

**Universidade de Brasília-UnB
Pós Graduação em Patologia Molecular
Faculdade de Medicina**

**Clonagem e caracterização do Fator Inibitório de Macrófago
do fungo *Paracoccidioides brasiliensis***

Gina Camilo de Oliveira

**Brasília-DF
2006**

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

**Universidade de Brasília-UnB
Pós Graduação em Patologia Molecular
Faculdade de Medicina**

**Clonagem e caracterização do Fator Inibitório de Macrófago
do fungo *Paracoccidioides brasiliensis***

Gina Camilo de Oliveira

Orientador: Marcelo de Macedo Brígido
Co-orientadora: Andréa Queiroz Maranhão

Dissertação apresentada à Faculdade
de Medicina da Universidade de
Brasília, como requisito parcial para
obtenção do título de Mestre em
Patologia Molecular (Genética
Molecular)

**Brasília-DF
2006**

Banca Examinadora:

Profa.Dra Maria Sueli Soares Felipe-UnB
Prof.Dr Marcos Antônio dos Santos Silva-UnB
Profa.Dra Ildinete Silva Pereira-UnB

Trabalho realizado no Laboratório
de Biologia Molecular (Instituto de
Biologia) da Universidade de
Brasília, com apoio financeiro da
CAPES-MCT

Este trabalho é dedicado
àqueles que incentivaram
e acompanharam as
minhas
oportunidades de aprendizado
e crescimento...

VALEU mesmo!!!!!!☺

Índice

Resumo	viii
Abstract	ix
Lista de Siglas e abreviaturas	x
Lista de Figuras	xiii
Lista de Tabelas	xiv
Introdução	
1. Interação parasito-hospedeiro	2
2. Fator Inibitório de Macrófago	8
Objetivos e estratégia experimental	10
Justificativa	11
Material	12
1. Meios de Cultura- <i>Escherichia coli</i>	12
2. Antibióticos e soluções utilizadas para seleção de transformantes	13
3. Linhagens bacterianas	14
4. Plasmídeos utilizados	14
5. Enzimas de restrição	15
6. Outras enzimas	15
7. Tampões de enzimas	15
8. Soluções de uso geral	16
9. Soluções utilizadas nos protocolos de transformação	17
10. Soluções para preparação de DNA plasmidial	18
11. Soluções para eletroforese em gel de agarose	19
12. Soluções para eletroforese em gel de poliacrilamida	19
13. Soluções para <i>Western Blot</i>	21
14. Anticorpos e conjugados para <i>Western Blot</i>	22
15. Soluções para <i>Northern-blot</i>	22
16. Reagentes e Kits utilizados	24
17. Oligonucleotídeos dos vetores	25

Metodologia	26
1. Desenho dos oligonucleotídeos para amplificação e clonagem da ORF do PbMIF, a partir da sequência de nucleotídeos do cDNA.	26
2. Amplificação da ORF do PbMIF para clonagem no vetor de expressão	26
3. Clonagem da ORF do PbMIF no vetor pGEMT	27
4. Clonagem da ORF do PbMIF no vetor de expressão pET21a	28
5. Preparação de Células Eletrocompetentes	28
6. Transformação de células competentes (<i>E.coli</i>) – Eletroporação	29
7. Preparo e transformação de células de <i>Escherichia coli</i> competentes congeladas pelo método de cloreto de cálcio	29
8. Preparação de DNA plasmidial	30
9. Digestão do DNA com enzimas de restrição	31
10. Sequenciamento automático	31
11. Análise da sequência de nucleotídeos	31
12. Análise da expressão diferencial pelo experimento de <i>Northern blot</i>	31
13. Expressão heteróloga em <i>E.coli</i>	32
14. Análise dos extratos protéicos de <i>E.coli</i> por SDS-PAGE	34
15. Transferência das proteínas para a membrana de nitrocelulose e imunodeteção	34
16. Análise da filogenia do MIF de <i>P. brasiliensis</i>	35
Resultados e Discussão	36
1. Obtenção do cDNA de MIF	36
2. Análise da filogenia do MIF de <i>P. brasiliensis</i>	40
3. Confirmação do perfil de expressão diferencial do gene <i>pbmif</i> por <i>northern blot</i> .	44
4. Expressão heteróloga em <i>E.coli</i>	45

Conclusão e Perspectivas	49
Referências Bibliográficas	50

Lista de Siglas e Abreviaturas

Amp	Ampicilina
APS	Persulfato de amônio
ATP	Adenosina trifosfato
BCIP	5-bromo-4-cloro-indolil fosfato
BSA	Albumina bovina sérica
°C	Graus Celsius
cDNA	Ácido desoxirribonucléico complementar
cm	Centímetros
Da	Dalton
DATP	Desoxiadenosina 5'trifosfato
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DNTP	Desoxinucleotídeo 5'trifosfato
DTH	Hipersensibilidade do tipo tardia (<i>Delayed Type Hypersensitivity</i>)
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EST	Pequena seqüência expressa (<i>Expressed Sequence Tag</i>)
Fc	Fragmento cristalizável de anticorpo(porção constante)
g	Grama
g	Força gravitacional
IFN	Interferon
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
IPTG	Isopropil- β -D-Tiogalactosídeo
Kb	Quilobase
KDa	Quilodalton
Kv	Quilovolts
L	Litro

M	Molar
mA	Miliampere
Mb	Megabase
MDR	Multiresistência a drogas (<i>Multi-Drug-Resistance</i>)
MIF	Fator inibitório de macrófago (<i>Macrophage Inhibitory Factor</i>)
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MM	Massa Molecular
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
NBT	Nitro Blue Tetrazole
OD ₆₀₀	Densidade ótica a 600 nanômetros
ORF	Fase aberta de leitura (<i>Open Reading Frame</i>)
Ori	Origem de replicação
p/v	Peso/volume
pb	Pares de base
PBS	Tampão de Fosfato-Salina (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PCR	Reação em cadeia de polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
qsp	Quantidade suficiente para
RNA	Ácido ribonucleico
RNAse	Ribonuclease
rpm	Revoluções por minuto
SDS	Sódio Dodecil Sulfato
SDS-PAGE	Gel de poliacrilamida desnaturante (com SDS)
TEMED	N,N,N,N'-metil etilenodimetilamina

T _m	Temperatura de anelamento (<i>T</i> emperature <i>M</i> elting)
TNF	Fator de necrose tumoral
Tris	Tri(hidroximetil)aminometano
U	Unidade enzimática
UV	Ultravioleta
v	Volume
v/v	Volume/volume
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosídeo
μF	Micro Faraday
μg	Micrograma
μL	Microlitro
μM	Micromolar
μm	Micrometro
ng	Nanograma

Lista de Figuras

Figura 1 Esquema indicando as duas ESTs isoladas da biblioteca de cDNA de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> .	36
Figura 2. Sequência de nucleotídeos do clone C02..	37
Figura 3. Alinhamento das seqüências de aminoácidos de MIF do <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> – PbMIF com outros organismos	38
Figura 4. Árvore filogenética do MIF de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> .	41
Figura 5. Estratégia para amplificação e clonagem do fragmento correspondente a ORF do PbMIF	42
Figura 6: Amplificação da ORF do PbMIF	42
Figura 7. Sequência de nucleotídeos da ORF do PbMIF	43
Figura 8. Análise do perfil de expressão do gene <i>pbmif</i> de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> nas formas de micélio(M) e levedura(L).	45
Figura 9. Análise de restrição do clone recombinante com as enzimas <i>Nde I</i> e <i>Xho I</i> .	46
Figura 10. Análise dos extratos protéicos de <i>Escherichia coli</i> por <i>western blot</i> .	48

Lista de Tabelas

Tabela 1. Linhagens de *Escherichia coli* utilizadas.

Tabela 2. Enzimas de restrição utilizadas.

Tabela 3. Características dos oligonucleotídeos utilizados.

Resumo

O fungo dimórfico *Paracoccidioides brasiliensis* é o agente etiológico da paracoccidioidomicose (PCM), uma micose sistêmica que acomete diversos indivíduos na América Latina. A forma miceliana encontrada na natureza constitui a fase infectiva que diferencia para a forma de levedura no pulmão humano estabelecendo a infecção. O fungo promove uma resposta imunitária mediada por células e uma resposta inflamatória no pulmão. Os macrófagos são células efetoras do sistema imunitário que reconhecem e eliminam patógenos invasores. Inicialmente identificada como uma citocina de linfócitos T, o fator inibitório de macrófago (MIF) é também uma citocina do macrófago e atua como um importante mediador da inflamação. O Projeto Genoma Funcional e Diferencial de *P. brasiliensis* realizado no Laboratório de Biologia Molecular da Universidade de Brasília junto à Rede Genoma Centro-Oeste permitiu a geração de ESTs (do inglês “Expressed Sequence Tags”) a partir de bibliotecas de cDNA das formas de micélio e levedura de *P. brasiliensis*. Não há relatos na literatura de homólogos de MIF em fungos, porém, no genoma do *P. brasiliensis* foi descrito uma sequência que possui similaridade gênica significativa com o MIF de mamíferos, indicando um envolvimento potencial na patogênese do *P. brasiliensis*. O fragmento encontrado (contig 1528: *pbmif*) é de aproximadamente 400 pares de bases, especificamente expresso na fase de levedura de *P. brasiliensis*. MIF é uma proteína que possui homólogos em plantas, nematóides e vertebrados. O objetivo desse trabalho é identificar e caracterizar possíveis clones de cDNA (**PbMIF**) homólogos a MIF isolado da biblioteca de *P. Brasiliensis*. Um clone de cDNA de MIF foi sequenciado e identificado como homólogo a MIF. A expressão do mRNA é restrita a levedura, como detectado por *Northern Blot*. A sequência de aminoácidos de MIF do *P. brasiliensis* tem similaridade de 56% (32% de identidade) com o MIF de *Mus musculus*. Para a produção da proteína recombinante em *Escherichia coli*, o cDNA de MIF foi clonado no vetor de expressão (pET21).

A detecção e caracterização de um homólogo de fator inibitório de macrófago (MIF) no *P. brasiliensis* é um relato inédito descrito em fungos e o papel de MIF mimetizando uma citocina pode revelar novos fatores de virulência para a infecção pelo *P. brasiliensis*. Portanto, pela coevolução com o sistema imunitário, patógenos poderiam desenvolver relevantes estratégias para evasão das defesas do hospedeiro desenvolvendo moléculas homólogas a citocinas, como seria o caso do MIF de *P. brasiliensis*. O papel do MIF de *P. brasiliensis* é desconhecido, assim sua caracterização poderá gerar informações relacionadas ao MIF endógeno, favorecendo o desenvolvimento de informações sobre o mecanismo de patogenicidade do fungo.

Abstract

The dimorphic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* is the etiological agent of paracoccidioidomycosis (PCM), a fungal disease that affects many individuals in Latin America. The mycelia found in nature probably constitute the infective phase that differentiates to yeast form in the human lungs to establish the infection. The fungus promotes a cell mediated immune and inflammatory pulmonary response. Macrophages are pivotal effector cells of the innate immune system, recognizing and eliminating invasive microbial pathogens. Initially identified as a T-cell cytokine, the Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) is also a macrophage cytokine and an important mediator of inflammation. From the project “Functional and Differential Genome of *P. brasiliensis*” ESTs (Expressed Sequence tags) database we discover a putative fungi homologue to the mammalian MIF. There are no previous reports in the literature of MIF homologues in fungi, however the sequence described in the genome of *P. brasiliensis* has sequence similarity to MIF genes found in animal, nematode and plant.

The aim of this work is to investigate the gene encoded by the **Pb MIF** homolog in order to characterize its coding sequence and predicted polypeptide.

A MIF related cDNA clone was fully sequenced and the predicted MIF homolog was identified. The mRNA expression is restricted to the yeast form, as detected by *Northern Blot*. Sequence analysis indicated that the predicted amino acid sequence has a similarity of 56% (32% identical) with the MIF of *M. musculus*. The Pb MIF CDS (coding sequence) was subcloned into bacterial expression vector (pET21) fused to a histidine tag. This CDS was expressed in *Escherichia coli* to produce recombinant protein.

We have detected and characterized a Pb MIF putative homolog. This is the first report of a MIF homolog among fungi and its role as a cytokine mimetic may reveal new virulent factors for *P. brasiliensis* infection. During the co-evolution with immune system, pathogens must have developed relevant strategies of evasion of host response. Though incorporating cytokines homologs may be a successful strategy for *P. brasiliensis* infection. The Pb MIF homolog may be part of an unknown strategy for *P. brasiliensis* survival inside the mammalian host.

Introdução

O fungo *Paracoccidioides brasiliensis* é o agente etiológico da paracoccidioidomicose (PCM), a mais prevalente micose sistêmica na América do Sul, destacando-se no Brasil como oitava causa de mortalidade entre as micoses sistêmicas (Coutinho *et al.*, 2002). A PCM acomete especialmente populações de áreas rurais e tem uma importância em saúde coletiva associada aos custos sociais e econômicos. Ela ocorre principalmente em indivíduos em fase produtiva, com freqüentes seqüelas secundárias, motivo comum de incapacitação para o trabalho.

A classificação taxonômica e a nomenclatura dos fungos são classicamente baseadas na observação do fenótipo nos estágios de reprodução sexuada. Assim, fungos com reprodução sexual desconhecida, como o *P. brasiliensis*, têm sua classificação imprecisa e conflitante. Atualmente o *P. brasiliensis* é considerado um ascomiceto, apesar de não ter ciclo sexual descrito, e por meio de comparações de seqüências de nucleotídeos do RNA ribossomal foi classificado como um provável membro da ordem Onygenales juntamente com os fungos *Histoplasma capsulatum* e *Blastomyces dermatitidis* (Guarro *et al.*, 1999).

P. brasiliensis é um fungo dimórfico. Lutz, em 1908, foi o primeiro a relatar a PCM e observar o dimorfismo, o qual é reprodutível *in vitro* por meio de variação de temperatura: 23-36° C micélio, 36-37° C levedura. (San-Blas & Niño-Vega, G, 2001). Esse processo de transformação é reversível e depende de um conjunto de genes expressos de forma diferencial, em adição à regulação enzimática para a síntese de glucanas que alteram a composição da parede celular do fungo (Borges-Walmsley *et al.*, 2002).

P. brasiliensis é multinucleado na sua forma patogênica de levedura, enquanto um único núcleo é presente na forma miceliana. A ploidia do *P. brasiliensis* não está completamente definida, porém a literatura disponível sugere que seja diplóide. Além disso, quatro ou cinco cromossomos variando o tamanho entre 2 e 10 Mb foram identificados e o tamanho do genoma é estimado em 20-23 Mb, o que indica presença de 10.000-15.000 genes (Cano *et al.*, 1998; Montoya *et al.*, 1999).

O habitat natural de *P. brasiliensis* ainda não foi precisamente determinado, embora esse fungo tenha sido ocasionalmente isolado do solo (Silva-Vergara *et al.*, 1998). Vários

estudos têm sido feitos no intuito de determinar o micro-habitat de *P. brasiliensis*: condições favoráveis à existência do micro-habitat de *P. brasiliensis* foram presumidas à partir de características geoclimáticas das regiões onde houve isolamento do fungo e das áreas endêmicas. Acredita-se que na sua fase miceliana esse fungo apresenta-se como saprófita em regiões com solos úmidos, ricos em matéria orgânica e com mínimas alterações de temperatura. Em condições adversas (falta de umidade e/ou nutrientes) o fungo produz propágulos da forma miceliana denominados conídios, os quais podem infectar o homem. Além do homem (*Homo sapiens*), um outro hospedeiro que apresenta relevância na elucidação da ecologia de *P. brasiliensis* é o tatu (*Dasypus novemcinctus*). Esse animal pode não ser apenas um simples carreador como também parece desenvolver a PCM, pois há formação de granuloma relacionado ao fungo que pode ser encontrado no pulmão, baço, fígado e linfonodos mesentéricos. O tatu pode ser o principal reservatório natural do fungo (Restrepo *et al.*, 2001).

Interação parasito-hospedeiro:

O complexo processo envolvendo a interação parasito-hospedeiro pode levar a diferentes resultados, tais como: infecção, comensalismo, colonização, resistência, doença ou erradicação do microorganismo (revisto por Casadevall & Pirofzki, 2000).

No progresso da infecção, os fungos dimórficos transitam para uma fase morfológica mais favorável à sua adaptação. A forma infectiva produz fatores de aderência e exoenzimas para a fixação inicial, crescimento e mobilidade do fungo no tecido do hospedeiro. Essa mudança morfológica do patógeno promove uma troca nas moléculas antigênicas de superfície, controla a expressão da cápsula de certos fungos que vão determinar a natureza comensal ou invasiva do micróbio, além de permitir mudanças no hospedeiro essenciais para o seu ciclo de vida (San –Blas *et al.*, 2000).

A adesão às células do hospedeiro e superfícies mucosas é uma etapa crucial no estabelecimento da infecção por *P. brasiliensis*. Existe uma forte relação entre aderência e virulência, como sugerido por Hanna e colaboradores (2000) que observaram que linhagens mais virulentas apresentam maior capacidade de adesão. Essa abordagem é baseada no postulado de Falkow, originalmente descrito para identificação de genes de virulência em bactéria, requeridos especificamente para evadir da resposta imune específica do

hospedeiro (Falkow *et al.*, 1988). Esse postulado preconiza que para um gene ser considerado de virulência deve haver atenuação ou perda da capacidade de isolados com um determinado gene nocauteado em sobreviver/crescer/promover doença em modelos animais bem estabelecidos, quando comparado a isolados do tipo-selvagem e reconstituídos. É importante ressaltar que um mutante nulo para um determinado gene de virulência pode ser cultivado sob certas condições *in vitro*, porém tem sua capacidade de produzir doença atenuada ou completamente perdida quando introduzido no ambiente do hospedeiro *in vivo* (Perfect & Cox, 2000ab). Apesar do *P. brasiliensis* ser um patógeno que infecta o homem, pouco ainda é conhecido a respeito de seus genes de virulência. Tavares e colaboradores (2005) compararam prováveis genes de virulência obtidos no transcriptoma do *P. brasiliensis* (Felipe *et al.*, 2003); distribuiu-se as ESTs (do inglês *Expressed Sequence Tags*) em cinco classes metabolismo, parede celular, genes relacionados à toxicidade, fatores de secreção e outros. Esses resultados sugerem que esse organismo pode utilizar um arsenal vasto de possíveis fatores de virulência, que permitem a sua sobrevivência em diferentes ambientes.

Portanto, o desenvolvimento da PCM, bem como de diversas outras micoses, depende de interações entre o fungo e componentes do hospedeiro, características desenvolvidas para uma versatilidade fisiológica e nutricional que simplesmente permitem a sobrevivência do patógeno no ambiente do hospedeiro mamífero. Navarro-Garcia e colaboradores (2001) observaram que mudanças na parede celular podem modificar a adesão e reconhecimento do fungo pelo sistema imunitário do hospedeiro, ocasionando alterações na virulência.

A transição para a morfologia associada à doença pode auxiliar o patógeno no aumento da resistência às defesas do hospedeiro. No processo de transição, ocorre a indução de genes fase-específicos cujos produtos podem contribuir para a sobrevivência do fungo no ambiente do hospedeiro (Felipe *et al.*, 2005a,b).

A capacidade que os microorganismos possuem de sintetizar e secretar componentes tóxicos exerce um papel importante na sobrevivência das espécies. Há proteínas transmembrânicas (transportadores) envolvidas na captação de nutrientes e excreção celular. Em células cancerosas e em patógenos, particularmente em alguns fungos, algumas dessas proteínas são responsáveis por um importante fenômeno conhecido como

“multi-resistência a drogas” (MDR do inglês: **M**ulti-**D**rug **R**esistance). Foram identificados 22 ESTs em *P. brasiliensis* relacionados a transportadores ABC e que estão envolvidos na resistência a drogas, com similaridade em outros fungos (Costa *et al.*, 2005).

Estudos moleculares estabeleceram fatores gerais de virulência para diferentes fungos patogênicos: termotolerância, dimorfismo, componentes polissacarídeos da parede celular, moléculas de adesão, produção de enzimas (proteínases, fosfolipases, lipases) entre outros (van Burik *et al.*, 2001; San-Blas *et al.*, 2000). Esses dados mostram que a virulência fúngica é um evento altamente complexo e polivalente, resultante da expressão de múltiplos genes em diferentes estágios e em diferentes locais de infecção (Odds *et al.*, 2001).

Os fungos dimórficos são responsáveis pela maioria das infecções sistêmicas de humanos e outros mamíferos. O progresso da doença é marcado pela conversão da forma infecciosa, não patogênica, para uma morfologia distinta, patogênica (Rooney *et al.*, 2002). A patogenia parece estar intimamente ligada à morfogênese devido ao fato de que algumas linhagens de *P. brasiliensis*, e também de outros fungos patogênicos como *H. capsulatum* e *B. dermatitidis*, são incapazes de fazer a transição dimórfica e não são virulentas. (Meddof *et al.*, 1986; Borges-Walmsley *et al.*, 2002)

Componentes do hospedeiro têm mostrado afetar a morfogênese dos fungos patogênicos. Devido a uma maior incidência da PCM em homens em relação às mulheres, apresentando uma proporção de 78:1, sugere-se um possível papel protetor do hormônio feminino β -estradiol (Restrepo *et al.*, 1997; revisto por Borges-Walmsley *et al.*, 2002). Estudos *in vitro* demonstraram que 17- β -estradiol inibe a transição de micélio para levedura. Os hormônios progesterona e estriol possuem menor efeito na inibição da transição enquanto que análogos como testosterona e 17- α -estradiol não possuem efeito (Salazar *et al.*, 1988; revisto por Rooney & Klein, 2002). Esses dados sugerem que a infecção por *P. brasiliensis* é menos observada em mulheres porque os hormônios femininos suprimem a conversão de micélio para levedura, um evento precoce e pivô no processo infeccioso. Além disso, outras características do indivíduo, como idade, estado nutricional, patrimônio genético e integridade da resposta imunológica são importantes fatores para o estabelecimento do fungo, assim como a virulência e antigenicidade

(Franco,1987). A PCM é na maioria dos casos assintomática, evoluindo em cerca de 2% de todos os indivíduos infectados (McEwen et al.,1995).

Acredita-se que o micélio e seus conídios constituam a forma infectiva que se transforma em levedura e estabelece a infecção nos pulmões, podendo também atingir outros órgãos do hospedeiro. Assim, no ambiente natural, os conídios produzidos pela forma miceliana de *P. brasiliensis* atuam como propágulos infecciosos que ao serem inalados, chegam ao pulmão e transformam-se em levedura, estabelecendo a infecção. Posteriormente, dependendo da relação parasito-hospedeiro, a infecção poderia disseminar para os demais tecidos do hospedeiro, tornar-se latente ou ser erradicada (Franco,1987; San-Blas *et al.*, 2002; revisto por Rooney & Klein, 2002 e Casadevall & Pirofski, 2000).

A infecção inicia-se principalmente nos pulmões e pode ser disseminada via corrente sanguínea ou pelos vasos linfáticos para vários tecidos do corpo. A maioria dos indivíduos infectados desenvolve apenas a infecção pulmonar assintomática; no entanto, alguns pacientes apresentando manifestações clínicas da doença dão origem à forma aguda, subaguda (tipo juvenil), e a forma crônica (tipo adulto). A progressão para a doença depende tanto das condições imunológicas do hospedeiro, como da virulência do fungo. A PCM afeta principalmente a faixa etária de 3-25 anos ocorrendo excepcionalmente em pacientes com idade mais avançada. As manifestações da doença refletem principalmente o grande comprometimento do sistema fagocitário mononuclear. Essa forma da doença progride rapidamente e dissemina pelo sistema linfático, com hipertrofia do linfonodo, hepatoesplenomegalia intensa e o envolvimento de outros órgãos. Nas formas crônicas, que são as mais comuns, a doença acomete indivíduos com mais de 25 anos de idade e tende a progredir mais lentamente. As lesões são restritas a determinados órgãos que podem surgir diretamente de um foco primário ou a partir de um foco quiescente após um determinado período de latência (Franco,1987; Martinez, 2004).

A resposta imunitária celular efetiva mediada por linfócitos e a imunidade celular não específica mediada por macrófagos, neutrófilos e células citotóxicas naturais constituem a principal defesa contra infecções por fungos parasitas intracelulares como *Cryptococcus neoformans*, *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis* e *Paracoccidioides brasiliensis* (Romani, 1997).

A resistência às infecções também tem sido associada ao papel protetor do interferon gama (IFN- γ) (Cano *et al.*, 1998), cuja depleção *in vivo* aumenta a severidade da doença desenvolvida tanto em camundongos resistentes (A/Sn) quanto em susceptíveis (B 10). A resistência está ligada principalmente à resposta imune do tipo Th 1 com elevada secreção de IFN- γ e Interleucina 12 (IL-12) e a susceptibilidade está associada com baixos níveis destas citocinas. (Kashino *et al.*, 2000)

O IFN- γ age na ativação de macrófagos, na produção de óxido nítrico (NO), o maior agente microbicida dos macrófagos, que inibe a transformação de conídio para levedura. Entretanto, quando produzido exageradamente parece ter um papel na imunossupressão observada na paracoccidiodomicose experimental e humana (Bocca *et al.*, 1998; Gonzalez *et al.* 2000). IFN- γ também estimula macrófagos infectados por *P. brasiliensis* a secretar fator de necrose tumoral (TNF- α), que é requerido para a persistência dos granulomas (Souto *et al.*, 2000). Assim, tanto IFN- γ quanto TNF- α conferem resistência a *P. brasiliensis* por estimular a formação do granuloma e produção de óxido nítrico, controlando a infecção.

Foi demonstrado recentemente que culturas *in vitro* de macrófagos de camundongos resistentes infectados com *P. brasiliensis* produzem muito TNF enquanto que macrófagos de camundongos sensíveis produzem somente NO. Na presença de um inibidor de NO ocorre a produção de TNF, o que sugere que o aumento de TNF ou a produção de NO estão associados, respectivamente, à resistência e à susceptibilidade na PCM (Nascimento *et al.*, 2002).

A falha na sinalização da ativação de fagócitos pode contribuir para a predisposição à infecção, limitar a eficácia terapêutica a antifúngicos e favorecer a persistência fúngica e/ou comensalismo (Calich *et al.*, 1998 revisto por Romani, 2004)

O estabelecimento do fungo no tecido pulmonar induz uma resposta inflamatória que permite a formação de granuloma, o qual é definido como uma coleção compacta de células do sistema fagocitário mononuclear, podendo transformar em células epitelióides e gigantes. Linfócitos, plasmócitos, eosinófilos e fibroblastos também estão presentes (Williams *et al.*, 1983; De Brito *et al.*, 1994). A resposta inflamatória induzida pelos fungos auxilia no controle da infecção, entretanto, também contribui para a patogenicidade, como

observado pela ocorrência de infecções severas em pacientes imunossuprimidos (Cheng *et al.*, 2000).

O granuloma é a lesão fundamental na PCM e como em outras doenças infecciosas (tuberculose, hanseníase, esquistossomose e histoplasmose) é resultado de uma reação de hipersensibilidade tardia (DTH do inglês *Delayed Type Hypersensitivity*) contra antígenos do agente infeccioso (Romani, 1997). O macrófago é a principal célula componente do granuloma, e vários estudos clínicos e experimentais sugerem que macrófagos ativados por linfócitos T têm papel fundamental como a primeira barreira de resistência a *P. brasiliensis*. Dessa forma, o granuloma é um componente essencial na defesa contra o *P. brasiliensis*, pois é onde ocorre a cooperação linfócito T-macrófago, permitindo que o macrófago não só exerça as suas atividades microbidas e de apresentador de antígenos, mas também, juntamente com o linfócito T, produza citocinas e outros fatores que proporcionem um granuloma competente e eficaz na contenção e eliminação do fungo, evitando assim a sua disseminação pelo organismo. Convém ressaltar que há uma plasticidade marcante do linfócito T em resposta às infecções fúngicas, como por exemplo, a ação antifúngica direta e lise dos fagócitos parasitados pelo fungo (Romani, 2004).

Fator Inibitório de Macrófago:

O fator inibitório de macrófago (MIF- do inglês: *Macrophage Migration Inhibitory Factor*), descrito primeiramente há 40 anos, era considerado um mediador linfocitário que inibia a migração randômica de macrófago (David *et al.* 1966). Posteriormente, MIF foi descrito novamente como um fator secretado pela hipófise e com propriedades neuro-endócrinas (Bernhagen *et al.*, 1993; Calandra *et al.*, 1995).

Atualmente, MIF é considerado uma proteína pleiotrópica secretada principalmente por macrófagos, linfócitos e células endoteliais. Exerce atividades inflamatórias e imunitárias, induz a secreção de citocinas inflamatórias, a formação de óxido nítrico e ânions superóxidos e a proliferação linfocitária (Nguyen *et al.*, 2003). A atividade de MIF também é associada à regulação do macrófago e à DTH (Bernhagen *et al.*, 2002).

As atividades imunorregulatórias de MIF são baseadas na regulação transcricional de produtos gênicos inflamatórios, na modulação da proliferação celular e no controle do ciclo celular, na inibição da apoptose inativando P53 e em diversos efeitos metabólicos (Bucala, 1996; Hudson *et al.*, 1999, Mitchell, 2000; Lue *et al.*, 2002; Petrenko *et al.*, 2005). P53 é uma proteína supressora tumoral que atua como um fator de transcrição responsável por uma ativação direta de genes envolvidos em diversos eventos celulares, incluindo a apoptose (Vogelstein *et al.*, 2000; Vousden *et al.*, 2002).

MIF apresenta atividade enzimática além da característica de citocina e, de acordo com a literatura, um resíduo de prolina na posição 2 é o que determina a atividade de tautomerase (Swoope *et al.*, 1998; Subramanya *et al.*, 1996).

MIF exerce um papel relevante na patogênese de uma variedade de condições inflamatórias e imunitárias, tais como choque séptico, artrite reumatóide, câncer e doenças pulmonares. Conseqüentemente, abordagens terapêuticas baseadas em MIF têm sido bastante sugeridas (Bozza *et al.*, 1999; Chesney *et al.*, 1999; Calandra *et al.*, 2000). Roger e colaboradores (2001) identificaram um papel crucial de MIF na resposta imunitária inata por meio da modulação dos receptores do tipo *TOLL-Like4*, indicando o tratamento anti-MIF como uma importante estratégia para a terapêutica de indivíduos com choque séptico induzido por bactérias GRAM negativas.

Apesar da estrutura gênica e molecular de MIF ser bem descrita (Bernhagen *et al.*, 1998) os mecanismos moleculares da ação de MIF ainda não foram bem elucidados.

Não há relatos de identificação de um receptor de membrana. MIF modula a fosforilação e a atividade de proteínas quinases (Mitchell *et al.*, 1999) e interage e regula a atividade de coativador transcricional JAB 1/ CSN 5 atuantes no ciclo celular (Kleemann *et al.*, 2000; Burger-Kentischer *et al.*, 2002; Burger-Kentischer *et al.*, 2005). Porém, ainda não é claro o que esses eventos moleculares regulatórios representam na interação do MIF com a célula alvo.

O Projeto Genoma Funcional e Diferencial de *P. brasiliensis* realizado no Laboratório de Biologia Molecular da Universidade de Brasília junto à Rede Genoma Centro-Oeste permitiu a geração de ESTs a partir de bibliotecas de cDNA das formas de micélio e levedura de *P. brasiliensis* (Felipe *et al.*, 2005; Felipe *et al.*, 2003). Não há relatos na literatura de homólogos de MIF em fungos, porém, no genoma do *P. brasiliensis* foi descrito uma sequência que possui similaridade gênica significativa com o MIF de mamíferos, indicando um envolvimento potencial na patogênese do *P. brasiliensis*.

Pela coevolução com o sistema imunitário, patógenos desenvolvem estratégias relevantes de evasão e adaptação às defesas do hospedeiro (Tosta, 2001) e podem assim desenvolver moléculas homólogas a citocinas, o que pode ser o caso do MIF de *P. brasiliensis*. Como o *P. brasiliensis* é um patógeno intracelular, conseqüentemente, uma interferência na sobrevivência do macrófago através de MIF, inativando P53 e interferindo no ciclo celular, pode permitir a sobrevivência do fungo ao microambiente do hospedeiro. O papel de MIF mimetizando uma citocina pode revelar novos fatores de virulência para a infecção pelo *P. brasiliensis*. Esse fenômeno sugere que caso seja confirmada a expressão de uma proteína homóloga a MIF em *P. brasiliensis*, o seu estudo favorecerá a elucidação de informações sobre o mecanismo de patogenicidade do fungo.

Objetivos e estratégia experimental

O objetivo geral desse trabalho é a clonagem e caracterização do cDNA completo do gene homólogo ao fator inibitório de macrófago (MIF) do fungo dimórfico *Paracoccidioides brasiliensis*.

Estratégia experimental:

1. Clonagem e sequenciamento do clone de cDNA similar a MIF isolado de biblioteca de *P. brasiliensis*.
2. Confirmação do perfil de expressão diferencial do gene mif (*Northern blot*).
3. Clonagem do fragmento de cDNA correspondente ao MIF no vetor de expressão pET 21 a (Novagen) fusionado a uma cauda de histidina.
4. Expressão de MIF recombinante na linhagem BL21(DE3)-pLys S de *Escherichia coli*.
5. Confirmação da expressão heteróloga da proteína de fusão por SDS-PAGE e *Western blot*.

Justificativa:

A detecção e caracterização de um homólogo de fator inibitório de macrófago (MIF) no *Paracoccidioides brasiliensis* é um relato inédito para fungos; caso se confirme o papel de MIF mimetizando uma citocina podem ser identificados novos fatores de virulência para a infecção pelo *Paracoccidioides brasiliensis*. É importante ressaltar que foi demonstrado uma molécula homóloga a MIF em nematóides biologicamente ativa em macrófagos (Zang *et al.*, 2002). Portanto, pela coevolução dos patógenos com o sistema imunitário, estes poderiam empregar estratégias relevantes para a evasão das defesas do hospedeiro, desenvolvendo assim moléculas homólogas a citocinas. Este seria o caso do MIF de *P. brasiliensis*. Desta forma, uma nova faceta da relação patógeno-hospedeiro pode ser postulada. A compreensão desses mecanismos miméticos pode sugerir novas formas de intervenção no tratamento da paracoccidioidomicose (PCM).

MATERIAL

1. Meios de Cultura- *Escherichia coli*

Meio Luria-Bertani (LB)

Peptona de caseína	1,0% (p/v)
Extrato de Levedura	0,5% (p/v)
NaCl	1,0% (p/v)
pH = 7,2	

Meio LB ágar (LA)

Meio LB adicionado de ágar bacteriológico a 1,5% (p/v)

Meio 2XYT

Peptona de caseína	1,6% (p/v)
Extrato de levedura	1,0% (p/v)
NaCl	0,5% (p/v)
pH = 7,2	

Meio SB

Triptona	3,0% (p/v)
Extrato de levedura	2,0% (p/v)
MOPS	1,0% (p/v)
pH = 7,0	

Meio SOB

Bacto-triptona	2,0% (p/v)
Extrato de levedura	0,5% (p/v)
NaCl	10 mM
KCl	2,5 mM
pH = 7,0	

Meio SOC

Ao meio SOB foram adicionadas as seguintes soluções estéreis, nas concentrações finais indicadas:

Glicose	20 mM
MgCl ₂	10 mM
MgSO ₄	10 mM

Os meios foram autoclavados a 120° C por 20 minutos.

2. Antibióticos e soluções utilizadas para seleção de transformantes:

Ampicilina

Solução estoque: 50 mg/mL em água estéril.

Estocar protegida da luz, a -20° C.

Concentração final de uso: 100 µg/mL. No caso de células transformadas por eletroporação, a concentração final utilizada é de 200 µg/mL.

Tetraciclina

Solução estoque: 20mg/mL em etanol 70%

Concentração final de uso: 30µg/mL.

Cloranfenicol

Solução estoque: 20 mg/mL em etanol

Concentração final de uso: 20 µg/mL

IPTG (isopropil-β-D-tiogalactosídeo)

Solução estoque: 100 mM de IPTG em H₂O. Solução esterilizada por filtração em membrana Millipore® de 0,2 µm.

X-Gal (5-bromo-4-cloro-3indolil- β -Dgalactopiranosídeo)

Solução estoque: 2,5% de X-Gal dissolvida em N-N-dimetilformamida. A solução é estocada em vidro ou tubo de polipropileno a -20°C , protegido da luz.

3. Linhagens bacterianas :

Tabela 1. Linhagens de *Escherichia coli* utilizadas.

Linhagem	Genótipo
XL 1-Blue (utilizada para amplificação de plasmídeos)	<i>rec A 1 endA1 gyr A 96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacI^qZΔM15 Tn10(<i>tet^r</i>)]</i>
BL-21 (DE 3)pLysS (utilizada para produção de proteína recombinante)	<i>hsdSgal (λcIts857) ind1 Sam7 nin5 lacUV5-T7 gene1</i>

4. Plasmídeos utilizados:

-pGEM-T Easy: 2.975 pb, ori fl, amp^r, promotores T 7 e SP6, lacZ, múltiplos sítios de clonagem (Promega[®], Madison, Wisconsin). O pGEM-T Easy é obtido à partir do corte do vetor pGEM[®], -5Zf(+) com *EcoRV*, e a adição de timidina às porções 3' das duas extremidades. Esta timidina que se sobressai na porção 3' aumenta a eficiência de ligação dos produtos de PCR, por prevenir a religação do vetor, e por fornecer extremidades compatíveis com produtos de PCR que tiveram adeninas acrescentadas às suas extremidades, o que pode ocorrer com o uso de determinadas *Taq* DNA Polimerases, que apresentam atividade de terminal deoxinucleotideo-transferase.

-pET 21a : vetor de fusão de 5.443 pb, oriPbr322, amp^r, promotor T7lac, lac I, múltiplos sítios de clonagem (Novagen). É utilizado para a expressão de proteínas fusionadas ao T7-tag na região amino-terminal e ao His-tag, que é muito útil como parceiro de fusão para purificação de proteínas, na região carboxi-terminal. O gene de interesse fica sob controle do promotor T7lac que necessita da RNA polimerase viral proveniente da célula hospedeira. O pET também carrega a seqüência natural promotora e codante do repressor lac (*lac I*) orientado de forma oposta ao promotor T7lac. Dessa forma, o

repressor age tanto no promotor *lacUV5* no cromossomo da célula hospedeira para reprimir a transcrição do gene T7 RNA polimerase pela polimerase da célula quanto no promotor *T7lac*, o vetor, para bloquear a transcrição do gene alvo pela T7 RNA polimerase que é produzida. Isso possibilita que a proteína de interesse somente seja expressa na presença do indutor IPTG, que se liga ao produto do gene *lac I*, levando à sua inativação

5. Enzimas de restrição:

Tabela 2. Enzimas de restrição utilizadas.

Enzima	Sítio de clivagem	Tampão	Temperatura	Fornecedor
<i>EcoR</i> I	G [^] AATT_C	Tampão III	37° C	Qbiogene
<i>Nde</i> I	CA [^] TA_TG	NEB II	37° C	Biolabs
<i>Pvu</i> II	CAG [^] CTG	Tampão B	37° C	Promega
<i>Xho</i> I	C [^] TCGA_G	NEB II	37° C	Biolabs

6. Outras enzimas:

T4 DNA ligase- 400 U/μL (New England Biolabs)

Fosfatase alcalina de camarão- SAP- 1000 U/μL (Boehringer Mannheim)

Taq DNA polimerase-2 U/μL (Cenbiot-RS)

7. Tampões de enzimas:

Tampão de ligação 10 X (New England Biolabs®)

Tris-HCl pH 7.4	0,50 M
MgCl ₂	0,10 M
DTT	0,10 M
Espermidina	0,01 M
ATP	0,01 M

Tampão da Taq DNA polimerase 10X

Tris-HCl pH 8.3	0,1 M
KCl	0,5 M
BSA	0,1%
MgCl ₂	15 mM

Tampão de reação para T4 DNA ligase (10X)

Tris-HCl pH 7.8	50 mM
MgCl ₂	10 mM
DTT	10 mM
ATP	1 mM
BSA	25 (g/mL)

Tampão da SAP (10X)

Tris-HCl pH 8,5	500 mM
Mg Cl ₂	50 mM

8. Soluções de uso geral:**Tampão TE**

Tris-HCl pH 8,0	10 mM
EDTA pH 8,0	1 mM

Glicerol 70%

Glicerol	70% (v/v)
----------	-----------

Solução de equilíbrio

Tris-HCl pH 8,0	100 mM
NaCl	100 mM

Fenol equilibrado

Fenol	1,0 v
β -hidroxiquinolina	0,1% (p/v)
β -mercaptoetanol	0,2% (v/v)

Homogeneizar repetidas vezes com solução de equilíbrio. Estocado protegido da luz e manipulado com luvas.

Clorofane

Fenol (equilibrado em pH 7,6)	1v
Clorofórmio	1v
β -hidroxiquinolina	0,05% (p/v)

Equilibrado com Tris-HCl 100 mM pH 7,6. Estocado protegido da luz e manipulado com luvas.

Clorofil

Clorofórmio	24 v
Álcool isoamílico	1 v

Equilibrado com 0,25 v de tampão TE e estocado protegido da luz.

9. Soluções utilizadas nos protocolos de transformação:**Cloreto de cálcio**

CaCl ₂	100 mM
-------------------	--------

Esterilizar por filtração em membrana Millipore ® de 0,2 μ m.

Estoque de Mg 2+ 2M

MgCl ₂ .6H ₂ O	1M
MgSO ₄ .7H ₂ O	1M

Estoque de glicose 2M

Solução de glicerol 10% (v/v)

Esterilizada por autoclavagem a 120°C por 30 minutos.

10. Soluções para preparação de DNA plasmidial**Solução I**

Tris-HCl pH8,0	50 mM
EDTA pH8,0	10 mM
RNAse A	100 µg/mL

Solução II

NaOH	0,2 M
SDS	1,0% (p/v)
Preparada na hora do uso	

Solução III

Acetato de potássio 5M	60 mL
Ácido acético	11,5 mL
H ₂ O	qsp 100 mL

Utiliza-se o acetato de potássio a uma concentração final de 3 M e o ácido acético a 2M. pH= 5,5.

RNAse A

RNAse A	10 mg/mL
---------	----------

Dissolvida em tampão acetato de sódio 50Mm (pH 4,8) e fervida em banho-maria por 20 minutos. Estocada a -20°C.

11. Soluções para eletroforese em gel de agarose:

Tampão de Corrida Tris-Borato TEB (10X)

Trizma base 0,89 M

Ácido bórico 0,89 M

EDTA 0,02 M

O pH é ajustado para 8,0 com ácido bórico.

Tampão de amostra para DNA/RNA (10X)

Glicerol 50% (v/v)

Azul de bromofenol 0,1% (p/v)

Xilenocianol 0,1% (p/v)

Tampão de corrida TEB 10X 50% (v/v)

Solução de brometo de etídio

Brometo de etídio 10 mg/mL

12. Soluções para eletroforese em gel de poliacrilamida:

Solução estoque acrilamida 30% (29:1)

Acrilamida 20%(p/v)

Bis-acrilamida 1% (p/v)

Filtrar e estocar na geladeira protegida da luz

Solução de Persulfato de Amônio (APS)

Persulfato de Amônio 10% (p/v)

TEMED (N,N,N',N'-tetrametietilenodiamina)

Foi utilizado o reagente TEMED da Companhia Organic Research.

Gel concentrador SDS-PAGE

Solução Acrilamida/Bis-acrilamida

29:1	4%(p/v)
Tris-HCl pH 6,8	125mM
SDS	0,1%(p/v)

Gel separador SDS-PAGE**Solução Acrilamida/Bis-acrilamida**

29:1	12%(p/v)
Tris-HCl pH 8,8	400mM
SDS	0,1%(p/v)

Tampão de Corrida para SDS-PAGE (Tris-Glicina)

Trizma base	125 mM
Glicina	960 mM
SDS	0,5% (p/v)
PH= 8,3.	

Tampão de amostra 2X para proteína

Tris-HCl pH 6.8	200 mM
SDS	4% (p/v)
Glicerol	20% (v/v)
β-mercaptoetanol	4% (v/v)
Azul de bromofenol	0,1%(p/v)

Solução Corante de Azul de Coomassie para Gel SDS-PAGE

Metanol	40%(v/v)
Ácido acético	10%(v/v)
“Coomassie Blue (R-250)”	1% (p/v)

Solução Descorante para Gel de SDS-PAGE

Metanol	40% (v/v)
Ácido acético	105 (v/v)

13. Soluções para *Western Blot*

Tampão PBS (*Phosphate-Buffered Saline*) 10X pH7,4

NaCl	1,37 M
KCl	2,7 M
Na ₂ HPO ₄	1,2 M
KH ₂ PO ₄	1,2 M
NaN ₃	0,02% (p/v)

Tampão PBST

PBS 1X adicionado de Tween 20 a 0,05% (v/v)

Tampão de Fosfatase Alcalina (*Alkaline Phosphatase Buffer-APB*)

Tris-HCl pH 9,5	100 mM
NaCl	100 mM
MgCl ₂	5 mM

Tampão para Transferência Semi-Seca de Proteínas

Trizma-base	48 mM
Glicina	39 mM
SDS	0,037% (p/v)
Metanol	20% (v/v)

Solução de bloqueio

BSA	3% (p/v)
Dissolvido em PBS 1X	

Solução reveladora para *Western Blot*

O NBT (Nitro Blue Tetrazole) e o BCIP (5-Bromo-4-Chloro-indolil fosfato) foram preparados em uma solução estoque de 50 mg/mL (Pierce), sendo o NBT dissolvido em N,N-dimetil formamida 70% enquanto o BCIP em água. Para preparar 10mL de solução reveladora adicionava-se 66µl do estoque de NBT e 33µl do estoque de BCIP em 10 mL de APB, nesta ordem para evitar a formação de precipitado.

Membrana de nitrocelulose

Hybond C+ (Amersham Biosciences)

14. Anticorpos e conjugados para *Western Blot*

Anti-HIS tag (Santa Cruz, SC 804)

Anticorpo IgG produzido em coelho, anti-HIS tag.

“Anti-Rabbit-IgG(Fc) Alkaline Phosphatase Conjugated”(PIERCE[®], nº de catálogo: 31341)

Anticorpo IgG produzido em cabra, anti-IgG de coelho, conjugado a fosfatase alcalina.

15. Soluções para *Northern-blot*

MOPS/EDTA 10X

MOPS 0,2 M

Acetato de sódio 50 mM

EDTA pH 8,0 10 mM

Ajustar o pH para 7,0 com NaOH 0,2M. A solução deve ser mantida em frasco escuro, a 4 °C.

Tampão de amostra para eletroforese desnaturante de RNA

Formamida deionizada	0,75 mL
MOPS/EDTA 10X	0,15 mL
Formaldeído	0,24 mL
H ₂ O	0,10 mL
Glicerol 100%	0,10 mL
Azul de bromofenol 10%	0,08 mL

SSC 20X

NaCl	3,0 M
Citrato Trissódico	0,3 M

Ajustar o pH para 7,0. Esta solução deve ser filtrada ou autoclavada após o preparo.

SSPE 20X

NaCl	3,6 M
NaH ₂ PO ₄	0,2 M
EDTA	0,02 M

Ajustar o pH para 7,4 com NaOH. Esta solução deve ser filtrada ou autoclavada após o preparo.

DEPC 0,1% (v/v)**Membrana de Nylon**

Hybond N+ (Amersham Biosciences)

16. Reagentes e Kits utilizados:

“BenchMark™ Pré-stained Protein Ladder” (Invitrogen Life Technologies) – Marcador de massa molecular pré-corado para eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE).

Cubetas de 0,2 cm – Utilizadas para eletroporação no equipamento Gene Pulser com Pulser Controller da Bio-Rad (Bio-Rad, número de catálogo 165-2086)

Glicogênio – 20 mg/mL (Invitrogen, número de catálogo: 10814-010)

High DNA Mass™ Ladder (Invitrogen, número de catálogo: 15618-010)

Marcador de Massa Molecular 1kb Ladder™ – (Invitrogen, número de catálogo: 15615-016)

Marcador de Massa Molecular 1kb Plus Ladder™ (Invitrogen, número de catálogo: 10787-026)

“pGEM-T®Easy Vector System I” (Promega, número de catálogo:A3600)

QIAprep Spin Miniprep kit- usado para preparação de plasmídios para o sequenciamento automático. (QIAGEN, número de catálogo: 27106)

QIAquick Gel Extraction kit (QIAGEN, número de catálogo: 28704)

Wizard®SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, número de catálogo: A9281)

Os Kits foram utilizados de acordo com a instrução dos fabricantes.

17. Oligonucleotídeos dos vetores

-Universal para M13

5'-CCCAGTCACGACGTTGTAAAACG-3'-23mer

- Reverso para M13

5'-AGCGGATAACAATTTACACAGG-3'-23 mer

-T3

5' ATTAACCCTCACTAAAGGGA-3'-20 mer

-T7 5'TAATACGACTCACTATAGGG-3'-20mer

METODOLOGIA

1. Desenho dos oligonucleotídeos para amplificação e clonagem da ORF do PbMIF, a partir da sequência de nucleotídeos do cDNA.

A estratégia para expressão heteróloga da ORF do PbMIF (ORF do inglês: *Open Reading Frame* do MIF de *P.brasiliensis*) envolveu sua amplificação (a partir do respectivo cDNA), seguido por clonagem no vetor de expressão de *E. coli*, pET21a (Novagen). Os oligonucleotídeos utilizados nesses experimentos foram desenhados a partir da análise da sequência nucleotídica do cDNA *pbmif*, flanqueando os prováveis códons de iniciação e terminação da tradução e adicionando-se à sequência, sítios de enzimas de restrição visando a clonagem no vetor escolhido.

As características dos oligonucleotídeos desenhados durante esse trabalho, encontram-se esquematizadas na tabela 3.

Tabela 3. Características dos oligonucleotídeos utilizados.

Nome	Sequência ^a (5'→3')	Tamanho	GC (%)	Tm ^b (°C)	Sítios de restrição

MIF5'	CCACATATGCCTTTCATTGAGCT	23	43,4	57	<i>NdeI</i>
MIF3'	ACCCTCGAGTGCACCATAATTTAGCT	26	46,1	60	<i>XhoI</i>

^a As posições dos sítios de restrição encontram-se sublinhadas nas seqüências dos oligonucleotídeos.

^b Método para cálculo da Tm: $Tm = [2(A+T) + 4(G+C)]$ (Silva-Pereira, 2003)

2. Amplificação da ORF do PbMIF para clonagem no vetor de expressão.

Foram utilizados 40 ng do cDNA *pbmif* em um sistema de amplificação de 50µL, contendo: tampão de reação 1X; 1,5mM de MgCl₂; 0,2mM de cada dNTP; 0,2 µM de cada oligonucleotídeo (MIF5' e MIF3') e 2U da enzima *Taq* DNA polimerase (Cenbiot/RS-Brasil).

A amplificação foi realizada de acordo com as seguintes etapas:

- Desnaturação: 94°C por 3 minutos.
- Anelamento: 42°C por 1 minuto.
- Extensão: 72°C por 2 minutos.
- Desnaturação: 94°C por 4 minutos.
- Repetição das etapas a-d por 4 vezes.
- Anelamento: 55°C por 1 minuto.
- Extensão: 72°C por 2 minutos.
- Desnaturação: 94°C por 1 minuto.
- Repetição das etapas a-i por 19 vezes.
- Anelamento: 55°C por 1 minuto.
- Extensão final: 72°C por 10 minutos.

O fragmento obtido na reação de PCR após ser analisado por meio de eletroforese em gel de agarose 1% foi purificado utilizando o kit "QIAquick Gel Extraction"(Qiagen) e utilizado para clonagem no vetor pGEMT (Promega). Posteriormente, foi digerido com as enzimas de restrição *XhoI* e *NdeI* e clonado no pET21a (Novagen). Esse fragmento de DNA, correspondendo à ORF do PbMIF, também foi usado como sonda em um experimento de *northern blot*, descrito a seguir.

3. Clonagem da ORF do PbMIF no vetor pGEMTe (Promega)

Os fragmentos obtidos por PCR, com os primers MIF5' e MIF3', referentes à ORF do PbMIF após serem analisados por meio de eletroforese em gel de agarose 1% (m/v), foram purificados e clonados no vetor pGEMT-Easy (Promega), de acordo com as instruções do fabricante. A reação de ligação foi efetuada utilizando-se uma razão molar de 1:6 (vetor: inserto), de acordo com as instruções do fabricante. Após incubação a 4°C durante a noite, o sistema de ligação foi utilizado para transformar células eletrocompetentes da linhagem XL1-Blue. Após a obtenção de clones recombinantes, os plasmídeos preparados foram analisados por perfil de restrição e um clone positivo foi submetido ao sequenciamento automático para confirmação da sequência.

4. Clonagem da ORF do PbMIF no vetor de expressão pET21a (Novagen)

O fragmento de cDNA correspondente à ORF do PbMIF, obtido conforme descrito anteriormente, foi clonado no vetor de expressão pET21a (Novagen). Inicialmente, este vetor foi usado para transformar células de *E.coli* da linhagem XL1-blue, por eletroporação, no intuito de manter o plasmídeo em uma linhagem de células mais estável. A reação de ligação constituiu em uma razão molar de 1:5 (vetor: inserto), de acordo com as instruções do fabricante. Após incubação a 16°C durante a noite, o sistema foi utilizado para transformar células eletrocompetentes da linhagem XL1-blue de *E.coli*. Após preparação do plasmídeo intacto, a partir de um clone recombinante confirmado por perfil de restrição, este foi quantificado para sequenciamento automático e usado para transformar a linhagem BL21(DE3)-pLysS de *E.coli* para expressão heteróloga da proteína recombinante de interesse.

5. Preparação de Células Eletrocompetentes (adaptado de Rader *et al.*, 2000)

Uma colônia isolada da linhagem XL1-blue de *E.coli* foi inoculada em 10 mL de meio SB, contendo tetraciclina a uma concentração final de 30µg/mL, e cultivada durante a

noite a 37°C sob agitação a 250 rpm. Na manhã seguinte, 7,5 mL desse pré-inóculo foi inoculado em 250 mL de meio SB em um Erlenmeyer de 1L contendo 25 mL de glicose 20% (p/v) e 25 mL de MgCl₂ 1M, na ausência de antibiótico. Os frascos foram então incubados a 37 °C sob agitação a 250 rpm, até o inoculo atingir uma densidade de células medida como OD₆₀₀= 0,7. Após atingir essa taxa de crescimento, os frascos foram resfriados no gelo, assim como todo o material e soluções a serem usados posteriormente (frascos de centrifugação, pipetas, ponteiros, microtubos, etc.). A cultura foi centrifugada a 3.000xg por 20 minutos a 4°C, sendo o sobrenadante descartado. O sedimento de células foi submetido a sucessivas lavagens em diferentes volumes de glicerol 10% gelado, seguido por centrifugação, como descritas a seguir: inicialmente, o sedimento foi ressuspensão em 25 mL de glicerol 10%(v/v) e o volume final completado com glicerol 10% para 100mL. As células foram novamente centrifugadas nas condições anteriores e o sedimento ressuspensão em um volume final de 50 mL. Após nova centrifugação o sedimento era ressuspensão em um volume final de 25 mL. Por fim, uma nova centrifugação era realizada e o sedimento de células era ressuspensão em um volume residual de glicerol (tipicamente 1 a 2 mL). Alíquotas de 100µl eram distribuídas em microtubos e em seguida congeladas em banho álcool/gelo seco ou N₂ líquido e estocadas a - 80°C.

6. Transformação de células competentes (*E.coli*) – Eletroporação - (adaptado de Maranhão,2000)

Uma alíquota de células eletrocompetentes era descongelada em um banho gelo-água. A uma alíquota de 100µL dessas células, em um microtubo gelado, era adicionado 20ng de DNA plasmidial ou até 5µL do sistema de ligação, e o tubo era então incubado no gelo por cerca de 20 minutos. Com o auxílio de uma micropipeta a mistura células/ DNA era colocada em uma cubeta de eletroporação pré-resfriada, com um espaço de 0,2 cm entre os eletrodos (BioRad). As eletroporações eram realizadas no aparelho “BioRad eletroporator” segundo os parâmetros: 2,5kV/200Ω/25 µF com uma duração de pulso de aproximadamente 5 milissegundos. Imediatamente após o pulso era adicionado à cubeta 1 mL de meio SOC à temperatura ambiente e o conteúdo transferido para um tubo tipo

Falcon de 50 mL, a cubeta era lavada mais duas vezes com 1 mL de meio SOC totalizando 3 mL de meio de cultura. O tubo Falcon era incubado a 37°C sob agitação (250 rpm) por 1 hora. Eram plaqueados 100 µL do sistema de transformação contendo o plasmídio intacto fazendo diluições quando necessárias. Quando se tratava de um sistema de ligação, as células eram sedimentadas por centrifugação, ressuspensas em 300µL de meio SOC e plaqueados 100-200µL da suspensão de células em meio LB ágar contendo o antibiótico apropriado na concentração adequada. As placas eram incubadas a 37°C por aproximadamente 16 horas.

7. Preparo e transformação de células de *Escherichia coli* competentes congeladas pelo método de cloreto de cálcio (adaptado de Sambrook *et al.*, 2001)

Inoculavam-se 50 mL de meio LB com 50µL de um pré-inóculo de *Escherichia coli* crescido durante a noite. Incubavam-se a 37 °C sob agitação até a cultura atingir uma densidade óptica a 600 nm de 0,5. Em seguida, a cultura era submetida à centrifugação a 5000 rpm a 4 °C por 5 minutos. O sedimento era ressuscitado em 30 mL de solução de CaCl₂ 100mM estéril gelada com uma suave agitação. A seguir as células eram incubadas no gelo por 30 minutos. Após este período de incubação as células eram submetidas a uma nova centrifugação durante 7 minutos a 5.000 rpm a 4°C. O sobrenadante era descartado e o sedimento ressuscitado em 5 mL de solução gelada de CaCl₂ 100mM/ glicerol 15% (v/v) estéril. Neste ponto, as células eram consideradas competentes e poderiam ser utilizadas imediatamente para transformação ou congeladas em alíquotas de 100µL em nitrogênio líquido e estocadas a -80 °C. Quando as células congeladas eram utilizadas para transformação, estas eram descongeladas em gelo por pelo menos 30 minutos antes de serem utilizadas. A transformação era feita utilizando-se 100 a 500 ng de DNA e 50µL de células (em tubos *ependorf* estéreis). O tubo era agitado suavemente e deixado em repouso no gelo por pelo menos 30 minutos. Em seguida, aplicava-se um choque térmico a 37°C por 3 minutos e os tubos recolocados no gelo imediatamente. Adicionavam-se 200µL de meio LB aos tubos submetidos ao choque térmico e incubava-se por 1 hora a 37°C para crescimento das células. Um volume de 50- 100 µL de células transformadas eram

semeadas em placas contendo meio LB ágar com 100 µg/mL do agente seletivo específico. As placas eram mantidas a 37°C durante a noite.

8. Preparação de DNA plasmidial

As extrações de DNA plasmidial em pequena e média escala foram feitas pelo método de lise alcalina de acordo com o protocolo padrão (Sambrook *et al.*, 2001). Alternativamente, foi empregado o kit QIAgen (QIAprep Spin Miniprep kit) seguindo-se as instruções fornecidas pelo fabricante. O DNA plasmidial purificado foi ressuspensão em água milliQ, analisado por meio de eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio, e quantificado por espectrofotometria.

9. Digestão do DNA com enzimas de restrição

As digestões dos plasmídeos com enzimas de restrição eram realizadas conforme instruções do fabricante.

10. Sequenciamento automático

O sequenciamento automático realizado nesse trabalho empregou cerca de 100ng de DNA plasmidial (purificado com o kit Wizard®SV Gel and PCR Clean-Up System), 5 picomoles do oligonucleotídeo adequado, o kit “DyEnamic ET DYE Terminator Cycle Sequencing” (Amersham Biosciences) e o sequenciador MegaBACE 500 plus Molecular Dynamics, disponível no Laboratório de Biologia Molecular da Universidade de Brasília.

11. Análise da sequência de nucleotídeos

As seqüências de nucleotídeos obtidas pelo seqüenciador automático são diretamente submetidas ao programa PhPh (<http://adenina.biomol.unb.br/phph>) para a leitura dos cromatogramas e filtragem para retirada de seqüência dos vetores. Os programas BLAST (NCBI) e Fasta 3.0 foram utilizados para análise da seqüência de interesse em banco de dados. As análises das seqüências também foram feitas utilizando-se o programa BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>) (Hall, 1999).

12. Análise da expressão diferencial pelo experimento de *northern blot*

As condições de eletroforese em gel de agarose desnaturante e transferência para a membrana de nylon (Hybond N⁺- Amersham), bem como as condições de preparo da sonda, hibridização e lavagem foram realizadas conforme rotina estabelecida no Laboratório de Biologia Molecular Universidade de Brasília (Silva-Pereira *et al.*, 1992; Venâncio *et al.*, 2002). Nesse experimento foram utilizados cerca de 15µg de RNA total de células de levedura (L) e micélio (M).

Síntese da sonda

A sonda utilizada para experimentos de “northern blot” consistiu do produto de PCR purificado correspondente ao cDNA da ORF do PbMIF como descrito no item 2. Cerca de 25 ng desse fragmento de cDNA foram marcados pela técnica de “random priming” com (α -³² P) dATP utilizando-se o kit Megaprime (Amersham Bioscience) de acordo com o protocolo descrito pelo fabricante. A sonda foi purificada por meio de colunas MicroSpin S300 (Amersham Bioscience) seguindo instruções do fabricante, sendo a radioatividade incorporada quantificada pelo “Liquid Scintillator Analyzer” 1600 (Packard Canberra Company). Após desnaturação, a sonda foi utilizada na hibridização da membrana preparada anteriormente.

Hibridização e Lavagem

A membrana foi submetida a uma pré-hibridização por 2 horas a 42°C em solução de hibridização (50% formamida; SSPE 4X; Solução de Denhardt 5X; 0,5% SDS acrescido de 100µg/mL de DNA de esperma de arenque desnaturado). Após esta etapa, as membranas foram hibridadas durante a noite com a sonda nas mesmas condições descritas na pré-hibridização. Seguiram-se à hibridização sucessivas lavagens da membrana até uma estringência final de 0,1X SSPE, SDS 0,1% a 65°C por 20 minutos. A membrana foi exposta à tela sensível do aparelho Typhoon 9210-Variable Mode Imager (Molecular Dynamics, GE) para varredura e interpretação, por um período de tempo adequado.

13. Expressão heteróloga em *E.coli*

Preparo de células competentes para transformação por choque térmico (uso imediato)

As células foram preparadas pelo método de cloreto de cálcio, conforme descrito anteriormente no item 7.

Na manhã seguinte à transformação, para seleção do melhor clone recombinante, cerca de 50 clones eram repicados em duas placas de Petri, na ausência e na presença do indutor IPTG (1mM). Desta forma, os melhores clones eram selecionados, isto é, aquele que crescia mais na placa sem indutor do que na placa com IPTG, sugerindo provavelmente um maior nível de expressão da proteína de interesse.

Curva de indução

Com o intuito de estabelecer as melhores condições de expressão da proteína de fusão T7-tag/*PbMIFORF*/His-tag (*PbMIF* recombinante), foi feita uma curva de indução da expressão em pequena escala. Para tanto, uma colônia isolada de um clone recombinante contendo a construção de interesse (pET 21a-*PbMIFORF*) foi inoculada em 20 mL de meio 2XYT. Uma cultura bacteriana controle (contendo o vetor pET21a) foi utilizada em paralelo nesse experimento. Após crescimento a 37°C, sob agitação, até atingirem uma OD₆₀₀=0,8, uma alíquota de 1 mL de cada cultura foi coletada (controle negativo- sem indução 0h), sendo em seguida adicionado o indutor IPTG (1mM concentração final) às culturas. Seguindo a adição de IPTG, foram coletadas alíquotas de 1 mL de cada cultura,

nos intervalos de tempo de 2 horas e 4 horas para análise da cinética de indução. Após a leitura da OD₆₀₀ de cada amostra, as células foram coletadas por centrifugação (10.000xg por 10 minutos a temperatura ambiente) e em seguida, ressuspensas em 100µL de tampão de amostra SDS-PAGE 2X. Cerca de 15 µL das amostras foram a seguir desnaturadas (100°C por 5 minutos) e analisadas por meio de eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida 12% (SDS-PAGE). Esse mesmo gel foi repetido e transferido para membrana de nitrocelulose, para experimento de *western blot* utilizando anticorpo anti-polihistidina.

14. Análise dos extratos protéicos de *E. coli* por SDS-PAGE (Laemmli *et al*, 1970).

As proteínas eram analisadas em gel desnaturante de poliacrilamida a 12 %. Eram preparados dois géis de 1,0 mm de espessura, que eram utilizados simultaneamente em um aparato de eletroforese submetido a uma corrente elétrica constante de 25mA. As amostras eram preparadas na presença de tampão de amostra contendo 5% de β-mercaptoetanol (v/v), fervidas por 10 minutos e aplicadas no gel de poliacrilamida logo em seguida. Após o término da eletroforese um dos géis era corado com uma solução de azul de Coomassie por aproximadamente seis horas sob leve agitação enquanto que o outro era utilizado na transferência das proteínas para uma membrana de nitrocelulose para o experimento de imuno-deteção (*western blot*).

15. Transferência das proteínas para a membrana de nitrocelulose e imunodeteção

Eram cortadas doze folhas de papel de filtro Whatmann e uma membrana de nitrocelulose (Hybond C+) do mesmo tamanho do gel a ser utilizado na transferência. Depois de terminada a corrida eletroforética, era montado sobre a plataforma do pólo positivo do aparelho de transferência de proteínas semi-seco (Macrodrive 1 Power Supply-LKB Bromma 2301), um “sanduíche” da seguinte forma : 6 folhas de papel de filtro Whatmann (cerca de 3 mm) umedecidos em tampão de transferência, uma membrana de nitrocelulose umedecida em tampão de transferência, o gel, 6 folhas de papel de filtro Whatmann (cerca de 3 mm) também umedecidos no mesmo tampão de transferência. Após

remoção das bolhas de ar o aparelho era fechado e submetido a uma corrente elétrica constante igual a 0,8 vezes a área do gel, pelo período de 1 hora. Depois de terminada a transferência, a membrana era corada com vermelho de Ponceau para verificar a eficácia da transferência. Após a remoção e lavagem em água destilada, adicionava-se a solução de bloqueio e a membrana era então incubada durante a noite a 4 °C, sob leve agitação. A solução de bloqueio era removida e a membrana lavada com PBST por três vezes. Uma solução de anticorpo primário (anticorpo IgG produzido em coelho, anti-HIS tag/titulação 1: 2500) era incubada por 1 hora a temperatura ambiente. A solução de anticorpo era então removida e a membrana lavada 3X com PBST. Uma solução do anticorpo secundário (anticorpo IgG produzido em cabra, anti-IgG de coelho, conjugado a fosfatase alcalina./ titulação 1:5000) era adicionada à membrana que era incubada por 1 hora a temperatura ambiente. A solução de anticorpo secundário era removida e a membrana lavada por três vezes com PBST. Era adicionada a solução reveladora NBT/BCIP a qual era incubada, sob leve agitação, até o aparecimento dos sinais correspondentes à interação antígeno-anticorpo (proteína imobilizada- anticorpo primário- anticorpo secundário). A reação de revelação era interrompida por sucessivas lavagens com água destilada e as membranas eram secas sobre um papel de filtro, a temperatura ambiente.

16. Análise da filogenia do MIF de *P. brasiliensis*

Para o cálculo da filogenia do MIF de *P. brasiliensis* foi utilizado o alinhamento das seqüências de aminoácidos produzidos no programa Bioedit. Posteriormente, foi empregado o programa PHYLIP com o algoritmo *Neighbour Joining*. (<http://www.hku.hk/bruhk/phylip.html>).

Resultados e Discussão

1. Obtenção do cDNA de MIF

A habilidade de *P.brasiliensis* iniciar a infecção, invadir o tecido do hospedeiro e sobreviver perante suas defesas está ligada a indução de genes específicos, que possibilitam a sobrevivência e eventual estabelecimento da infecção. A descoberta de fatores em *P. brasiliensis* que modulam a atividade de macrófagos pode contribuir com esse conhecimento.

A análise das ESTs geradas pelo Projeto Genoma de *P.brasiliensis* (Rede Centro-Oeste) mostra uma contig (1528), com um fragmento de aproximadamente 400pb, expressa na fase de levedura e com uma sequência prevista de aminoácidos com similaridade gênica com o MIF de diversos organismos, indicando um envolvimento potencial na patogênese do *P.brasiliensis*. Consideramos essa ORF para a caracterização do MIF de *P.brasiliensis* (Pb). Esse contig era formado por duas ESTs (PBDMF-M1-008t_C10.esd e PBDEX-Y1-051t_C02.esd) isoladas da biblioteca de cDNA de *P. brasiliensis* (figura 1). O clone C02 de cDNA foi escolhido para sequenciamento e identificação da sequência completa do PbMIF (figura 2).



Figura 1. Esquema indicando as duas ESTs isoladas da biblioteca de cDNA de *Paracoccidioides brasiliensis*.

MIF de todos os organismos não possui um peptídeo sinal amino-terminal clássico e o seu mecanismo de secreção é desconhecido. Flieger e colaboradores (2003) demonstraram que a regulação da secreção de MIF é mediada por uma via não clássica envolvendo um transportador ABC. A sequência homóloga a MIF presente no transcriptoma de *P.brasiliensis* também não possui peptídeo sinal clássico (figura 2), assim é possível propor a existência de uma via de secreção envolvendo transportador ABC.

Costa e colaboradores (2005) identificaram ESTs do *P.brasiliensis* relacionadas aos transportadores ABC neste fungo.

1	ACT AGG TGG ATC CCC CGG GCG TGC AGG AAA TTG GAA GCA TCG GAG ATT TCA CCA TTA ATC	
61	AGC CAC TGC TCT TCG CCG CAT TGT GCT AAA ATG CCT TTC ATT GAG CTT CTC ACA AAT GTA	Met Pro Phe Ile Glu Leu Leu Thr Asn Val
121	TGC TCT CTC ACG CGA GCA GAG CAA AGA ACT CGC CCT TTC ACT CTC CAA GGT GTC AGC GAG	Ala Leu Ser Arg Glu Gln Ser Lys Glu Leu Ala Leu Ser Leu Ser Lys Val Ser Ala Arg
181	GAT CCT TAA AAA GCC CGA GTC TTT CAT TTC AGT TCA AAT CCG CTC TGA TGA GGT CTT GAC	Ile Leu Lys Lys Pro Glu Ser Phe Ile Ser Val Gln Ile Arg Ser Asp Glu Val Leu Thr
241	GTT TGC GGG CAC TCA TGA TCC ATG CTT TCA AAT GCG CGT AAC TTC TCT GGG CAA TCT AAA	Phe Ala Gly Thr His Asp Pro Cys Phe Gln Met Arg Val Thr Ser Leu Gly Asn Leu Asn
301	CCC AGA CGA TAA TGT TAA TTT CTC CAA GGC CTT TGC TGA ATT CCT CAA GGA GGA GAT TGG	Pro Asp Asp Asn Val Asn Phe Ser Lys Ala Phe Ala Glu Phe Leu Lys Glu Glu Ile Gly
361	TGT CAC GAA CGA TAG AGG ATA TGT TAT CTT TTA CGA TCC GGA CTA TGC AAA TCT AGG ATA	Val Thr Asn Asp Arg Gly Tyr Val Ile Phe Tyr Asp Pro Asp Tyr Ala Asn Leu Gly Tyr
421	TAA AGG GAC AAC TGG AGC TAA ATT ATG GTG CTG AAG GGG TAA ACG CTT ACA CGC AGA CAT	Lys Gly Thr Thr Gly Ala Lys Leu Trp Cys End
481	GTA AGG CAT GAA ACT GTC GCC CAC CTT GAG GCT TGG GAT TCG CGA GAG GTT ACT TGC ACT	
541	TGT CAT GTT GGC ATG GAG TCT CTT CTT TTT TTC GGC CTG GGA ATA AAA GAA ACC CTT TGC	
601	CAT TTA GCC TGA TAA CGA GAT TTT GCA TCG TTT ATC TAT TTG AAA TTT TAT TTT TTG CTA	
661	CNG CTA ACA TGG TCT TTT TCA AAAAAAAAAAGAAAAA	

Figura 2. Sequência de nucleotídeos do clone C02. A sequência de nucleotídeos está apresentada em caracteres pretos, enquanto a sequência deduzida de aminoácidos é apresentada abaixo da sequência nucleotídica. O aminoácido Prolina está destacado em azul, o “stop códon” está representado em verde.

Como já dito anteriormente, MIF é considerado uma proteína pleiotrópica e possui a estrutura gênica e molecular bem descrita, porém os mecanismos moleculares e a interação do MIF com a célula alvo ainda não são bem definidos. MIF é uma proteína que possui homólogos em plantas, nematóides e vertebrados (Bucala *et al.*, 2001). Comparamos a sequência prevista de aminoácidos do PbMIF com o MIF de diversas espécies a fim de analisarmos a homologia e características do MIF de diferentes organismos com o MIF de *P.brasiliensis*.(figura 3).

%Identidade ao Pb MIF		
1 MPFTELLTNVALSREQSKELALSLSKVSARILKKPESFISVQIRSDEVLTFAGTHDPCFQ	PbMIF	
1 MPTFVIHTNVSA DRV--SASVHDEVTA LVA KALGKPVQYVAHVVPQG LMSFGGTKEPCAL	PmMIF	27%
1 MPTLNLFITNIPVDAVTCSDILKDATKAVAKLIGKPESYVMILLNSGVPIAFAGTEEPAAAY	AtMIF	30%
1 MPTLTINTNIPASKIPNDFLKTT-ANVVADSLGKPLSYVVVHINADQLLSFGGTDDPCAI	AaMIF	30%
1 MPMFIVNTNVPHASVPEGFLS-ELTQQLAQATGKPAQYIAVHVVPDQLMTFSGTNDPCAL	MmMIF	29%
1 MPMFIVNTNVPRASVPEGFLS-ELTQQLAQATGKPAQYIAVHVVPDQLMTFSGTSDPCAL	RnMIF	29%
1 MPVFTIRTNVC--RDSVPDTLLSDLTKQLAKATGKPAEYIAIHIVPDQIMSFQDSTDPCA	XlMIF	25%
1 MPCFTINTNVPSDKVPQDFLKKTSALVAKSLSKPESYVAVRVNPDQMTFGGSADPCAV	AsMIF	28%
1 MPIFTFSTNVPSNISVDFLKSTSKLIAGMLGKPESYVAVHINGGQKITFGGTDAFAGF	TtMIF	33%
1 MPMFVVNTNVPRASVPDGLLS-ELTQQLAQATGKPAQYIAVHVVPDQLMTFGGSSEPCAL	BtMIF	31%
1 MPYFTIDTINIPQNSISSAFLKKA-SNVVAKALGKPESYVSIHVNGGQAMVFGGSEDPCAV	BmMIF	25%
1 MPVFSINNVNLSLDEKKTSLKELSDVIGKLLAKPEKYMCIHINTDQAISFAGTQFAGF	CbMIF	27%
1 MPMFIVNTNVPRASVPEGFLS-ELTQQLAQATGKPPQYIAVHVVPDQLMAFGGSSEPCAL	HsMIF	28%
1 MPIFTINTNIKATDVPSDFLS-STSA LVGNILSKPGSYVAVHINTDQQLSFGGSTKPAAF	TsMIF	30%
1 MPAFTINTNIPQSNVDAFLKKASSTV-AKALGKPESYVAVIHVNGGQAMVFGGSTDPICAV	OvMIF	24%
1 MPFTQINTSSKSVVEND-DLLQKDISKMIAVLTGKPENYVMTMIQRNAKMTFAGSDEPCC	PdMIF	30%
1 MPQLSLTINTVPVDAVVAADIKDCSKALARIIGKPESYVMVSSGSGVPMSFAASEEPAAAY	OsMIF	29%
1 MPLIKLQTSIAALPSDQTSTLLQSLSTTLAQQLGKPERYVMTLLETDPMTFAGTTAPAC	SlMIF	32%
1 MPSTFVLTNKLARSAP-KDFLTETSKLVADILGKPEGCVCVCEADVLMTYGSSDAPCCL	BlMIF	29%
1 MPSFVVNTNVGARADVP-AALLSEAHQRAGNRSCCKPAQYIAVQINTDQMMMFQKGDPCA	TnMIF	28%
1 MPIFVVNTNVAKADVP-VALLSEATNELAKAMGKPAQYIAVHINTDQMMMFQKGDPCAL	TrMIF	28%
1 MPLIKVQTSVAPQKAEIESMLNLNSAKLAKHLGKPESYVMTAFEPFIPMTFAGNTDPVC	NmMIF	30%
1 MPMFIVNTNVPRSSVP-EGLLSELTQQLAQATGKPAQYIAVHVVPDQLMTFGSSDPCAL	MuMIF	28%
1 MPMFTIHTNVCKDAVP-DSLGLGELTQQLAKATGKPAQYIAVHVVPDQMMSFGGSTDPICAL	GgMIF	25%
1 MPMFVVNTNVPRASVP-DGFLSELTQQLVQAMGKPAQYIAVHVVPDQLMAFGGSSEPCAL	GkMIF	27%
1 MPMFVVNTNVPRASVP-DGFLSELTQQLVQAMGKPAQYIAVHVVPDQLMAFGGSSEPCAL	SsMIF	25%
MRVTSIGNLNFDDNVNFSKFAAEFLKEEIGVTNDRGYVIFYDPDYANLGYKGTGA	PbMIF	
AHLSSIGKISPAENKKYSALLSEAMNTHLGIPKDRMYIAFHNDPANVGWNGSTFA	PmMIF	115
GELISIGGLGPGVNGKLSSETISEILQIKLSIDSSRFYIKFYDSPRPFFGYNGST	AtMIF	114
ANLYSIGCLSPKENKKHSAVLFEHIEKTLGIKENRMYINYFDMPSADVGYNGKTF	AaMIF	115
CSLHSIGKIGGAQNRNYSKLLCGLLSDRLHISPDVYINYDMNAANVGWNGSTFA	MmMIF	115
CSLHSIGKIGGAQNRNYSKLLCGLLSDRLHISPDVYINYDMNAANVGWNGSTFA	RnMIF	115
VCSLCSIGKIGGPQNKSYTKLLCDILTKQLNIPANRVYINYDLNAANVGWNGSTFA	XlMIF	115
CTLESIGAVGGSRNNAHAELKYKHLNETLGIPKNRMYISFVIDPTTMAYNGSTFA	AsMIF	115
GQLLSLGGVGGKRNRSYAKLFKHLTDGLGIPGNRMYINFVDMRGSDVGYNGST	TtMIF	113
CSLHSIGKIGGAQNRYSKLLCGLLTERLRISPDRYINFCMDNAANVGWNGSTFA	BtMIF	115
CVLKSIGCVGPKVNNSHAEKLYKLLADELKIPKNRCYIEFVDEASSMAFNGST	BmMIF	113
AVLKSIGGVGTAKQNRNATSDKVPIITQHVGIQDRLYIEFVSLGAADIAFEGHTFA	CbMIF	116
CSLHSIGKIGGAQNRYSKLLCGLLAERLRISPDRYINYDMNAANVGWNGSTFA	HsMIF	115
GTLMSIGGIEPSRNRDHSKALFDHLNKKLGIPKNRMYIHFVNLNGDDVGNNGTT	TsMIF	113
CVLKSIGCVGPNVNNSHSEKLFKLLADELKIPKNRCYIEFVNIDASTMAFNGST	OvMIF	113
IKVQSIGSLNP--SSMSKALCELIASKTNINTNRIYIEFFDVKASNWGFNGSTFG--	PdMIF	115
GELMSIGGIGPGVNGKLSAALAEILETKLSVSRSFYVYKFDDVKGFNLGFNGSTF--	OsMIF	114
VEIKSVGQMKPTQTAQMSRLFCNQIASLCLIASDRIYIEYFDMPSADVGYNGKTFAG-	SlMIF	116
IDLMSIGKLGLEENKHTTAAICDHVKKHLGIPGDRLYNVFFDMDAANVGWDSNTFA--	BlMIF	115
CSLHSIGKISRQNKLYSNLLCGLLHKHLGISPNNRIYINFVMDAANVGWSSDTFA--	TnMIF	115
CSLHSIGKINGAQNQYSKLLCDQLSKHLGISPNNRIYINFVMDAANVGWSSDTFA--	TrMIF	115
EIKSIGTMKPDQTAAMSO-EFCQQINQTLGVPKNNRIYIEYDMNAANVGWNGSTFA--	NmMIF	115
CSLHSIGKIGGAQNRYSKLLCGLLADRLRISPDRYINYDMNAANVGWNGSTFA--	MuMIF	115
CSLHSIGKIGGQNKTYTKLLCDMIAKHLHVSADRVYINYDMNAANVGWNGSTFA--	GgMIF	115
CSLHSIGKIGGAQNRYSKLLCGLLAERLRISPDRYINFEASSMAFNGSTFG--	GkMIF	115
CSLHSIGKIGGAQNRYSKLLCGLLAERLRISPDRYINYDMNAANVGWNG-----	SsMIF	111

Figura 3. Alinhamento das seqüências de aminoácidos de MIF do *Paracoccidioides brasiliensis* / PbMIF com: *Petromyzon marinus* / PmMIF; *Arabidopsis thaliana* / AtMIF; *Amblyoma americanum* / AaMIF; *Mus musculus* / MmMIF; *Rattus norvegicus* / RnMIF; *Xenopus laevis* / XlMIF; *Ascaris suum* / AsMIF; *Trichuris trichiura* / TtMIF; *Bos taurus* / BtMIF; *Brugia malayi* / BmMIF; *Caenorhabditis briggsae* / CbMIF; *Homo sapiens* / HsMIF; *Trichinella spiralis* / TsMIF; *Onchocerca volvulus* / OvMIF; *Prochloron didemni* / PdMIF; *Oryza sativa* / OsMIF; *Synechococcus leopoliensis* / SiMIF; *Branchiostoma lanceolatum* / BLMIF; *Tetraodon nigrovidis* / TnMIF; *Takifugu rubripes* / TrMIF; *Nostoc microscopium* / NmMIF; *Meriones unguiculatus* / MuMIF; *Gallus gallus* / GgMIF; *Gekko gekko* / GkMIF; *Sus scrofa* / SsMIF As regiões destacadas em cinza são regiões de aminoácidos conservadas entre as espécies, além disso encontra-se em azul a Prolina na posição 2, que confere atividade enzimática.

A análise e comparação das seqüências de aminoácidos foi obtida a partir da tradução da seqüência nucleotídica do MIF presente no banco do *P. brasiliensis* através do programa BLAST (do inglês: **B**asic **L**ocal **A**lignment **S**earch **T**ool). O BLAST é o programa mais usado a fim de avaliar a similaridade de seqüências de proteínas e nucleotídeos (Altschul *et al*,1997).

Considerando a similaridade gênica do MIF de *P.brasiliensis* com o MIF dos nematóides *Trichuris trichiura*, *Trichinella spiralis* e *Brugia malayi* é importante ressaltar a habilidade desses organismos de sobreviverem por longos períodos em uma constante interface com o sistema imunitário de seus hospedeiros, através da produção de fatores imunomodulatórios (Tan *et al*,2001), característica também da infecção pelo *P.brasiliensis*.. As moléculas de MIF desses parasitos já foram isoladas e caracterizadas quanto à similaridade e atividade biológica em relação ao MIF de mamíferos (Zang *et al.*; 2002; Pennock *et al.*,1998). Esses estudos permitiram elucidar claramente a atividade enzimática e imunomodulatória dessa citocina. Com 55% de similaridade com o MIF de *P. brasiliensis*, o MIF de *Brugia malayi*, por exemplo, apresentou funções paralelas ao MIF de *Homo sapiens* : são quimiotáticos para monócitos humanos e os ativam para secretar IL-8, TNF α e MIF endógeno; possuem atividade enzimática que é abolida com uma mutação do resíduo amino-terminal de prolina. A atividade biológica e a estrutura cristalográfica é conservada entre o MIF humano e o MIF nematóide, apesar da distância filogenética entre estes organismos (Zang *et al.*; 2002). Essa similaridade permite uma proposição de que mecanismos envolvendo MIF exercem um papel importante nas estratégias de evasão do sistema imunitário pelo parasito.

MIF apresenta atividade enzimática além da característica de citocina e, de acordo com a literatura, um resíduo de prolina na posição 2 é o que determina a atividade de tautomerase (Swoope *et al.*, 1998; Subramanya *et al.*,1996). Porém, pouco se conhece a respeito das interações imunológicas dessa citocina que podem interferir na interação parasito-hospedeiro e que, conseqüentemente, seriam importantes na patogênese e adaptação ao microambiente. Talvez o mecanismo imunológico seja através da atividade enzimática. MIF apresenta características comuns às citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL1 (interleucina 1) mas difere de outras citocinas pró-inflamatórias devido a uma

diversidade de propriedades bem características, dentre elas os aspectos funcionais e estruturais que envolvem a expressão de MIF, a sua localização, a secreção e interação com a célula alvo (Bernhagen *et al* 1998). Convém ressaltar que o TNF é requerido para a persistência do granuloma em *P.brasiliensis* (Souto *et al.*, 2000), permitindo assim uma sugestão de que o MIF também pode estimular a formação e proliferação do granuloma além de interferir no ciclo celular e apoptose do macrófago através da inativação de P53.

A presença de MIF em organismos que não apresentam características de patogenicidade, como por exemplo a planta *Arabidopsis thaliana*, evidencia o papel enzimático como uma característica marcante dessa molécula. Apesar do mecanismo ainda ser desconhecido, já é comprovado que MIF também atua no ciclo celular através de sua atividade enzimática conferida pela prolina na posição 2 (Burguer-Kentischer *et al.*, 2005).

2. Análise da filogenia do MIF de *P. brasiliensis*

A associação íntima e prolongada entre o hospedeiro e agentes infecciosos é capaz de gerar diversidade e mútua adaptação e, conseqüentemente coevolução. A similaridade do MIF de *P.brasiliensis* com outros organismos inclusive com o MIF de *Homo sapiens* (figura 3) permite a consideração de que esse mimetismo molecular é uma estratégia de sobrevivência do *P.brasiliensis*. Apesar do mecanismo molecular de atuação do MIF ainda permanecer obscuro, é importante ressaltar que a homologia manifesta-se principalmente pela atividade enzimática, determinada pela prolina conservada na posição 2.

Uma alternativa à manutenção do gene *mif* em *P. brasiliensis* seria a captura de genes (transferência lateral). Essa possibilidade pode ser descartada diante da análise da filogenia do MIF de *P.brasiliensis*, que está relativamente distante do MIF de *H.sapiens* e outros mamíferos (figura 4).

Para entender a evolução da proteína MIF foi construída uma árvore filogenética com diversas seqüências de aminoácidos encontradas em praticamente todos os Reinos. É possível observar que o MIF é um peptídeo bem distribuído na natureza, porém é único no Reino Fungi. Mesmo com a determinação do genoma de diferentes espécies de fungos, a presença de possíveis homólogos ainda não foi detectada (Magee *et al*, 2003). É possível

que os outros fungos tenham perdido esse peptídeo ao longo da evolução, enquanto o *P.brasiliensis* provavelmente manteve sua cópia através de pressão seletiva.

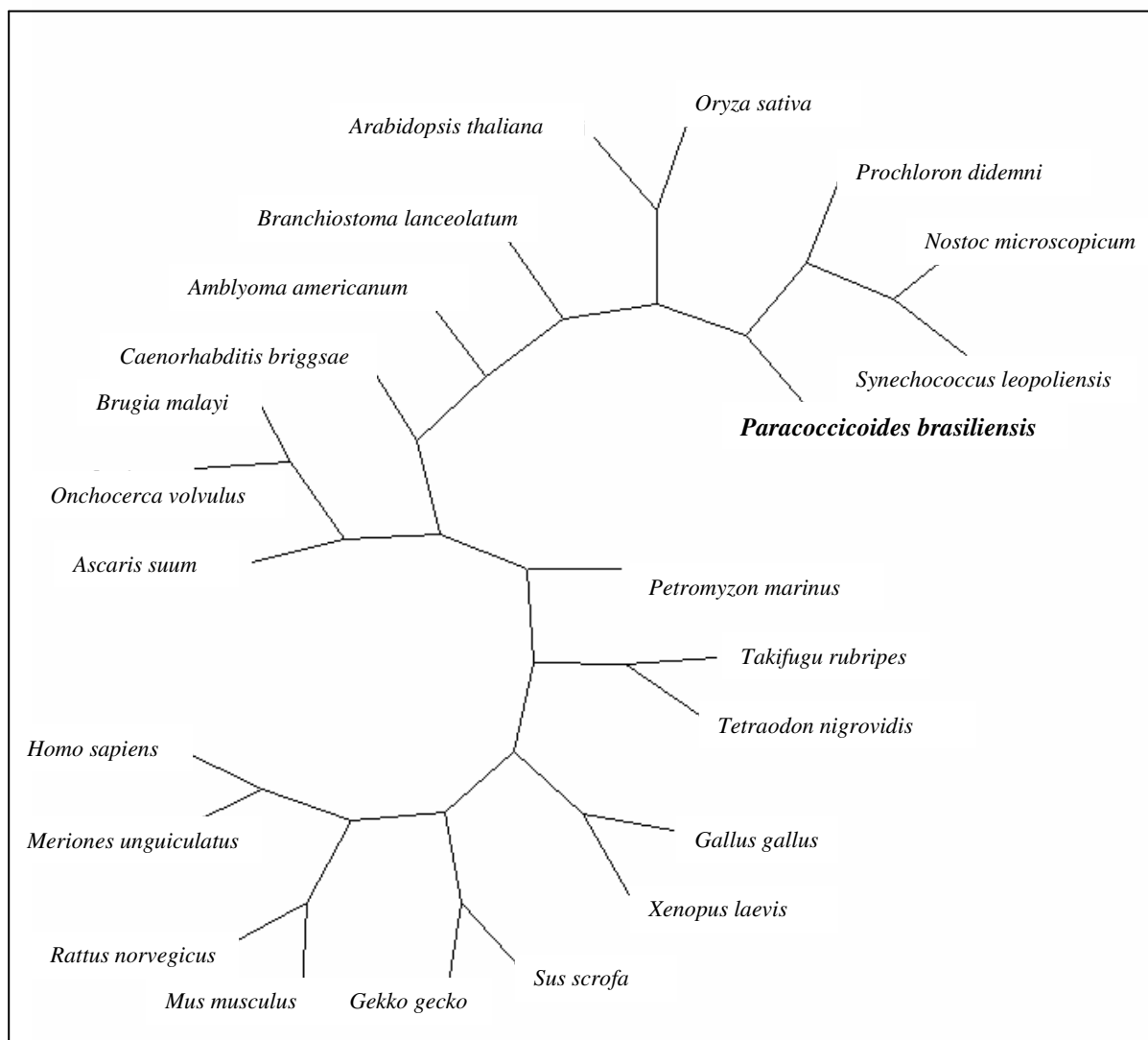
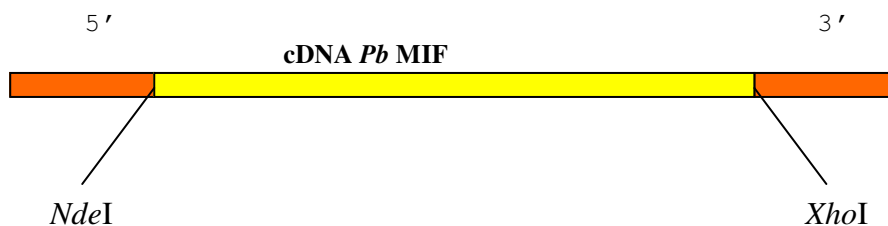


Figura 4 Árvore filogenética do MIF de *Paracoccidioides brasiliensis*

Com o objetivo de obter um fragmento de DNA contendo a ORF do PbMIF para análise da expressão diferencial por *Northern blot* e clonagem em vetor de expressão, procedemos a amplificação da ORF do PbMIF. Foram desenhados oligonucleotídeos flanqueando o sítio de iniciação (ATG) e terminação (CTG), utilizando o clone C02 de cDNA de MIF como molde para PCR (figura 5).

1. PCR com iniciadores para os sítios de *NdeI* / *XhoI*



2. Clonagem do produto amplificado no vetor pGEM-T (Promega) e posterior seqüenciamento automático.

3. Clonagem no vetor pET 21a digerido com as enzimas de restrição *NdeI* / *XhoI*

4. Transformação de *E. coli* (BL21-DE3 pLys-S) com a construção pET 21a / ORF *PbMIF*

Figura 5. Estratégia para amplificação e clonagem do fragmento correspondente a ORF do *PbMIF*.

O resultado da amplificação do fragmento de cDNA do MIF de *P. brasiliensis* apresentou o tamanho esperado, de aproximadamente 400 pares de bases (397pb) (figura 6)

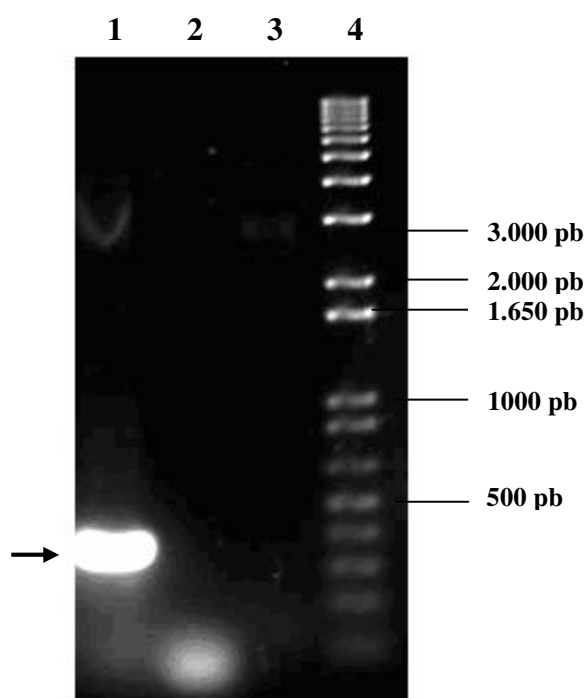


Figura 6. Amplificação da ORF do *PbMIF*. Cerca de 1/10 de cada reação de PCR foi analisada em gel de agarose 1% corado com Brometo de Etídio. Amostras: (1). PCR mostrando o fragmento de cDNA de

aproximadamente 400pb (MIF com sítios para as enzimas de restrição *NdeI*/*XhoI*). (2).Controle - (PCR com apenas um dos oligonucleotídeos *Xho I*). (3).Controle + (PCR sem o cDNA de MIF). (4). MM Marcador de Massa Molecular 1 kb plus (Invitrogen).

O fragmento de cDNA correspondendo à ORF do PbMIF foi clonado no plasmídeo pGEM-T (Promega)- sequência mostrada na figura 7 ; foi utilizado ainda como sonda em um experimento de *northern blot* comprovando a expressão diferencial do MIF de *P.brasiliensis* (figura 8). Esse fragmento de cDNA foi também clonado no vetor pET21a (Novagen) e transformado em células de *E.coli* da linhagem Xl-1blue para análise de restrição (figura 9). Posteriormente, esta ORF do PbMIF clonada no vetor de expressão foi utilizado nos experimentos de expressão heteróloga.

2	CGA	ATG	GGC	CCG	ACG	TCG	CAT	GCT	CCC	GGC	CGC	CAT	GGC	CGC	GGG	46
1	Arg	Met	Gly	Pro	Thr	Ser	His	Ala	Pro	Gly	Arg	His	Gly	Arg	Gly	15
47	ATT	CCA	CAT	ATG	CCT	TTC	ATT	GAG	CTT	CTC	ACA	AAT	GTT	GCT	CTC	91
16	Ile	Pro	His	Met	Pro	Phe	Ile	Glu	Leu	Leu	Thr	Asn	Val	Ala	Leu	30
92	TCA	CGC	GAG	CAG	AGC	AAA	GAA	CTC	GCC	CTT	TCA	CTC	TCC	AAG	GTG	136
31	Ser	Arg	Glu	Gln	Ser	Lys	Glu	Leu	Ala	Leu	Ser	Leu	Ser	Lys	Val	45
137	TCA	GCG	AGG	ATC	CTT	AAA	AAG	CCC	GAG	TCT	TTC	ATT	TCA	GTT	CAA	181
46	Ser	Ala	Arg	Ile	Leu	Lys	Lys	Pro	Glu	Ser	Phe	Ile	Ser	Val	Gln	60
182	ATC	CGC	TCT	GAT	GAG	GTC	TTG	ACG	TTT	GCG	GGC	ACT	CAT	GAT	CCA	226
61	Ile	Arg	Ser	Asp	Glu	Val	Leu	Thr	Phe	Ala	Gly	Thr	His	Asp	Pro	75
227	TGC	TTT	CAA	ATG	CGC	GTA	ACT	TCT	CTG	GGC	AAT	CTA	AAC	CCA	GAC	271
76	Cys	Phe	Gln	Met	Arg	Val	Thr	Ser	Leu	Gly	Asn	Leu	Asn	Pro	Asp	90
272	GAT	AAT	GTT	AAT	TTC	TCC	AAG	GCC	TTT	GCT	GAA	TTC	CTC	AAG	GAG	316
91	Asp	Asn	Val	Asn	Phe	Ser	Lys	Ala	Phe	Ala	Glu	Phe	Leu	Lys	Glu	105
317	GAG	ATT	GGT	GTC	ACG	AAC	GAT	AGA	GGA	TAT	GTT	ATC	TTT	TAC	GAT	361
106	Glu	Ile	Gly	Val	Thr	Asn	Asp	Arg	Gly	Tyr	Val	Ile	Phe	Tyr	Asp	120
362	CCG	GAC	TAT	GCA	AAT	CTA	GGA	TAT	AAA	GGG	ACA	ACT	GGA	GCT	AAA	406
121	Pro	Asp	Tyr	Ala	Asn	Leu	Gly	Tyr	Lys	Gly	Thr	Thr	Gly	Ala	Lys	135
407	TTA	TGG	TGC	ACT	CGA	GGG	TAA	TCA	CTA	GTG	CGG	CCG	CCT	GCA	GGT	451
136	Leu	Trp	Cys	Thr	Arg	Gly	End	Ser	Leu	Val	Arg	Pro	Pro	Ala	Gly	150
452	CGA	CCA	TAT	GGG	AGA	GCT	CCC	AAC	GCG	TTG	GAT	GCA	TAG	CTT	GAG	496
151	Arg	Pro	Tyr	Gly	Arg	Ala	Pro	Asn	Ala	Leu	Asp	Ala	End	Leu	Glu	165
497	TAT	TCT	ATA	GTG	TCA	CCT	AAA	TAG	CTT	GGC	GTA	ATC	ATG	GTC	ATA	541
166	Tyr	Ser	Ile	Val	Ser	Pro	Lys	End	Leu	Gly	Val	Ile	Met	Val	Ile	180
542	GCT	GTT	TCC	TGT	GTG	AAA	TTG	TTA	565							
181	Ala	Val	Ser	Cys	Val	Lys	Leu	Leu								

Figura 7: Sequência de nucleotídeos da ORF do PbMIF. A sequência de nucleotídeos está apresentada em caracteres pretos, enquanto a sequência deduzida de aminoácidos é apresentada abaixo da sequência nucleotídica. Os oligonucleotídeos usados na PCR estão em verde, e em azul o aminoácido prolina, característico de atividade enzimática

3. Confirmação do perfil de expressão diferencial do gene *pbmif* por *northern blot*.

O estudo da expressão diferencial de genes comprova o seu envolvimento no processo de virulência de *P.brasiliensis* na interface hospedeiro-patógeno. Uma vez que a forma de levedura é a fase infectante de *P.brasiliensis*, a expressão de MIF nesta fase sugere seu papel como um possível fator de virulência (figura 8). O desenvolvimento da PCM, bem como de diversas outras micoses, depende de interações entre o fungo e componentes do hospedeiro, características desenvolvidas para uma versatilidade fisiológica e nutricional que simplesmente permitem a sobrevivência do patógeno no ambiente do hospedeiro.

Como já citado anteriormente, os mecanismos moleculares da ação de MIF ainda não foram bem elucidados, porém, devido ao fato de MIF exercer um papel relevante na patogênese de uma variedade de condições inflamatórias e imunitárias (Nguyen *et al.*, 2003), a presença de MIF na fase infectante de *P.brasiliensis* favorece o entendimento sobre o mecanismo de patogenicidade do fungo e permite sugerir abordagens terapêuticas baseadas em MIF.

A hibridização de membranas contendo RNA isolado de *P.brasiliensis* na forma leveduriforme e micelial resultou em um perfil típico de expressão diferencial. É possível verificar que a sonda hibridizou especificamente com a forma leveduriforme. A equivalência entre a quantidade de RNA nas duas amostras (micélio e levedura) pode ser observada pelo fragmento de RNA correspondente ao constitutivo L34, expresso em ambas as fases.



Figura 8. Análise do perfil de expressão do gene *pbmif* de *Paracoccidioides brasiliensis* nas formas de micélio(M) e levedura(L). *Northern blot* mostrando a expressão diferencial de MIF na fase de levedura(L)
Controle: L34- gene que codifica para a proteína constitutiva da subunidade ribossomal 60S do *P.brasiliensis*

4. Expressão heteróloga em *E.coli*

Embora a análise da sequência do cDNA *pbmif* indique uma ORF, e o caráter específico de expressão diferencial seja um indício da importância desse gene, não temos qualquer dado indicando que esse mRNA seja realmente traduzido e que seu produto protéico desempenhe um papel biológico relevante nesse fungo. Nesse sentido, optamos por expressar a provável PbMIF em um sistema heterólogo

O vetor de expressão utilizado foi o pET21a (Novagen) que produz a proteína de interesse na forma de proteína de fusão contendo um T7-tag na região amino-terminal e um His-tag na região carboxi-terminal. O gene de interesse clonado no vetor pET fica sob o controle do promotor *T7lac*, dessa forma a expressão é induzida ao prover uma fonte de T7

RNA polimerase na célula hospedeira. A enzima T7 RNA polimerase é muito seletiva e eficiente, recrutando quase todos os recursos da célula para a expressão do gene alvo que pode compreender até mais de 50% das proteínas totais da célula. O vetor pET contém uma sequência operadora *lac downstream* ao promotor T7. Ele também carrega a sequência promotora natural e codante do repressor *lac* (*lacI*) orientado em orientação oposta a *T7lac*. Quando esse tipo de vetor é utilizado, o repressor *lac* age tanto no promotor *lacUV5* no cromossomo da célula hospedeira para reprimir a transcrição do gene da T7 RNA polimerase pela RNA polimerase da célula bacteriana quanto no promotor *T7lac* do vetor bloqueando dessa forma a transcrição do gene alvo pela T7 RNA polimerase residual. Isso possibilita que a proteína de interesse somente seja expressa na presença do indutor IPTG, que se liga ao produto do gene *lacI* levando à sua inativação.

Outra forma de provermos estabilidade adicional aos genes alvos foi expressá-lo em linhagem hospedeira que contem o plasmídeo pLys S (resistente a cloranfenicol) que provê uma quantidade de lisozima do fago T7, um inibidor natural da T7 RNA polimerase. A lisozima viral é uma proteína bifuncional: cliva uma ligação específica na camada de peptidoglicana na parede celular de *E.coli* e se liga a T7 RNA polimerase inibindo a transcrição de genes sob controle do promotor T7. Dessa forma, pode ser usada para inibir os baixos níveis de atividade da RNA polimerase viral presente no estado não induzido e assim estabilizar plasmídeos que codificam proteínas estranhas que podem ser tóxicas à célula hospedeira. Como marca de seleção esse vetor apresenta um gene de resistência a ampicilina (β lactamase) na mesma orientação do gene alvo. A sequência His-tag é muito útil como parceiro de fusão, favorecendo a posterior purificação de proteínas em geral. É particularmente usada para proteínas inicialmente expressas como corpos de inclusão, pois a purificação por cromatografia de afinidade pode ser feita em condições totalmente desnaturantes. Além disso, a fusão com His-tag apresenta a grande vantagem de permitir a detecção da proteína de fusão por *western blot*.

Após a construção do vetor contendo T7-tag/ORF do *PbMIF*/His-tag (figura 9), foi realizada indução utilizando-se células de *E.coli* da linhagem BL21-DE3 pLys S. Essa linhagem, além de produzir a T7 RNA polimerase necessária para a produção do gene de interesse dirigido pelo promotor T7 contém ainda o plasmídeo pLys S.

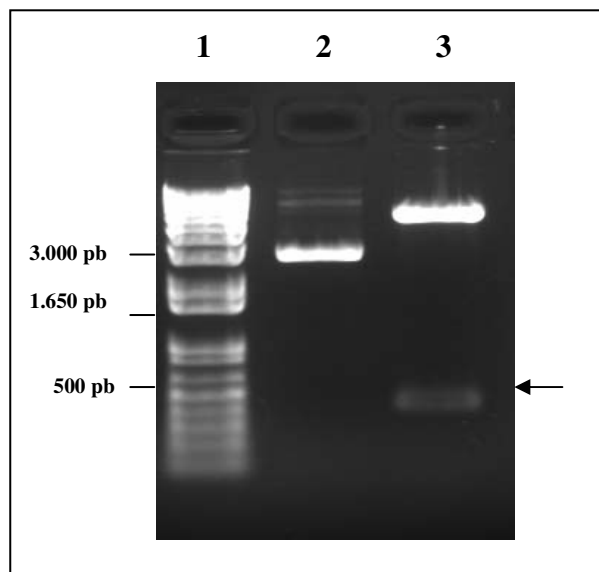


Figura 9. Análise de restrição do clone recombinante com as enzimas *Nde* I e *Xho* I. (em gel de agarose 1% corado com Brometo de Etídio.) Amostras: (1) MM Marcador de Massa Molecular 1 kb plus (Invitrogen). (2) T7-tag/*ORF* do *PbMIF*/His-tag intacto. (3) T7-tag/*ORF* do *PbMIF*/His-tag digerido com *Nde*I e *Xho*I mostrando um fragmento de aproximadamente 400 pares de bases.

A análise de restrição do clone recombinante (T7-tag/*ORF* do *PbMIF*/His-tag) foi satisfatória, porém não foi possível confirmar a clonagem por sequenciamento automático.

O experimento de *western blot*, empregando anticorpo anti-poli-histidina, mostra um fragmento peptídico com massa molecular de aproximadamente 15 kDa, correspondente ao tamanho esperado para a proteína de fusão. Comparando-se a presença do fragmento nas células induzidas com as amostras não induzidas é possível observá-lo apenas nas células induzidas. É possível visualizar a proteína *PbMIF* em extratos protéicos de *E. coli* mas não há uma cinética de indução o que torna necessário ressaltar que esse é um resultado preliminar que precisa ser validado, visto que esse resultado foi observado uma única vez. (figura 10).

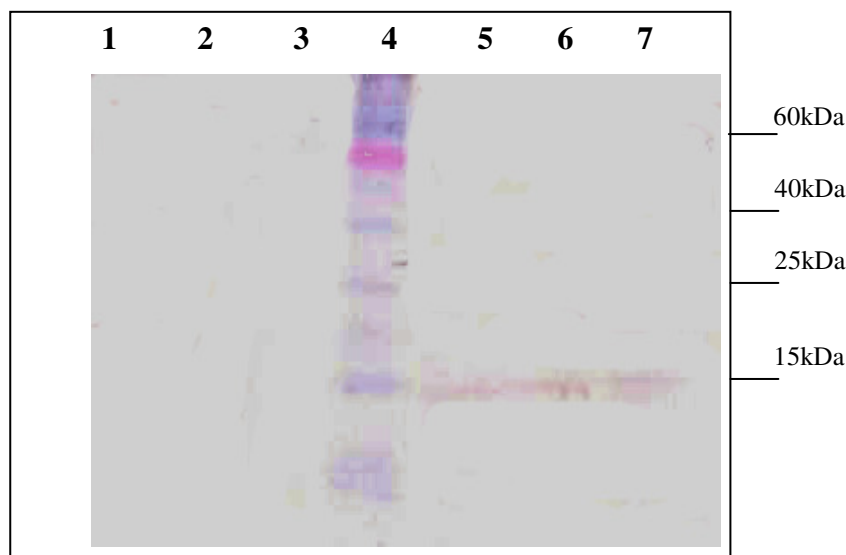


Figura 10. Análise dos extratos protéicos de *Escherichia. coli* por western blot. Os extratos protéicos de *E.coli* transformadas com T7-tag/*ORF do PbMIF*/His-tag foram submetidos a eletroforese em gel de SDS-PAGE 12% e transferidas para membrana de nitrocelulose. Foi utilizado para a detecção da proteína recombinante, anticorpo anti-poli-histidina na diluição de 1 : 2.500. Após a reação de imunodeteção (anticorpo IgG produzido em cabra, anti-IgG de coelho, conjugado a fosfatase alcalina./ titulação 1:5000) a membrana foi revelada com solução NBT/BCIP, possibilitando a visualização de um fragmento peptídico com massa molecular de ~15 kDa, correspondente à proteína de fusão de tamanho esperado. Amostras: **(1).** Controle negativo: células transformadas com o plasmídeo pET21a e sem indução 0h. **(2) e (3)** células transformadas com o plasmídeo pET21a: 2h e 4h após a indução com IPTG. **(4)** Padrão de Massa Molecular pré-corado da Invitrogen **(5)** Controle negativo: células transformadas com o plasmídeo T7-tag/*ORF do PbMIF*/His-tag e sem indução 0h. **(6) e (7)** células transformadas com o plasmídeo pET21a-*ORF do PbMIF*: 2h e 4h após a indução.

Conclusão e Perspectivas

No presente trabalho foi possível uma caracterização da sequência prevista de aminoácidos, da análise filogenética e da expressão diferencial de um provável gene de MIF de *P. brasiliensis* por meio da análise da sequência de nucleotídeos presente no banco de ESTs geradas pelo Projeto Genoma Funcional de *P.brasiliensis* (Felipe *et al*, 2005; Felipe *et al.*, 2003). A observação da sequência prevista de aminoácidos possui similaridade gênica com o MIF de diversos organismos, indicando um envolvimento potencial na patogênese do *P.brasiliensis*. A análise do cDNA de MIF por *northern blot* comprovou a expressão na fase de levedura e a análise filogenética mostra que a presença de MIF no *P. brasiliensis* é um fato inédito em fungo.

A clonagem do MIF no vetor de expressão foi realizada com sucesso, porém a ocorrência de baixos níveis da proteína recombinante obtida no ensaio de indução e a ausência de uma cinética de indução observadas no ensaio de *western blot* indicam que deverão ser realizados ajustes na metodologia empregada, com a finalidade de otimizar o rendimento na obtenção das proteínas recombinantes.

É necessário ainda um sequenciamento completo do clone pET21a- *PbMIFORF*, visando confirmar a eficiência da clonagem.

Após a otimização dos experimentos de expressão heteróloga, SDS-PAGE e *western blot* há perspectivas de produção para purificação protéica e teste da atividade biológica. Estes ensaios deverão indicar se o PbMIF apresenta algum efeito sobre o sistema imunitário de mamíferos, permitindo uma extrapolação de seu papel na infecção do hospedeiro animal.

Referências Bibliográficas

Altschul S.F, Madden T.L., Schaffer A.A., Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman D J (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs *Nucleic Acids Res* **21**: 3389-3402.

Bernhagen J, Lue H, Kleemann R, Calandra T, Roger T (.2002) Macrophage migration inhibitory factor (MIF): mechanisms of action and role in disease. *Microbes Infect* **4(4)**:449-60.

Bernhagen J, Calandra T, Bucala R (1998) Regulation of the immune response by macrophage migration inhibitory factor: biological and structural features. *J Mol Med.* **76**:151-161.

Bernhagen J, Calandra T, Mitchell RA, Martin SB, Tracey KJ, Voelter W, Manogue KR, Cerami A, Bucala R.(1993) MIF is a pituitary-derived cytokine that potentiates lethal endotoxaemia. *Nature.* **365**:756-759.

.

Bocca AL, Hayashi EE, Pinheiro AG, Furlanetto AB, Campanelli AP, Cunha FQ, Figueiredo F. (1998) Treatment of *Paracoccidioides brasiliensis*-infected mice with a nitric oxide inhibitor prevents the failure of cell-mediated immune response. *J Immunol.* **161**:3056-3063.

Borges-Walmsley MI, Chen D, Shu X, Walmsley AR. (2002) The pathobiology of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Trends Microbiol.* **10**:80-7

- Bozza M, Satoskar AR, Lin G, Lu B, Humbles AA, Gerard C, David JR. (1999) Targeted disruption of migration inhibitory factor gene reveals its critical role in sepsis. *J Exp Med.* **18**: 341-346.
- Bucala R. Fingerle-Rowson GR, (2001) Neuroendocrine properties of macrophage migration inhibitory factor (MIF). *Immunol Cell Biol.* **79** :368-375.
- Bucala R. (1996) MIF rediscovered: cytokine, pituitary hormone, and glucocorticoid-induced regulator of the immune response. *FASEB J.* **10**:1607-1613.
- Burger-Kentischer A, Goebel H, Seiler R, Fraedrich G, Schaefer HE, Dimmeler S, Kleemann R, Bernhagen J, Ihling C.(2002). Expression of macrophage migration inhibitory factor in different stages of human atherosclerosis.*Circulation.* **105**:1561-1566.
- Burger-Kentischerb, A. Finkelmeierb, D., Thielea, M., Schmuckerb, J., Geigerb, G., Tovarb, G.E.M., Bernhagena, J (2005) Binding of JAB1/CSN5 to MIF is mediated by the MPN domain but is independent of the JAMM motif. *FEBS Letters* **579**:1693–1701.
- Calandra T, Echtenacher B, Roy DL, Pugin J, Metz CN, Hultner L, Heumann D, Mannel D, Bucala R, Glauser MP.(2000) Protection from septic shock by neutralization of macrophage migration inhibitory factor. *Nat Med* **6**:164-70.
- Calandra T, Bernhagen J, Metz CN, Spiegel LA, Bacher M, Donnelly T, Cerami A, Bucala R.(1995). MIF as a glucocorticoid-induced modulator of cytokine production. *Nature.* **377**:68-71.
- Calich VL, Vaz CA, Burger E (1998) Immunity to *Paracoccidioides brasiliensis* infection. *Res Immuno l***149**:407-417

- Cano MI, Cisalpino PS, Galindo I, Ramirez JL, Mortara RA & da Silveira JF.(1998) Electrophoretic karyotypes and genome sizing of the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *J.Clin.Microbiol.***36**: 742-747
- Casadevall A & Pirofski LA. (2000) Host-pathogen interactions: basic concepts of microbial commensalism, colonization, infection, and disease. *Infect Immun* .**68**:6511-6518
- Chesney J, Metz C, Bacher M, Peng T, Meinhardt A, Bucala R. (1999) An essential role for macrophage migration inhibitory factor (MIF) in angiogenesis and the growth of a murine lymphoma. *Mol Med.* **5**:181-91.
- Cheng, V. C. Yuen KY, Chan WM, Wong SS, Ma ES, Chan RM.(2000).Immunorestitution disease involving the innate and adaptive response. *Clin. Infect. Dis.* **30**:882–892
- Costa SC, Albuquerque FC, Andrade RV, Oliveira GC, Almeida MF, Brigido MM, Maranhão AQ (2005) Transporters in the *Paracoccidioides brasiliensis* transcriptome:insights on drug resistance.*Genetics and Molecular Research* **4**(2):390-408
- Coutinho, Z. F., da Silva, D., Lazéra. M., Petri, v., de Oliveira, R. M., Saboza, P.C, Wanke, B. (2002). Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980-1995), *Cad. Saúde Pública*, Rio de janeiro, **18**: 1441-1454.
- David JR. Delayed hypersensitivity in vitro: its mediation by cell-free substances formed by lymphoid cell-antigen interaction (1966) *Proc Natl Acad Sci USA.***56**:72-77.
- De Brito T, Franco MF. Granulomatous inflammation(1994). *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* **36**:185-192
- Falkow.S, (1988). Molecular Koch's postulates applied to microbial pathogenicity. *Rev Infect. Dis., Suppl2* : S274-276, *Nat.Rev. Microbiol.* **2**,67-72

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, Network P, 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, Brigido MM. (2005a) Transcriptional profiles of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* in mycelium and yeast cells. *J Biol Chem.* **280**: 24706-24714.

Felipe MS, Torres FA, Maranhao AQ, Silva-Pereira I, Pocas-Fonseca MJ, Campos EG, Moraes LM, Arraes FB, Carvalho MJ, Andrade RV, Nicola AM, Teixeira MM, Jesuino RS, Pereira M, Soares CM, Brigido MM (2005b) Functional genome of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *FEMS Immunol Med Microbiol* **45(3)**:369-81.

Felipe MS, Andrade RV, Petrofeza SS, Maranhao 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, Pocas-Fonseca MJ, Resende R, Ribeiro BM, Saldanha RR, Santos SC, Silva-Pereira I, Silva MA, Silveira E, Simoes 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. (2003) Transcriptome characterization of the dimorphic and pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* by EST analysis. *Yeast.* **20**: 263-271.

Flieger O, Engling A, Bucala R, Lue H, Nickel W, Bernhagen J. (2003) Regulated secretion of macrophage migration inhibitory factor is mediated by a non-classical pathway involving an ABC transporter. *FEBS Lett.* **551**: 78-86.

- Franco M. (1987) Host-parasite relationships in paracoccidioidomycosis. *J Med Vet Mycol.* **25** :5-18.
- Gonzalez A, de Gregori W, Velez D, Restrepo A, Cano LE. (2000) Nitric oxide participation in the fungicidal mechanism of gamma interferon-activated murine macrophages against *Paracoccidioides brasiliensis* conidia. *Infect Immun.* **68** :2546-2552.
- Guarro J, GeneJ, Stchigel AM. (1999) Developments in fungal taxonomy. *Clin Microbiol Rev.* **12**: 454-500.
- Hanna SA, Monteiro da Silva JL, Giannini MJ. (2000) Adherence and intracellular parasitism of *Paracoccidioides brasiliensis* in Vero cells. *Microbes Infect.* **2**: 877-884.
- Hall,T.A.(1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis. *Nucleic Acids Symp.* **41**:95-98
- Hudson, J.D., Shoaibi, M.A., Maestro, R., Carnero, A., Hannon, G.J., Beach, D.H. (1999). A proinflammatory cytokine inhibits p53 tumor suppressor activity. *J. Exp. Med.* **190**, 1375–1382.
- Kashino SS, Fazioli RA, Cafalli-Favati C, Meloni-Bruneri LH, Vaz CA, Burger E, Singer LM, Calich VL. (2000) Resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* infection is linked to a preferential Th1 immune response, whereas susceptibility is associated with absence of IFN-gamma production. *J Interferon Cytokine Res.* **20**:89-97
- Kleemann R, Rorsman H, Rosengren E, Mischke R, Mai NT, Bernhagen J. (2000) Dissection of the enzymatic and immunologic functions of macrophage migration inhibitory factor. Full immunologic activity of N-terminally truncated mutants. *Eur J Biochem.* **267**:7183-7193.

- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. **227**:680-685.
- Lue H, Kleemann R, Calandra T, Roger T, Bernhagen J. (2002) Macrophage migration inhibitory factor (MIF): mechanisms of action and role in disease. *Microbes Infect.* **4**: 449-460.
- Magee, P. T., Gale, C., Berman, J. & Davis, D. (2003).Molecular genetic and genomic approaches to the study of medically important fungi. *Infect. Immun.* **71**, 2299–2309
- Maranhão AQ, Brígido MM.(2000) Expression of anti-Z-DNA single chain antibody variable fragment on the filamentous phage surface *Braz J Med Biol Res* **33(5)**:569-79.
- Martinez R. (2004). Paracoccidioidomycosis. Em: Micologia médica à luz dos autores contemporâneos Eds., Sedim & Rocha. Editora Guanabara Koogan S.A. Rio de Janeiro, RJ. pp. 204-221.
- McEwen JG, Garcia AM, Ortiz BL, Botero S & Restrepo A (1995) In search of the natural habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Arch Med Res* **26(3)**:305-6.
- Medoff G, Maresca B, Lambowitz AM, Kobayashi G, Painter A, Sacco M, Carratu L. (1986) Correlation between pathogenicity and temperature sensitivity in different strains of *Histoplasma capsulatum*. *J Clin Invest.* **78**:1638-1647.
- Mitchell RA, Bucala R. (2000) Tumor growth-promoting properties of macrophage migration inhibitory factor (MIF). *Semin Cancer Biol.* **10**:359-366.
- Mitchell RA, Metz CN, Peng T, Bucala R. (1999) Sustained mitogen activated protein kinase (MAPK) and cytoplasmic phospholipase A2 activation by macrophage migration inhibitory factor (MIF). Regulatory role in cell proliferation and glucocorticoid action. *J Biol Chem.* **274**:18100-18106.

- Montoya AE, Alvarez AL, Moreno MN, Restrepo A, Mcewen JG (1999) Electrophoretic karyotype of environmental isolates of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Med Mycol.* **37**:219-222
- Nascimento FR, Calich VL, Rodriguez D, Russo M. (2002) Dual role for nitric oxide in paracoccidioidomycosis: essential for resistance, but overproduction associated with susceptibility. *J Immunol.* **168**: 4593-4600.
- Navarro-Garcia F, Eisman B, Roman E, Nombela C, Pla J. (2001) Signal transduction pathways and cell-wall construction in *Candida albicans*. *Med Mycol.* **39**:87-100.
- Nguyen MT, Beck J, Lue H, Funfzig H, Kleemann R, Koolwijk P, Kapurniotu A, Bernhagen J. (2003) A 16-residue peptide fragment of macrophage migration inhibitory factor, MIF-(50-65), exhibits redox activity and has MIF-like biological functions. *J Biol Chem.* **278**: 33654-33671.
- Odds FC, Gow NA & Brown AJ. (2001) Fungal virulence studies come of age. *Genome Biol.* **2(3)**:REVIEWS1009.
- Pennock JL, Behnke JM., Bickle QD, Devaney E, Grecis RK, Isaac RE, Joshua GWP, Selkirk ME, Zhang Y & Meyer DJ (1998) Rapid purification and characterization of L-dopachrome methyl ester tautomerase (macrophage-migration-inhibitory factor) from *Trichinella spiralis*, *Trichuris muris* and *Brugia pahangi*. *Biochem J* 495-498.
- Perfect J & Cox G (2000a) Virulence Mechanisms for Fungi, Part I. *Clin Microbiol Newsletter.* **22**:113-119
- Perfect J & Cox G (2000b) Virulence Mechanisms for Fungi, Part II. *Clin Microbiol Newsletter.* **22**:121-125

- Petrenko, O & Moll U. M. (2005) Macrophage Migration Inhibitory Factor MIF Interferes with the Rb-E2F Pathway *Molecular Cell* **17**, 225–236
- Rader C., Steiberg P. & Barbas C.F. (2000) Selection from antibody libraries. In: *Phage display- a laboratory manual*. 1a-Edição. CSHL Press, Cold Spring Harbor, NY, USA, pp 10.1-10.9
- Restrepo A, McEwen JG, Castaneda E. (2001) The habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*: how far from solving the riddle? *Med Mycol.* **39**:233-241.
- Restrepo, A. et al., (1997). Hormonal influences in the host-interplay with *Paracoccidioides brasiliensis*. Em: Fungal Interactions Eds Stevens, DA et al., National Foundation for Infectious Diseases. pp. 125-133.
- Roger T, David J, Glauser MP, Calandra T. (2001) MIF regulates innate immune responses through modulation of Toll-like receptor 4. *Nature.* **414**:920-924.
- Romani L (2004) Immunity to fungal infections. *Nat Rev Immunol* **4**(1):1-23.
- Romani L. (1997) The T cell response against fungal infections. *Curr Opin Immunol.* **9**:484-490.
- Rooney PJ, Klein BS. (2002) Linking fungal morphogenesis with virulence. *Cell Microbiol.* **4**:127-137.
- Salazar ME, Restrepo A, Stevens DA. (1988) Inhibition by estrogens of conidium-to-yeast conversion in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Infect Immun.* **56**:711-713.
- Sambrook J. & Russel D.V. (2001) Molecular Cloning- A Laboratory Manual. Third Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press

- San-Blas G, Nino-Vega G, Iturriaga T. (2002) *Paracoccidioides brasiliensis* and paracoccidioidomycosis: molecular approaches to morphogenesis, diagnosis, epidemiology, taxonomy and genetics. *Med Mycol.* **40**:225-42.
- San-Blas, G. & Niño-Vega, G (2001). *Paracoccidioides brasiliensis*: Virulence and Host Response. Em: Fungal Pathogenesis Principles and Clinical Applications. Eds. Cihlar R. L., Calderone R.A., Marcel Dekker. New York. pp. 205-226.
- San-Blas G, Travassos LR, Fries BC, Goldman DL, Casadevall A, Carmona AK, Barros TF, Puccia R, Hostetter MK, Shanks SG, Copping VM, Knox Y, Gow NA. (2000) Fungal morphogenesis and virulence. *Med Mycol.* **38**:79-86.
- Silva-Vergara ML, Martinez R, Chadu A, Madeira M, Freitas-Silva G, Leite Maffei CM. (1998) Isolation of a *Paracoccidioides brasiliensis* strain from the soil of a coffee plantation in Ibia, State of Minas Gerais, Brazil. *Med Mycol.* **36**:37-42.
- Silva-Pereira I(2003) Amplificação de DNA por PCR. In: Técnicas básicas em Biologia Molecular. Ed. Azevedo MO, Felipe-Soares MS, Brígido MM, Maranhão AQ e De-Souza MT. Editora UnB, Brasília- DF
- Silva Pereira I, Bey F, Coux O, Scherrer K (1992) Two mRNAs exist for the Hs PROS-30 gene encoding a component of human prosomes. *Gene.* **120(2)**:235-242.
- Souto JT, Figueiredo F, Furlanetto A, Pfeffer K, Rossi MA, Silva JS. (2000) Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha determine resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* infection in mice. *Am J Pathol.* **156**:1811-1820.
- Subramanya HS, Roper DI, Dauter Z, Dodson EJ, Davies GJ, Wilson KS, Wigley DB. (1996) Enzymatic ketonization of 2-hydroxymuconate: specificity and mechanism investigated by the crystal structures of two isomerases. *Biochemistry.* **35**:792-802.

- Swope, M., Sun, Hong-Wei, Blak, P.R.& Lolis E. (1998) Direct link between cytokine activity and a catalytic site for macrophage migration inhibitory factor. *The EMBO Journal* **17** (13):3534–3541, 1998
- Tavares AH, Silva SS, Bernardes VV, Maranhao AQ, Kyaw CM, Pocas-Fonseca M, Silva-Pereira I.(2005) Virulence insights from the *Paracoccidioides brasiliensis* transcriptome. *Genet Mol Res* **4**(2):372-89.
- Tosta CE (2001) Infectrons and coevolution. *Rev Soc Bras Med Trop.* **34**(1):1-3..
- van Burik, J. H and Magee, P. T. (2001) Aspects of fungal pathogenesis in humans.. *Annual Review of Microbiology*, **55**: 743-772
- Williams GT, Williams WJ. (1983) Granulomatous inflammation--a review. *J Clin Pathol.* **36**:723-733.
- Tan TH, Edgerton SA, Kumari R, McAlister MS, Roe SM, Nagl S, Pearl LH, Selkirk ME, Bianco AE, Totty NF, Engwerda C, Gray CA, Meyer DJ. (2001). Macrophage migration inhibitory factor of the parasitic nematode *Trichinella spiralis* . *Biochem J* **357**,373-383
- Venancio EJ, Kyaw CM, Mello CV, Silva SP, Soares CM, Felipe MS, Silva-Pereira I. (2002) Identification of differentially expressed transcripts in the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* by differential display. *Med Mycol* **40**:45-51.
- Vogelstein B, Lane D, Levine AJ. (2000) Surfing the p53 network. *Nature.* 408(6810):307-10
- Vousden KH & Lu X. (2002) Live or let die: the cell's response to p53. *Nat Rev Cancer.***2**(8):594-604.
- Zang X, Taylor P, Wang JM, Meyer DJ, Scott AL, Walkinshaw MD, Maizels RM (2002) Homologues of human macrophage migration inhibitory factor from a parasitic

nematode. Gene cloning, protein activity, and crystal structure. *J Biol Chem.* **277(46)**:44261-7

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](#)