAFVSTG---	7	seq_A7	---QGARLEA--	7
seq_D5	-----GSYGFNA	7	seq_E2	---RALMGFL-	7
seq_D7	-----GSYGFNA	7	seq_A8	---WQEVVPS--	7
seq_F11	-----GSYGFNA	7	seq_E12	---GDAMANP--	7
seq_E10	--GSRGGVG---	7	seq_G3	---EHAPRSS--	7
seq_H4	----RGAVGFV-	7	seq_B6	---NWQTQAL--	7
seq_C2	---SASVSSS--	7	seq_F8	---AWMSKAM--	7
seq_H1	---ADSSPST--	7	seq_F6	---SGLQREN--	7
seq_B5	--FWRSVDS---	7	seq_H6	---GSNLYKP--	7
seq_C3	---IVQVDRS--	7	seq_H8	---LQHPQHR--	7
seq_E1	---SVWFNRS--	7	seq_G10	---LVNLQVH--	7
seq_E8	---I-VLGSVM-	7	seq_F3	---VHRDVYR--	7
seq_G12	---VGVRGSS--	7	seq_F10	---EYLKVTR--	7
seq_A11	---VRVTVGS--	7	seq_D11	---SRLRWSD--	7
			seq_G2	--GEWSRVA---	7

**Tabela 2 – Alinhamento das sequências obtidas no segundo ciclo de seleção.** Os aminoácidos foram agrupados de acordo com as seguintes características, pequenos e hidrofóbicos (AVFPMILW incluindo Y) - vermelho; ácidos (DE) - azul; básicos (RHK) – magenta e aminoácido com grupamento hidroxil, amina ou básico (STYHCNGQ) – verde.

seq_A8	----LLGGLSH--- 7	seq_C1	----GLRLEST--- 7
seq_D8	----LGGSSLV-- 7	seq_F2	----GLRLEST--- 7
seq_E9	--RSGLGGL----- 7	seq_B7	----SLERLGF--- 7
seq_B4	-----GLSLHDW 7	seq_B8	----SLERLGF--- 7
seq_G1	----RAGLSVA-- 7	seq_B12	----SLERLGF--- 7
seq_B6	----RALDLFS- 7	seq_C4	----SLERLGF--- 7
seq_E4	----GQALSLF-- 7	seq_F10	----SLERLGF--- 7
seq_G3	-----WLFVSVA- 7	seq_G8	----SLERLGF--- 7
seq_G7	-----WLFVSVA- 7	seq_G11	----SLERLGF--- 7
seq_E12	-----FLSVTTI 7	seq_A4	---ISLRRLA---- 7
seq_F7	----RGFQSVF-- 7	seq_D2	----GLRATGY--- 7
seq_C5	-----GSYGFNA- 7	seq_E8	----SRRAT-FA-- 7
seq_E3	-----GSYGFNA- 7	seq_H3	YRLTGLW----- 7
seq_F6	-----GSYGFNA- 7	seq_H5	YRLTGLW----- 7
seq_D7	----LGSFGLI-- 7	seq_C3	----GLWRGRL--- 7
seq_C10	----GKLSWGL--- 7	seq_E6	---KEHPHV-V--- 7
seq_F3	----RLSWGAS-- 7	seq_F8	----ERPQVPV--- 7
seq_E5	----RGNWGGV-- 7	seq_A9	--VIVIPDV----- 7
seq_A2	----QGRWLVV--- 7	seq_B3	--GSWYGVV----- 7
seq_D11	---AGGRLSG---- 7	seq_H2	----VMHGVGP--- 7
seq_H4	---EGRRHR----- 7	seq_C9	--G---SGVWPR-- 7
seq_G2	--TQRGIRS----- 7	seq_C8	----LVVTLGV--- 7
seq_H11	----RGIASGR--- 7	seq_C11	----VLPQVGP--- 7
seq_A7	----GFDLGR--- 7	seq_D5	VGVELVW----- 7
seq_B11	---QYGSDLG---- 7	seq_F5	---ELVSSMG---- 7
seq_A12	----PTRDLGR--- 7	seq_E10	----VREMVPW--- 7
seq_G4	----LLVDSGR--- 7	seq_F9	---FVRSYVN---- 7
seq_E1	-HVASGWR----- 7	seq_B9	-WQYDTSS----- 7
seq_E2	---ASAWWLG---- 7	seq_C12	----VTSSILA--- 7
seq_D10	----FHRXFGX--- 7	seq_D3	----VTASEQL--- 7
seq_F11	----FAR-YGGV-- 7	seq_H8	----SSYMVTA--- 7
seq_A1	-TPFALQR----- 7	seq_B1	----ARGLGKA--- 7
seq_A6	-S--GLQREN----- 7	seq_D1	---SAFKGYS----- 7
seq_B5	---MDWQRQP----- 7	seq_E7	----ENKMARV--- 7
seq_C2	-----SRATSLQ- 7	seq_C6	----LDHERFM--- 7
seq_H1	----WSRFT-VS- 7	seq_B10	----RFFIFDN--- 7
seq_E11	----HPAWLVP- 7	seq_A10	----VWSGVVA--- 7
seq_F4	----PTPLLLV-- 7	seq_D6	----VGAVKST--- 7
seq_F1	----RLRPML--- 7	seq_C7	----GVYESSR--- 7
seq_A11	----LDSASRG-- 7	seq_D4	----ICGCET--- 7
seq_D9	----LDSASRG-- 7	seq_H9	----PHRAYAR--- 7
seq_B2	----ALRSASV--- 7	seq_A3	----VLHTQYW--- 7
seq_A5	----FVFSLDS--- 7		

**Tabela 3 – Alinhamento das sequências obtidas no terceiro ciclo de seleção.** Os aminoácidos foram agrupados de acordo com as seguintes características: pequenos e hidrofóbicos (AVFPMILW incluindo Y) - vermelho; ácidos (DE) - azul; básicos (RHK) – magenta e aminoácido com grupamento hidroxil, amina ou básico (STYHCNGQ) – verde.

Nome do fago	Motivo	Ciclo de seleção	
		Segundo	Terceiro
p01	CYRLTGLWC	-	2
p02	CLDSASRGC	-	2
p03	CWLFSVSAC	-	2
p04	CGSYGFNAC	3	3
p05	CGLRLESTC	-	2
p06	CSLERLGFC	1	7
p07	CLEVGFWTC	2	-

**Tabela 4 – Enriquecimento das sequências dos clones ligantes selecionados no segundo e no terceiro ciclo de seleção do Pb18 virulento.**

Motivo	Ciclo de seleção		Motivo	Ciclo de seleção	
	Segundo	Terceiro		Segundo	Terceiro
GLW	0	3	ERL	1	7
LGG	0	3	DLG	1	3
LSW	0	2	GGG	1	3
SWG	0	2	GRL	2	4
TSS	0	2	LER	2	7
GLS	0	3	GSY	3	3
LDS	0	3	VLT	3	0
RLE	1	2	VFA	3	0
SAS	1	3	EVG	3	0
SLE	1	7	LSP	3	0

**Tabela 5 – Enriquecimento dos motivos de três aminoácidos das sequências dos clones ligantes selecionados no segundo e no terceiro ciclo de seleção do Pb18 virulento.**

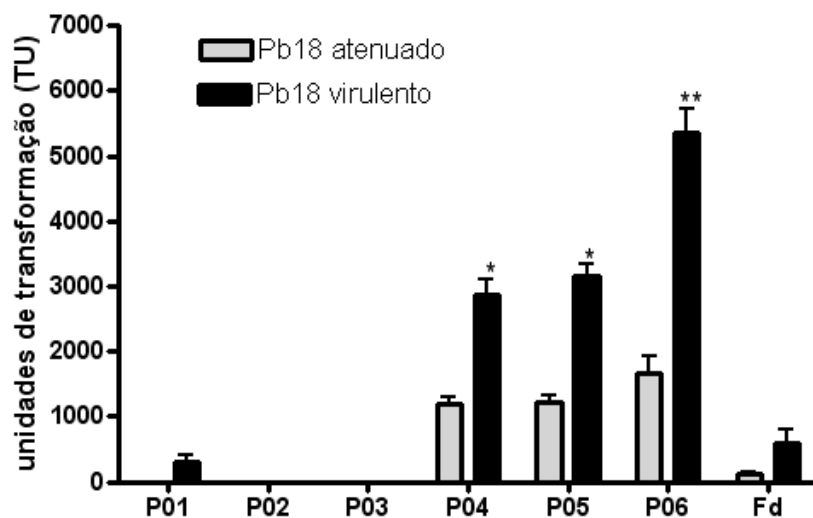
#### **4.3.4. Ensaio de ligação**

Os dados de enriquecimento das sequências ou dos motivos dos clones ligantes de Pb18 virulento permitiram selecionar inicialmente 6 fagos para validação por ensaio de ligação: p01 (CYRLTGLWC), p02 (CLDSASRGC), p03 (CWLFSVSAC), p04 (CGSYGFNAC), p05 (CGLRLESTC) e p06 (CSLERLGFC).

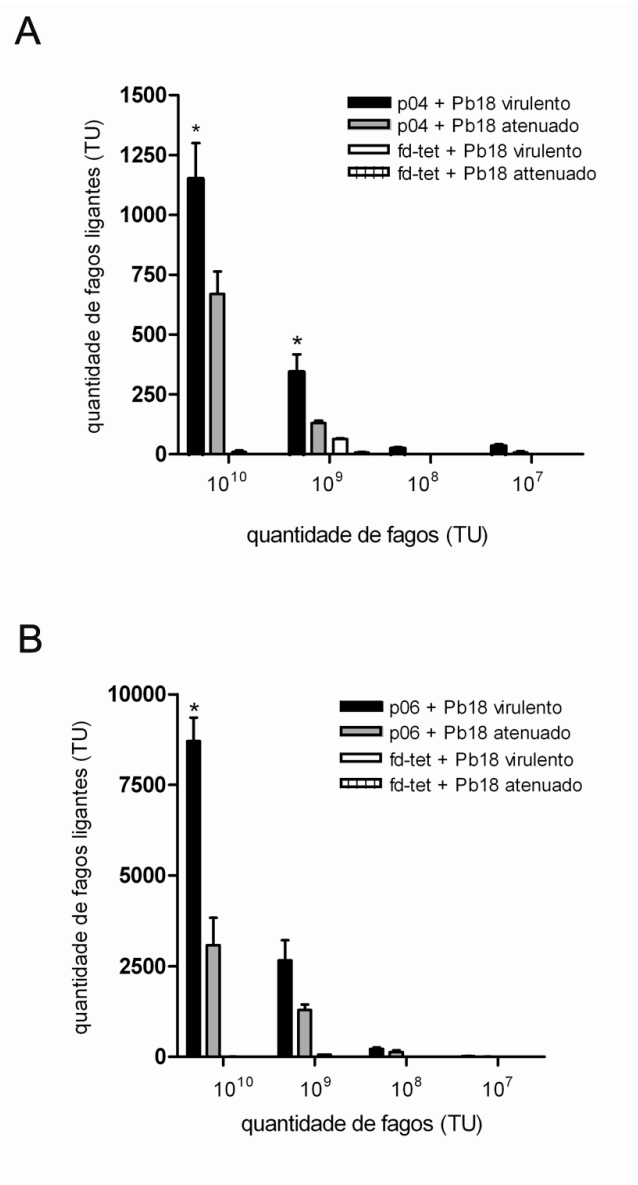
Aproximadamente  $10^6$  células leveduriformes de cada isolado (Pb18 virulento ou Pb18 atenuado) foram incubadas com fagos de cada um dos clones selecionados por 4 horas, em gelo sob frequente agitação. Os fagos p04, p05 e p06 apresentaram ligação maior ao isolado virulento do que ao atenuado. Estes fagos praticamente não se ligaram ao fago controle, sem inserto, como mostra a Figura 21.

#### **4.3.5. Ligação dose-dependente**

A ligação dos fagos p04 e p06 às células leveduriformes foi avaliada quanto à sua dose dependência. Aproximadamente  $10^6$  células leveduriformes de cada isolado foram incubadas com quantidades variadas de fagos ( $10^{10}$ ,  $10^9$ ,  $10^8$ ,  $10^7$ ,  $10^6$  TU) durante 4 horas. As quantidades de fagos recuperadas foram determinada por infecção em *E.coli* K91kan seguida de plaqueamento em meio LB kan/tet. As Figuras 22A e 22B mostram que houve dose dependência e, adicionalmente, que a melhor concentração de fagos que se ligaram às células leveduriformes do isolado Pb18 virulento, por ensaio de ligação, foi de  $10^9$  TU.



**Figura 21 - Ensaio de ligação dos fagos a células leveduriformes dos isolados virulento ou atenuado de *P. brasiliensis*.** Foram utilizadas  $10^6$  células leveduriformes de *P. brasiliensis* e  $10^9$  TU de fagos apresentando os peptídeos previamente selecionando: p01(CSGLQRENC), p02 (CLEVGFWTC), p03(CQYGS DLGC), p04(CGSYGFNAC), p05(CGLRLESTC) e p06 (CSLERLGFC). Gráfico representativo de três experimentos independentes. Barras indicam o desvio padrão. Teste *t-Student* (\*  $P < 0,05$ ) e (\*\*  $P < 0,01$ ) comparado ao isolado atenuado.

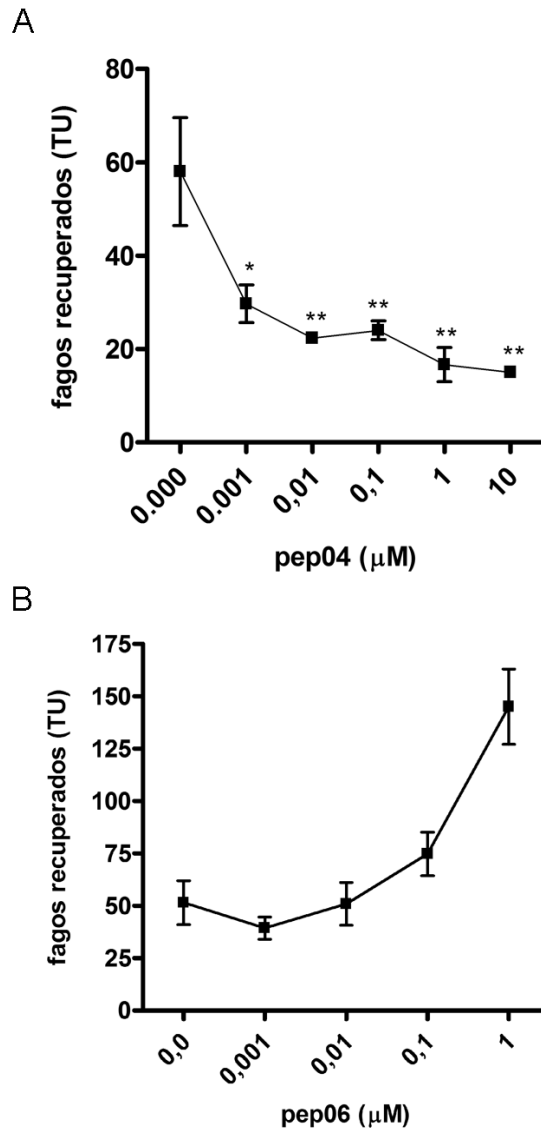


**Figura 22 – Ligação Dose dependente. A.** Ligação do fago p04 às células leveduriformes dos isolados Pb18 virulento ou do, Pb18 atenuado utilizando diferentes quantidades de TU de fagos em experimentos independentes ( $10^6$  to  $10^{10}$  TU). **B.** Ligação do fago p06 às células leveduriformes do isolados virulento ou atenuado utilizando diferentes concentrações de TU de fagos em experimentos independentes ( $10^6$  to  $10^{10}$  TU). Teste *t-Student* (\*  $P < 0,05$ ) comparado ao fago sem inserto. Barras indicam desvio padrão. Gráfico representativo de dois experimentos independentes.



#### **4.3.6. Ensaio de inibição competitiva**

Neste ensaio foram utilizados os peptídeos sintéticos homólogos aos fagos p04 e p06. O peptídeo sintético apresentado pelo fago p04 (CGSYGFNAC) foi denominado de pep04 e o apresentado pelo fago p06 (CSLERLGFC) denominado pep06. Como mostrado na Figura 23, apenas o pep04 foi capaz de impedir a ligação do seu fago homólogo, competindo, provavelmente, pelo mesmo sítio de ligação. Concentrações crescentes de pep04 reduziram as quantidades de fagos p04 recuperadas após ligação ao isolado Pb18 virulento. A taxa de inibição foi gradual. A partir da concentração de 1 $\mu$ M de pep04 a taxa de inibição tornou-se relativamente constante (Figura 23A). Pep06 não apresentou o mesmo efeito sobre a ligação do seu fago homólogo, como mostra a Figura 23B.



**Figura 23- Ensaio de inibição competitiva. A** O peptídeo sintético (pep04) foi incubado com células leveduriformes do isolado virulento. Após lavagens seu fago homólogo (p04) foi incubado e avaliada sua ligação. O gráfico mostra inibição significativa a partir da concentração de  $0.001\mu\text{M}$  de pep04. ANOVA seguido pelo teste Tukey-Kramer, (\*  $P < 0.05$ ) e (\*\*  $P < 0.01$ ) relativo à concentração  $0.0\mu\text{M}$ . **B.** O ensaio de inibição competitiva entre o peptídeo sintético (pep06) e seu fago homólogo (p06) mostrou que não há inibição significativa.

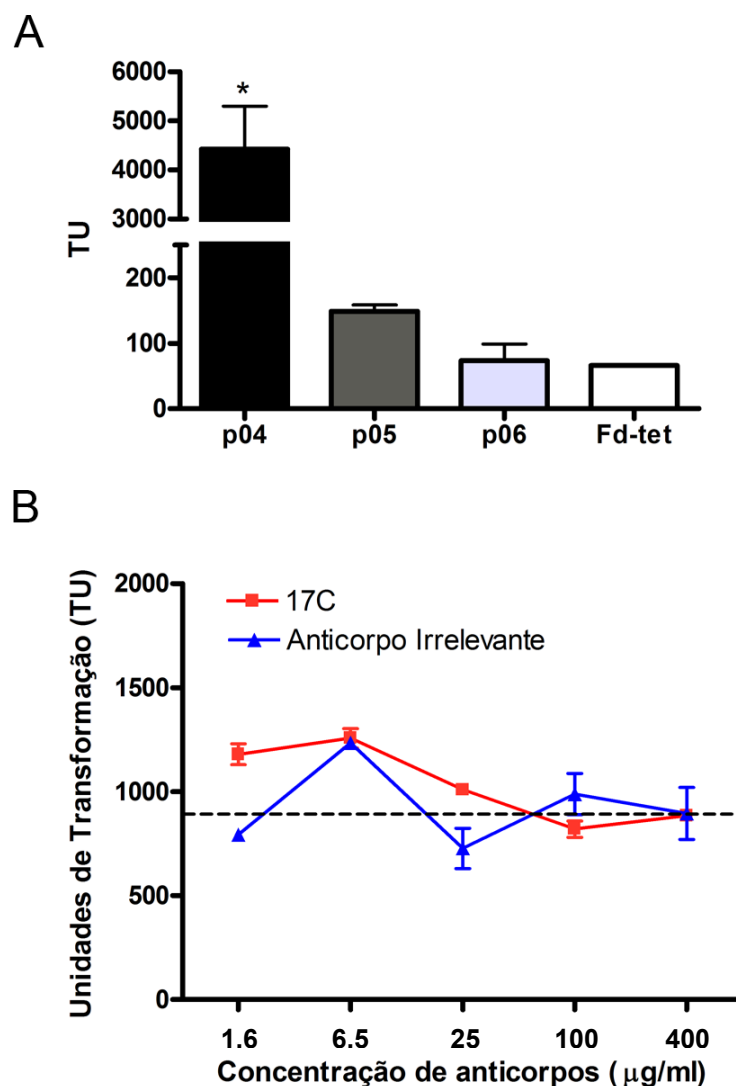
#### **4.3.7. Ensaio de ligação a gp43**

Considerando que a glicoproteína de 43kDa tem sido amplamente estudada como adesina, a molécula pode atuar como um fator de virulência. Por isso, foram realizados ensaios para avaliar a ligação dos fagos selecionados à esta glicoproteína. Três ensaios foram realizados com a glicoproteína purificada do sobrenadante de cultura do isolado Pb18.

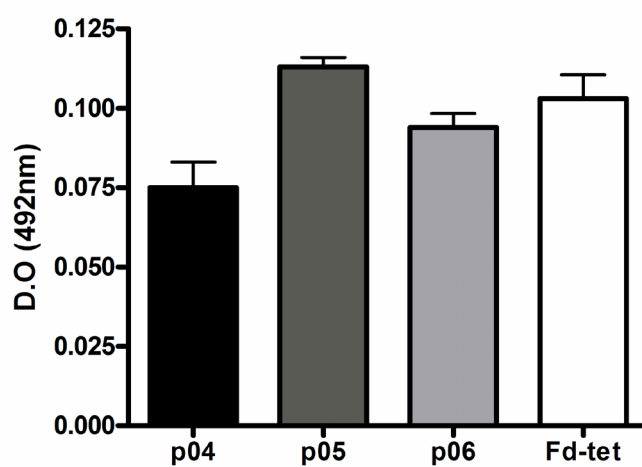
O primeiro protocolo realizado foi o ensaio de ligação de fagos à gp43 imobilizada em placas de 96 poços. Para tanto, poços de placa (COSTAR) foram sensibilizados com 10 $\mu$ g de gp43. Os fagos teste e controle foram incubados e recuperados, após lavagem, pela infecção em *E.coli*K91. Neste ensaio, como mostrado na Figura 24A, o fago p04 mostrou-se ligante de gp43 de maneira significativa quando comparado ao fago sem inserto. Entretanto, devido ao pequeno tamanho do peptídeo e das forças de interação entre estas moléculas, não seria prudente excluir estes peptídeos como ligantes de outras moléculas importantes que poderiam estar envolvidos na patogenicidade do fungo em estudo.

O segundo experimento realizado foi de inibição competitiva do anticorpo monoclonal 17C (anti-gp43) e o fago p04. Utilizando a metodologia BRASIL, células do isolado Pb18 virulento foram incubadas com anticorpos (17C ou irrelevante) em diversas concentrações (400 $\mu$ g/ml até 1,6 $\mu$ g/ml). Após três lavagens com PBS, as células fúngicas foram incubadas com 10<sup>9</sup> TU do fago p04, por 4h a 4°C. Os resultados demonstraram que não há diferença na taxa de inibição da ligação do fago p04 a leveduras do isolado virulento quando comparado o anticorpo 17C com o anticorpo irrelevante (Fig. 24B). Portanto, o epítipo ao qual o anticorpo monoclonal 17C (anti-gp43) se liga parece não ser o mesmo utilizado pelo fago p04, se é que este fago realmente é capaz de se ligar à glicoproteína gp43.

No terceiro experimento, foi realizado ELISA *phage* utilizando o fago sem inserto (Fd-tet) e os fagos p04, p05 e p06. Como mostra a Figura 25, não existe ligação significativa dos fagos à gp43 por este método. Especula-se que este ensaio necessitaria de um controle positivo, mais representativo, como um fago ligante de gp43 e, para obtenção deste, seria necessário uma seleção de fagos utilizando a proteína como ligante.



**Figura 24– Análise da ligação dos fagos selecionados à gp43. A. ensaio de ligação.** Placa de 96 poços foi sensibilizada com a proteína de 43kDa. Após o bloqueio, os fagos p04, p05, p06 e fd-tet (fago controle) foram adicionados e incubados durante 2h à 25°C. Após lavagens, os fagos ligados à gp43 foram recuperados por infecção de *E.coli*K91kan. ANOVA seguido pelo teste Tukey-Kramer (\*\* $P < 0,01$ ) comparado ao fd-tet. **B. Ensaio de inibição competitiva entre o anticorpo monoclonal anti-gp43 (17C) e o fago p04.** Utilizando a metodologia BRASIL, células do isolado Pb18 virulento foram incubadas com anticorpos (17C ou irrelevante) em diversas concentrações (400 $\mu\text{g/ml}$  até 1,6 $\mu\text{g/ml}$ ). Após lavagem as leveduras foram incubadas com  $10^9$  TU do fago p04, por 4h à 4°C. Não houve diferenças entre o anticorpo (Ac) anti-gp43 e o Ac irrelevante.



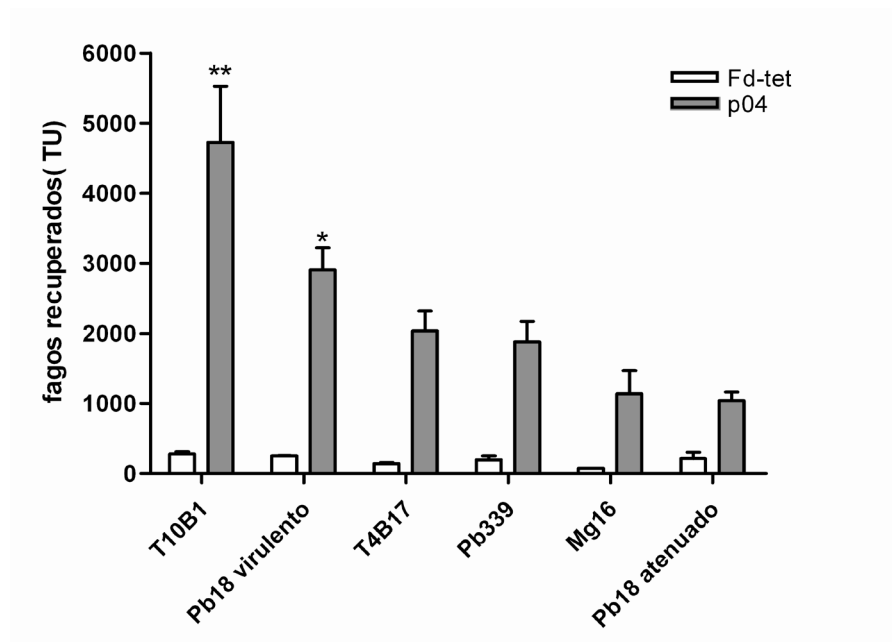
**Figura 25 - Análise da ligação dos fagos selecionados à gp43 por ELISA *phage*.** A Placa de 96 poços foi sensibilizada com a proteína de 43KDa. Após o bloqueio com PBS-BSA 3% os fagos p04, p05, p06 e fd-tet (fago controle) foram adicionados e incubados durante 2h a 37°C. Em seguida, foram incubados com anticorpos anti-fd (sigma) e após lavagens marcados com anti-mouse-IgG-peroxidase mouse.

#### **4.3.8. Ensaio de ligação: p04 e outros isolados**

Neste experimento foram utilizados outros 4 isolados de *P. brasiliensis* com perfis de virulência conhecidos. Dois deles foram, gentilmente, cedidos pelo Professor Eduardo Bagagli, da Universidade Estadual de São Paulo, *campus* Botucatu. Os isolados T10B1 e T4B17 foram isolados de tatus da espécie *Dasyopus novemcinctus*, capturados na área endêmica de PCM, Botucatu, São Paulo. O perfil de virulência desses isolados foram descrito por Hebelers-Barbosa e col. (2003), sendo o isolado T10B1 considerado altamente virulento e o T4B17 com virulência intermediária no modelo de infecção testicular em hamster.

O isolado Mg16 foi, gentilmente, cedido pela Professora Dra. Terezinha Inez Estivalet Svidzinski, da Universidade Estadual de Maringá. Este isolado foi recentemente obtido de uma lesão granulomatosa, na região de fundo de sulco anterior do maxilar inferior, de uma agricultora da região de Maringá. Este isolado apesar de não apresentar perfil de virulência definido, veio de paciente cuja história clínica leva admitir que não se trata de isolado altamente virulento. O isolado Pb339 foi cedido pelo Prof. Dr. Zoilo Pires de Camargo, da Universidade Federal de São Paulo, pertence à sua coleção particular, mantido sob a forma miceliana em micoteca.

Para este experimento foram utilizadas os isolado T10B1, T4B17, Mg16, Pb339, Pb18 virulento ou Pb18 atenuado. Cada isolado foi incubado com  $10^9$  TU do fago p04 ou do Fd-tet (fago controle – sem inserto) por 4 horas, em gelo, sob frequente agitação. Conforme mostrado na Fig.26, o p04 apresentou maior ligação ao isolado T10B1 ( $P < 0,01$ ), seguido pelo isolado Pb18 virulento ( $P < 0,05$ ), quando comparados ao isolado atenuado. Este fago apresentou ligação intermediária às células de levedura dos isolados Pb339 e T4B17. Para o isolado Mg16 recentemente isolado de paciente, o fago p04 apresentou ligação semelhante ao obtido com o isolado atenuado (Pb18).

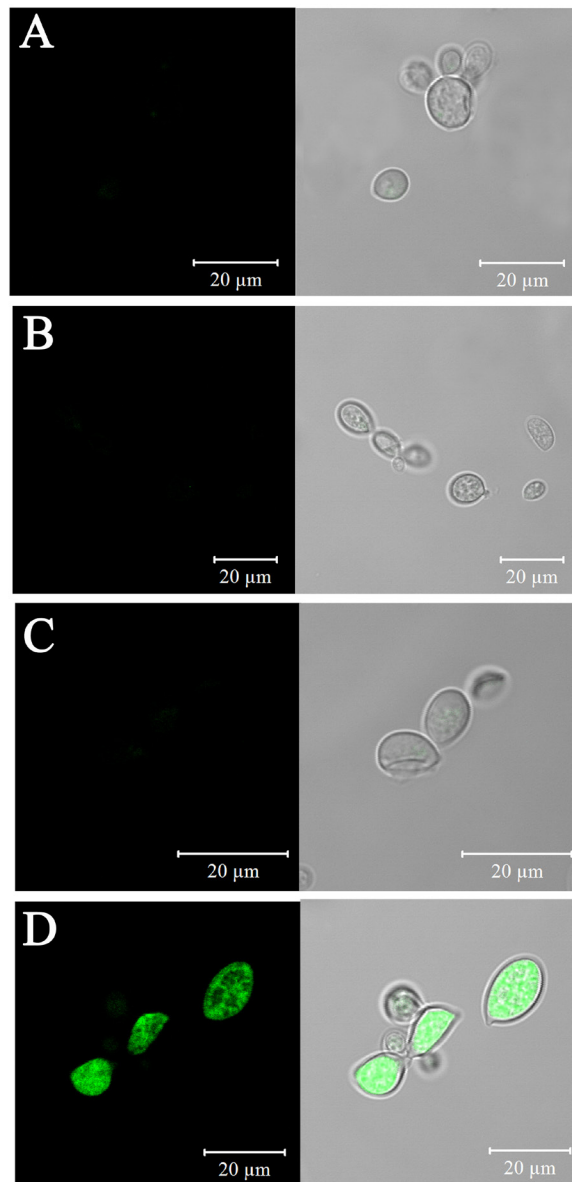


**Figura 26 - p04 como marcadores de virulência.** Ensaio de ligação do fago p04 ou fago controle (sem inserto, fd-tet) com diferentes isolados de *P. brasiliensis* com perfil de virulência predefinido. O fago p04 foi incubado com os isolados T10B1 (altamente virulento), T4B17 (virulência intermediária), Mg16 (isolado de paciente), Pb339, Pb18 atenuado e virulento. Este fago foi capaz de distinguir o grau de virulência de diferentes isolados. ANOVA seguido pelo teste Tukey-Kramer (\*  $P < 0.05$ ) e (\*\*  $P < 0.01$ ) relativos isolado atenuado controle.

#### **4.3.9. P04 liga-se preferencialmente ao isolado virulento**

Peptídeos sintéticos marcados com 6-carboxifluoresceína (6-FAM) foram utilizados para determinar a localização da proteína, à qual o pep04 se liga, nas células leveduriformes de *P. brasiliensis*. As primeiras reações de fluorescência foram realizadas para padronização das condições experimentais e para verificar a melhor concentração de peptídeo a ser utilizada. As células leveduriformes dos isolados Pb18 virulento ou atenuado foram incubadas com pep04 ou peptídeo irrelevante (pepIR) acoplados à 6-FAM. A observação das células ao microscópio de fluorescência mostrou que pepIR não foi capaz de marcar o isolado atenuado (Pb18) (Fig.27C) nem o virulento (Fig. 27E), demonstrando especificidade de pep04. A maioria células do isolado Pb18 atenuado não apresentaram marcação com peptídeo pep04 (Fig.27E). Se quantificado pelo sistema de cruces, este isolado receberia a indicação de uma cruz (+). No entanto, esse peptídeo marcou predominantemente o isolado Pb18 virulento (Fig. 27F), indicação de 3 (+++) a 4 (+++++) cruces. As imagens de fluorescência apontam para uma marcação parcialmente localizada, a ser melhor investigada.



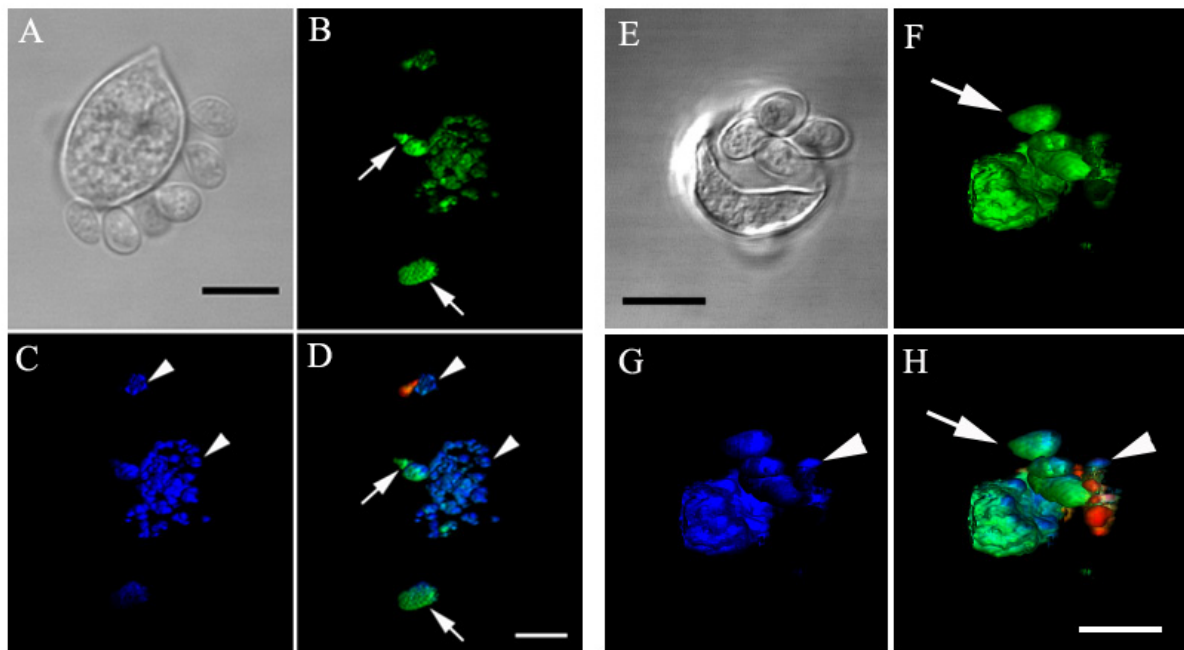


**Figura 27 - P04 liga-se preferencialmente ao isolado virulento.** A microscopia de fluorescência demonstrou que o peptídeo irrelevante (pepIR) marcado com 6-FAM não foi capaz de marcar o isolado atenuado (A) nem o virulento (C). A maioria das células do isolado atenuado não demonstraram marcação com o pep04 marcado com 6-FAM (B). O peptídeo sintético (pep04-6FAM) marcou preferencialmente células leveduriformes do isolado virulento. (D)

#### **4.3.10. Microscopia Confocal**

Para melhor examinar a localização subcelular da proteína à qual o fago p04 ligou-se, as células leveduriformes do *P. brasiliensis* foram marcadas com pep04-6FAM e analisadas ao microscópio confocal. Foram utilizados dois marcadores de estruturas celulares: DAPI, que se liga a DNA dupla-fita e, portanto, cora o material genético e o anticorpo monoclonal 5E7C (mAb anti-gp75), que se liga de maneira pontual à superfície e regiões de brotamento de *P. brasiliensis* (Xander *et al.*, 2007).

A Figura 28 mostra marcação e internalização do pep04 por leveduras do isolado Pb18 virulento. As imagens dos cortes seriados obtidas foram reconstruídas e indicaram marcação intracelular (Fig.28B e 28F), mas frequentemente associada à marcação por DAPI, com evidentes áreas de sobreposição (Fig. 28D e 28H). Houve regiões de marcação apenas do pep04-6FAM e outras, predominantemente de DAPI. O mAb anti-gp75 marcou apenas região de superfície ou de brotamento do fungo (Fig. 28D e 28H - vermelho). Estes dados corroboram aqueles obtidos no experimento anterior, com a adição de uma informação importante para caracterização das proteínas à qual o peptídeo se liga.



**Figura 28 - Associação do pep04 com DNA de leveduras do isolado virulento de *P. brasiliensis*.** As leveduras foram marcadas com pep04-6FAM, mAb anti-gp75 (marcado com Alexa 610) e DAPI. As imagens foram obtidas por microscopia confocal. A e E: imagem DIC; B e F: imagem renderizada da marcação com pep04-6FAM; C e G: imagem renderizada da marcação com DAPI; D e H: Sobreposição de imagens renderizadas da marcação de pep04 (verde), gp75 (vermelho), and DAPI (azul). As setas apontam para áreas de forte marcação do pep04-6FAM e as pontas de seta para áreas de marcação predominante de DAPI. Barras: 10 $\mu$ m.

#### **4.3.11. A atividade antifúngica *in vitro* de peptídeos selecionados**

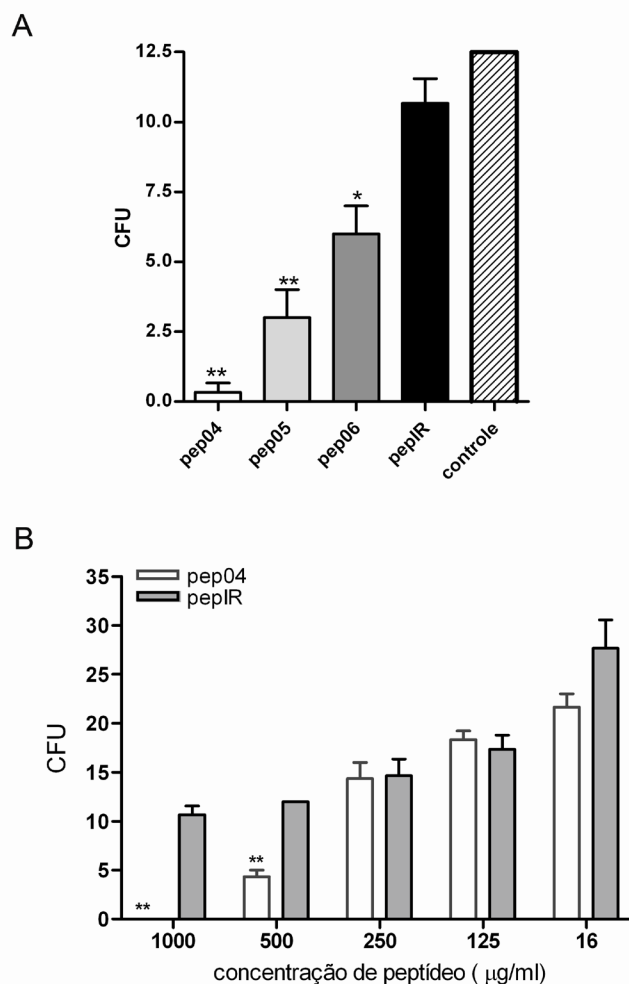
Como os fagos selecionados se ligaram especificamente ao isolado virulento, testamos se os peptídeos sintéticos, homólogos a estes fagos, apresentavam atividade biológica *in vitro*. Os peptídeos (pep04, pep05, pep06 e pepIR - peptídeo irrelevante) foram adicionados na concentração de 1mg/ml sobre 100 células do isolado virulento em caldo Fava-Netto. Após incubação volume da suspensão foi plaqueada para determinação de CFUs.

A Figura 29A demonstra a atividade fungicida *in vitro* contra *P. brasiliensis* dos peptídeos pep04, pep05 e pep06 e que estes valores foram estatisticamente significativos quando comparados ao pepIR ou ao controle (meio). A atividade fungicida de pep04 pareceu ser dependente da dose. Como mostra a Fig.29B houve redução de pelo menos 50% do número de CFUs, quando foi utilizada a concentração de 500µg/ml de pep04.

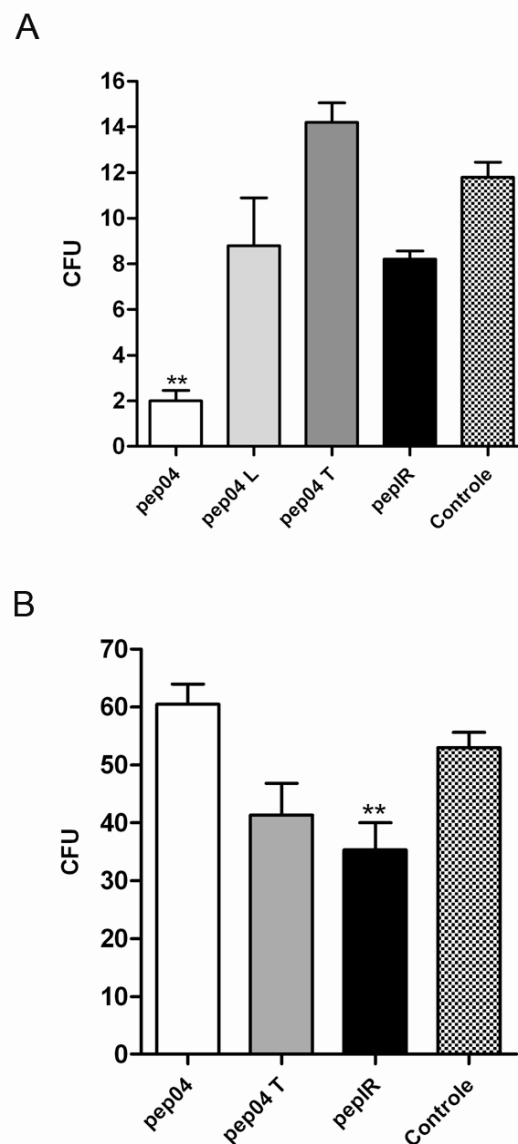
##### **4.3.11.1. Especificidade da Atividade fungicida de pep04**

Para confirmar a especificidade da atividade antifúngica *in vitro* de pep04, outros peptídeos semelhantes à ele foram desenhados e sintetizados. Um peptídeo truncado, contendo os mesmos aminoácidos de pep04, mas em sequência aleatória (pep04 T), um peptídeo linear com a mesma sequência, mas com aminoácido alanina substituindo as cisteínas (pep04 L), e uma sequência diferente, não correlacionada com os peptídeos selecionados por *Phage display* (pepIR).

Conforme mostrado na Fig.30A, as células leveduriformes do isolado virulento foram completamente inibidas por pep04. Na mesma concentração, nenhum dos outros peptídeos produziu qualquer inibição detectável. Estes resultados sugerem uma importância conformacional dos epítomos aos quais pep04 se liga. Este peptídeo apresenta na forma cíclica devido à presença de duas cisteínas nas extremidades que sofrem oxidação e formam pontes dissulfeto. No entanto, quando pep04 foi incubado com células do isolado atenuado a atividade fungicida não foi observada (Fig.30B), mostrando que este peptídeo não foi tóxico para o fungo.



**Figura 29 - A atividade antifúngica *in vitro* de peptídeos selecionados. A.** Os peptídeos (pep04, pep05, pep06 e pepIR – peptídeo irrelevante) foram incubados, na concentração de 1mg/ml, com 100 células leveduriformes do isolado virulento por 24h a 37°C sob agitação. Em seguida, todo o volume da suspensão foi plaqueado para determinação da CFU. Estes resultados demonstraram que o pep04 (\*\*,  $P < 0,01$ ), pep05 (\*\*,  $P < 0,01$ ) e pep06 (\*,  $P < 0,05$ ) apresentaram atividade fungicida *in vitro* contra o *P. brasiliensis*. ANOVA seguido pelo teste Tukey-Kramer. **B. Dose dependência.** A atividade fungicida do pep04 *in vitro* contra o *P. brasiliensis* parece ser dependente da dose, uma vez que na concentração de 500µg/ml houve uma diminuição de 50% da CFU. Teste *t-Student* (\*\*  $P < 0,01$ ) em comparação ao peptídeo irrelevante (pepIR).

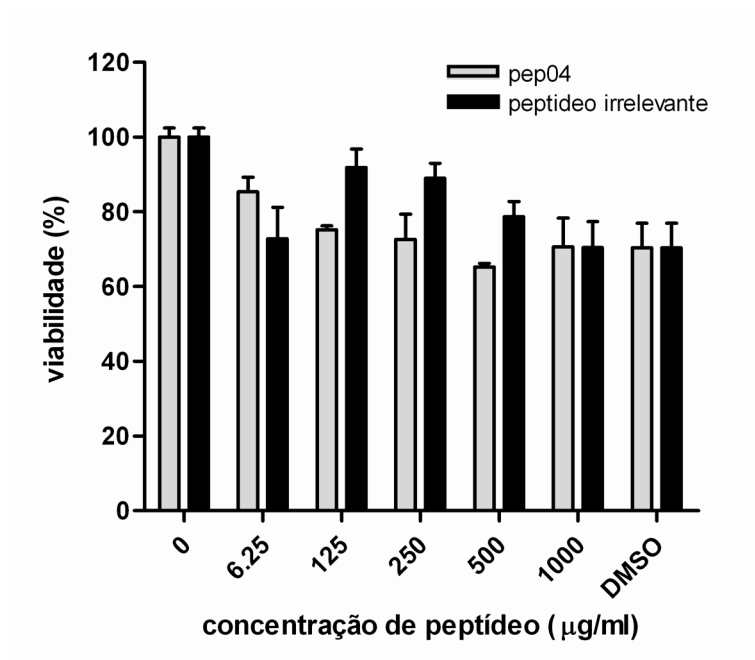


**Figura 30 - Atividade fungicida direcionada. A.** A atividade fungicida de pep04 *in vitro* contra o isolado virulento de *P. brasiliensis* demonstrou-se dependente da conformação estrutural. Pep04 L (pep04 linear - cisteínas substituídas por alaninas), pep04 T (peptídeo truncado) e pepIR (peptídeo irrelevante) não foram capazes de reduzir a CFU. (\*\*  $P < 0,01$ ) em comparação ao controle (somente meio). **B.** A atividade fungicida de pep04 *in vitro* contra o isolado atenuado. Este peptídeo não apresentou atividade fungicida e portanto não apresenta toxicidade para o fungo sendo, aparentemente, seletivo para isolados virulentos. ANOVA seguido pelo teste Tukey-Kramer;

#### **4.3.11.2. Ensaio de citotoxicidade dos peptídeos**

Os resultados de atividade fungicida *in vitro* dos peptídeos selecionados tornaram-os, candidatos à adjuvantes terapêuticos da PCM. Por isso, foi realizada avaliação do perfil citotóxico desses peptídeos em células do hospedeiro. Inicialmente, células aderentes de peritônio foram utilizadas para os ensaios de citotoxicidade por MTT, considerando que os macrófagos são as primeiras células a entrarem em contato com o patógeno, o qual é o alvo dos peptídeos antifúngicos.

Os resultados comparando a citotoxicidade dos peptídeos pep04 ou pepIR ao diluente (DMSO) ou ao meio de cultura são mostrados na Figura 31. Várias concentrações de peptídeos foram avaliadas e nenhuma apresentou diferença significativa. A concentração de 1000 $\mu$ g/ml do pep04, que apresenta a melhor atividade fungicida, não demonstrou toxicidade às células peritoneais.



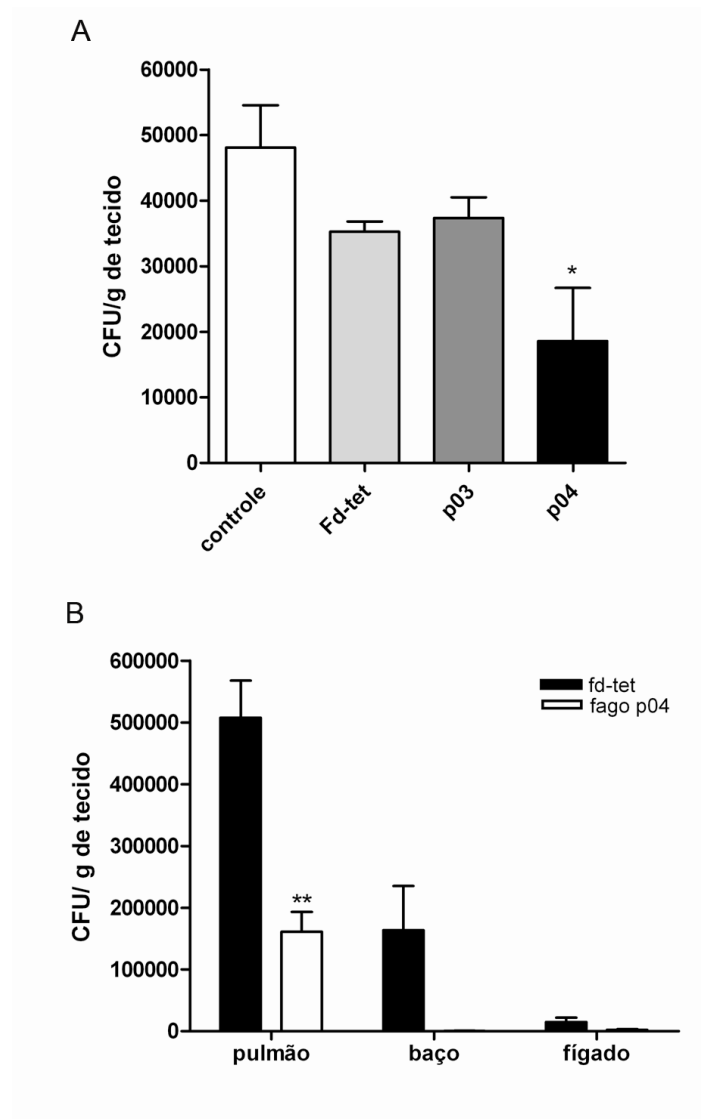
**Figura 31 – Ensaio de citotoxicidade.** Células peritoneais aderentes foram submetidas ao ensaio de citotoxicidade por MTT. Este ensaio colorimétrico detecta a quantidade do produto de reação MTT-formazana (cor azul escuro), convertido pela desidrogenase mitocondrial das células vivas. Diversas concentrações dos peptídeos, pep04 e pepIR, foram testadas (0.0 a 1000µg/ml). O diluente dos peptídeos também foi avaliado [ 20% (v/v) de DMSO]. O gráfico é representativo de três experimentos independentes. Barras indicam o desvio padrão.



#### **4.3.11.3. O fago p04 impede a implantação de infecção.**

Após a caracterização da ligação *in vitro* do fago p04 às leveduras de vários do isolados *P. brasiliensis*, foi avaliado se este fago também poderia impedir a implantação da infecção do fungo em camundongos susceptíveis (linhagem B10.A). Dois protocolos foram testados. Primeiro, as células do isolado Pb18 virulento foram incubadas com fago por uma hora e, em seguida, os animais foram infectados. O sacrifício destes camundongos ocorreu 72 horas após a infecção. Como mostra Fig. 32A, o número CFUs recuperadas dos pulmões dos animais infectados com as células do isolado virulento incubadas com p04 foi, significativamente, inferior aos fagos p03, fd-tet ou controle. Essa diferença tornou-se mais pronunciada quando o sacrifício dos animais foi realizado 45 dias após a infecção (Fig.32B), segundo protocolo utilizado.

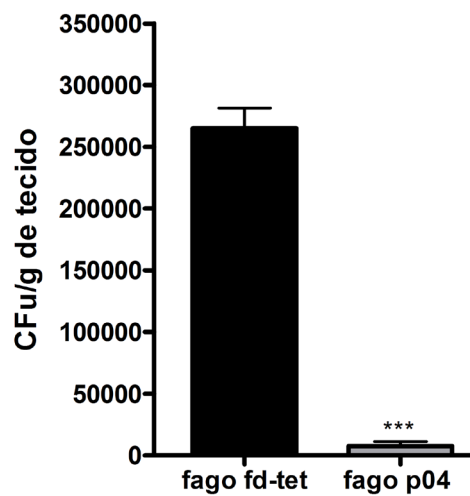
A quantidade de CFUs recuperadas a partir do pulmão, fígado e baço dos animais infectados com isolado Pb18 virulento tratado com p04 foi sempre menor quando comparado com aqueles tratados com fago sem inserto (Fd-tet). Estes resultados sugerem que a interação do fungo como fago p04 impedem a disseminação da infecção para outros órgãos-alvos em camundongos B10-A.



**Figura 32 - O fago p04 impede a implantação de infecção.** **A.** células leveduriformes do isolado virulento foram incubadas com os fagos p04, p03 ou fd-tet (fago sem inserto) por uma hora. Em seguida, camundongos B10.A foram infectados (5 animais). O sacrifício destes camundongos ocorreu 72 horas após a infecção. O número de CFUs nos pulmões dos camundongos infectados com o isolado virulento incubado com p04 foi significativamente inferior aos fagos p03, fd-tet ou controle. (\*\* $P < 0,01$ ). **B.** o isolado virulento foi incubado com p04 ou fd-tet (fago sem inserto) por uma hora. Em seguida, os camundongos B10A foram infectados (5 animais). O sacrifício destes camundongos ocorreu 45 dias após a infecção e a diferença de número de CFUs dos pulmões tornou-se mais acentuada, ANOVA seguido pelo teste Tukey-Kramer (\*\*  $P < 0,01$ ). CFUs detectadas no baço e no fígado não apresentam diferenças significativas.

#### **4.3.11.4. Tratamento com fago p04**

Os estudos *in vitro* demonstram a importância biológica do biomarcador encontrado (pep04) e de sua atividade antifúngica, possibilitando assim o desenvolvimento de um agente adjuvante terapêutico. Portanto, próximo passo foi averiguar se este biomarcador seria capaz de tratar os animais já infectados com *P. brasiliensis*. Inicialmente, o fago p04 foi utilizado, uma vez que a rápida e eficiente replicação deste bacteriófago, facilitaria a obtenção de grandes quantidades do reagente para padronização dos experimentos. Para tanto, camundongos da linhagem Balb/c foram infectados pela via intratraqueal com  $10^6$  células do isolado Pb18 virulento. Após 24 horas da infecção um grupo de animais recebeu  $10^9$ TU do fago p04, o outro recebeu  $10^9$ TU do fago sem inserto (Fd-tet). O tratamento foi realizado por 7 dias, diariamente. Sete dias após o fim do tratamento, os camundongos foram sacrificados e o número de CFUs recuperadas do pulmão foi determinada. Como mostra a Figura 33, o tratamento com fago p04 foi capaz de reduzir a quantidade de CFUs recuperadas de maneira significativa quando comparada com o fago controle (Fd-tet). Uma vez que este fago apresentou-se como um promissor adjuvante terapêutico, novos protocolos deverão ser testados com objetivo de reduzir dose, ou ainda, melhorar a eficácia.



**Figura 33 - Análise do efeito do tratamento com fagos p04 e fd-tet em camundongos infectados por *P. brasiliensis*.** Contagem da CFU do pulmão de camundongos infectados por 24 horas com *P. brasiliensis* e tratados com p04 ou fd-tet (fago sem inserto). As barras mostram a média de 10 contagens e as barras indicam o desvio padrão. Estatisticamente significativo quando comparado ao controle. Teste *t-Student* \*\*\*  $P < 0.001$ .

## **5. DISCUSSÃO**

---

Este trabalho apresenta o primeiro relato da obtenção de biomarcadores de virulência para *P. brasiliensis* capaz de distinguir diferentes isolados com padrão de virulência pré-determinado e apresentar atividade antifúngica direcionada. Os resultados obtidos a cada experimento realizado nos encorajaram, cada dia mais, a acreditar no potencial deste fago e do peptídeo dele derivado em atuar como biomarcador de virulência.

Sabendo que a relação parasita-hospedeiro é definida por moléculas expressas na superfície do parasita e constituintes teciduais e celulares do hospedeiro, a busca pela caracterização dos componentes da superfície do parasita torna-se valiosa. A compreensão das funções biológicas destas moléculas permitirá o melhor entendimento dos mecanismos de sua interação com hospedeiro. Estes mecanismos estão correlacionados à virulência e, em consequência, à patogenicidade de microorganismos.

Indícios de variabilidade em relação ao grau de patogenicidade e virulência do *P. brasiliensis* têm sido descrito por vários autores (Zacharias *et al.*, 1986, Burger *et al.*, 1996, Carvalho *et al.*, 2005). Singer-vermes *et al.* (1985) estudaram seis isolados e os agruparam quanto a sua virulência, considerando Pb18 como altamente virulento, e Pb265, como pouco virulento ou avirulento. Carvalho e colaboradores (2005) demonstraram claramente que dois isolados de *P. brasiliensis*, Pb12 e Pb18, após diversas passagens consecutivas em animais, diminuíram a sobrevivência de camundongos infectados. Portanto, os autores evidenciaram o aumento da patogenicidade do mesmo isolado após inoculação em animais de experimentação.

O fenômeno de atenuação da virulência pelo contínuo cultivo *in vitro* e restauração da virulência pela passagem dos animais foi reportado por outros autores (Castaneda *et al.*, 1987; Zacharias *et al.*, 1986; Brummer *et al.*, 1990; Svidzinski *et al.*, 1999). A atenuação da virulência do isolado Pb18 de *P. brasiliensis* foi detectada em nosso laboratório e parece ser dependente do tempo de subcultivo *in vitro*. A perda de virulência pareceu ser mais evidente nos órgãos de disseminação do que nos sítios de inoculação. Após ter sido mantido em cultura *in vitro* por 5 ou 6 anos o isolado Pb18 de *P. brasiliensis*, anteriormente descrito como virulento (Zacharias *et al.*, 1986), comportou-se como isolado Pb265, descrito pelo mesmo autor como pouco virulento. Com grande empenho foi possível recuperar a virulência do isolado e comparar o agora virulento e atenuado sobre diversos aspectos, sejam eles estruturais ou funcionais.

O perfil de virulência e patogenicidade dos isolados foi inicialmente avaliado por curva de sobrevivência de camundongos susceptíveis (da linhagem B10.A). Estes animais foram infectados com os isolados Pb18 atenuado e virulento. Os resultados obtidos mostraram claramente a atenuação do isolado Pb18, uma vez que o tempo de sobrevivência dos animais tornou-se maior. Os resultados adicionais de CFU e análise histopatológica mostraram que os animais infectados com o isolado atenuado, não apresentaram lesões granulomatosas definidas no sítio de inoculação e as células recuperadas ficaram restritas aos pulmões. Perfil completamente oposto foi detectado no isolado Pb18 virulento, corroborando nossos resultados com dados da literatura. A taxa de sobrevivência dos animais infectados com este isolado diminuiu drasticamente e as seções de histopatologia demonstraram granulomas confluentes envolvendo extensas áreas do pulmão e do fígado. Houve ainda grande quantidade de CFU recuperada do pulmão e disseminação para outros órgãos-alvo, como baço e fígado.

McClelland e colaboradores (2005) tinham proposto a utilização da passagem seriada do patógeno em animais de experimentação e posterior comparação do perfil pré e pós-passagem com o objetivo de avaliar a evolução da virulência experimentalmente. Esta abordagem torna-se uma ferramenta aplicável no estudo da patogenicidade de *P. brasiliensis*. *In vivo*, a mudança pode estar mais relacionada com a capacidade de sobrevivência no hospedeiro e pelas condições de escape do sistema imune; já *in vitro*, a atenuação da virulência também poderia estar associada às mudanças fisiológicas e citoplasmáticas, uma vez que em materiais genéticos nucleares as alterações tendem a ser mais conservadoras (Macoris *et al.*, 2006). Alterações de citoplasma envolvendo material genético induzido por baixa virulência foram observadas em alguns fungos fitopatogênicos (Choi & Nuss, 1992). Tais variações morfológicas, fisiológicas e genéticas também puderam ser detectadas em *P. brasiliensis* (Franco *et al.*, 1996, Svidzinski *et al.*, 1999). Diferenças morfológicas também foram demonstradas no presente trabalho, apoiando a teoria destes autores. As células leveduriformes do isolado virulento são significativamente maiores e apresentaram morfologia mais alongada com poucos brotamentos. Entretanto, entre os dois isolados não há diferenças significativas na taxa de crescimento e na quantidade de células viáveis detectadas ao longo do tempo de cultivo *in vitro*.

Na tentativa de entender os mecanismos e as estruturas celulares possivelmente envolvidas na patogenicidade deste fungo, avaliamos a ultra-estrutura dos isolados por microscopia eletrônica de transmissão. Como em outros fungos, a parede celular desempenha diversas funções além de proteção. Esta estrutura tem se mostrado dinâmica dependendo do ambiente no qual se encontra o patógeno. Por manter contínuo contato com o ambiente ou com o hospedeiro, a parede celular atua como reservatório de moléculas como proteínas, enzimas e toxinas que podem ter função ativa durante a infecção (Gastebois *et al.*, 2009). Os resultados mostraram diferenças estruturais na parede celular do isolado atenuado, apontando a presença de grânulos eletrodensos e de fibrilas maiores e mais abundantes. Dados adicionais apontaram diferenças em grânulos citoplasmáticos e vacúolos. Os resultados reafirmaram o papel importante desempenhado pela parede celular apontando diferenças nesta estrutura entre os dois isolados avaliados. No entanto, qualquer conclusão sobre a função e estruturas envolvidas seria precipitada, uma vez que a patogenicidade deste fungo envolve mecanismos complexos e ainda pouco conhecidos. Especula-se que estas diferenças possam ser devidas à adaptação do isolado ao cultivo *in vitro*.

O padrão de proteínas secretadas em exoantígenos dos dois isolados também foi avaliado em gel de SDS-PAGE corado pela prata. Sabe-se que a produção de antígenos exocelulares em cultura de leveduras de *P. brasiliensis* nem sempre é reprodutível, pois depende de fatores como meio de cultura, isolado e tempo de incubação (Puccia *et al.*, 1986). Entretanto, esses antígenos secretados têm contribuído amplamente na caracterização de componentes celulares importantes para patogenicidade deste fungo (Puccia *et al.*, 1986; Mattos Grosso *et al.*, 2003; Coltri *et al.*, 2006; Xander *et al.*, 2007). No entanto, esta avaliação se restringe à análise qualitativa de proteínas, na qual apenas foi possível observar perfis de secreção diferenciados. Vale destacar a presença de uma banda, de aproximadamente 215kDa, presente de forma mais abundante no isolado virulento.

Considerando essas diferenças fenotípicas demonstradas e os distintos graus de patogenicidade detectados, foi utilizada a técnica de *Microarray* para comparar o perfil de expressão gênica entre os isolados Pb18 atenuado e Pb18 virulento. Esta técnica tem sido utilizada por vários grupos na tentativa de encontrar genes diferentemente expressos nas mais diversas situações. Nunes e colaboradores (2005) construíram *Microarrays* baseado nas 4692 sequências expressas (ESTs) da



fase leveduriforme, e hibridizaram com RNAs isolados de *P. brasiliensis* de diferentes tempos na transição micélio-levedura. Genes preferencialmente expressos no isolado Pb18 virulento foram classificados em amplas categorias funcionais. Baseado na função de seus ortólogos foi identificado genes que estão envolvidos em diversos processos celulares.

Alguns genes foram selecionados para validação por RT-PCR quantitativo, entre eles o *ACDH*, que está envolvido diretamente na produção de acil-CoA, um precursor da síntese de ácidos graxos (Lehninger, 1993). É possível que altos níveis de expressão do mRNA do gene *ACDH* de *P. brasiliensis* possam refletir no aumento da síntese de ácidos graxos. Níveis aumentados da expressão do gene *ERG24*, também foram detectados. Este gene codifica a C-14 redutase, uma enzima necessária para completa demetilação do lanosterol (Shah *et al.*, 2007). É possível que o aumento na quantidade de lipídeos sintetizados esteja correlacionado ao aumento do *turnover* de membrana celular ou mesmo ao aumento das funções intracelulares ou ainda possível aumento de transporte de vesículas e outras substâncias necessárias para adaptação do isolado ao ambiente hostil do hospedeiro. Alternativamente, já foi demonstrado, através de análise global da expressão gênica em *S. cerevisiae*, que genes envolvidos na biossíntese de ergosterol têm sua expressão de mRNA aumentada em condições de *stress*, tais como *stress* oxidativo (Bammert *et al.*, 2000; Higgins *et al.*, 2003), ao qual possivelmente o isolado virulento foi submetido.

Entre os genes relacionados à virulência e *stress*, encontramos o *HSP70* codificador da proteína de choque térmico de 70kDa. Da Silva e colaboradores (1999) evidenciaram aumento da sua expressão na fase leveduriforme, sugerindo que a indução de *HSP70* em células leveduriformes do isolado Pb01 de *P. brasiliensis* pode estar associado à interação parasita-hospedeiro durante o processo infeccioso e resposta do hospedeiro. Recentemente Theodoro e colaboradores (2008) reafirmaram que a transcrição de *HSP70* pode estar associada com a tolerância térmica em *P. brasiliensis*.

O gene *KEX* codifica uma serina proteinase da família das subtilases, as quais têm sido descritas, em fungos, como moléculas importantes no processamento de proteínas como as hidrofobinas (McCabe & Van Alfen, 1999), fosfatase alcalina e lipase extracelulares (Enderlin & Ogrydziak, 1994; Pignède *et al.*, 2000). Em *Candida albicans*, a deleção deste gene reduziu a virulência por impedir a formação de hifas

e a secreção da aspartil proteinase ativa (Newport *et al.*, 2003). Em *Yarrowia lipolytica*, a deleção levou a defeitos na formação das hifas (Richard *et al.*, 2001). Em *Cryphonectria parasitica* a perda da virulência foi devida a redução na esporulação, reduzindo a fertilidade do microorganismo (Jacob-Wilk *et al.*, 2009). Em *P. brasiliensis* os estudos desta proteína tem sido limitados à análise da expressão heteróloga em *S. cerevisiae* (Torres *et al.*, 2008).

O gene *CAMPb*, codificador da calmodulina, tem sido apontado como importante na diferenciação de fungos. Em *C. albicans* parece participar da formação do tubo germinativo (Guptaroy & Datta, 1987). Em *S. cerevisiae*, esta proteína desempenha papel importante na organização do citoesqueleto, endocitose e divisão celular (Desrivieres *et al.*, 2002). A calmodulina também foi identificada em vários fungos como *Phycomyces blakesleeanus*, *Neurospora crassa* e *A. nidulans*, regulando a proliferação celular e mediando funções do Ca<sup>2+</sup> como segundo mensageiro (Fernandes *et al.*, 2005).

Houve regulação positiva do gene *TEF3*, codificador do fator de alongação 3 (EF-3). Este fator foi primeiramente identificado em *S. cerevisiae* (Skogerson & Wakatama, 1976), também tem sido descrito em outros fungos como *Schizosaccharomyces pombe* (Uritani & Miyazaki, 1988), *Pneumocystis carinii* (Ypma-Wong *et al.*, 1992), e em várias espécies de *Candida sp.* (Chakraborty & Kamath, 1988; Colthurst *et al.*, 1991). Embora a função exata do EF-3 permaneça desconhecida, sabe-se que esta molécula apresenta atividade de GTPase e ATPase ribossomo-dependente (Skogerson & Wakatama, 1976; Dasmahapatra & Chakraborty, 1981) e pode desempenhar função de manutenção da acurácia da decodificação do mRNA no sítio A do ribossomo (Belfieldi & Tuite, 1993). EF-3 representa um alvo atrativo para drogas antifúngicas por ser essencial no processo de tradução em fungos, mas não em mamíferos. Swoboda e colaboradores (1994) demonstraram níveis elevados do mRNA de *TEF3* durante a transição dimórfica de *C. albicans*.

Outro gene que se mostrou positivamente modulado foi o *G6PD*, o qual codifica uma enzima “housekeeping” (Levy *et al.*, 1979). Esta enzima atua em mecanismos de proteção contra *stress* oxidativo (espécies reativas de peróxido e super-óxido) (Angelova *et al.*, 2005). Entre as categorias de genes encontradas, o gene 4HPPD (4-hidroxi-fenil piruvato desidrogenase) foi o mais significativamente expresso, como já descrito na transição micélio-levedura, por Nunes e col. (2005).

Recentemente, Schmalzer-Ripcke e colaboradores (2009) demonstraram que a deleção deste gene em *Aspergillus fumigatus* aumenta a sensibilidade a reativos intermediários do oxigênio.

Análises mais profundas são necessárias para determinação da função de cada gene na patogenicidade deste fungo. Todavia, ferramentas de genética clássica, tais como transformação mediada por DNA e modulação da expressão gênica ou por deleção/inativação ou por interferência de RNAs, não foram ainda aplicadas com sucesso em *P. brasiliensis*. A aplicabilidade destas metodologias tornar-se-ia uma valiosa alternativa para a real compreensão da biologia deste fungo.

Algumas proteínas e genes foram relatados como putativos fatores virulência (Ortiz *et al.*, 1996; Molinari-Madlum *et al.*, 1999; Sano *et al.*, 1999, Goldman *et al.*, 2003; Felipe *et al.*, 2003; Carvalho *et al.*, 2005, Bastos *et al.*, 2007; Matute *et al.*, 2008). Alguns autores sugerem que marcadores de virulência podem estar associados a fatores imunogênicos presentes em levedura (Singer-vermes *et al.*, 1989) e outros que possam ser correlacionados com alguns aspectos fenotípicos da colônia miceliana (Macoris *et al.*, 2006). Portanto, não existe ainda um consenso quanto a marcadores de virulência em *P. brasiliensis*.

Diversas técnicas têm sido empregadas na busca de possíveis marcadores de virulência, incluindo a de *Phage display*. Essa tecnologia tem sido utilizada recentemente para identificação de moléculas expressas por patógenos que medeiam a infecção (Lionakis *et al.*, 2005; Mullen *et al.*, 2006), entre outras aplicações. Vários autores também observaram que os peptídeos selecionados a partir de bibliotecas de fagos são muitas vezes semelhantes aos encontrados em proteínas naturalmente expressas (Pasqualini *et al.*, 2006). Então, como o isolado Pb18 apresentou diferenças no grau de virulência, este fungo também poderia apresentar proteínas diferencialmente expressas na parede ou outras estruturas celulares e, portanto, marcadores de virulência poderiam ser encontrados. No presente estudo, foi utilizada uma abordagem da técnica de *Phage display* e sua aplicação em doenças infecciosas. O método BRASIL tem sido utilizado amplamente para seleção de ligantes específicos, devido à capacidade intrínseca desta metodologia para minimizar o *background* (Giordano *et al.*, 2001). Após três ciclos de seleção, as sequências foram analisadas e dois fagos foram considerados importantes e, portanto, validados por ensaio ligação. Os motivos selecionados

foram analisados no banco de proteínas (*National Center for Biotechnology Information* [NCBI] BLAST). Entretanto, esta análise não possibilitou o estudo da interação entre os candidatos a receptores e moléculas expressas na superfície do *P. brasiliensis* envolvidas na virulência. As seqüências dos peptídeos, quando analisadas no banco de dados BLAST, apresentaram homologia com proteínas hipotéticas e, assim nada contribuíram para elucidar possíveis moléculas envolvidas na virulência do fungo.

A seqüência obtida mais importante foi CGSYGFNAC (denominados fago p04 para o bacteriófago exibindo este motivo e, pep04 para o peptídeo sintético homólogo). Este fago foi capaz de distinguir o grau de virulência de diferentes isolados pelo ensaio de ligação. Nestes experimentos foram utilizados dois isolados *P. brasiliensis* obtidos de tatus (T4B17 e T10B1, gentilmente cedidos pelo Dr. Eduardo Bagagli) e um isolado de paciente recentemente obtido (Mg16, gentilmente cedido pela Dra. Terezinha Svidzinski). Hebler-Barbosa (2003) demonstrou que isolado T10B1 foi mais virulento do que o Pb18 em infecção de testículo de hamsters. Usando nosso possível marcador de virulência, este isolado de tatu apresentou o mesmo comportamento. Seguindo a mesma linha, T4B17, também apresentou o mesmo padrão de virulência, determinada como intermediária como na infecção em hamsters (Hebler-Barbosa *et al.*, 2003), assim como o Pb339. Já os isolados Mg16 e Pb18 atenuado apresentaram baixo nível de virulência. A fim de validar o peptídeo obtido como um marcador de virulência, foram realizadas reações de fluorescência utilizando pep04 marcados com 6-FAM. O isolado Pb18 virulento apresentou forte marcação após incubação, enquanto a maioria das células do isolado atenuado mostrou marcação fraca ou ausente com este mesmo peptídeo fluorescente.

A determinação da localização subcelular da proteína a qual o pep04-6FAM se liga foi realizada por Microscopia Confocal. Marcações parcialmente co-localizadas do pep04-6FAM com DAPI sugeriram associação desta proteína com o DNA do fungo. Existem vários indícios de que proteínas que não apresentam o peptídeo sinal, mas que conseguem alcançar a superfície celular e poderiam estar envolvidas em vários processos importantes na parede, incluindo alterações dinâmicas e interações com componentes do hospedeiro (Nombela *et al.*, 2006). Estas proteínas poderiam realizar dupla ou multifunções dependendo da localização celular, sendo chamadas de “*moonlighting*”. Como exemplo, podemos citar a Tsa1,

uma proteína nuclear de *C. albicans*, que durante o estresse oxidativo está envolvida no controle da homeostase e, na parede celular participa da sua biogênese (Urban *et al.*, 2005). Portanto, a presença de proteínas nucleares ou associadas ao DNA transitoriamente presente na parede celular do fungo não seria um fato inédito mas, no mínimo, intrigante para este trabalho, uma vez que as moléculas selecionadas por *Phage display* são, em geral, proteínas de superfície.

Proteínas associadas ao DNA como fatores de transcrição, histonas ou *Binding proteins* são indispensáveis para regulação dos processos celulares. Interações entre fatores de transcrição e seus alvos têm sido descritos em vários fungos como *S. cerevisiae* (Joo *et al.*, 2009, Lawless *et al.*, 2009) *Candida sp.* (Riggle *et al.*, 2006; Shahi *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2007; Hoot *et al.*, 2009; Zeidler *et al.*, 2009), *Aspergillus sp* (Wang *et al.*, 2007, Olszewska *et al.*, 2007). Em *S. cerevisiae* podemos citar a regulação do gene *ADE3*, o qual está envolvido na biossíntese de purina e aminoácidos (metionina e glicina) e é regulado por três prováveis fatores de transcrição (Joo *et al.*, 2009). Outros fatores de transcrição têm sido descritos atuando em funções importantes para relação parasita-hospedeiro como resposta ao *stress* (Uffenbeck *et al.*, 2006; Lawless *et al.*, 2009; Demczuk *et al.*, 2009), resistência a drogas (Riggle *et al.*, 2006; Shahi *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2007; Hoot *et al.*, 2009; ) e virulência (Martchenko *et al.*, 2005; Cornet *et al.*, 2005).

Outras classes de proteínas com função reguladora também se encontram associadas ao DNA, sendo responsáveis por modificações na cromatina seja através da remodelação dependente de ATP ou através de modificações pós-traducionais de histonas. (Wood *et al.*, 2005). Proteínas também podem se ligar a regiões traduzidas ou não do mRNA e modificar a estabilidade, a localização e o estado de tradução do mRNA (Dostie *et al.*, 2002; Mazumder *et al.*, 2003; Parker & Song, 2004), e especialmente a região 3' não traduzida (3' UTR) que parece ser alvo de várias proteínas reguladoras (Mazumder *et al.*, 2003). No entanto, a molécula à qual o biomarcador se liga ainda é desconhecida e sua função reguladora, se confirmada, deverá ser melhor investigada em futuros trabalhos.

Baseado nos experimentos *in vitro* pep04, além de atuar como marcador de virulência, também apresentou atividade fungicida específica para isolado virulento. Esta atividade foi dose-dependente no protocolo de 24 horas de incubação. A atividade fungicida de peptídeos foi também demonstrada contra *Cryptococcus neoformans* (Cenci *et al.*, 2004), *Paracoccidioides brasiliensis* (Travassos *et al.*,

2004) e *Candida albicans* (Manfredi *et al.*, 2007). A conformação estrutural foi também importante, uma vez que peptídeo linear ou truncado não foi tão eficiente. Estes dados nos levam a crer que o(s) epítipo(s) ao qual(is) os peptídeos se ligaram devem ser conformacionais. Além disso, o fago apresentando o pep04 foi capaz de impedir implantação da infecção em camundongos. Portanto, o acoplamento ou adição de peptídeos específicos a drogas antifúngicas poderá, no futuro, aumentar sua atividade no tratamento da PCM.

Este estudo apresenta a identificação e caracterização de, no mínimo, dois biomarcadores de virulência de *P. brasiliensis*. O fago selecionado foi capaz de distinguir diferentes graus de virulência e, *in vivo*, não apenas impediu a implantação e disseminação da PCM, mas também reduziu significativamente o número de CFUs recuperadas do pulmão de camundongos infectados. O peptídeo marcou leveduras do isolado virulento, para o qual apresentou atividade fungicida específica *in vitro*. Portanto, a contribuição deste trabalho apresenta-se em duas vertentes, (i) a aplicabilidade clínica desses reagentes como potenciais adjuvantes terapêuticos ou de diagnóstico e, (ii) como ferramentas que poderão auxiliar no melhor entendimento de moléculas importantes para relação fungo/hospedeiro.

## **6. CONCLUSÕES**

---

---

1. Os isolados (atenuado e virulento) apresentam diferenças no grau de patogenicidade, na morfologia e no padrão de secreção de proteínas.
2. Análises da expressão gênica mostraram modulação de 187 genes dos quais, entre os mais modulados, estão os relacionados ao metabolismo de proteínas, a virulência e a resposta ao estresse.
3. Três fagos selecionados por *Phage display* apresentaram maior afinidade ao isolado Pb18 virulento.
4. O fago p04 foi capaz de distinguir perfis de virulência. Isolados altamente virulentos apresentam alta recuperação de fagos p04, por ensaio de *binding*.
5. Análises de reação de fluorescência como pep04, acoplado à 6-FAM, mostrou intensa marcação de leveduras do isolado virulento. Por microscopia confocal, foi demonstrado que a(s) proteína(s) à(s) qual(is) este biomarcador se liga está(ão) associada(s) ao DNA.
6. O peptídeo sintético pep04 mostrou atividade fungicida *in vitro*, de forma dose e estrutura dependente e específica para o fungo virulento, não reconhecendo a forma atenuada.
7. O fago p04 impediu a implantação e disseminação da doença em modelo experimental de PCM. Adicionalmente, camundongos tratados com este fago apresentaram redução no número de CFUs recuperadas do pulmão.



## ***7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS***

---

1. Almeida AJ, Matute DR, Carmona JA, Martins M, Torres I, McEwen JG, Restrepo A, Leao C, Ludovico P, Rodrigues F. Genome size and ploidy of *Paracoccidioides brasiliensis* reveals a haploid DNA content: flow cytometry and gp43 sequence analysis. *Fungal Genet Biol.* 2007 Jan;44(1):25-31.
2. Amaral AC, Bocca AL, Ribeiro AM, Nunes J, Peixoto DL, Simioni AR, Primo FL, Lacava ZG, Bentes R, Titze-de-Almeida R, Tedesco AC, Morais PC, Felipe MS. Amphotericin B in poly(lactico-glycolic acid) (PLGA) and dimercaptosuccinic acid (DMSA) nanoparticles against paracoccidioidomycosis. *J Antimicrob Chemother.* 2009 Mar;63(3):526-33.
3. Angelova MB, Pashova SB, Spasova BK, Vassilev SV, Slokoska LS. Oxidative stress response of filamentous fungi induced by hydrogen peroxide and paraquat. *Mycol Res.* 2005 Feb;109(2):150-8.
4. Ansorge W. Fast and sensitive detection of protein and DNA bands by treatment with potassium permanganate. *J Biochem Biophys Methods.* 1985 May;11(1):13-20.
5. Arap W, Kolonin MG, Trepel M, Lahdenranta J, Cardó-Vila M, Giordano RJ, Mintz PJ, Ardelt PU, Yao VJ, Vidal CI, Chen L, Flamm A, Valtanen H, Weavind LM, Hicks ME, Pollock RE, Botz GH, Bucana CD, Koivunen E, Cahill D, Troncoso P, Baggerly KA, Pentz RD, Do KA, Logothetis CJ, Pasqualini R. Steps toward mapping the human vasculature by phage display. *Nat Med.* 2002 Feb;8(2):121-7.
6. Arap, W., Pasqualini, R., and Ruoslahti, E. 1998. Cancer treatment by targeted drug delivery to tumor vasculature in a mouse model. *Science* 279: 377-380.
7. Aristizabal BH, Clemons KV, Stevens DA, Restrepo A. Morphological transition of *Paracoccidioides brasiliensis* conidia to yeast cells: *in vivo* inhibition in females. *Infect Immun.* 1998 Nov;66(11):5587-91.
8. Aurélien M, Bottani, S and Vergassola, M. An evolutionary and functional assessment of regulatory network motifs. *Genome Biol.* 2005; 6(4): R35.
9. Bader O, Schaller M, Klein S, Kukula J, Haack K, Mühlischlegel F, Korting HC, Schäfer W, Hube B. The *KEX2* gene of *Candida glabrata* is required for cell surface integrity. *Mol Microbiol.* 2001 Sep;41(6):1431-44.
10. Bagagli E, Franco M, Bosco SM, Hebel-Barbosa F, Trinca LA, Montenegro MR. High frequency of *Paracoccidioides brasiliensis* infection in armadillos (*Dasypus novemcinctus*): an ecological study. *Med Mycol.* 2003 Jun;41(3):217-23.
11. Bagagli E, Sano A, Coelho KI, Alquati S, Miyaji M, de Camargo ZP, Gomes GM, Franco M, Montenegro MR. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillos (*Dasypus novemcinctus*) captured in an endemic area of paracoccidioidomycosis. *Am J Trop Med Hyg.* 1998 Apr;58(4):505-12.
12. Bagagli E, Theodoro RC, Bosco SM, McEwen JG. *Paracoccidioides brasiliensis*: phylogenetic and ecological aspects. *Mycopathologia.* 2008 Apr-May;165(4-5):197-207. Review.
13. Bago B, Zipfel W, Williams RM, Jun J, Arreola R, Lammers PJ, Pfeffer PE, Shachar-Hill Y. Translocation and utilization of fungal storage lipid in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Plant Physiol.* 2002 Jan;128(1):108-24
14. Bailão AM, Shrank A, Borges CL, Parente JA, Dutra V, Felipe MS, Fiúza RB, Pereira M, de Almeida Soares CM. The transcriptional profile of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast cells is influenced by human plasma. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2007 Oct;51(1):43-57
15. Bammert GF, Fostel JM. Genome-wide expression patterns in *Saccharomyces cerevisiae*: comparison of drug treatments and genetic alterations affecting biosynthesis of ergosterol. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000 May;44(5):1255-65.
16. Barbosa MS, Bao SN, Andreotti PF, de Faria FP, Felipe MS, dos Santos Feitosa L, Mendes-Giannini MJ, Soares CM. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Paracoccidioides brasiliensis* is a cell surface protein involved in fungal adhesion to extracellular matrix proteins and interaction with cells. *Infect Immun.* 2006 Jan;74(1):382-9.

17. Barbosa, MS, Bão, SN, Andreotti, PF, de Faria, FP, Felipe, MS, dos Santos Feitosa, L, Mendes-Giannini, MJ and Soares, CM. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Paracoccidioides brasiliensis* is a cell surface protein involved in fungal adhesion to extracellular matrix proteins and interaction with cells. *Infect Immun*. 2006 74:382-9.
18. Barros HC, Verbisck NV, Da Silva S, Araguth MF, Mortara RA. Distribution of epitopes of *Trypanosoma cruzi* amastigotes during the intracellular life cycle within mammalian cells. *J Eukaryot Microbiol*. 1997 Jul-Aug;44(4):332-44.
19. Barros TF, Puccia R. Cloning and characterization of a *LON* gene homologue from the human pathogen *Paracoccidioides brasiliensis*. *Yeast*. 2001 Jul;18(10):981-8.
20. Batista WL, Barros TF, Goldman GH, Morais FV, Puccia R. Identification of transcription elements in the 5' intergenic region shared by *LON* and *MDJ1* heat shock genes from the human pathogen *Paracoccidioides brasiliensis*. Evaluation of gene expression. *Fungal Genet Biol*. 2006 Dec 11.
21. Batista WL, Matsuo AL, Ganiko L, Barros TF, Veiga TR, Freymuller E, Puccia R. The *PbMDJ1* gene belongs to a conserved MDJ1/LON locus in thermotolerant pathogenic fungi and encodes a heat shock protein that localizes to both the mitochondria and cell wall of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Eukaryot Cell*. 2006 Feb;5(2):379-90.
22. Beenhouwer, D.O.; May, R.J.; Valadon, P & Scharff, M.D 2002 High Affinity Mimotope of the Polysaccharide Capsule of *Cryptococcus neoformans* Identified from an Evolutionary Phage Peptide Library *The Journal of Immunology*, 169: 6992–6999.
23. Belfield GP, Bauer M, Ross-Smith N, Tan P, Colthurst DR, Tuite MF. EF-3: a novel fungal elongation factor with homology to *E. coli* ribosomal protein S5. *Biochem Soc Trans*. 1993 Nov;21(4):331S
24. Benard G, Duarte AJ. Paracoccidioidomycosis: a model for evaluation of the effects of human immunodeficiency virus infection on the natural history of endemic tropical diseases. *Clin Infect Dis*. 2000 Oct;31(4):1032-9. Epub 2000 Oct 20. Review.
25. Benard G, Mendes-Giannini MJ, Juvenale M, Miranda ET, Duarte AJ. Immunosuppression in paracoccidioidomycosis: T cell hyporesponsiveness to two *Paracoccidioides brasiliensis* glycoproteins that elicit strong humoral immune response. *J Infect Dis*. 1997 May;175(5):1263-7.
26. Benard G, Oriei NM, Marques HH, Mendonca M, Aquino MZ, Campeas AE, del Negro GB, Durandy A, Duarte AJ. Severe acute paracoccidioidomycosis in children. *Pediatr Infect Dis J*. 1994 Jun;13(6):510-5.
27. Benard G, Romano CC, Cacere CR, Juvenale M, Mendes-Giannini MJ, Duarte AJ. Imbalance of IL-2, IFN-gamma and IL-10 secretion in the immunosuppression associated with human paracoccidioidomycosis. *Cytokine*. 2001 Feb 21;13(4):248-52.
28. Biagione L, Souza MJ, Chamma LG, Mendes RP, Marques SA, Mota NG, Franco M. Serology of paracoccidioidomycosis. II. Correlation between class-specific antibodies and clinical forms of the disease. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1984;78(5):617-21.
29. Bonnet F, Vigneron M, Bensaude O, Dubois MF. Transcription-independent phosphorylation of the RNA polymerase II C-terminal domain (CTD) involves ERK kinases (MEK1/2). *Nucleic Acids Res*. 1999 Nov 15;27(22):4399-404.
30. Borges-Walmsley MI, Chen D, Shu X, Walmsley AR. The pathobiology of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Trends Microbiol*. 2002 Feb;10(2):80-7.
31. Borowski T, Bassan A, Siegbahn PE. 4-Hydroxyphenylpyruvate dioxygenase: a hybrid density functional study of the catalytic reaction mechanism. *Biochemistry*. 2004 Sep 28;43(38):12331-42.
32. Brown GD, Gordon S. Fungal beta-glucans and mammalian immunity. *Immunity*. 2003 Sep;19(3):311-5.
33. Brummer E, Castaneda E, Restrepo A. Paracoccidioidomycosis: an update. *Clin Microbiol Rev* 1993; 6:89–117.

34. Brummer E, Hanson LH, Restrepo A, Stevens DA. Intracellular multiplication of *Paracoccidioides brasiliensis* in macrophages: killing and restriction of multiplication by activated macrophages. *Infect Immun*. 1989 Aug;57(8):2289-94
35. Brummer E, Hanson LH, Stevens DA. Gamma-interferon activation of macrophages for killing of *Paracoccidioides brasiliensis* and evidence for nonoxidative mechanisms. *Int J Immunopharmacol*. 1988;10(8):945-52.
36. Brummer E, Restrepo A, Hanson LH, Stevens DA. Virulence of *Paracoccidioides brasiliensis*: the influence of *in vitro* passage and storage. *Mycopathologia* 1990 109:13-7.
37. Brummer, E, Castañeda, E and Restrepo, A. Paracoccidioidomycosis: an update. *Clin. Microbiol. Rev*. 1993 6: 89-113.
38. Burger E, Vaz CC, Sano A, Calich VL, Singer-Vermes LM, Xidieh CF, Kashino SS, Nishimura K, Miyaji M. *Paracoccidioides brasiliensis* infection in nude mice: studies with isolates differing in virulence and definition of their T cell-dependent and T cell-independent components. *Am J Trop Med Hyg*. 1996 Oct;55(4):391-8.
39. Burnie JP, Carter TL, Hodgetts SJ, Matthews RC. Fungal heat-shock proteins in human disease. *FEMS Microbiol Rev*. 2006 Jan;30(1):53-88.
40. Calcagno A.M., G. Nino-Vega, F. San Blas and G. San Blas, Geographic discrimination of *Paracoccidioides brasiliensis* strains by randomly amplified polymorphic DNA analysis, *J. Clin. Microbiol*. 36 (1998), pp. 1733–1736.
41. Calich VL, Singer-Vermes LM, Siqueira AM, Burger E. Susceptibility and resistance of inbred mice to *Paracoccidioides brasiliensis*. *Br J Exp Pathol*. 1985 Oct;66(5):585-94.
42. 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.
43. Camargo ZP, Gesztesi JL, Saraiva EC, Taborda CP, Vicentini AP, Lopes JD. Monoclonal antibody capture enzyme immunoassay for detection of *Paracoccidioides brasiliensis* antibodies in paracoccidioidomycosis. *J Clin Microbiol*. 1994 Oct;32(10):2377-81.
44. Camargo ZP, Unterkircher C, Campoy SP, Travassos LR. Production of *Paracoccidioides brasiliensis* exoantigens for immunodiffusion tests. *J Clin Microbiol*. 1988 Oct;26(10):2147-51.
45. Camargo ZP. Serology of paracoccidioidomycosis. *Mycopathologia*. 2008 Apr-May;165(4-5):289-302
46. Cano LE, Brummer E, Stevens DA, Restrepo A. Fate of conidia of *Paracoccidioides brasiliensis* after ingestion by resident macrophages or cytokine-treated macrophages. *Infect Immun*. 1992 May;60(5):2096-100.
47. Cano LE, Singer-Vermes LM, Vaz CA, Russo M, Calich VL. Pulmonary paracoccidioidomycosis in resistant and susceptible mice: relationship among progression of infection, bronchoalveolar cell activation, cellular immune response, and specific isotype patterns. *Infect Immun*. 1995 May;63(5):1777-83.
48. Cano MI, Cisalpino PS, Galindo I, Ramirez JL, Mortara RA, da Silveira JF. Electrophoretic karyotypes and genome sizing of the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Clin Microbiol*. 1998 Mar;36(3):742-7.
49. Cano, LE, Singer-Vermes, LM, Costa, TA, Mengel, JO, Xidieh, CF, Arruda, C, André, DC, Vaz, CA, Burger, E and Calich, VL. Depletion of CD8(+) T cells *in vivo* impairs host defense of mice resistant and susceptible to pulmonary paracoccidioidomycosis. *Infect Immun*. 2000 68:352-9.
50. Carneiro LC, de Faria FP, Felipe MS, Pereira M, de Almeida Soares CM. *Paracoccidioides brasiliensis* presents two different cDNAs encoding homologues of the fructose 1,6-biphosphate aldolase: protein isolation, cloning of the cDNAs and genes, structural, phylogenetic, and expression analysis. *Fungal Genet Biol*. 2005 Jan;42(1):51-60.
51. Carvalho KC, Ganiko L, Batista WL, Morais FV, Marques ER, Goldman GH, Franco MF, Puccia R. Virulence of *Paracoccidioides brasiliensis* and gp43 expression in isolates bearing known PbGP43 genotype. *Microbes Infect*. 2005 Jan;7(1):55-65.

52. Casadevall A, Steenbergen JN, Nosanchuk JD. *Ready made* virulence and 'dual use' virulence factors in pathogenic environmental fungi - the *Cryptococcus neoformans* paradigm. *Curr Opin Microbiol.* 2003 Aug;6(4):332-7.
53. Casey, JL, Coley, AM, Parisi, K and Foley, M. Peptide mimics selected from immune sera using phage display technology can replace native antigens in the diagnosis of Epstein-Barr virus infection. *Protein Eng Des Sel.* 2009 22:85-91.
54. Castañeda E, Brummer E, Perlman AM, McEwen JG, Stevens DA. A culture medium for *Paracoccidioides brasiliensis* with high plating efficiency, and the effect of siderophores. *J Med Vet Mycol.* 1988;26(6):351-8.
55. Castañeda, E, Brummer, E, Pappagianis, D and Stevens, DA. Chronic pulmonary and disseminated paracoccidioidomycosis in mice: quantitation of progression and chronicity. *J Med Vet Mycol.* 1987 25:377-87.
56. Cenci, E, Bistoni, F, Mencacci, A, Perito, S, Magliani, W, Conti, S, Polonelli, L and Vecchiarelli, A. A synthetic peptide as a novel anticryptococcal agent. *Cell Microbiol.* 2004 6:953-61
57. Chaffin WL, López-Ribot JL, Casanova M, Gozalbo D, Martínez JP. Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: identification, function, and expression. *Microbiol Mol Biol Rev.* 1998 Mar;62(1):130-80.
58. Chagas RF, Bailão AM, Pereira M, Winters MS, Smullian AG, Deepe GS Jr, de Almeida Soares CM. The catalases of *Paracoccidioides brasiliensis* are differentially regulated: protein activity and transcript analysis. *Fungal Genet Biol.* 2008 Nov;45(11):1470-8
59. Chen D, Janganan TK, Chen G, Marques ER, Kress MR, Goldman GH, Walmsley AR, Borges-Walmsley MI. The cAMP pathway is important for controlling the morphological switch to the pathogenic yeast form of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Mol Microbiol.* 2007 Aug;65(3):761-79.
60. Chen KH, Miyazaki T, Tsai HF, Bennett JE. The bZip transcription factor Cgap1p is involved in multidrug resistance and required for activation of multidrug transporter gene CgFLR1 in *Candida glabrata*. *Gene.* 2007 Jan 15;386(1-2):63-72.
61. Choi, GH & Nuss, DL. Hypovirulence of chesnut blight fungus conferred by an infectious viral cDNA. *Science* 1992. 257:800-803
62. Cisalpino PS, Puccia R, Yamauchi LM, Cano MI, da Silveira JF, Travassos LR. Cloning, characterization, and epitope expression of the major diagnostic antigen of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Biol Chem.* 1996 Feb 23;271(8):4553-60.
63. Clemons KV, Feldman D, Stevens DA. Influence of oestradiol on protein expression and methionine utilization during morphogenesis of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Gen Microbiol.* 1989 Jun;135(6):1607-17.
64. Colthurst DR, Santos M, Grant CM, Tuite MF. *Candida albicans* and three other *Candida* species contain an elongation factor structurally and functionally analogous to elongation factor 3. *FEMS Microbiol Lett.* 1991 May 1;64(1):45-9.
65. Coltri KC, Casabona-Fortunato AS, Gennari-Cardoso ML, Pinzan CF, Ruas LP, Mariano VS, Martinez R, Rosa JC, Panunto-Castelo A, Roque-Barreira MC. Paracoccin, a GlcNAc-binding lectin from *Paracoccidioides brasiliensis*, binds to laminin and induces TNF-alpha production by macrophages. *Microbes Infect.* 2006 Mar;8(3):704-13.
66. Cornet M, Bidard F, Schwarz P, Da Costa G, Blanchin-Roland S, Dromer F, Gaillardin C. Deletions of endocytic components VPS28 and VPS32 affect growth at alkaline pH and virulence through both RIM101-dependent and RIM101-independent pathways in *Candida albicans*. *Infect Immun.* 2005 Dec;73(12):7977-87.
67. Correia J, de Moraes Borba C, Reis B, Martins A, Unkles S, Kinghorn JR, Lucena-Silva N. The ceja-1 sequence as a potential new molecular marker for *Paracoccidioides brasiliensis* infection. *Mycoses.* 2009 Mar 7.

68. Coutinho ZF, Silva D, Lazera M, Petri V, Oliveira RM, Sabroza PC, Wanke B. Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980-1995). *Cad Saude Publica*. 2002 Sep-Oct;18(5):1441-54.
69. Da Fonseca CA, Jesuino RS, Felipe MS, Cunha DA, Brito WA, Soares CM. Two-dimensional electrophoresis and characterization of antigens from *Paracoccidioides brasiliensis*. *Microbes Infect*. 2001 Jun;3(7):535-42.
70. Da Silva SP, Borges-Walmsley MI, Pereira IS, Soares CM, Walmsley AR, Felipe MS. Differential expression of an hsp70 gene during transition from the mycelial to the infective yeast form of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Mol Microbiol*. 1999 Feb;31(4):1039-50.
71. Dadachova, E, Moadel, T, Schweitzer, AD, Bryan, RA, Zhang, T, Mints, L, Revskaya, E, Huang, X, Ortiz, G, Nosanchuk, JS, Nosanchuk, JD and Casadevall, A. Radiolabeled melanin-binding peptides are safe and effective in treatment of human pigmented melanoma in a mouse model of disease. *Cancer Biother Radiopharm*. 2006 21:117-29.
72. Dasmahapatra B, Chakraborty K. Protein synthesis in yeast. I. Purification and properties of elongation factor 3 from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*. 1981 Oct 10;256(19):9999-10004.
73. Daum G, Lees ND, Bard M, Dickson R. Biochemistry, cell biology and molecular biology of lipids of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. 1998 Dec;14(16):1471-510. Review.
74. De Alborno MB. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from rural soil in Venezuela. *Sabouraudia*. 1971 Nov;9(3):248-53.
75. De Mattos Grosso D, de Almeida SR, Mariano M, Lopes JD. Characterization of gp70 and anti-gp70 monoclonal antibodies in *Paracoccidioides brasiliensis* pathogenesis. *Infect Immun*. 2003 Nov;71(11):6534-42.
76. De Moraes Borba C, Schäffer GM. *Paracoccidioides brasiliensis*: virulence and an attempt to induce the dimorphic process with fetal calf serum. *Mycoses*. 2002 Jun;45(5-6):174-9.
77. Demczuk A, Guha N, Nguyen PH, Desai P, Chang J, Guzinska K, Rollins J, Ghosh CC, Goodwin L, Vancura A. *Saccharomyces cerevisiae* phospholipase C regulates transcription of Msn2p-dependent stress-responsive genes. *Eukaryot Cell*. 2008 Jun;7(6):967-79.
78. Derengowski LS, Tavares AH, Silva S, Procópio LS, Felipe MS, Silva-Pereira I. Upregulation of glyoxylate cycle genes upon *Paracoccidioides brasiliensis* internalization by murine macrophages and in vitro nutritional stress condition. *Med Mycol*. 2008 Mar;46(2):125-34.
79. Desrivières S, Cooke FT, Morales-Johansson H, Parker PJ, Hall MN. Calmodulin controls organization of the actin cytoskeleton via regulation of phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem J*. 2002 Sep 15;366(Pt 3):945-51
80. Diez S, Garcia EA, Pino PA, Botero S, Corredor GG, Peralta LA, Castano JH, Restrepo A, McEwen JG. PCR with *Paracoccidioides brasiliensis* specific primers: potential use in ecological studies. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1999 Nov-Dec;41(6):351-8.
81. Diez S, Gomez BL, Restrepo A, Hay RJ, Hamilton AJ. *Paracoccidioides brasiliensis* 87-kilodalton antigen, a heat shock protein useful in diagnosis: characterization, purification, and detection in biopsy material via immunohistochemistry. *J Clin Microbiol*. 2002 Feb;40(2):359-65.
82. Donofrio FC, Calil AC, Miranda ET, Almeida AM, Benard G, Soares CP, Veloso SN, Soares CM, Mendes Giannini MJ. Enolase from *Paracoccidioides brasiliensis*: isolation and identification as a fibronectin-binding protein. *J Med Microbiol*. 2009 Jun;58(Pt 6):706-13.
83. Dostie J, Dreyfuss G. Translation is required to remove Y14 from mRNAs in the cytoplasm. *Curr Biol*. 2002 Jul 9;12(13):1060-7.
84. Ellerby, H. M., Arap, W., Ellerby, L. M., Kain, R., Andrusiak, R., Rio, G. D., Krajewski, S., Lombardo, C. R., Rao, R., Ruoslahti, E., Bredesen, D. E., and Pasqualini, R. (1999) Anti-cancer activity of targeted pro-apoptotic peptides. *Nature Med*. 5: 1032-1038.

85. Enderlin CS, Ogrydziak DM. Cloning, nucleotide sequence and functions of XPR6, which codes for a dibasic processing endoprotease from the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Yeast*. 1994 Jan;10(1):67-79.
86. Farias MR, Werner J, Muro MD, Marques SA, Marques MEA, Franco MF, Ribeiro MG, Custodio CC, Condas LAZ, Bosco SMG, Bagagli E. 2005. Canine Paracoccidioidomycosis: case report of generalized lymphadenitis. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*. 47 (Suppl. 14), 64.
87. Feitosa Ldos S, Cisalpino PS, dos Santos MR, Mortara RA, Barros TF, Moraes FV, Puccia R, da Silveira JF, de Camargo ZP. Chromosomal polymorphism, syntenic relationships, and ploidy in the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Fungal Genet Biol*. 2003 Jun;39(1):60-9.
88. Felipe MS, Andrade RV, Arraes FB, Nicola AM, Maranhao AQ, Torres FA, Silva-Pereira I, Pocas-Fonseca MJ, Campos EG, Moraes LM, Andrade PA, Tavares AH, Silva SS, Kyaw CM, Souza DP, Pereira M, Jesuino RS, Andrade EV, Parente JA, Oliveira GS, Barbosa MS, Martins NF, Fachin AL, Cardoso RS, Passos GA, Almeida NF, Walter ME, Soares CM, Carvalho MJ, Brígido MM. Transcriptional profiles of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* in mycelium and yeast cells. *J Biol Chem*. 2005 Jul 1;280(26):24706-14.
89. Felipe MS, Andrade RV, Petrofeza SS, Maranhão AQ, Torres FA, Albuquerque P, Arraes FB, Arruda M, Azevedo MO, Baptista AJ, Bataus LA, Borges CL, Campos EG, Cruz MR, Daher BS, Dantas A, Ferreira MA, Ghil GV, Jesuino RS, Kyaw CM, Leitão L, Martins CR, Moraes LM, Neves EO, Nicola AM, Alves ES, Parente JA, Pereira M, Poças-Fonseca MJ, Resende R, Ribeiro BM, Saldanha RR, Santos SC, Silva-Pereira I, Silva MA, Silveira E, Simões IC, Soares RB, Souza DP, De-Souza MT, Andrade EV, Xavier MA, Veiga HP, Venancio EJ, Carvalho MJ, Oliveira AG, Inoue MK, Almeida NF, Walter ME, Soares CM, Brígido MM. Transcriptome characterization of the dimorphic and pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* by EST analysis. *Yeast*. 2003 Feb;20(3):263-71
90. Fernandes L, Araújo MA, Amaral A, Reis VC, Martins NF, Felipe MS. Cell signaling pathways in *Paracoccidioides brasiliensis* - inferred from comparisons with other fungi. *Genet Mol Res*. 2005 Jun 30;4(2):216-31.
91. Fernandes L, Paes HC, Tavares AH, Silva SS, Dantas A, Soares CM, Torres FA, Felipe MS. Transcriptional profile of *ras1* and *ras2* and the potential role of farnesylation in the dimorphism of the human pathogen *Paracoccidioides brasiliensis*. *FEMS Yeast Res*. 2008 Mar;8(2):300-10
92. Ferreira KS, Lopes JD, Almeida SR. Down-regulation of dendritic cell activation induced by *Paracoccidioides brasiliensis*. *Immunol Lett*. 2004 Jun 15;94(1-2):107-14.
93. Ferreira ME, Marques Edos R, Malavazi I, Torres I, Restrepo A, Nunes LR, de Oliveira RC, Goldman MH, Goldman GH. Transcriptome analysis and molecular studies on sulfur metabolism in the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Mol Genet Genomics*. 2006 Nov;276(5):450-63
94. Ferreira MS, Freitas LH, Lacaz Cda S, del Negro GM, de Melo NT, Garcia NM, de Assis CM, Salebian A, Heins-Vaccari EM. Isolation and characterization of a *Paracoccidioides brasiliensis* strain from a dogfood probably contaminated with soil in Uberlândia, Brazil. *J Med Vet Mycol*. 1990;28(3):253-6.
95. Figueroa JI, Hamilton AJ, Allen MH, Hay RJ. 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*. 1995 Sep-Oct;89(5):566-72.
96. Franco M, Montenegro MR, Mendes RP, Marques AS, Dillon NL, MotaNGS. Paracoccidioidomycosis: a recently proposed classification of its clinical forms. *Rev Soc Bras Med Trop* 1987; 20:129–32.
97. Franco M. Host-parasite relationships in paracoccidioidomycosis. *J Med Vet Mycol*. 1987 Feb;25(1):5-18.
98. Franco, M, Bagagli, E, Cunha, M, Chama, LG and Fecchio, D. *Paracoccidioides brasiliensis* antigens batches from the same isolate show immunological and biochemical differences. *Mycopathologia*. 1996 135: 13-19.

99. Fujimura-Kamada K, Nouvet FJ, Michaelis S. A novel membrane-associated metalloprotease, Ste24p, is required for the first step of NH<sub>2</sub>-terminal processing of the yeast  $\alpha$ -factor precursor. *J Cell Biol.* 1997 Jan 27;136(2):271-85.
100. Galili, N, Devemy, E and Raza, A. Isolation of specific and biologically active peptides that bind cells from patients with acute myeloid leukemia (AML). *J Hematol Oncol.* 2008 10:1-9.
101. Ganiko, L, Puccia, R, Mariano, VS, Sant'Anna, OA, Freymüller, E, Roque-Barreira, MC and Travassos, LR. Paracoccin, an N-acetyl-glucosamine-binding lectin of *Paracoccidioides brasiliensis*, is involved in fungal growth. *Microbes Infect.* 2007 9:695-703
102. Garcia NM, Del Negro GM, Heins-Vaccari EM, de Melo NT, de Assis CM, Lacaz C da. 1993. *Paracoccidioides brasiliensis*, a new sample isolated from feces of a penguin (*Pygoscelis adeliae*) *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 35(3):227-35.
103. Gastebois A, Clavaud C, Aimaniana V, Latgé JP. *Aspergillus fumigatus*: cell wall polysaccharides, their biosynthesis and organization. *Future Microbiol.* 2009 Jun;4:583-95.
104. Gesule E. Aislamento de *Paracoccidioides sp.* de heces de pinguino de la Antártida. In: Proceedings of the 4th International Meeting on Paracoccidioidomycosis; 1989; Caracas. Venezuela: 1989. Abstract.
105. Ghosh S, Navarathna DH, Roberts DD, Cooper JT, Atkin AL, Petro TM, Nickerson KW. Arginine-induced germ tube formation in *Candida albicans* is essential for escape from murine macrophage line RAW 264.7. *Infect Immun.* 2009 Apr;77(4):1596-605
106. Giordano RJ, Cardó-Vila M, Lahdenranta J, Pasqualini R, Arap W. Biopanning and rapid analysis of selective interactive ligands. *Nat Med.* 2001 Nov;7(11):1249-53.
107. Goldani LZ, Picard M, Sugar AM. Synthesis of heat-shock proteins in mycelia and yeast forms of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Med Microbiol.* 1994 Feb;40(2):124-8.
108. Goldani LZ, Sugar AM. Short report: use of the polymerase chain reaction to detect *Paracoccidioides brasiliensis* in murine paracoccidioidomycosis. *Am J Trop Med Hyg.* 1998 Feb;58(2):152-3.
109. Goldman GH, dos Reis Marques E, Duarte Ribeiro DC, de Souza Bernardes LA, Quiapin AC, Vitorelli PM, Savoldi M, Semighini CP, de Oliveira RC, Nunes LR, Travassos LR, Puccia R, Batista WL, Ferreira LE, Moreira JC, Bogossian AP, Tekaiia F, Nobrega MP, Nobrega FG, Goldman MH. Expressed sequence tag analysis of the human pathogen *Paracoccidioides brasiliensis* yeast phase: identification of putative homologues of *Candida albicans* virulence and pathogenicity genes. *Eukaryot Cell* 2003;2:34-48.
110. Gomes GM, Cisalpino PS, Taborda CP, de Camargo ZP. PCR for diagnosis of paracoccidioidomycosis. *J Clin Microbiol.* 2000 Sep;38(9):3478-80.
111. Gomez BL, Figueroa JI, Hamilton AJ, Ortiz B, Robledo MA, Hay RJ, Restrepo A. Use of monoclonal antibodies in diagnosis of paracoccidioidomycosis: new strategies for detection of circulating antigens. *J Clin Microbiol.* 1997 Dec;35(12):3278-83.
112. Goward CR, Nicholls DJ. Malate dehydrogenase: a model for structure, evolution, and catalysis. *Protein Sci.* 1994 Oct;3(10):1883-8.
113. Grose E, Tamsitt JR. *Paracoccidioides brasiliensis* recovered from the intestinal tract of three bats (*Artibeus lituratus*) in Colombia, S.A. *Sabouraudia.* 1965 Jun;4(2):124-5.
114. Guptaoy, B & Datta, A. A calmodulin inhibitor blocks morphogenesis in *Candida albicans*. *FEMS Microbiol. Lett.* 1987 41:327-329.
115. Hanna SA, Monteiro da Silva JL, Giannini MJ. Adherence and intracellular parasitism of *Paracoccidioides brasiliensis* in Vero cells. *Microbes Infect.* 2000 Jul;2(8):877-84.
116. Hebelers-Barbosa F, Montenegro MR, Bagagli E. Virulence profiles of ten *Paracoccidioides brasiliensis* isolates obtained from armadillos (*Dasypus novemcinctus*). *Med Mycol.* 2003 Apr;41(2):89-96.



117. Herr RA, Tarcha EJ, Taborda PR, Taylor JW, Ajello L, Mendoza L. Phylogenetic analysis of *Lacazia loboi* places this previously uncharacterized pathogen within the dimorphic *Onygenales*. *J Clin Microbiol*. 2001;39:309-14.
118. Hertveldt, K; Dechassa, M.L.; Robben, J., Volckaert, G. 2003 Identification of Gal80p-interacting proteins by *Saccharomyces cerevisiae* whole genome phage display. *Gene* 307:141–149
119. Higgins VJ, Beckhouse AG, Oliver AD, Rogers PJ, Dawes IW. Yeast genome-wide expression analysis identifies a strong ergosterol and oxidative stress response during the initial stages of an industrial lager fermentation. *Appl Environ Microbiol*. 2003 Aug;69(8):4777-87.
120. Hogan LH, Klein BS, Levitz SM. Virulence factors of medically important fungi. *Clin Microbiol Rev*. 1996 Oct;9(4):469-88. Review.
121. Hong YR, Chen YL, Farh L, Yang WJ, Liao CH, Shiuan D. Recombinant *Candida utilis* for the production of biotin. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2006 Jun;71(2):211-21.
122. Hong, HY., Lee, HY., Kwak, W, Yoo, J, Na, MH, So, IS, Kwon, TH, Park, HS, Huh, S, Oh, GT, Kwon, IC, Kim, IS and Lee, BH. Phage display selection of peptides that home to atherosclerotic plaques: IL-4 receptor as a candidate target in atherosclerosis. *J Cell Mol Med*. 2008 12:2003-2014.
123. Hoot SJ, Oliver BG, White TC. *Candida albicans* UPC2 is transcriptionally induced in response to antifungal drugs and anaerobicity through Upc2p-dependent and -independent mechanisms. *Microbiology*. 2008 Sep;154:2748-56
124. Howell, RC, Revskaya, E, Pazo, V, Nosanchuk, JD, Casadevall, A and Dadachova, E. Phage display library derived peptides that bind to human tumor melanin as potential vehicles for targeted radionuclide therapy of metastatic melanoma. *Bioconjug Chem*. 2007 18:1739-1748.
125. Hui, X, Han, Y, Liang, S, Liu, Z, Liu, J, Hong, L, Zhao, L, He, L, Cao, S, Chen, B, Yan, K, Jin, B, Chai, N, Wang, J, Wu, K and Fan, D. Specific targeting of the vasculature of gastric cancer by a new tumor-homing peptide CGNSNPKSC. *J Control Release*. 2008 131:86-93.
126. Izacc SM, Gomez FJ, Jesuino RS, Fonseca CA, Felipe MS, Deepe GS, Soares CM. Molecular cloning, characterization and expression of the heat shock protein 60 gene from the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Med Mycol*. 2001 Oct;39(5):445-55.
127. Jackson J, Shilatifard A. Global Proteomic Analysis of *Saccharomyces cerevisiae* Identifies Molecular Pathways of Histone Modifications. *Methods Mol Biol*. 2009;548:175-86.
128. Jacob-Wilk D, Turina M, Kazmierczak P, Van Alfen NK. Silencing of Kex2 significantly diminishes the virulence of *Cryphonectria parasitica*. *Mol Plant Microbe Interact*. 2009 Feb;22(2):211-21.
129. Jesuino RS, Azevedo MO, Felipe MS, Pereira M, De Almeida Soares CM. Characterization of a chaperone *ClpB* homologue of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Yeast*. 2002 Aug;19(11):963-72.
130. Johnson WD, Lang CM. Paracoccidioidomycosis (South American blastomycosis) in a squirrel monkey (*Saimiri sciureus*). *Vet Pathol*. 1977 Jul;14(4):368-71.
131. Joo YJ, Kim JA, Baek JH, Seong KM, Han KD, Song JM, Choi JY, Kim J. Cooperative regulation of ADE3 transcription by Gcn4p and Bas1p in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell*. 2009 Jun 12.
132. Jouault T, Fradin C, Dzierszinski F, Borg-Von-Zepelin M, Tomavo S, Corman R, Trinel PA, Kerckaert JP, Poulain D. Peptides that mimic *Candida albicans*-derived beta-1,2-linked mannosides. *Glycobiology*. 2001 Aug;11(8):693-701.
133. Kamath A, Chakraborty K. Role of yeast elongation factor 3 in the elongation cycle. *J Biol Chem*. 1989 Sep 15;264(26):15423-8.
134. Kashino SS, Calich VL, Burger E, Singer-Vermes LM. *In vivo* and *in vitro* characteristics of six *Paracoccidioides brasiliensis* strains. *Mycopathologia*. 1985 Dec;92(3):173-8.
135. Kashino SS, Calich VL, Singer-Vermes LM, Abrahamsohn PA, Burger E. Growth curves, morphology and ultrastructure of ten *Paracoccidioides brasiliensis* isolates. *Mycopathologia*. 1987 Aug;99(2):119-28

- 136.** Kashino, SS, Singer-Vermes, LM, Calich, VL and Burger, E. Alterations in the pathogenicity of one *Paracoccidioides brasiliensis* isolate do not correlate with its *in vitro* growth. *Mycopathologia*. 1990 111:173-80.
- 137.** Kindler V, Sappino AP, Grau GE, Pigué PF, Vassalli P. The inducing role of tumor necrosis factor in the development of bactericidal granulomas during BCG infection, *Cell*. 1989 56: 731-740.
- 138.** Koivunen E, Gay DA, Ruoslahti E. Selection of peptides binding to the alpha 5 beta 1 integrin from phage display library. *J Biol Chem*. 1993 Sep 25;268(27):20205-10.
- 139.** Koivunen E, Restel BH, Rajotte D, Lahdenranta J, Hagedorn M, Arap W, Pasqualini R. Integrin-binding peptides derived from phage display libraries. *Methods Mol Biol*. 1999a;129:3-17.
- 140.** Koivunen E, Arap W, Rajotte D, Lahdenranta J, Pasqualini R. Identification of receptor ligands with phage display peptide libraries. *J Nucl Med*. 1999b May;40(5):883-8.
- 141.** Konno AY, Maricato JT, Konno FT, Mariano M, Lopes JD. Peptides from *Paracoccidioides brasiliensis* gp43 inhibit macrophage functions and inflammatory response. *Microbes Infect*. 2009 Jan;11(1):92-9.
- 142.** Kretsinger RH, Rudnick SE, Sneden DA, Schatz VB. Calmodulin, S-100, and crayfish sarcoplasmic calcium-binding protein crystals suitable for X-ray diffraction studies. *J Biol Chem*. 1980 Sep 10;255(17):8154-6.
- 143.** Kurita N, Biswas SK, Oarada M, Sano A, Nishimura K, Miyaji M. Fungistatic and fungicidal activities of murine polymorphonuclear leucocytes against yeast cells of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Med Mycol*. 1999b Feb;37(1):19-24.
- 144.** Kurita N, Oarada M, Miyaji M, Ito E. Effect of cytokines on antifungal activity of human polymorphonuclear leucocytes against yeast cells of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Med Mycol*. 2000 Apr;38(2):177-82.
- 145.** Kurokawa CS, Lopes CR, Sugizaki MF, Kuramae EE, Franco MF, Peraçoli MT. Virulence profile of ten *Paracoccidioides brasiliensis* isolates: association with morphologic and genetic patterns. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2005 Sep-Oct;47(5):257-62.
- 146.** Lacaz CS, Historical Evolution of the knowledge on paracoccidioidomycosis and its etiologic agent, *Paracoccidioides brasiliensis*. In: Franco M, Lacaz CS, Restrepo-Moreno A, Del Negro G, eds. *Paracoccidioidomycosis*. London: Boca Raton, 1994a. 1-11 p.
- 147.** Lacaz CS, *Paracoccidioides brasiliensis*: morphology; evolutionary; maintenance during saprophytic life; biology, virulence, taxonomy. In: Franco M, Lacaz CS, Restrepo-Moreno A, Del Negro G, eds. *Paracoccidioidomycosis*. London: Boca Raton, 1994b. 13-25 p.
- 148.** Ladds G, Davey J. Identification of proteases with shared functions to the proprotein processing protease Krp1 in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Microbiol*. 2000 Nov;38(4):839-53
- 149.** Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970 Aug 15;227(5259):680-5.
- 150.** Lawless C, Pearson RD, Selley JN, Smirnova JB, Grant CM, Ashe MP, Pavitt GD, Hubbard SJ. Upstream sequence elements direct post-transcriptional regulation of gene expression under stress conditions in yeast. *BMC Genomics*. 2009 Jan 7;10:7.
- 151.** Levy HR, Daouk GH, Katopes MA. Regulation of coenzyme utilization by the dual nucleotide-specific glucose 6-phosphate dehydrogenase from *Leuconostoc mesenteroids*. *Arch Biochem Biophys*. 1979 Dec;198(2):406-13
- 152.** Levyh, R. & Cook, C (1991). Purification and properties of NADP linked glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Acetobacter Hansenii* (*Acetobacter xylinum*). *Archives of Biochemistry and Biophysics* 291, 161-167.
- 153.** Li, X, Chen, H, Khan, AA, Lauterbach, SB, Lanzillotti, R, Rai, PR, Kane, RS, Coetzer, TL and Chishti, AH. Receptor-based identification of an inhibitory peptide against blood stage malaria. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008 376:489-93

154. Lind K, Norbeck J. A QPCR-based reporter system to study post-transcriptional regulation via the 3' untranslated region of mRNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. 2009 Jun 8.
155. Lionakis, MS, Lahdenranta, J, Sun, J, Liu, W, Lewis, RE, Albert, ND, Pasqualini, R, Arap, W and Kontoyiannis, DP. Development of a ligand-directed approach to study the pathogenesis of invasive aspergillosis. *Infect. Immun*. 2005 73:7747–1158.
156. Loose DS, Stover EP, Restrepo A, Stevens DA, Feldman D. Estradiol binds to a receptor-like cytosol protein and initiates a biological response in *Paracoccidioides brasiliensis*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1983;80:7659–7663
157. Lopes, JD. & Alves, MJM. Production of monoclonal antibodies by somatic cells hybridizations, In: C. M. Morel ed. *Genes and parasites. A laboratory manual*. Rio de Janeiro, 1983. 386-398.
158. Lorenz RT, Parks LW. Cloning, Sequencing, and Disruption of the Gene Encoding Sterol C-14 Reductase in *Saccharomyces cerevisiae*. *DNA Cell Biol*. 1992;11:685–692.
159. Luo Z, van Vuuren HJ. Stress-induced production, processing and stability of a seripauperin protein, Pau5p, in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res*. 2008 May;8(3):374-85.
160. Macoris, SA, Sugizaki, MF, Peraçoli, MT, Bosco, SM., Hebelers-Barbosa, F, Simões, LB, Theodoro, RC, Trinca, LA, and Bagagli, E. Virulence attenuation and phenotypic variation of *Paracoccidioides brasiliensis* isolates obtained from armadillos and patients. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2006 101:331-334.
161. Mamoni RL, Blotta MH. Flow-cytometric analysis of cytokine production in human paracoccidioidomycosis. *Cytokine*. 2006 Aug;35(3-4):207-16.
162. Mamoni RL, Blotta MH. Kinetics of cytokines and chemokines gene expression distinguishes *Paracoccidioides brasiliensis* infection from disease. *Cytokine*. 2005 Oct 7;32(1):20-9.
163. Manfredi, M, Merigo, E, Salati, A, Conti, S, Savi, A, Polonelli, L, Bonanini, M and Vescovi, P. *In vitro* candidacidal activity of a synthetic killer decapeptide (KP) against *Candida albicans* cells adhered to resin acrylic discs. *J Oral Pathol Med*. 2007 36:468-71.
164. Marcireau C, Guyonnet D, Karst F. Construction and Growth Properties of a Yeast Strain Defective in Sterol 14-Reductase. *Curr. Genet*. 1992 22:267–272.
165. Marques da Silva SH, Colombo AL, Blotta MH, Lopes JD, Queiroz-Telles F, Pires de Camargo Z. Detection of circulating gp43 antigen in serum, cerebrospinal fluid, and bronchoalveolar lavage fluid of patients with paracoccidioidomycosis. *J Clin Microbiol*. 2003 Aug;41(8):3675-80.
166. Marques ER, Ferreira MES, Drummond RD, Felix JM, Menossi M, Savoldi M, Travassos LR, Puccia R, Batista WL, Carvalho KC, Goldman MHS, Goldman GH. Identification of genes preferentially expressed in the pathogenic yeast phase of *Paracoccidioides brasiliensis*, using suppression subtraction hybridization and differential macroarray analysis. *Mol Gen Genome* 2004 271:667–77.
167. Martchenko M, Alarco AM, Harcus D, Whiteway M. Superoxide dismutases in *Candida albicans*: transcriptional regulation and functional characterization of the hyphal-induced SOD5 gene. *Mol Biol Cell*. 2004 Feb;15(2):456-67. Epub 2003 Nov 14.
168. Matsuo, AL, Tersariol, II, Kobata, SI, Travassos, LR, Carmona, AK and Puccia, R. Modulation of the exocellular serine-thiol proteinase activity of *Paracoccidioides brasiliensis* by neutral polysaccharides. *Microbes Infect*. 2006; 8:84-91.
169. Matute DR, McEwen JG, Puccia R, Montes BA, San-Blas G, Bagagli E, Rauscher JT, Restrepo A, Morais F, Niño-Vega G, Taylor JW. Cryptic speciation and recombination in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* as revealed by gene genealogies. *Mol Biol Evol*. 2006 Jan;23(1):65-73
170. Matute, DR, Quesada-Ocampo, LM, Rauscher, JT and McEwen, JG. Evidence for Positive Selection in Putative Virulence Factors within the *Paracoccidioides brasiliensis* Species Complex. *PLoS Negl Trop Dis*. 2008; 2:e296.

171. Mazumder B, Sampath P, Seshadri V, Maitra RK, DiCorleto PE, Fox PL. Regulated release of L13a from the 60S ribosomal subunit as a mechanism of transcript-specific translational control. *Cell*. 2003 Oct 17;115(2):187-98.
172. McCabe PM, Van Alfen NK. Secretion of cryparin, a fungal hydrophobin. *Appl Environ Microbiol*. 1999 Dec;65(12):5431-5.
173. McClelland, EE, Perrine, WT, Potts, WK, and Casadevall, A. Relationship of virulence factor expression to evolved virulence in mouse-passaged *Cryptococcus neoformans* lines. 2005 *Infect Immun*. 73:7047-50.
174. McEwen JG, Bedoya V, Patino MM, Salazar ME, Restrepo A. Experimental murine paracoccidioidomycosis induced by the inhalation of conidia. *J Med Vet Mycol*. 1987 Jun;25(3):165-75.
175. McEwen JG, Ortiz BL, Garcia AM, Florez AM, Botero S, Restrepo A. Molecular cloning, nucleotide sequencing, and characterization of a 27-kDa antigenic protein from *Paracoccidioides brasiliensis*. *Fungal Genet Biol*. 1996 Jun;20(2):125-31
176. Medoff G, Painter A, Kobayashi GS. Mycelial- to yeast-phase transitions of the dimorphic fungi *Blastomyces dermatitidis* and *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Bacteriol*. 1987 Sep;169(9):4055-60.
177. Mendes-Giannini MJ, Andreotti PF, Vincenzi LR, da Silva JL, Lenzi HL, Benard G, Zancopé-Oliveira R, de Matos Guedes HL, Soares CP. Binding of extracellular matrix proteins to *Paracoccidioides brasiliensis*. *Microbes Infect*. 2006 May;8(6):1550-9
178. Mendes-Giannini MJ, Bueno JP, Shikanai-Yasuda MA, Ferreira AW, Masuda A. Detection of the 43,000-molecular-weight glycoprotein in sera of patients with paracoccidioidomycosis. *J Clin Microbiol*. 1989 Dec;27(12):2842-5.
179. Mendes-Giannini MJ, Hanna SA, da Silva JL, Andreotti PF, Vincenzi LR, Benard G, Lenzi HL, Soares CP. Invasion of epithelial mammalian cells by *Paracoccidioides brasiliensis* leads to cytoskeletal rearrangement and apoptosis of the host cell. *Microbes Infect*. 2004 Aug;6(10):882-91.
180. Mintz PJ, Kim J, Do KA, Wang X, Zinner RG, Cristofanilli M, Arap MA, Hong WK, Troncoso P, Logothetis CJ, Pasqualini R, Arap W. (2002) Fingerprinting the circulating repertoire of antibodies from cancer patients. *Nat Biotechnol* 21:57-63.
181. Mohsen AW, Navarette B, Vockley J. Identification of *Caenorhabditis elegans* isovaleryl-CoA dehydrogenase and structural comparison with other acyl-CoA dehydrogenases. *Mol Genet Metab*. 2001 Jun;73(2):126-37
182. Molinari-Madlum EE, Felipe MS, Soares CM. Virulence of *Paracoccidioides brasiliensis* isolates can be correlated to groups defined by random amplified polymorphic DNA analysis. *Med Mycol*. 1999 Aug;37(4):269-76.
183. Monteiro JP, Clemons KV, Mirels LF, Coller JA, Wu TD, Shankar J, Lopes CR, Stevens DA. Genomic DNA microarray comparison of gene expression patterns in *Paracoccidioides brasiliensis* mycelia and yeasts in vitro. *Microbiology*. 2009 Apr 30.
184. Montenegro, MR and Franco, M. 1994. Pathology. 131-150. In M. Franco, C. S. Lacaz, A. Restrepo, and G. del Negro (ed.), *Paracoccidioidomycosis*. CRC Press, Boca Raton, FL.
185. Montoya AE, Alvarez AL, Moreno MN, Restrepo A, McEwen JG. Electrophoretic karyotype of environmental isolates of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Med Mycol*. 1999 Jun;37(3):219-22.
186. Montoya AE, Moreno MN, Restrepo A, McEwen JG. Electrophoretic karyotype of clinical isolates of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Fungal Genet Biol*. 1997 Apr;21(2):223-7.
187. Morais FV, Barros TF, Fukada MK, Cisalpino PS, Puccia R. Polymorphism in the gene coding for the immunodominant antigen gp43 from the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Clin Microbiol*. 2000 Nov;38(11):3960-6.
188. Moreira SF, Bailao AM, Barbosa MS, Jesuino RS, Felipe MS, Pereira M, de Almeida Soares CM. Monofunctional catalase P of *Paracoccidioides brasiliensis*: identification, characterization, molecular cloning and expression analysis. *Yeast*. 2004 Jan 30;21(2):173-82.

- 189.** Mota NG, Rezkallah-Iwasso MT, Peraçoli MT, Audi RC, Mendes RP, Marcondes J, Marques SA, Dillon NL, Franco MF. Correlation between cell-mediated immunity and clinical forms of paracoccidioidomycosis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1985;79(6):765-72.
- 190.** Mühlenhoff U, Gerl MJ, Flauger B, Pirner HM, Balser S, Richhardt N, Lill R, Stolz J. The ISC proteins Isa1 and Isa2 are required for the function but not for the de novo synthesis of the Fe/S clusters of biotin synthase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell.* 2007 Mar;6(3):495-504.
- 191.** Mullen, LM, Nair, SP, Ward, JM, Rycroft, AN and Henderson, B. Phage display in the study of infectious diseases. *Trends Microbiol.* 2006 14:141–147.
- 192.** Muller OJ, Kaul F, Weitzman MD, Pasqualini R, Arap W, Kleinschmidt JA, Trepel M. (2003) Random peptide libraries displayed on adeno-associated virus to select for targeted gene therapy vectors. *Nat Biotechnol* 21:1040-6.
- 193.** Musatti CC, Rezkallah MT, Mendes E, Mendes NF. In vivo and in vitro evaluation of cell-mediated immunity in patients with paracoccidioidomycosis. *Cell Immunol.* 1976 Jun 15;24(2):365-78
- 194.** Namiki F, Matsunaga M, Okuda M, Inoue I, Nishi K, Fujita Y, Tsuge T. Mutation of an arginine biosynthesis gene causes reduced pathogenicity in *Fusarium oxysporum f. sp. melonis*. *Mol Plant Microbe Interact.* 2001
- 195.** Netto CF, Vegas VS, Sciannaméa IM, Guarnieri DB. The polysaccharidic antigen from *Paracoccidioides brasiliensis*. Study of the time of cultivation necessary for the preparation of the antigen. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 1969 May-Jun;11(3):177-81.
- 196.** Newport G, Kuo A, Flattery A, Gill C, Blake JJ, Kurtz MB, Abruzzo GK, Agabian N. Inactivation of Kex2p diminishes the virulence of *Candida albicans*. *J Biol Chem.* 2003;278:1713–1720.
- 197.** Nicola AM, Andrade RV, Dantas AS, Andrade PA, Arraes FB, Fernandes L, Silva-Pereira I, Felipe MS. The stress responsive and morphologically regulated hsp90 gene from *Paracoccidioides brasiliensis* is essential to cell viability. *BMC Microbiol.* 2008 Sep 22;8:158
- 198.** Nombela C, Gil C, Chaffin WL. Non-conventional protein secretion in yeast. *Trends Microbiol.* 2006 Jan;14(1):15-21.
- 199.** Nunes LR, Costa de Oliveira R, Leite DB, da Silva VS, dos Reis Marques E, da Silva Ferreira ME, Ribeiro DC, de Souza Bernardes LA, Goldman MH, Puccia R, Travassos LR, Batista WL, Nóbrega MP, Nobrega FG, Yang DY, de Bragança Pereira CA, Goldman GH. Transcriptome analysis of *Paracoccidioides brasiliensis* cells undergoing mycelium-to-yeast transition. *Eukaryot Cell.* 2005 Dec;4(12):2115-28.
- 200.** Oliveira SJ, Mamoni RL, Musatti CC, Papaiordanou PM, Blotta MH. Cytokines and lymphocyte proliferation in juvenile and adult forms of paracoccidioidomycosis: comparison with infected and non-infected controls. *Microbes Infect.* 2002 Feb;4(2):139-44.
- 201.** Olszewska A, Król K, Weglenski P, Dzikowska A. Arginine catabolism in *Aspergillus nidulans* is regulated by the rrmA gene coding for the RNA-binding protein. *Fungal Genet Biol.* 2007 Dec;44(12):1285-97.
- 202.** Ono MA, Bracarense AP, Morais HS, Trapp SM, Belitardo DR, Camargo ZP. Canine paracoccidioidomycosis: a seroepidemiologic study. *Med Mycol.* 2001 Jun;39(3):277-82.
- 203.** Ortiz, BL, Garcia, AM, Restrepo, A and McEwen JG. Immunological characterization of a recombinant 27-kilodalton antigenic protein from *Paracoccidioides brasiliensis*. *Clin Diagn Lab Immunol.* 1996; 3: 239–241.
- 204.** Paranjape V, Roy BG, Datta A. Involvement of calcium, calmodulin and protein phosphorylation in morphogenesis of *Candida albicans*. *J Gen Microbiol.* 1990 Nov;136(11):2149-54.
- 205.** Parente JA, Borges CL, Bailão AM, Felipe MS, Pereira M, de Almeida Soares CM. Comparison of transcription of multiple genes during mycelia transition to yeast cells of *Paracoccidioides brasiliensis* reveals insights to fungal differentiation and pathogenesis. *Mycopathologia.* 2008;165(4-5):259-73.

- 206.** Parker R, Song H. The enzymes and control of eukaryotic mRNA turnover. *Nat Struct Mol Biol.* 2004 Feb;11(2):121-7.
- 207.** Pasqualini, R, Koivunen, E, Kain, R, Lahdenranta, J, Sakamoto, M, Stryhn, A, Ashmun, RA, Shapiro, LH, Arap, W and Ruoslahti, E. Aminopeptidase N is a receptor for tumor-homing peptides and a target for inhibiting angiogenesis. *Cancer Res.* 2000; 60:722–727.
- 208.** Pereira LA, Pereira M, Felipe MS, Zancope-Oliveira RM, Soares CM. Proteomic identification, nucleotide sequence, heterologous expression and immunological reactivity of the triosephosphate isomerase of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Microbes Infect.* 2004 Aug;6(10):892-900.
- 209.** Phang JM, Pandhare J, Liu Y. The metabolism of proline as microenvironmental stress substrate. *J Nutr.* 2008 Oct;138(10):2008S-2015S.
- 210.** Pignède G, Wang H, Fudalej F, Gaillardin C, Seman M, Nicaud JM. Characterization of an extracellular lipase encoded by LIP2 in *Yarrowia lipolytica*. *J Bacteriol.* 2000 May;182(10):2802-10.
- 211.** Popi AF, Lopes JD, Mariano M. GP43 from *Paracoccidioides brasiliensis* inhibits macrophage functions. An evasion mechanism of the fungus. *Cell Immunol.* 2002 Jul-Aug;218(1-2):87-94.
- 212.** Puccia R, McEwen JG, Cisalpino PS. Diversity in *Paracoccidioides brasiliensis*. The *PbGP43* gene as a genetic marker. *Mycopathologia.* 2008 Apr-May;165(4-5):275-87. Review.
- 213.** Puccia R, Schenkman S, Gorin PA, Travassos LR. Exocellular components of *Paracoccidioides brasiliensis*: identification of a specific antigen. *Infect Immun.* 1986 Jul;53(1):199-206.
- 214.** Puccia R, Travassos LR. 43-kilodalton glycoprotein from *Paracoccidioides brasiliensis*: immunochemical reactions with sera from patients with paracoccidioidomycosis, histoplasmosis, or Jorge Lobo's disease. *J Clin Microbiol.* 1991a Aug;29(8):1610-5.
- 215.** Puccia R, Travassos LR. The 43-kDa glycoprotein from the human pathogen *Paracoccidioides brasiliensis* and its deglycosylated form: excretion and susceptibility to proteolysis. *Arch Biochem Biophys.* 1991b Sep;289(2):298-302.
- 216.** Rappleye, C.A., and Goldman, W.E. 2006. Defining virulence genes in the dimorphic fungi. *Annu Rev Microbiol.* 60:281-303.
- 217.** Restrepo A, Baumgardner DJ, Bagagli E, Cooper CR Jr, McGinnis MR, Lázera MS, Barbosa FH, Bosco SM, Camargo ZP, Coelho KI, Fortes ST, Franco M, Montenegro MR, Sano A, Wanke B. Clues to the presence of pathogenic fungi in certain environments. *Med Mycol.* 2000;38 Suppl 1:67-77.
- 218.** Restrepo A, Benard G, de Castro CC, Agudelo CA, Tobón AM. Pulmonary paracoccidioidomycosis. *Semin Respir Crit Care Med.* 2008 Apr;29(2):182-97.
- 219.** Restrepo A, Jiménez BE. Growth of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast phase in a chemically defined culture medium. *J Clin Microbiol.* 1980 Aug;12(2):279-81.
- 220.** Restrepo A, McEwen JG, Castañeda E. The habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*: how far from solving the riddle? *Med Mycol.* 2001 Jun;39(3):233-41.
- 221.** Restrepo A. Ecology of *P. brasiliensis*. In: Franco M, Da Silva-Lacaz C, Restrepo-M. A, Del Negro G, editors. *Paracoccidioidomycosis*. Boca Raton, Fla: CRC Press; 1994. pp. 121–128.
- 222.** Restrepo A. La prueba de inmunodifusion en el diagnosticode la paracoccidioidomycose. *Sabouraudia.* 1966 4:223.
- 223.** Ricci G, Mota FT, Wakamatsu A, Serafim RC, Borra RC, Franco M. Canine paracoccidioidomycosis. *Med Mycol.* 2004 Aug;42(4):379-83.
- 224.** Richard M, Quijano RR, Bezzate S, Bordon-Pallier F, Gaillardin C. Tagging morphogenetic genes by insertional mutagenesis in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *J Bacteriol.* 2001 May;183(10):3098-107.
- 225.** Richini-Pereira VB, Bosco Sde M, Griese J, Theodoro RC, Macoris SA, da Silva RJ, Barrozo L, Tavares PM, Zancopé-Oliveira RM, Bagagli E. Molecular detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in road-killed wild animals. *Med Mycol.* 2008 Feb;46(1):35-40

- 226.** Riggle PJ, Kumamoto CA. Transcriptional regulation of MDR1, encoding a drug efflux determinant, in fluconazole-resistant *Candida albicans* strains through an Mcm1p binding site. *Eukaryot Cell*. 2006 Dec;5(12):1957-68
- 227.** Rooney PJ, Klein BS. Linking fungal morphogenesis with virulence. *Cell Microbiol*. 2002 Mar;4(3):127-37. Review.
- 228.** Salazar ME, Restrepo A, Stevens DA. Inhibition by estrogens of conidium-to-yeast conversion in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Infect Immun*. 1988 Mar;56(3):711-3.
- 229.** San-Blas G, Niño-Vega G, Barreto L, Hebler-Barbosa F, Bagagli E, Olivero de Briceño R, Mendes RP. Primers for clinical detection of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Clin Microbiol*. 2005 Aug;43(8):4255-7.
- 230.** San-Blas G, Niño-Vega G. *Paracoccidioides brasiliensis*: chemical and molecular tools for research on cell walls, antifungals, diagnosis, taxonomy. *Mycopathologia*. 2008; 165(4-5):183-95.
- 231.** San-Blas G. The cell wall of fungal human pathogens: its possible role in host-parasite relationships. *Mycopathologia*. 1982 Sep 17;79(3):159-84.
- 232.** San-Blas, G & Niño-Vega, G. (2001). *Paracoccidioides brasiliensis*: virulence and host response. In: R.L. Cihlar and R.A. Calderone (eds.), *Fungal pathogenesis: principles and clinical applications*, Marcel Dekke. Inc. New York.
- 233.** San-Blas, G, Niño-Vega, G and Iturriaga, T. *Paracoccidioides brasiliensis* and paracoccidioidomycosis: molecular approaches to morphogenesis, diagnosis, epidemiology, taxonomy and genetics. *Med Mycol*. 2002; 40:225-42.
- 234.** Sandhu GS, Aleff RA, Kline BC, da Silva Lacaz C. Molecular detection and identification of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Clin Microbiol*. 1997 Jul;35(7):1894-6.
- 235.** Sano A, Miyaji M, Nishimura K, de Franco MF. Studies on the relationship between the pathogenicity of *Paracoccidioides brasiliensis* in mice and its growth rate under different oxygen atmospheres. *Mycopathologia*. 1991 May;114(2):93-101
- 236.** Sano A, Nishimura K, Horie Y, Franco M, Mendes RP, Coelho KI, Scapolio SH, Fukushima K, de Camargo ZP, Miyaji M, Montenegro MR. Antigenic similarities to *Paracoccidioides brasiliensis* in thermo-dependent dimorphic fungi isolated from soil in Botucatu, SP, Brazil. *Mycopathologia*. 1997;138(1):37-41.
- 237.** Sano A, Tanaka R, Nishimura K. Characteristics of 17 *Paracoccidioides brasiliensis* isolates. *Mycoscience* 1997;38:117-22.
- 238.** Sano, A, Defaveri, J, Tanaka, R, Yokoyama, K, Kurita, N, Franco, M, Coelho, KI, Bagagli, E, Montenegro, MR, Miyaji, M and Nishimura, K.. Pathogenicities and GP43kDa gene of three *Paracoccidioides brasiliensis* isolates originated from a nine-banded armadillo (*Dasypus novemcinctus*). *Mycopathologia*. 1998; 144:61-5.
- 239.** Schmalzer-Ripcke J, Sugareva V, Gebhardt P, Winkler R, Kniemeyer O, Heinekamp T, Brakhage AA. Production of pyomelanin, a second type of melanin, via the tyrosine degradation pathway in *Aspergillus fumigatus*. *Appl Environ Microbiol*. 2009 Jan;75(2):493-503.
- Shah ABM, Eckstein J, Barbuch R, Bard M. Synthetically lethal interactions involving loss of the yeast ERG24: the sterol C-14 reductase gene. *Lipids*. 2007 Feb;42(1):69-76. Epub 2006 Dec 19.
- 240.** Scott, JK and Smith, GP. Searching for peptide ligands with an epitope library. *Science*. 1990; 249(4967):386-90.
- 241.** Sergeeva, A, Kolonin, MG, Molldrem, JJ, Pasqualini, R and Arap, W. Display technologies: application for the discovery of drug and gene delivery agents. *Adv Drug Deliv Rev*. 2006; 58:1622-54.
- 242.** Shahi P, Gulshan K, Moyer-Rowley WS. Negative transcriptional regulation of multidrug resistance gene expression by an Hsp70 protein. *J Biol Chem*. 2007 Sep 14;282(37):26822-3
- 243.** Shikanai-Yasuda, MA; Telles Filho, FQ; Mendes, RP; Colombo, AL; Moretti, ML. Consenso em paracoccidioidomicose *Rev. Soc. Bras. Med. Trop*; 2006. 39(3):297-310.

244. Silva-Vergara ML, Martinez R, Chadu A, Madeira M, Freitas-Silva G, Leite Maffei CM. Isolation of a *Paracoccidioides brasiliensis* strain from the soil of a coffee plantation in Ibia, State of Minas Gerais, Brazil. *Med Mycol.* 1998 Feb;36(1):37-42.
245. Silveira LH, Domingos IH, Kouchi K, Itano EN, Silva EA, Landgraf VO, Werneck SM, Camargo ZP, Ono MA. Serological detection of antibodies against *Paracoccidioides brasiliensis* in dogs with leishmaniasis. *Mycopathologia.* 2006 Nov;162(5):325-9.
246. Simão RCG & Gomes SL. Structure, expression, and functional analysis of the gene coding for calmodulin in the chytridiomycete *Blastocladiella emersonii*. *J. Bacteriol.* 183 (2001), pp. 2280–2288.
247. Singer-Vermes LM, Burger E, Franco MF, Di-Bacchi MM, Mendes-Giannini MJ, Calich VL. Evaluation of the pathogenicity and immunogenicity of seven *Paracoccidioides brasiliensis* isolates in susceptible inbred mice. *J Med Vet Mycol.* 1989;27(2):71-82.
248. Singer-Vermes, LM, Ciavaglia, MC, Kashino, SS, Burger, E and Calich, VL. The source of the growth-promoting factor(s) affects the plating efficiency of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Med Vet Mycol.* 1992; 30:261-4.
249. Skogerson L, Wakatama E. A ribosome-dependent GTPase from yeast distinct from elongation factor 2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1976 Jan;73(1):73-6
250. Smith GP & Scott JK. Libraries of peptides and proteins displayed on filamentous phage. *Methods Enzymol.* 1993;217:228-57.
251. Staquicini, FI, Tandle, A, Libutti, SK, Sun, J, Zigler, M, Bar-Eli, M, Aliperti, F, Pérez, EC, Gershenwald, JE, Mariano, M, Pasqualini, R, Arap, W and Lopes, JD. A subset of host B lymphocytes controls melanoma metastasis through a melanoma cell adhesion molecule/MUC18-dependent interaction: evidence from mice and humans. *Cancer Res.* 2008; 68:8419-28.
252. Svidzinski TI, Miranda Neto MH, Santana RG, Fischman O, Colombo AL. *Paracoccidioides brasiliensis* isolates obtained from patients with acute and chronic disease exhibit morphological differences after animal passage. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 1999 Sep-Oct;41(5):279-83.
253. Swoboda RK, Bertram G, Colthurst DR, Tuite MF, Gow NA, Gooday GW, Brown AJ. Regulation of the gene encoding translation elongation factor 3 during growth and morphogenesis in *Candida albicans*. *Microbiology.* 1994 Oct;140 ( Pt 10):2611-6
254. Takayama A, Itano EN, Sano A, Ono MA, Kamei K. An atypical *Paracoccidioides brasiliensis* clinical isolate based on multiple gene analysis. *Med Mycol.* 2009 Feb 19:1-9.
255. Tavares AH, Silva SS, Dantas A, Campos EG, Andrade RV, Maranhão AQ, Brígido MM, Passos-Silva DG, Fachin AL, Teixeira SM, Passos GA, Soares CM, Bocca AL, Carvalho MJ, Silva-Pereira I, Felipe MS. Early transcriptional response of *Paracoccidioides brasiliensis* upon internalization by murine macrophages. *Microbes Infect.* 2007 Apr;9(5):583-90.
256. Teixeira MM, Theodoro RC, de Carvalho MJ, Fernandes L, Paes HC, Hahn RC, Mendoza L, Bagagli E, San-Blas G, Felipe MS. Phylogenetic analysis reveals a high level of speciation in the *Paracoccidioides* genus. *Mol Phylogenet Evol.* 2009 Aug;52(2):273-83.
257. Terçarioli GR, Bagagli E, Reis GM, Theodoro RC, Bosco Sde M, Macoris SA, Richini-Pereira VB. Ecological study of *Paracoccidioides brasiliensis* in soil: growth ability, conidia production and molecular detection. *BMC Microbiol.* 2007 Oct 22;7:92.
258. Theodoro RC, Candeias JM, Araújo JP Jr, Bosco Sde M, Macoris SA, Padula LO, Franco M, Bagagli E. Molecular detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in soil. *Med Mycol.* 2005 Dec;43(8):725-9.
259. Theodoro RC, de Moraes Gimenes Bosco S, Araújo JP Jr, Candeias JM, da Graça Macoris SA, Trinca LA, Bagagli E. Dimorphism, thermal tolerance, virulence and heat shock protein 70 transcription in different isolates of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Mycopathologia.* 2008 Jun;165(6):355-65
260. Torres FA, Vilaça R, Pepe De Moraes LM, Reis VC, Felipe MS. Expression of a kexin-like gene from the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* in *Saccharomyces cerevisiae*. *Med Mycol.* 2008 Jun;46(4):385-8.



- 261.** Travassos, LR, Silva, LS, Rodrigues, EG, Conti, S, Salati, A, Magliani, W and Polonelli, L. Therapeutic activity of a killer peptide against experimental paracoccidioidomycosis. *J Antimicrob Chemother.* 2004; 54:956-8.
- 262.** Trepel, M., Grifman, M., Weitzman, M. D., and Pasqualini, R. (2000) Molecular adaptors for vascular-targeted adenoviral gene delivery. *Hum. Gene Ther.* 11: 1971-1981.
- 263.** Tyagi S, Bratu DP, Kramer FR. Multicolor molecular beacons for allele discrimination. *Nat Biotechnol.* 1998 Jan;16(1):49-53.
- 264.** Uffenbeck SR, Krebs JE. The role of chromatin structure in regulating stress-induced transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Cell Biol.* 2006 Aug;84(4):477-89. Review.
- 265.** Urban C, Xiong X, Sohn K, Schröppel K, Brunner H, Rupp S. The moonlighting protein Tsa1p is implicated in oxidative stress response and in cell wall biogenesis in *Candida albicans*. *Mol Microbiol.* 2005 Sep;57(5):1318-41.
- 266.** Uritani M, Miyazaki M. Role of yeast peptide elongation factor 3 (EF-3) at the AA-tRNA binding step. *J Biochem.* 1988 Jul;104(1):118-26.
- 267.** van Burik JA, Magee PT. Aspects of fungal pathogenesis in humans. *Annu Rev Microbiol.* 2001;55:743-72
- 268.** Vicentini, AP, Gesztesi, JL, Franco, MF, de Souza, W, de Moraes, JZ, Travassos, LR and Lopes, JD. Binding of *Paracoccidioides brasiliensis* to laminin through surface glycoprotein gp43 leads to enhancement of fungal pathogenesis. *Infect Immun.* 1994; 62:1465-9.
- 269.** Vigna AF, Almeida SR, Xander P, Freymuller E, Mariano M, Lopes JD. Granuloma formation in vitro requires B-1 cells and is modulated by *Paracoccidioides brasiliensis* gp43 antigen. *Microbes Infect.* 2006 Mar;8(3):589-97.
- 270.** Wagemaker MJ, Eastwood DC, van der Drift C, Jetten MS, Burton K, Van Griensven LJ, Op den Camp HJ. Argininosuccinate synthetase and argininosuccinate lyase: two ornithine cycle enzymes from *Agaricus bisporus*. *Mycol Res.* 2007 Apr;111(Pt 4):493-50
- 271.** Wang Y, Li W, Siddiqi Y, Kinghorn JR, Unkles SE, Glass AD. Evidence for post-translational regulation of NrtA, the *Aspergillus nidulans* high-affinity nitrate transporter. *New Phytol.* 2007;175(4):699-706.
- 272.** Wanke B & Londero AT. Epidemiology and paracoccidioidomycosis infection. *In:* Franco M, Da Silva-Lacaz C, Restrepo-M. A, Del Negro G, editors. *Paracoccidioidomycosis*. Boca Raton, Fla: CRC Press; 1994. pp. 109–120.
- 273.** Wood A, Schneider J, Shilatfard A. Cross-talking histones: implications for the regulation of gene expression and DNA repair. *Biochem Cell Biol.* 2005 Aug;83(4):460-7. Review.
- 274.** Wu, C, Lo, SL, Boulaire, J, Hong, ML, Beh, HM, Leung, DS and Wang, S. A peptide-based carrier for intracellular delivery of proteins into malignant glial cells *in vitro*. *J Control Release.* 2008; 130:140-5.
- 275.** Xander P, Vigna AF, Feitosa Ldos S, Pugliese L, Bailão AM, Soares CM, Mortara RA, Mariano M, Lopes JD. A surface 75-kDa protein with acid phosphatase activity recognized by monoclonal antibodies that inhibit *Paracoccidioides brasiliensis* growth. *Microbes Infect.* 2007 Oct;9(12-13):1484-92
- 276.** Ypma-Wong MF, Fonzi WA, Sypherd PS. Fungus-specific translation elongation factor 3 gene present in *Pneumocystis carinii*. *Infect Immun.* 1992 Oct;60(10):4140-5
- 277.** Zacharias D, Ueda A, Moscardi-Bacchi M, Franco M, San-Blas G. A comparative histopathological, immunological, and biochemical study of experimental intravenous paracoccidioidomycosis induced in mice by three *Paracoccidioides brasiliensis* isolates. *J Med Vet Mycol.* 1986 Dec;24(6):445-54.
- 278.** Zeidler U, Lettner T, Lassnig C, Müller M, Lajko R, Hintner H, Breitenbach M, Bito A. UME6 is a crucial downstream target of other transcriptional regulators of true hyphal development in *Candida albicans*. *FEMS Yeast Res.* 2009 Feb;9(1):126-42



**A SYNTHETIC PEPTIDE DISCRIMINATES AND  
KILLS ONLY VIRULENT *PARACOCCIDIODES BRASILIENSIS* YEASTS**

**Erika Seki Kioshima<sup>1</sup>, Fabiana Aliperti<sup>1</sup>, Juliana Terzi Maricato<sup>1</sup>, Renato Arruda Mortara<sup>1</sup>,  
Eduardo Bagagli<sup>2</sup>, Mario Mariano<sup>1,3</sup> and José Daniel Lopes<sup>1</sup>**

Department of Microbiology, Immunology and Parasitology, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil<sup>1</sup>, Department of Microbiology, Immunology, Institute of Biosciences of Botucatu, State University of São Paulo, Botucatu, SP, Brazil<sup>2</sup>, Institute of Health, Paulista University, São Paulo, Brazil<sup>3</sup>

Address correspondence to: José Daniel Lopes, Rua Botucatu 862, 4º andar. São Paulo, SP 04023-901, Brazil Tel.: +55 11 55764529; fax: +55 11 55723328, E-mail: [jdlopes@unifesp.br](mailto:jdlopes@unifesp.br)

**Paracoccidioidomycosis (PCM) is a human systemic granulomatous disease, prevalent in South America, caused by a thermodimorphic fungus, *Paracoccidioides brasiliensis*. This fungus presents complex antigenic structure and some components have been related with its pathogenicity, of which little is known. Several techniques have unsuccessfully been employed to characterize these elusive structures. Using phage display methodology, three peptide-displaying phages binding preferentially to virulent isolates were selected. By binding assay, p04 phage distinguished predefined degrees of virulence of isolates. By confocal microscopy, 6-FAM labeled synthetic peptide (pep04) bound to the virulent yeasts and did not or did much less to nonvirulent fungi. Labeling was restricted to intracellular milieu and frequently close or overlapping DAPI staining. These results showed that both, phage p04 and pep04, can be considered as biomarkers of virulence in PCM since both bound to virulent *P. brasiliensis*. To evaluate the consequences of interactions between the biomarkers and fungal cells, *in vitro* and *in vivo* experiments were performed. The latter demonstrated that p04 phage was sufficient to prevent the implantation of the fungus in the lungs and its migration to spleen and liver. In addition, this phage reduced colony-forming units in the lungs of mice infected with *P. brasiliensis* as compared to controls. *In vitro* experiments showed that pep04 exhibited fungicidal activity only against virulent *P. brasiliensis*, leaving unaltered the growth of the attenuated isolate. Therefore, these biomarkers may be useful tools for prognosis in PCM and may be possibly used in the routine clinical practice as therapeutic drug adjuvants.**

*Paracoccidioides brasiliensis* is the agent of the systemic granulomatous mycosis Paracoccidioidomycosis (PCM) (1, 2). The disease is restricted to Latin America, where at least one evaluation suggests that ten million people can be infected with this fungus of which up to 2% may develop disease (3, 4). The infection occurs by inhalation of infectious propagules that within pulmonary alveolar epithelium transform into pathogenic yeasts (2, 5). The chronic form of the disease is the more frequent one among adult males and progresses slowly (6). The acute form is fast (weeks or months) and more severe, leading to high mortality levels (2).

The broad spectrum of the disease depends on several factors associated with the host response. However, characteristics of the infecting agent, mainly its virulence, can also influence the outcome of PCM (7,8). The surface glycoprotein gp43 is considered a virulence factor since it binds specifically to laminin and enhances pathogenicity of yeast forms (9). This protein binds to other extracellular matrix (ECM) components such as fibronectin and collagens I and IV. These ECM components act as adhesion molecules (10). Other proteins with functions possibly involved in the pathogenicity of the fungus have been described. Among them, a 70-kDa secreted glycoprotein (11), Paracoccin (12), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (13), extracellular serine-thiol protease (14) and a 75-kDa secreted glycoprotein (15). None of these agents, however, has been proved as a distinguishing virulence characteristic since most, if not all, are present in all isolates.

The number of defined virulence factors for dimorphic fungal pathogens is relatively small (16). Thus, studies identifying and characterizing molecules with this potential will lead to a better understanding of the host-parasite relationship and may guide the production of new therapeutic

agents. One of the techniques used for this purpose is phage display. This simple but powerful technology has allowed identification of disease markers and development of approaches for drug design based on their ligand directed targeting (17).

Herein we report the identification by this technique of at least three different peptide-displaying phages that bound to the surface of the high-virulent but did not or did much less to attenuated isolates of *P. brasiliensis*. One of those phages was able to distinguish, by binding assay, high-virulent from less or nonvirulent isolates, whose predefined degrees of virulence were known. In addition, p04 prevented the implantation of the fungus *in vivo* and its derived synthetic peptide exhibited fungicidal activity *in vitro* against *P. brasiliensis* by inhibiting colony forming units (CFUs).

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

*Animals.* Six-week-old male B10.A mice, from the animal facilities of The Federal University of São Paulo, Brazil, were used throughout this study. Mice were bred under specific pathogen-free conditions in closed environment cages. Animals handling and housing were performed according to NIH guide for care and use of laboratory animals.

*Fungi and growth conditions.* Two *P. brasiliensis* isolates (T4B17 and T10B1) were originally obtained from armadillos living in an endemic area for PCM (Botucatu, SP), as described previously (18). Mg16 was recently isolated from a patient in the Laboratory of Medical Mycology, State University of Maringá, and Pb339 was obtained from the fungal culture collection of the Department of Microbiology, University of São Paulo, Brazil. Pb18, virulent and attenuated for susceptible B10.A mice, were also used in this study. To ensure the maintenance of Pb18 virulence, this isolate was used after serial animal passages (19). The attenuated Pb18 isolate had been maintained on culture *in vitro* for 5 to 6 years. All isolates were weekly sub-cultivated in semisolid Fava-Netto's culture medium (20) at 35°C and used on the 5th day of culture.

*Pathogenicity and virulence of P. brasiliensis isolates in mice.* Groups of 6 male mice from the B10.A strain, susceptible to *P. brasiliensis* infection, were used for evaluation of mortality, number of CFUs and histology. CFUs were

counted as previously described (22). Mice were 6-8 weeks of age at the time of infection and all procedures were conducted in conformity to national and international policies. After anesthesia, mice were subjected to intra-tracheal (i.t.) *P. brasiliensis* infection, as described (21). Mortality of the animals was recorded for 250 days after i.t. infection. In assays for organ CFUs, the number of viable microorganisms in the lungs, liver and spleen from experimental and control mice was determined by counting the number of colonies. Animals from each group were sacrificed at adequate intervals after infection and the amounts of viable organisms in the examined organs were counted as previously described (22). Briefly, aliquots of the cellular suspensions and their serial dilutions from each organ were plated on brain heart infusion (BHI) agar (Difco) supplemented with 4% (v/v) horse serum (Instituto Butantan, São Paulo, Brazil) and 5% Pb339 culture filtrate, the latter as a source of growth-promoting factor. Plates were incubated at 35°C and colonies were daily counted until no increase in number of colonies was observed. The number ( $\log_{10}$ ) of viable *P. brasiliensis* colonies per gram of tissue was expressed as mean  $\pm$  standard error. For histopathological analysis, the lung, spleen and liver from each mouse was removed, fixed in 10% formalin and embedded in paraffin. Five-micrometer sections were stained with hematoxylin-eosin (H&E) and examined microscopically.

*Evaluation of morphometrical features.* Morphometrical features were evaluated according to Svidzinski (23). Yeasts morphology as well as diameter of the mother cells of isolates were microscopically observed. Measurement of yeast cell sizes was carried out with an Olympus CBB microscope coupled with a micrometer disc. The major transverse and longitudinal axes of 100 viable cells of each preparation was measured.

*Biopanning and rapid analysis of selective interactive ligands (BRASIL).* The phage display library was screened for virulent isolate of *P. brasiliensis* (Pb18) binding ligands by the BRASIL method (24). The library used in the present study contained the insert CX7C (C, cysteine; X, any amino acid residue). It was derived from a large-scale preparation of a phage random peptide library and designed to display a constrained cyclic loop within the pIII capsid protein (17). The preparation was optimized to

create the highest possible insert diversity, approximately  $10^8$  to  $10^9$  (25). All phage clones of the library were evaluated *in vitro* to rule out any selective growth advantage (rather than binding capability) that could explain the enrichment observed during the panning rounds. This is a routine control in all experiments with phage display screenings. As such, there is no growth advantage for any of the clones in this library. Yeasts of attenuated *P. brasiliensis* isolate suspended in PBS ( $10^6$ ) were incubated with  $10^9$  transducing units (TU) of the phage library. The yeast-phage coinubation was performed in the presence of phosphate buffered saline (PBS) containing 1% bovine serum albumin (BSA) on ice. After 4h coinubation, the suspension was transferred to the top of a nonmiscible organic lower phase with an intermediate specific density solution and centrifuged (24). The optimal phage separation conditions were obtained with a dibutyl phtalate:cyclohexane (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) in a ratio of 9:1. After centrifugation (12.000 RPM, 15 minutes, 25°C), the upper aqueous phase, containing unbound phage to nonvirulent isolate, was incubated with yeasts of virulent *P. brasiliensis* isolate, as described above. Following centrifugation (12.000 RPM, 15 minutes, 25°C), yeasts of *P. brasiliensis* virulent isolate entered the lower organic phase and deposited at the bottom of the tube, carrying only specifically bound phages. The pellet was then transferred to another clean tube as previously described (24). Phages bound to virulent *P. brasiliensis* isolate yeasts were rescued by infection of log-phase *Escherichia coli* K91kan. Briefly, following co-incubation of *E. coli* K91kan with yeast-bound phages for 30 min, the infected bacteria were initially incubated in Luria-Bertani (LB) liquid medium containing kanamycin for selection of *E. coli* K91kan bacteria and tetracycline (low concentration, 0.2 µg/ml) for the genes responsible for tetracycline resistance in the host bacteria to be induced, since phages carry a tetracycline resistance gene (26). Bacteria were then incubated overnight at 37°C in LB liquid medium containing kanamycin and tetracycline (high concentration; 40µg/ml), for the selection of phage-infected *E. coli* K91kan bacteria. The next day, amplified phages were separated from bacteria by polyethylene glycol NaCl precipitation and used in subsequent selection rounds (titer,  $10^9$  TU) to further enrich for the

phages binding specifically to yeasts of virulent *P. brasiliensis* isolate. After three complete rounds of selection, the DNA corresponding to peptide inserts of randomly picked phage clones were sequenced. Peptide sequences were then analyzed according to enrichment and by Clustal W, Version 2 (EMBL in Heidelberg, Germany [<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>]) sequence alignment. Selected motifs were used to search non redundant protein databanks (National Center for Biotechnology Information [NCBI] BLAST [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>]).

To measure phage binding, the insertless phage (fd-tet) was used as negative control (27). The virulent or attenuated isolates *P. brasiliensis* were co-incubated with selected peptide-displaying or control phages. The binding to *P. brasiliensis* isolates were quantified relative to fd-tet phage. In parallel, the four isolates *P. brasiliensis* (T4B17, T10B1, Pb339, Mg16) also were co-incubated with selected peptide-displaying or control phages and similarly quantified.

*Peptide synthesis and purification for screening.* Peptide synthesis and purification were carried out at the Department of Biophysics, Federal University of São Paulo. The amino acid sequence of pep04 (CGSYGFNAC), pep05 (CGLRLESTC), pep06 (CSLERLGFC), irrelevant peptide (pepIR) (CGSTSAYGC), linear pep04 (AGSYGFNAA) and its specific scrambled peptide (CSFAGYNGC) were used to synthesize the peptides as previously described (14).

*Confocal fluorescence microscopy.* Labeling for fluorescence microscopy was performed as previously described with modifications (28). *P. brasiliensis* yeast cells ( $3 \times 10^6$  all viable) were fixed in cold methanol for 30 min in the dark and incubated with 3% (wt/vol) BSA in PBS (blocking buffer) for 16h at 4°C. Next, they were washed three times with PBS and then incubated in the dark with either 100µg/ml of pep04 or pepIR labeled with 6-Carboxyfluorescein (6-FAM) for 1h at room temperature. Between each step, fungal cells were washed six times with PBS. A drop of 10µl of each suspension was mounted on glass slides with 80% Glycerol and the slides sealed with nail polish. For confocal fluorescence microscopy, samples were prepared as described above but, to better define fungal surface, were also labeled with monoclonal antibody to *P. brasiliensis* gp75 (15) developed

with Alexa-610 goat anti-Mouse IgG (Invitrogen), and 20µm DAPI (4'-6-Diamidino-2-phenylindole di-lactate, Invitrogen); specimens were then imaged on a BioRad 1024UV instrument attached to a Zeiss Axiovert microscope using a 63X 1.4 NA DIC oil immersion lens (29). Z-series were processed with ImageJ and rendered with VolumeJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

**Blocking infection implantation.** Yeast cells ( $10^6$ ) were incubated with 1mg/ml of pep04, pepIR or PBS for 1h. After that, the viability of fungal suspensions, determined by trypan blue exclusion in a Neubauer chamber, was always higher than 90%. Then, this fungal suspension was inoculated i.v. (100µl of PBS) in the lateral tail vein of male B10.A mice (five animals per group). Control mice received only PBS. Animals were sacrificed after 3 or 45 days post-infection, and the number of viable *P. brasiliensis* cells in the lungs, spleen and liver were determined as the number of CFUs recovered in supplemented BHI plates.

**Phage treatment of mice infected with *P. brasiliensis*.** Mice, after anesthesia, were subjected to i.t. *P. brasiliensis* infection as previously described (21). Briefly, animals were infected with *P. brasiliensis* virulent Pb18 isolate yeast cells, contained in 50µl of PBS, by surgical i.t. inoculation that dispenses fungal cells directly into the lungs. After 24h, fd-tet or p04 were inoculated i.v. ( $10^{11}$  TU phage/100µl of PBS) in the lateral tail vein of male BALB/c mice (five animals per group) every day. Treatment was given for 10 days, 7 days after which mice were sacrificed and the number of viable *P. brasiliensis* cells in the lungs was determined as the number of CFUs recovered in supplemented BHI plates.

**Peptides activity on *P. brasiliensis* in vitro.** The *in vitro* antifungal activity of peptides selected by phage display against virulent or attenuated *P. brasiliensis* isolates, as demonstrated by inhibition of CFU after treatment and plating on enriched BHI-agar medium was measured. Briefly, logarithmically growing budding yeast cells (virulent or attenuated isolates) were incubated for 24h in the presence of peptides (1mg/ml) in Fava-Netto's medium. A final volume of 200µL was added to each well of 96-wells plates, at 37°C with shaking, as previously described (30). Readings were performed from day 8 to 20 and results were expressed in CFU. The serial concentrations of pep04 and pepIR

(1000, 500, 250, 125 and 15.6µg/ml) were tested against virulent isolates of *P. brasiliensis*.

**Statistical analysis.** Results were expressed as the mean ± the standard deviations (SD). Data was analyzed by unpaired Student's *t* test with Welch's correction (two-tailed) used for comparison of the two groups when the data met the assumptions of the *t* tests. Analysis of variance (ANOVA) followed by the Tukey-Kramer test were sometimes applied (INSTAT software, GraphPad, San Diego, CA). *P* values under 0.05 indicated statistical significance.

## RESULTS

**Virulence of *P. brasiliensis* isolates.** Pb18 *P. brasiliensis* isolate was repeatedly inoculated into mice to recover its virulence. The attenuated Pb18 isolate used had been maintained in culture *in vitro* for 5 to 6 years. The virulence of *P. brasiliensis* isolates (virulent and attenuated Pb18) were compared by i.t. infection. After 250 days of infection, virulent Pb18 isolate killed all the animals and its attenuated counterpart only 20% of them. In the control group inoculated with PBS, all animals survived (Fig. 1A). Fig. 1B shows the number of viable yeast cells recovered from lungs, spleen and liver of mice after 30, 60 and 90 days of i.t. inoculation. The number of lung CFUs from virulent Pb18 was significantly higher than attenuated Pb18. Dissemination of virulent Pb18 to spleen and liver was always observed, while dissemination of attenuated Pb18 to spleen was observed after 30 and 60 days post-inoculation and in the liver, it could be detected only once, 30 days after infection. Histopathology reflected the CFU data as shown in Figs.1C-1H. Mice infected with attenuated Pb18 showed diffuse inflammatory cells in the lungs (Fig.1C) and no defined granulomas in the liver (data not shown) after 30 days of inoculation. Mice infected with virulent Pb18 showed isolated granulomas after 30 days both, in the lungs (Fig.1D) and in the liver (Fig.1F). After 60 days of infection, large and confluent granulomas involving extensive areas of the lungs were observed (Fig.1E). Both organs contained numerous budding yeast cells with inflammatory cellular infiltration (Figs.1G and 1H).

**Morphological differences among Pb18 isolates.** Differences between isolates were not restricted to the degree of virulence, but also in size, morphology and other characteristics. Fig.

II shows that isolates presented significant differences in the size of yeasts ( $P<0,001$ ). The diameter of virulent isolates, recorded by the analyses of 100 mother cells of each isolate, exhibited a minimum size of  $9,01\mu\text{m}$ , a maximum of  $15,9\mu\text{m}$  with a medium of  $12.3\mu\text{m}$  ( $\text{SD}\pm 2$ ). The same parameters measured in attenuated isolates were minimum of  $4.01\mu\text{m}$ , maximum of  $10.9\mu\text{m}$  with a medium  $7.2\mu\text{m}$  ( $\text{SD}\pm 1.8$ ) ( $P<0,001$ ). These data showed that the attenuated cells presented roughly half the cellular diameter as compared to virulent Pb18 yeasts. The morphological analyses of *P. brasiliensis* in yeast-like forms demonstrated that while the attenuated Pb18 isolate exhibited small and isodiametrical multibudding cells (Fig. 1J), the highly virulent Pb18 isolate, after animal passage, exhibited oval and elongated cells (Fig. 1K).

**Selection of peptide motifs that bind to the surface of virulent *P. brasiliensis* isolates.** To investigate whether proteins or other type of molecules could be differentially expressed on the cell wall surface of the virulent isolate, therefore representing a marker of virulence, phage display technology was used. First, to decrease non-specific binding, the phage library was pre-cleared with yeast cells of attenuated isolate. The isolate was incubated with the phage library and centrifuged through the organic phase. Unbound phage pool remaining in the aqueous phase was transferred to a fresh tube and incubated with yeast cells of the highly virulent isolate. After centrifugation through the organic phase, phages bound to the yeast cells pellet were recovered by bacterial infection and amplified. This procedure was repeated three times to enrich specific phages, as shown in Fig. 2A. Random samplings of second and third round phages were sequenced to identify peptides and approximately two hundred sequences were obtained. The CLUSTALW software was used to align these peptides and to detect possible repeated "hits" of three or more amino acids. Six phages that presented repetitions in second and third rounds were selected, as shown in Table 1. Two phages presented a considerable enrichment, the CGSYGFNAC and CSLERLGFC-displaying phages, denominated p04 and p06 respectively. However, some phages presented two repetitions in the third round and were also selected for binding assays – CYRLTGLWC (p01), CLDSASRGC (p02), CGLRLESTC (p05),

CWLFSVSAC (p03). Selected motifs were used to search non redundant protein databanks (National Center for Biotechnology Information [NCBI]) BLAST, with no conclusive results.

**Validation of phage binding to yeast cells of highly virulent isolate of *P. brasiliensis*.** The degree of phages binding to virulent or attenuated Pb18 isolates compared to control phages was analyzed by the BRASIL method. As expected, binding of the p04, p05 and p06 phages recovered from virulent Pb18 isolate were significantly higher when compared to attenuated Pb18 isolate and control in all experimental conditions tested ( $P<0.05$ ) (Fig. 2B). These three phages with specific binding to virulent isolates were selected for further experiments. Binding of the p04 and p06 phages to yeast cells using different phage in independent experiments ( $10^6$  to  $10^{10}$  TUs) showed that the binding was dose-dependent as compared to control (Figs. 2C and 2D). However, the assay of competitive inhibition using synthetic peptides showed that only pep04 inhibited the binding of the homologous phage. As shown in Fig.2E, increase in concentration of pep04 decreased the titer of phages recovered from virulent isolate, while the rate of inhibition increased gradually. When peptide concentration reached 1mM or above, the inhibition rate became flattened. Pep06 had no effect on the binding of homologous phage (p06), as shown in Fig.2F.

**P04 as possible marker of virulence.** To check whether p04 phage could be the expected virulence marker, binding assays to other four isolates with predefined degrees of virulence were performed. For comparison, isolates T10B1 (highly virulent) and T4B17 (intermediate virulence) were also tested. As shown in Fig. 3, p04 phage showed the greatest binding to yeast cells of isolate T10B1 ( $P<0.01$ ), followed by virulent Pb18 isolate ( $P<0.05$ ), when compared to the attenuated isolate. This phage presented intermediate binding to yeast cells of isolates Pb339 and T4B17. To the isolate Mg16, recently obtained from a human patient, p04 phage presented binding similar to that observed with the attenuated Pb18 isolate.

**Pep04 binding to virulent Pb18 isolate.** The synthetic peptides were labeled with 6-FAM. The yeast cells of virulent or attenuated Pb18 isolates were incubated with pep04 or pep1R, both coupled to 6-FAM. The irrelevant peptide did not label the attenuated Pb18 nor virulent

Pb18 isolates. Most of the attenuated Pb18 cells showed no labeling with the pep04-6FAM (Fig. 1, supplementary data). Conversely, this labeled peptide was internalized by virulent isolate yeast cells (Fig. 4). Sequential optical section imaging indicated that the labeling was within the intracellular milieu and frequently close or overlapping DAPI staining, as shown in Fig. 4.

**Phage p04 prevented the deployment of infection.** It was then assessed whether p04 could prevent the deployment of infection in susceptible mice (B10.A). Two protocols were tested. First, the virulent Pb18 was incubated with phages for one hour and used to infect the animals. These mice were sacrificed 72 hours after infection. As shown Fig. 5A, the number of lung CFUs from virulent Pb18 incubated with p04 was significantly lower than p03, fd-tet or controls. This difference was increased when animals sacrificed 45 days after infection were examined (Fig. 5B). The amount of CFUs recovered from the lung, spleen and liver of animals infected with Pb18 isolate treated with p04 was always lower when compared with those treated with non-inserted phage. These data suggest that the interaction of the fungus with p04 phage inhibits deployment of infection in mice.

**Treatment of mice infected with *P. brasiliensis* with p04 phage.** Since p04 phage prevented the establishment of infection, the next step was to assess whether it could be capable of treating mice already infected with *P. brasiliensis*. Mice treated with p04 phage showed significantly reduced CFU average in the lungs as compared to controls (Fig. 5C).

**The *in vitro* antifungal activity of peptides selected by phage display.** Since the selected phages bound specifically to the virulent isolate, we tested whether synthetic peptides, derived from these phages, presented similar biological activity. Peptides (pep04, pep05, pep06 and pepIR) were added at concentration of 1mg/ml to virulent isolate in Fava-Netto's medium. After 24h of incubation, the entire suspension volumes were plated for CFU determination on enriched BHI-agar medium. Fig. 6A shows that pep04 ( $P<0.01$ ), pep05 ( $P<0.01$ ) and pep06 ( $P<0.05$ ) demonstrated *in vitro* fungicidal activity against *P. brasiliensis* and that these values were statistically significant when compared to pepIR or controls (medium only). Other concentrations of pep04 were tested. Results seemed to be dose dependent since from a concentration of

500 $\mu$ g/ml CFU decreased below 50% (Fig. 6C). The synthetic peptide (pep04) and its vehicle (DMSO) did not show any toxicity to peritoneal macrophages in all concentrations tested by MTT cell viability assays (data not shown).

**The *in vitro* antifungal activity of pep04 is specific for virulent isolate.** To confirm specificity of *in vitro* pep04 antifungal activity, other peptides similar to pep04 were engineered and synthesized. A scrambled peptide, containing the same amino acids as pep04 but a different sequence (scrambled peptide), a linear peptide with same sequence, but with cysteine amino acids substituted by alanine (linear peptide); and other sequences, not correlated with the peptide selected by phage display (irrelevant peptide) were used. As shown in Fig.6D, multi-budding yeast cells of virulent isolate were completely inhibited by pep04. In the same concentration none of the other peptides produced any detectable inhibition. These results suggest a conformational importance to pep04 peptide since the presence of two cysteines, which can oxidize to form a disulfide bond, seem to be necessary to the fungicidal activity. However, when pep04 was incubated with the attenuated isolate, the fungicidal activity was not observed (Fig.6B). The fact that the peptide did not interfere with the rate of proliferation of attenuated isolate suggest that this peptide is nontoxic and does not recognize the attenuated fungus isolate.

## DISCUSSION

Evidence of variability in the degree of virulence of *P. brasiliensis* has been described by various authors (31, 32, 33). Singer-Vermes *et al.* (34) classified six isolates according to their virulence, considering Pb18 and Pb265 as high and as low virulent, respectively. Recently, Carvalho *et al.* (33) demonstrated that two isolates of *P. brasiliensis*, Pb12 and Pb18, after several consecutive passages in animals, shortened the survival time of mice. This phenomenon of attenuation of virulence by consecutive culture *in vitro* and its restoration by animal passage has been reported by others (23, 31, 35, 36). The decreased virulence of *P. brasiliensis* isolate Pb18 detected in our laboratory seems to be dependent on the time of *in vitro* continuous subcultivation. The lost virulence seems to be more evident for dissemination than for the inoculation site. *P. brasiliensis* isolate 18 has first been described as



virulent (31), but after being maintained in culture *in vitro* for 5 to 6 years, it lost its ability to disseminate to spleen and liver when compared to its virulent counterpart. Histopathological analyses following infection with the latter demonstrated confluent granulomas involving extensive areas of the lung and commitment of liver, features not observed when animals were infected with the attenuated isolate.

One approach to experimentally study the alterations on virulence is to serially passage a microbe by a host and then compare the pre and post-passaged lines to identify traits that induce changes in virulence (37). *In vivo*, changes may be selected for longer survival in the host and ability to evade immune defenses; *in vitro*, attenuation of virulence could be associated with physiological and cytoplasmic alterations, since the nuclear genetic materials tend to be more conservative concerning variation (38). Induced loss of virulence involving genetic material has been observed in some phytopathogenic fungi (39). Such morphological, physiological and genetical variation could also be observed in *P. brasiliensis* (8, 23). Morphologic differences were shown in this study, supporting such hypothesis.

However, the basis for virulence in *P. brasiliensis* remains to be defined. Some proteins and genes have been reported as putative virulence factors (33, 40, 41, 42, 43, 44, 45). Other authors suggest that virulence markers may be associated with immunogenic factors present on yeasts (46) which may be correlated with some phenotypic aspects of mycelia colonies (38). However, there is not a well established virulence marker as yet.

Several techniques have been employed in the search for possible markers of cellular components responsible for virulence, including phage display. This technique has been recently used for identifying adhesion molecules expressed by microbial pathogens that mediate infection (47; 48), among other applications. Also, various authors have observed that cell surface-binding peptides selected from display libraries are often similar to domains found in naturally expressed proteins (17). This technology allowed the production of useful tools in identification, validation, and prioritization of ligands to molecular targets expressed on the cell surface, as well as of derived peptides directed to these targets (17).

Furthermore, the isolated peptides can be used to treat different diseases (49, 50, 51,52). Since Pb18 isolates present differences in their degree of virulence, they could differentially express proteins on their cell wall, allowing any possible virulence marker available to be disclosed. In the present study, the main objective was to identify a molecule or its ligand capable of acting as virulence marker and for this purpose a peptide approach for selecting cell surface motifs based on phage display libraries by BRASIL method was employed (24). After three rounds of selection, the motifs were analyzed and phages that seemed to be relevant were subsequently validated. At least one virulence marker was found and validated, the motif CGSYGFNAC (denominated p04 for the phages displaying it, and pep04 for its homologous synthetic peptide). Thus, by binding assays, the p04 phage allowed us to rank different isolates according to their virulence. The T10B1 and virulent Pb18 isolates were classified as high-virulent by binding assay. Previous studies have determined by hamster infections the degrees of virulence of *P. brasiliensis* isolates from armadillos (53). One of these *P. brasiliensis* isolates, T10B1, was considered even more virulent than Pb18. T4B17, also isolated from armadillos, showed intermediate virulence for both, by hamster infection and by binding assay with p04 phage, as did Pb339 isolate. On the other hand, Mg16 and attenuated Pb18 isolates presented low level of virulence. The Mg16, whose virulence degree remains unknown, showed clinically little aggressivity to the patient from whom it was isolated, suggesting low virulence. In addition, 6-FAM labeled pep04, by confocal microscopy, showed that while the virulent Pb18 isolate presented strong labeling, the majority of the attenuated isolate cells showed weak or no labeling at all. Moreover, pep04 displayed a marked association with DAPI labeling, suggesting that it might either bind directly to the fungus DNA or to proteins that could have a regulatory function in the virulence phenotype. These results point that both, phage p04 and pep04 may be considered as biomarkers of virulence in PCM by binding assays, as are used nowadays most monoclonal antibodies for similar purposes.

Since that marker could distinguish virulence degrees by simply binding to molecule or molecules in the cell wall of *P. brasiliensis*, we decided to check whether such interaction could

be important for the development of the mycosis. Unexpectedly, the pep04 displaying phage was sufficient to prevent implantation of *P. brasiliensis* in the lung, blocking the deployment of infection in mice. This fungus so treated did not migrate to other organs, restricting the infection to the lungs with few CFU. In addition, p04 was able to reduce CFUs in the lungs of mice infected with *P. brasiliensis* as compared to controls. These *in vivo* assays demonstrated that this biomarker could play an important role in the pathogenicity of this mycosis, since beyond binding to yeast cells of only virulent *P. brasiliensis* isolates, interaction unveiled biological effects that allow assuming its possible use as therapeutic adjuvant. Fungicidal activity of peptides has been demonstrated against *Cryptococcus neoformans* (54), *Paracoccidioides brasiliensis* (55) and *Candida albicans* (56). *In vitro*, synthetic peptide pep04 presented fungicidal activity

highly specific to virulent isolates. This activity was dose-dependent in one day incubation assay. After three days of pep04 interaction, it was still observed inhibition of growth of *P. brasiliensis* even with non-lethal (250µg/ml) concentrations. Conformational structure seemed important since linear or scrambled peptides were not efficient to kill fungi. These data suggest that the target(s) for the binding peptides should also be conformational. Considering that drugs against *P. brasiliensis* require long-term treatment regimens and may induce renal and liver toxicity, specific peptides administered along with antifungal drugs could enhance and shorten conventional treatment. Although the mechanisms of pathogenicity have not yet been fully established, it is reasonable to assume that the *P. brasiliensis* molecule to which both, phage p04 and pep04 bind plays an important role in the fungus virulence. Their clinical applicability is now under investigation.

## REFERENCES

1. San-Blas G. *J Med Vet Mycol* (1993) **31**(2), 99-113
2. Borges-Walmsley MI, Chen D, Shu X, Walmsley AR. *Trends Microbiol* (2002) **10**(2), 80-7
3. San-Blas G, Niño-Vega G, Iturriaga T. *Med Mycol* (2002) **40**(3), 225-242
4. Coutinho ZF, Silva D, Lazera M, Petri V, Oliveira RM, Sabroza PC, Wanke B. *Cad Saude Publica* (2002) **18**(5), 1441-1454
5. Restrepo A, Benard G, de Castro CC, Agudelo CA, Tobón AM. *Semin Respir Crit Care Med* (2008) **29**(2), 182-197
6. Brummer E, Castaneda E, Restrepo A. *Clin Microbiol Rev* (1993) **6**(2), 89-117
7. Franco M. *J Med Vet Mycol* (1987) **25**(1), 5-18.
8. Franco M, Bagagli E, Cunha M, Chamma LG, Fecchio D. *Mycopathologia* (1996) **135**(1), 13-19
9. Vicentini AP, Gesztesi JL, Franco MF, de Souza W, de Moraes JZ, Travassos LR, Lopes JD. *Infect Immun* (1994) **62**(4), 1465-1469.
10. Mendes-Giannini MJ, Andreotti PF, Vincenzi LR, da Silva JL, Lenzi HL, Benard G, Zancopé-Oliveira R, de Matos Guedes HL, Soares CP. *Microbes Infect* (2006) **8**(6), 1550-9
11. de Mattos Grosso D, de Almeida SR, Mariano M, Lopes JD. *Infect Immun* (2003) **71**(11), 6534-6542
12. Ganiko L, Puccia R, Mariano VS, Sant'Anna OA, Freymüller E, Roque-Barreira MC, Travassos LR. *Microbes Infect* (2007) **9**(6), 695-703
13. Barbosa MS, Bão SN, Andreotti PF, de Faria FP, Felipe MS, dos Santos Feitosa L, Mendes-Giannini MJ, Soares CM. *Infect Immun* (2006) **74**(1), 382-389
14. Matsuo AL, Tersariol II, Kobata SI, Travassos LR, Carmona AK, Puccia R. *Microbes Infect* (2006) **8**(1), 84-91
15. Xander P, Vigna AF, Feitosa Ldos S, Pugliese L, Bailão AM, Soares CM, Mortara RA, Mariano M, Lopes JD. *Microbes Infect* (2007) **9**(12-13), 1484-1492
16. Rappleye CA, Goldman WE. *Annu Rev Microbiol* (2006) **60**, 281-303.
17. Sergeeva A, Kolonin MG, Molldrem JJ, Pasqualini R, Arap W. *Adv Drug Deliv Rev* (2006) **58**(15), 1622-1654

18. Bagagli E, Sano A, Coelho KI, Alquati S, Miyaji M, de Camargo ZP, Gomes GM, Franco M, Montenegro MR. *Am J Trop Med Hyg* (1998) **58**(4), 505-512
19. Kashino SS, Singer-Vermes LM, Calich VL, Burger E. *Mycopathologia* (1990) **111**(3), 173-180
20. Netto CF, Vegas VS, Sciannaméa IM, Guarnieri DB. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* (1969) **11**(3), 177-181
21. Cano LE, Singer-Vermes LM, Costa TA, Mengel JO, Xidieh CF, Arruda C, André DC, Vaz CA, Burger E, Calich VL. *Infect Immun* (2000) **68**(1), 352-359
22. Singer-Vermes LM, Ciavaglia MC, Kashino SS, Burger E, Calich VL. *J Med Vet Mycol* (1992) **30**(3), 261-264
23. Svidzinski TI, Miranda Neto MH, Santana RG, Fischman O, Colombo AL. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* (1999) **41**(5), 279-283
24. Giordano RJ, Cardó-Vila M, Lahdenranta J, Pasqualini R, Arap W. *Nat Med* (2001) **7**(11), 1249-1253
25. Arap W, Kolonin MG, Trepel M, Lahdenranta J, Cardó-Vila M, Giordano RJ, Mintz PJ, Ardelt PU, Yao VJ, Vidal CI, Chen L, Flamm A, Valtanen H, Weavind LM, Hicks ME, Pollock RE, Botz GH, Bucana CD, Koivunen E, Cahill D, Troncoso P, Baggerly KA, Pentz RD, Do KA, Logothetis CJ, Pasqualini R. *Nat Med* (2002) **8**(2), 121-127
26. Smith GP, Scott JK. *Methods Enzymol* (1993) **217**, 228-57
27. Staquicini FI, Tandle A, Libutti SK, Sun J, Zigler M, Bar-Eli M, Aliperti F, Pérez EC, Gershenwald JE, Mariano M, Pasqualini R, Arap W, Lopes JD. *Cancer Res* (2008) **68**(20), 8419-28
28. Batista WL, Matsuo AL, Ganiko L, Barros TF, Veiga TR, Freymüller E, Puccia R. *Eukaryot Cell* (2006) **5**(2), 379-90
29. Barros HC, Verbisck NV, Da Silva S, Araguth MF, Mortara RA. *J Eukaryot Microbiol* (1997) **44**(4), 332-44.
30. Travassos LR, Silva LS, Rodrigues EG, Conti S, Salati A, Magliani W, Polonelli L. *J Antimicrob Chemother* (2004) **54**(5), 956-8
31. Zacharias D, Ueda A, Moscardi-Bacchi M, Franco M, San-Blas G. *J Med Vet Mycol* (1986) **24**(6), 445-54
32. Burger E, Vaz CC, Sano A, Calich VL, Singer-Vermes LM, Xidieh CF, Kashino SS, Nishimura K, Miyaji M. *Am J Trop Med Hyg* (1996) **55**(4), 391-398
33. Carvalho KC, Ganiko L, Batista WL, Morais FV, Marques ER, Goldman GH, Franco MF, Puccia R. *Microbes Infect* (2005) **7**(1), 55-65
34. Singer-Vermes LM, Burger E, Franco MF, Di-Bacchi MM, Mendes-Giannini MJ, Calich VL. *J Med Vet Mycol*. 1989;**27**(2):71-82
35. Castaneda E, Brummer E, Pappagianis D, Stevens DA. *J Med Vet Mycol* (1987) **25**(6), 377-387
36. Brummer E, Restrepo A, Hanson LH, Stevens DA. *Mycopathologia* (1990) **109**(1), 13-17
37. McClelland EE, Perrine WT, Potts WK, Casadevall A. *Infect Immun* (2005) **73**(10), 7047-7050
38. Macoris SA, Sugizaki MF, Peraçoli MT, Bosco SM, Hebelbarbosa F, Simões LB, Theodoro RC, Trinca LA, Bagagli E. *Mem Inst Oswaldo Cruz* (2006) **101**(3), 331-334
39. Choi GH, Nuss DL. *Science* (1992) **257**(5071), 800-803
40. Ortiz BL, Garcia AM, Restrepo A, McEwen JG. *Clin Diagn Lab Immunol* (1996) **3**(2), 239-241
41. Molinari-Madlum EE, Felipe MS, Soares CM. *Med Mycol* (1999) **37**(4), 269-276
42. Sano A, Defaveri J, Tanaka R, Yokoyama K, Kurita N, Franco M, Coelho KI, Bagagli E, Montenegro MR, Miyaji M, Nishimura K. *Mycopathologia* (1999) **144**(2), 61-65
43. Goldman GH, dos Reis Marques E, Duarte Ribeiro DC, de Souza Bernardes LA, Quiapin AC, Vitorelli PM, Savoldi M, Semighini CP, de Oliveira RC, Nunes LR, Travassos LR, Puccia R, Batista WL, Ferreira LE, Moreira JC, Bogossian AP, Tekaiia F, Nobrega MP, Nobrega FG, Goldman MH. *Eukaryot Cell* (2003) **2**(1), 34-48

44. Felipe MS, Andrade RV, Petrofeza SS, Maranhão AQ, Torres FA, Albuquerque P, Arraes FB, Arruda M, Azevedo MO, Baptista AJ, Bataus LA, Borges CL, Campos EG, Cruz MR, Daher BS, Dantas A, Ferreira MA, Ghil GV, Jesuino RS, Kyaw CM, Leitão L, Martins CR, Moraes LM, Neves EO, Nicola AM, Alves ES, Parente JA, Pereira M, Poças-Fonseca MJ, Resende R, Ribeiro BM, Saldanha RR, Santos SC, Silva-Pereira I, Silva MA, Silveira E, Simões IC, Soares RB, Souza DP, De-Souza MT, Andrade EV, Xavier MA, Veiga HP, Venancio EJ, Carvalho MJ, Oliveira AG, Inoue MK, Almeida NF, Walter ME, Soares CM, Brigido MM. *Yeast* (2003) **20**(3), 263-271
45. Matute DR, Quesada-Ocampo LM, Rauscher JT, McEwen JG. *PLoS Negl Trop Dis* (2008) **2**(9), e296
46. Singer-Vermes LM, Burger E, Franco MF, Di-Bacchi MM, Mendes-Giannini MJ, Calich VL. *J Med Vet Mycol* (1989) **27**(2), 71-82
47. Lionakis MS, Lahdenranta J, Sun J, Liu W, Lewis RE, Albert ND, Pasqualini R, Arap W, Kontoyiannis DP. *Infect Immun* (2005) **73**(11), 7747-7758
48. Mullen LM, Nair SP, Ward JM, Rycroft AN, Henderson B. *Trends Microbiol* (2006) **14**(3), 141-147
49. Dadachova E, Moadel T, Schweitzer AD, Bryan RA, Zhang T, Mints L, Revskaya E, Huang X, Ortiz G, Nosanchuk JS, Nosanchuk JD, Casadevall A. *Cancer Biother Radiopharm* (2006) **21**(2), 117-129
50. Howell RC, Revskaya E, Pazo V, Nosanchuk JD, Casadevall A, Dadachova E. *Bioconjug Chem* (2007) **18**(6), 1739-1748
51. Wu C, Lo SL, Boulaire J, Hong ML, Beh HM, Leung DS, Wang S. *J Control Release* (2008) **130**(2), 140-145
52. Li X, Chen H, Khan AA, Lauterbach SB, Lanzillotti R, Rai PR, Kane RS, Coetzer TL, Chishti AH. *Biochem Biophys Res Commun* (2008) **376**(3), 489-93
53. Hebelbarbosa F, Montenegro MR, Bagagli E. *Med Mycol* (2003) **41**(2), 89-96
54. Cenci E, Bistoni F, Mencacci A, Perito S, Magliani W, Conti S, Polonelli L, Vecchiarelli A. *Cell Microbiol* (2004) **6**(10), 953-961
55. Travassos LR, Silva LS, Rodrigues EG, Conti S, Salati A, Magliani W, Polonelli L. *J Antimicrob Chemother* (2004) **54**(5), 956-958
56. Manfredi M, Merigo E, Salati A, Conti S, Savi A, Polonelli L, Bonanini M, Vescovi P. *J Oral Pathol Med* (2007) **36**(8), 468-471

## FOOTNOTE

We are indebted to Creuza Oliveira and Dr. Patricia Xander Batista for technical assistance, to Drs. Zoilo Pires de Camargo, Terezinha Inez Estivalet Svidzinski, Vera Lúcia Garcia Calich who kindly provided *P. brasiliensis* isolates and Dr. Alexandre Basso for critical reading of the manuscript. This work was supported by Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

## TABLE

Table 01. Enrichment of peptides displayed by phages selected after second and third rounds.

## FIGURE LEGENDS

Fig. 1. Differences of virulence degrees of Pb18 isolates. (A) Survival curves of B10.A mice inoculated i.t. with  $10^6$  viable yeasts of different isolates of *P. brasiliensis* (as indicated), or with PBS (controls). All mice that received highly virulent Pb18 isolate died 250 days after injection, while those injected with non-virulent Pb18 isolates behaved as the control group (PBS). (B) CFU from lungs, spleen and liver of mice infected with either virulent or attenuated Pb18 isolates. Bars depict means  $\pm$  standard errors of log<sub>10</sub> CFU obtained from groups of 5-6 mice at 30, 60 and 90 days after infection. (\* $P$ <0.05) and (\*\* $P$ <0.01) relative to the attenuated isolate. (C and F) Histopathology

(H&E; 100X) 30 days after of infection, from a representative i.t. infected mouse with attenuated Pb18. Diffuse inflammatory cells are seen in the lung (C). The lung section of mice infected with virulent Pb18 showed well-organized granulomas (D - arrows; arrowhead shows lung preserved areas) while liver sections showed isolate granulomas (F - arrow). (E) Lung section, after 60 days of infection with large and confluent granulomas involving extensive areas. (G and H) Histopathology (H&E; 400X) 60 days after of infection, from an i.t. infected mouse with virulent Pb18; (G) lung section showing numerous budding yeast cells surrounded by inflammatory cellular infiltration. (H) Liver section with yeast cells and focal neutrophilic aggregates (arrowhead). (I) Morphological aspects of *P. brasiliensis* in yeast-like form after five days of incubation at 37°C in Fava-Netto's medium. The diameter of virulent yeasts, as recorded by the analyses of 100 mother cells from each isolate, exhibited a minimum size of 9,01µm, a maximum of 15,9µm with a medium of 12.3µm (SD±2). The same parameters measured on attenuated isolate was minimum of 4.01µm, maximum of 10.9µm, with minimum of 7.2µm (SD±1.8) ( $P<0,001$ ). (J) The attenuated Pb18 isolate exhibited small and isodiametrical multibudding cells. (K) Highly virulent Pb18 isolate, after animal passage, exhibited oval elongated cells.

Fig. 2. Biopanning strategy to isolate phages binding only to highly virulent isolate of yeast cells of *P. brasiliensis*. (A) Enrichment of specific phages after three rounds of selection, as described in Materials and Methods, and (B) cell binding assay with selected phages. Clones were incubated with highly virulent isolate and attenuated isolate to identify three phages (p04, p05 and p06) presenting higher specificity and affinity to the highly virulent isolate. (C) Binding of the pep04 displaying (relative to control) phage yeast cells using different TU of the phage in independent experiments ( $10^6$  to  $10^{10}$  TU). (D) Binding of the pep06-displaying (relative to control) phage yeast cells using different TU of the phage in independent experiments ( $10^6$  to  $10^{10}$  TU). These results showed dose-dependent bindings. (E) Inhibition results between the synthetic peptide (pep04) and its homologous phage (p04); with pep04 concentrations higher than 0.001µM, significant inhibition was observed. [\* , significant ( $P<0.05$ ) and \*\*, significant ( $P<0.01$ ) relative to control, PBS only]. (F) Competitive inhibition results between the synthetic peptide (pep06) and its homologous phage (p06), where no difference was detected.

Fig. 3. P04 as biomarker of virulence. Cell binding assay with p04 and control phage (fd-tet phage, no insert). P04 was incubated with T10B1 (highly virulent), T4B17 (intermediate virulence), Mg16 (patient isolate), Pb339 and highly virulent or attenuated Pb18 isolates. This phage distinguished degrees of virulence of different isolates. \*, significant ( $P<0.05$ ) and \*\*, significant ( $P<0.01$ ) relative to attenuated isolate Pb18.

Fig. 4. Association of pep04 with DNA in *P. brasiliensis* yeasts. Yeasts were labeled with pep04-6FAM, anti-gp75-Alexa610 and DAPI and imaged by confocal microscopy. A: DIC image; B: pep04 rendered image; C: DAPI, rendered image; D: merged pep04 (green), gp75 (red), and DAPI (blue) rendered image). Arrows point to areas of stronger pep04 labeling; arrowheads indicate stronger DAPI labeling on areas rich in pep04. Bars: 10µm.

Fig. 5. p04 phage prevented the deployment of infection and reduced CFU in the lungs of infected mice. (A) Virulent Pb18 was incubated with p04, p03 (the latter unable to bind to *P. brasiliensis*, as shown in Fig. 2) or fd-tet (non inserted) phages for one hour and then five B10.A mice were infected and sacrificed 72 hours after the infection. The number of lung CFUs from virulent Pb18 incubated with p04 was significantly lower than p03, fd-tet phages or controls ( $P<0.01$ ). (B) Virulent Pb18 was incubated with p04 or fd-tet phages for one hour after which B10.A mice were infected (5 animals). Sacrificed 45 days after the infection, mice showed that the difference of number of lung CFUs became more pronounced and significantly different ( $P<0.01$ ). Spleen and liver CFUS were not different. (C) Treated mice with p04 phage showed significantly reduced CFU in the lungs as compared with controls (Fd-tet – non inserted phage).

Fig. 6. The *in vitro* antifungal activity of selected peptides. (A) Peptides (pep04, pep05, pep06 and pepIR) were incubated, at a concentration of 1mg/mL, with logarithmically growing multiple-budding yeast cells for 24h at 37°C with shaking. After incubation, the entire suspension volumes were plated for CFU determination. Results showed that pep04 ( $P<0.01$ ), pep05 ( $P<0.01$ ) and pep06 ( $P<0.05$ ) peptides demonstrated fungicidal activity *in vitro* against *P. brasiliensis*. (B) Similar assay with pep04 against attenuated isolate showed no killing, thus demonstrating its selectivity to virulent isolates. (C) The fungicidal activity of pep04 *in vitro* seemed to be dose dependent, since from the concentration of 500µg/ml there was a 50% or lower decrease of viable fungi, significantly different ( $P<0.01$ ) as compared with pepIR. Bars indicate standard errors. (D) Fungicidal activity of pep04 *in vitro* against virulent *P. brasiliensis* isolate depends on molecular conformation. Pep04L (linear pep04, with cysteine amino acids substituted by alanine), pep04T (scrambled peptide) and pepIR (irrelevant peptide) were unable to kill fungi, this difference being significant ( $P<0.01$ ) as compared with controls (medium only).

Table 1

Phage name	Peptide display phage	Round	
		Second	Third
p01	CYRLTGLWC	-	2
p02	CLDSASRGC	-	2
p03	CWLFSVSAC	-	2
p04	CGSYGFNAC	3	3
p05	CGLRLESTC	-	2
p06	CSLERLGFC	1	7

Figure 1

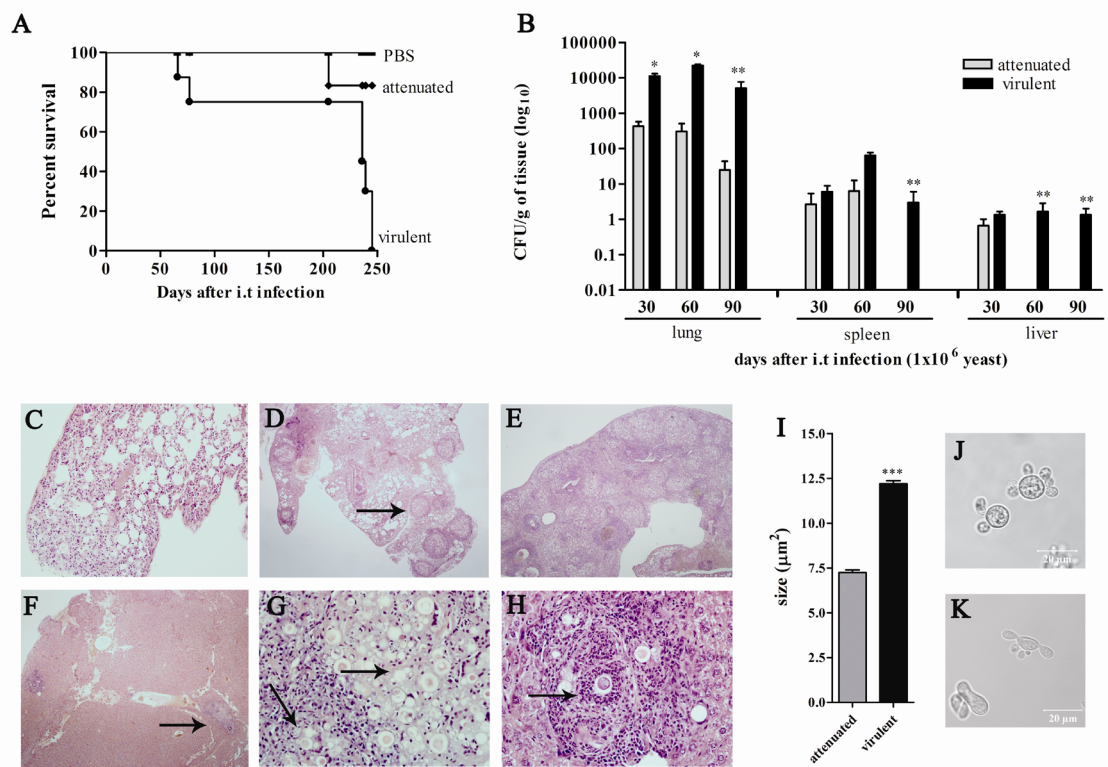




Figure 2

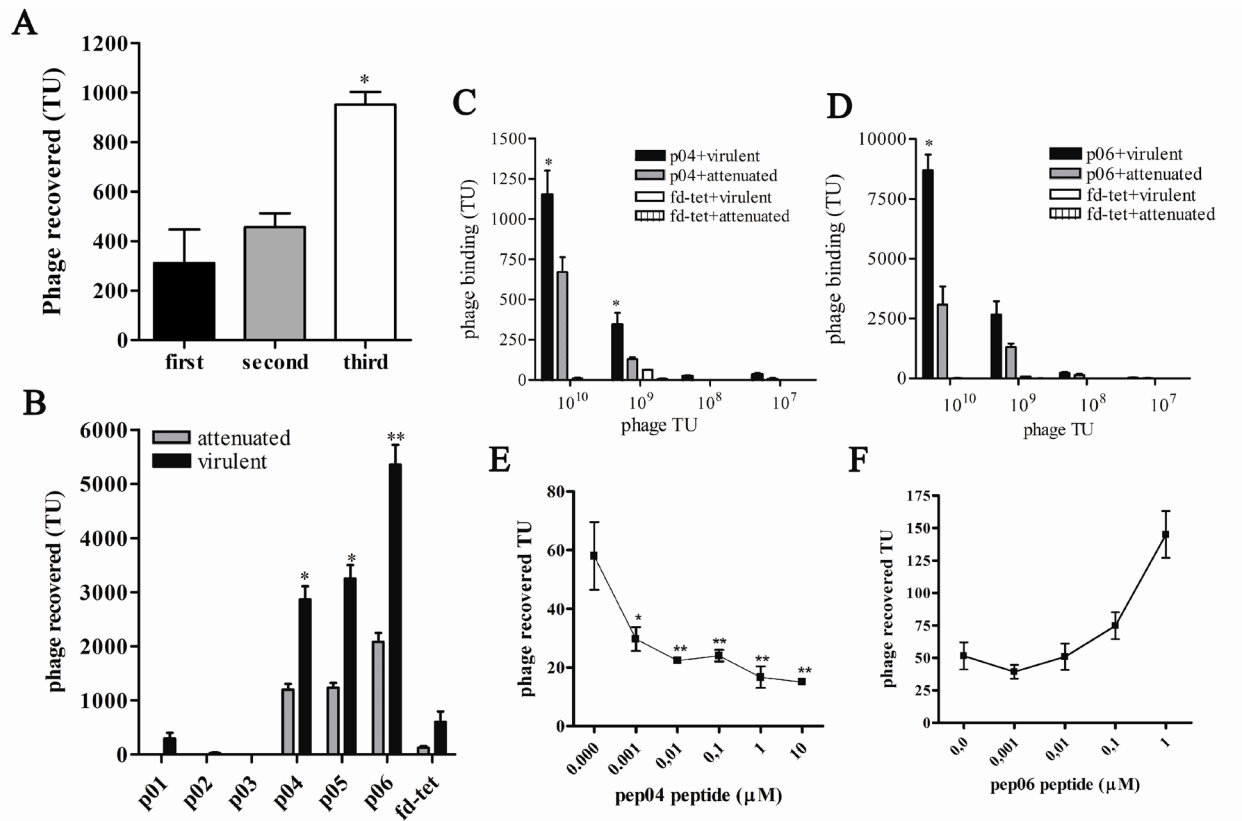


Figure 3

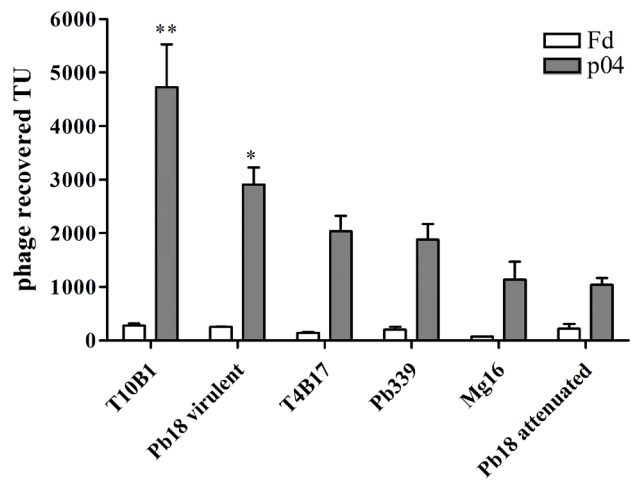


Figure 4

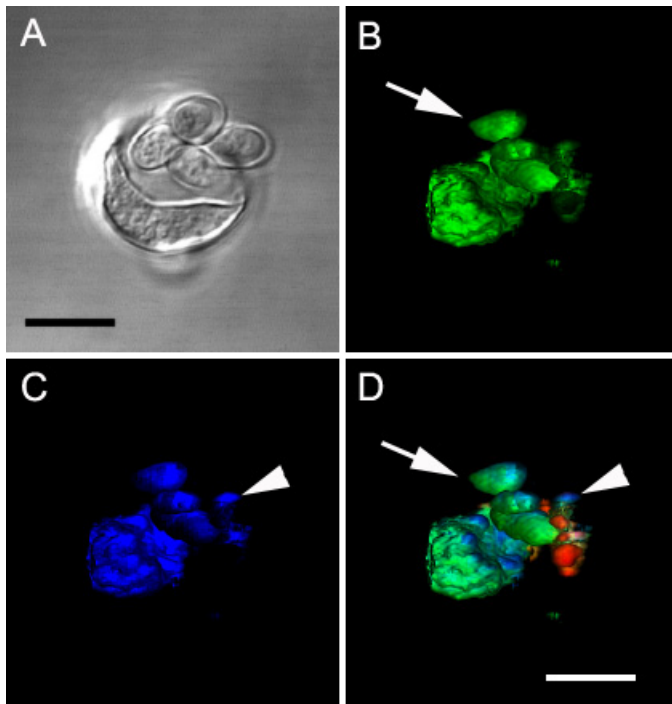


Figure 5

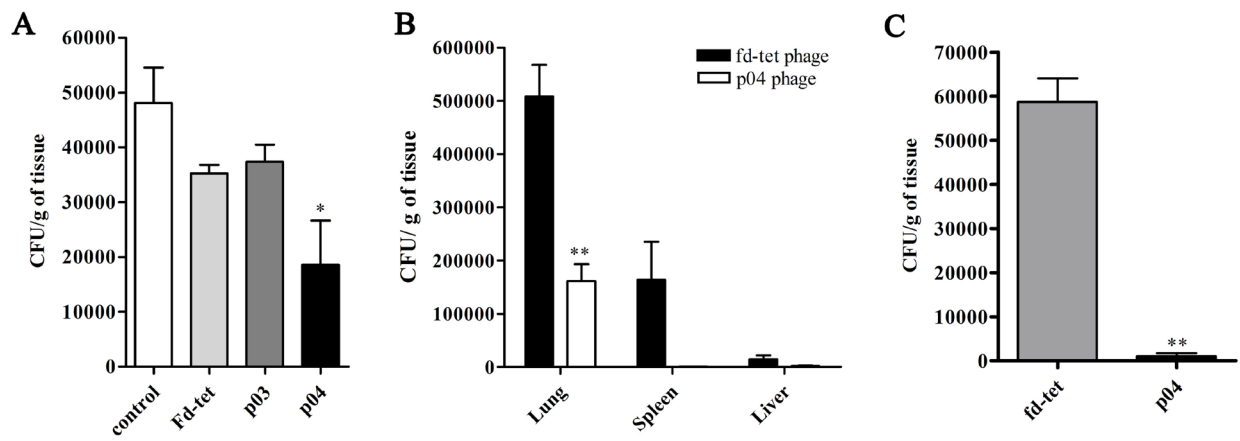
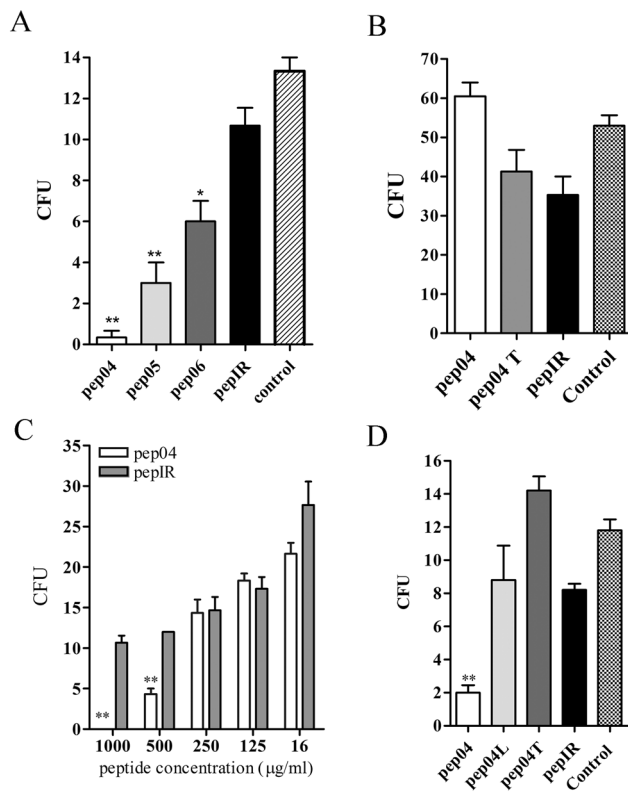


Figure 6



# 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](#)