

JULIANA TERZI MARICATO

**Clonagem e caracterização do gene que codifica a
glicoproteína de 70 kDa (gp70) de
*Paracoccidioides brasiliensis***

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

**São Paulo
2009**

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

JULIANA TERZI MARICATO

**Clonagem e caracterização do gene que codifica a
glicoproteína de 70 kDa (gp70) de
*Paracoccidioides brasiliensis***

Orientador: Prof. Dr. José Daniel Lopes

Co-orientador: Prof. Dr. Wagner Luiz Batista

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

**São Paulo
2009**

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

Chefe de Departamento:

Profa. Dra. Clara Lúcia Barbieri Mestriner

Coordenador do Curso de Pós-Graduação:

Prof. Dr. Renato Arruda Mortara

Ficha Catalográfica

Maricato, Juliana Terzi

Clonagem e caracterização do gene que codifica a glicoproteína de 70 kDa (gp70) de *Paracoccidioides brasiliensis*. Juliana Terzi Maricato – São Paulo, 2009.

xx,130f

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

Título em inglês; Cloning and characterization of the gene that encodes the glycoprotein of 70 kDa from *Paracoccidioides brasiliensis*.

1. *Paracoccidioides brasiliensis* 2. antígeno 3. flavoproteínas 4. estresse oxidativo.

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

*Aos meus pais **Cristian** e **Rosmeire**, que com muito amor e dignidade me ensinaram tantas lições e, com muito sacrifício, contribuíram para que mais essa etapa de minha vida pudesse se realizar.*

*Ao meu companheiro **Antonio Carlos**, que
sempre me apoiou e dividiu comigo
conquistas, tristezas e alegrias.*

*Ao meu irmão **Gabriel**, pessoa iluminada e
especial em minha vida.*

*Aos meus familiares, que me apoiaram e me
incentivaram sempre.*

AGRADECIMENTOS

Registro meu agradecimento especial ao meu orientador Prof. Dr. **José Daniel Lopes** por me acolher em seu laboratório, pela orientação, ensinamentos, amizade, confiança e grande contribuição para meu crescimento científico. Minha admiração e meu reconhecimento.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Wagner Luiz Batista por toda a ajuda, disponibilidade, amizade e total incentivo durante a realização deste trabalho.

À Profa. Dra. Rosana Puccia pelas valiosas contribuições, amizade, por todo o apoio e pela grande ajuda e entusiasmo na confecção do manuscrito.

Ao Dr. Luciano dos Santos Feitosa pela ajuda fundamental nas primeiras etapas desse trabalho, pela amizade, incentivo e horas de descontração.

Aos professores da Disciplina de Imunologia: Dra. Célia Regina Whitaker Carneiro – obrigada pelo apoio também nas horas difíceis; Dra. Ieda Maria Longo Maugéri, Dra. Zulma Fernandes Peixinho, Dr. Mario Mariano e Dr. Alexandre Salgado Basso por todo auxílio e contribuições inestimáveis para minha formação científica.

Aos Profs. Dra. Miriam Galvonas Jasiulionis e Dr. Joel Machado Jr. pelo apoio e incentivo à minha vida acadêmica.

Ao Prof. Dr. Gustavo Henrique Goldman, pela contribuição e apoio a este trabalho.

À Profa. Dra. Soraia S. Smaili (INFAR) e às técnicas Carol e Beth pela valorosa ajuda com os experimentos de microscopia.

Ao Prof. José Franco da Silveira e à todos do seu laboratório por toda ajuda em diversos experimentos.

À Profa. Dra. Tânia Aparecida Tardelli Gomes do Amaral por ser a primeira a me receber na UNIFESP e pela ajuda ao longo desse trabalho, principalmente com os experimentos de radiomarcagem.

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

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

Ao meu amigo Dr. Ronni Rômulo Novaes por toda a contribuição, ajuda, amizade e confiança.

À Profa. Dra. Patrícia Xander Batista por toda ajuda, companheirismo e agradável convivência (dentro e fora do laboratório) durante esses anos.

À Dra. Érika Seki Kioshima pelo carinho, ajuda, amizade e incentivo sempre.

À amiga Dra. Elizabeth Cristina Perez Hurtado pela amizade, apoio, companheirismo, tanto na “bancada” quanto em minha vida pessoal.

Aos queridos amigos do laboratório: Bruno Camolese Vivanco, Fabiana Aliperti, Fabiana Toshie, Livia Pugliesi, Marcela da Costa Antonio (filha), Márcia Guerreschi, Edsel Nunes (filha), Camila Caldini, Nádia Lucena, Jaqueline Pozzibon e Nadijane Ferreira - muito obrigada por esses anos de convivência, companheirismo e ajudas nas horas mais difíceis.

Aos amigos egressos da Pós-graduação: Ms. Adriana Konno, Ms. Aline Morgado de Araújo, Dra. Beatriz Helena Pizarro de Lorenzo, Ms. Carolina Hager, Dra. Priscila Fraga Penteado Mendes.

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

Aos colegas do Departamento: Fabio Mitsuo, Geisa Ferreira Fernandez, Crisitane Amaral, Dr. Alisson Matsuo, Alexandre Sassaki, Luiz (Luizão), Milene, Larissa, pelo valioso “socorro” em procedimentos e materiais

À minha chefe atual Dra. Juliana Maria Ferraz Sallum pela oportunidade de trabalho oferecida, por confiar no meu potencial e pelo apoio nas horas em que mais precisei.

À minha amiga Silvana Baldon pela ajuda, cooperação, amizade e momentos de descontração.

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

*“O significado das coisas não está nas
coisas em si, mas sim em nossa
atitude com relação a elas.”*

Antoine de Saint-Exupéry

RESUMO

Paracoccidioides brasiliensis é o fungo termodimórfico patogênico causador da Paracoccidioidomicose (PCM). Esse agente infeccioso produz antígenos importantes como a gp43, já bem caracterizada, e a glicoproteína de 70 kDa (gp70) que é reconhecida por 96% dos soros de pacientes com PCM. No presente estudo reportamos que o gene codificador do antígeno gp70 possui uma fase de leitura aberta de 2.154 pares de bases. A estratégia utilizada na clonagem do gene PbGP70 incluiu análises *in silico* de sequências contidas no banco de dados de sequências expressas de *P. brasiliensis* (*P. brasiliensis*' Expressed Sequence Tags Databank) e sequenciamento por meio da técnica de *primer-walking*. A análise da sequência da proteína deduzida mostrou a presença de dois motivos para *N*-glicosilação, epítomos para células B e T com putativas funções antigênicas e protetoras, respectivamente. Análises comparativas *in silico* classificaram a proteína pertencente à família das flavoproteínas monoxigenases. Muitas proteínas dessa família possuem funções antioxidativas em diversos modelos biológicos e são compostos bioativos importantes. Anticorpos policlonais produzidos contra gp70 recombinante foram capazes de reconhecer a proteína nativa no extrato celular total de *P. brasiliensis*. A proteína recombinante parcial foi reconhecida por 5 de 7 soros de pacientes com PCM e pelo anticorpo monoclonal previamente produzido contra gp70 nativa (MAb C5F11). Experimentos de microscopia confocal com o anticorpo policlonal anti-gp70 recombinante e o MAb C5F11 mostraram co-localização da marcação citoplasmática, como esperado para gp70. Análises da expressão gênica por RT-PCR quantitativo em tempo real mostraram baixos níveis de expressão do gene PbGP70 em condições normais, porém sob condições de estresse oxidativo, induzido pela adição de H₂O₂ e durante o crescimento do fungo, a expressão foi significativamente aumentada. Por fim, após incubação de células leveduriformes de *P. brasiliensis* com macrófagos derivados de medula óssea, foi observado aumento da expressão gênica nas leveduras aderidas ou fagocitadas após 24 horas e, nas leveduras não aderidas, a expressão foi aumentada após 48 horas. Esses achados sugerem que a gp70 possa desempenhar um papel duplo na biologia e infecção por *P. brasiliensis*. Por um lado, a molécula estimula resposta imune celular e humoral no hospedeiro e por outro protege o fungo do estresse oxidativo gerado por células fagocíticas.

ABSTRACT

Paracoccidioides brasiliensis is a thermodimorphic pathogenic fungus that causes Paracoccidioidomycosis (PCM). This infectious agent produces important antigens as gp43, already fully characterized, and a 70 kDa glycoprotein (gp70) recognized by 96% PCM patients' sera. In the present study, we report that the gene encoding gp70 antigen has an open reading frame in a 2,154 base pair fragment. The gp70 gene in *P. brasiliensis* (*PbGP70*) has been cloned using *in silico* screening of the *P. brasiliensis*' Expressed Sequence Tag databank and primer-walking sequencing approach. In the deduced protein sequence, we found two motifs for *N*-glycosilation, B and T-cell epitopes, with putative antigenic and protector functions, respectively. Comparative *in silico* analysis showed that this protein belongs to flavoprotein monooxygenase family. Many proteins of this family show anti-oxidative functions in several biologic models thus, being important bioactive compounds. Anti-recombinant gp70 polyclonal antibodies recognized the native protein in the total cell extract of *P. brasiliensis*. Moreover, the partial recombinant protein was recognized by 5 out of 7 PCM patients' sera and by the gp70 C5F11 monoclonal antibody previously produced against native gp70. Confocal microscopy with polyclonal antibodies anti-gp70 recombinant and C5F11 MAb anti-native gp70, showed co-localization in the cell cytoplasm, as expected for gp70. Gene expression analysis using Real-Time PCR showed low levels of gp70 gene expression in normal conditions, but under oxidative stress induced by H₂O₂ and during the fungal growth, expression is significantly increased. Finally, when we incubated *P. brasiliensis* with bone-marrow derived macrophages, the phagocytosed or attached cells showed increased gp70 gene expression at 24 hours and, in the non-phagocytosed cells, the expression was increased after 48 hours. These findings suggest that gp70 might play a dual role in *P. brasiliensis*, both eliciting immune cellular and humoral responses in the host and protecting the fungus from oxidative stress generated by phagocytic cells.

LISTA DE ABREVIATURAS

°C	graus Celsius
APS	persulfato de amônio
ATP	adenosina-trifosfato
pb	pares de base
BSA	soro albumina bovina
CBB	<i>Comassie Brilliant Blue</i>
cDNA	DNA complementar
D.O.	densidade óptica
DAPI	4',6'-diamidine-2-phenylindole
dATP	desoxiadenosina-trifosfato
dCTP	desoxicitidina-trifosfato
DEPC	dimetil pirocarbonato
dGTP	desoxiguanosina-trifosfato
DMSO	dimetilsufoxido
dNTP	desoxiribonucleotídeo-trifosfato
DTT	ditiotreitól
dTTP	desoxitimidina-trifosfato
EDTA	ácido etilenodiamino tetracético
ELISA	<i>Enzyme linked Immunosorbent assay</i>
gp	glicoproteína
h	hora
ICAM-1	<i>Intercellular adhesion molecule-1</i>
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
IPTG	isopropil-tiol-galactopironosídeo
kDa	kilo Dalton
kV	<i>kilovolts</i>
<i>LacZ</i>	β -galactosidase
M	molar
MAb	anticorpo monoclonal
MHC	complexo de histocompatibilidade principal
min	minuto

mL	mililitro
mM	milimolar
MOPS	ácido 3-N-Morpholino propanesulfônico
mRNA	RNA mensageiro
N	normal (normalidade)
nt	nucleotídeo
ORF	fase aberta de leitura
p/v	peso a volume
PA	para análise/grau analítico
PBS	Tampão salino fosfato
PCM	paracoccidioidomicose
PCR	reação da polimerização em cadeia
PGFE	<i>Pulsed Field Gel Electrophoresis</i>
PMSF	fluoreto de fenilmetanosulfonato
RNA	ácido ribonucleico
RNAse	ribonuclease
rpm	rotação por minuto
RT-PCR	<i>Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction</i>
SD	desvio padrão
SDS	dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida – SDS
seg	segundos
SSC	tampão salina citrato de sódio
TBE	tampão tris-borato-EDTA
TE	tampão tris-EDTA
TEMED	<i>N,N,N,N'</i> - tetrametilenodiamina
TLR	<i>toll-like receptor</i>
Tris	tris-hidroximetil-aminometano
U	unidade enzimática
UTR	região não-traduzida
UV	ultravioleta
V	Volts
v/v	volume a volume

W	watts
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosídeo
μm	micrometro
μM	micromolar
μL	microlitro

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Oligonucleotídeos iniciadores utilizados	27
Tabela 2 – Homologia do gene <i>PbGP70</i> com sequências de nucleotídeos de outros fungos no banco de dados GENBank (NCBI)	54

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Gel de Agarose 1% do fragmento PbGP70 (384 pb) clonado	48
Figura 2 - Representação esquemática do alinhamento entre a sequência de 384-pb e a EST-111-F10 e da ORF PbGP70	49
Figura 3 - Gel de agarose 1% do fragmento de 2,154 kb amplificado	50
Figura 4 - Sequência de nucleotídeos (1-2154) do gene PbGP70 e sequência deduzida de aminoácidos (1-718)	53
Figura 5 - Alinhamento da sequência de deduzida de aminoácidos de PbGP70 com sequências homólogas de outros fungos	57
Figura 6 - Representação esquemática da Pbgp70 deduzida	58
Figura 7 - Perfil de hidrofiliidade de sequências homólogas à Pbgp70	59
Figura 8 - Reações de <i>immunoblotting</i> do extrato celular tratado (T) ou não (NT) com metaperiodato de sódio ou Endo-H	60
Figura 9 - Expressão da proteína Pbgp70 recombinante parcial	63
Figura 10 - Solubilidade da proteína Pbgp70 recombinante parcial	64
Figura 11 - Purificação da proteína recombinante parcial	64
Figura 12 - <i>Immunoblotting</i> da reatividade do soro policlonal anti-Pbgp70r	65
Figura 13 - <i>Immunoblotting</i> da reatividade do soro de pacientes com PCM e a proteína Pbgp70r	69
Figura 14 - Reconhecimento da gp70 nativa pelo anticorpo anti-Pbgp70r	70
Figura 15 - Reconhecimento da Pbgp70r pelo MAb C5F11 anti gp70 nativa	70
Figura 16 - Localização da gp70 por microscopia confocal com anticorpos policlonais anti-Pbgp70r	71
Figura 17 - Co-localização da marcação com MAb C5F11 e anti-Pbgp70r por microscopia confocal	72
Figura 18 - Análise da região promotora de PbGP70 de <i>P. brasiliensis</i> pelo programa TFSEARCH	76
Figura 19 - Expressão do gene PbGP70 sob estresse oxidativo pela adição de H ₂ O ₂	80
Figura 20 - Expressão do gene PbGP70 durante a curva de crescimento	81

Figura 21 – Gel de agarose 1% do RNA das leveduras de <i>P. brasiliensis</i> incubadas com macrófagos	82
Figura 22 - Gel de agarose 1% do produto de RT- PCR do gene <i>PbCAM</i>	82
Figura 23 - Expressão do gene <i>PbGP70</i> após a incubação de leveduras de <i>P. brasiliensis</i> com macrófagos murinos	83

SUMÁRIO

Dedicatória	v
Agradecimentos	vii
Epígrafe	ix
Resumo	x
Abstract	xi
Lista de Abreviaturas	xii
Lista de Tabelas	xv
Lista de Figuras	xvi
1. INTRODUÇÃO	01
1.1. <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	01
1.2. Paracoccidioidomicose	02
1.3. Relação parasita-hospedeiro	05
1.4. Componentes antigênicos de <i>P. brasiliensis</i>	08
1.4.2. A glicoproteína gp70	11
1.5. Heterogeneidade de <i>P. brasiliensis</i>	13
1.6. Transcritoma e genoma de <i>P. brasiliensis</i>	14
1.6.1. Transcriptoma	14
1.6.2. Genoma	15
1.6.3. Análises moleculares e genes identificados	15
2. OBJETIVOS	18
3. MATERIAIS E MÉTODOS	19
3.1. Soluções	19
3.2. Meios de cultivo para microrganismos	21
3.3. Meios de cultivo para células de mamíferos	22
3.4. Cepas Bacterianas	22
3.5. Isolado de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	22
3.5.1. <i>P. brasiliensis</i> isolado 18 (Pb18)	22
3.5.2. Manutenção do Isolado	23
3.6. Animais	23
3.7. Preparação do extrato celular de <i>P. brasiliensis</i>	23
3.8. Extração de DNA	24
3.9. Extração de RNA	24
3.10. Tratamento do RNA com DNase I	25

3.11. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para sequenciamento, RT-PCR e RT-PCR quantitativo em tempo real (<i>Real-time PCR</i>)	27
3.12. Estratégia para clonagem do gene <i>PbGP70</i>	28
3.13. PCRs e RT-PCRSs	28
3.14. Clonagem e Transformação	29
3.15. Extração do DNA plasmidial por lise alcalina (Mini-Prep)	30
3.16. Digestão do DNA com enzimas de restrição	31
3.17. Sequenciamento automático	31
3.18. Análises in silico da sequência do gene <i>PbGP70</i> e região promotora	31
3.19. Análises gráficas dos parâmetros antigênicos e estruturais da sequência deduzida da proteína codificada por <i>PbGP70</i>	33
3.20. Subclonagem da sequência parcial de <i>PbGP70</i> em vetor de expressão	33
3.21. Expressão e purificação da proteína recombinante <i>PbGP70</i> parcial	34
3.22. Obtenção e purificação de anticorpos policlonais anti- <i>PbGP70</i> recombinante	35
3.23. Obtenção de anticorpos monoclonais C5F11 anti- <i>gp70</i> nativa de <i>P. brasiliensis</i>	36
3.24. Purificação de anticorpos monoclonais C5F11 anti- <i>gp70</i> nativa de <i>P. brasiliensis</i>	36
3.25. Experimentos de <i>Immunoblotting</i>	37
3.25.1. Detecção da proteína <i>gp70</i> nativa em <i>Pb18</i>	37
3.25.2. Detecção da proteína <i>PbGP70</i> recombinante pelo anticorpo monoclonal anti- <i>gp70</i> nativa (MAb C5F11)	38
3.25.3. Detecção da proteína <i>PbGP70</i> recombinante por soros de pacientes com PCM	39
3.26. Imunolocalização da <i>PbGP70</i> recombinante por microscopia confocal	39
3.27. Experimentos para análise da expressão gênica	41
3.27.1. Análise da expressão do gene <i>PbGP70</i> durante o crescimento	41
3.27.2. Análise da expressão do gene <i>PbGP70</i> em condições de estresse oxidativo	41
3.27.3. Análise da expressão do gene <i>PbGP70</i> após a incubação com macrófagos derivados de medula óssea	42
3.27.3.1. Cultura de macrófagos derivados de medula óssea	42
3.27.3.2. Incubação de macrófagos murinos com <i>P. brasiliensis</i>	42
3.28. RT-PCR quantitativo em tempo real	43

3.29. Southern blot	44
3.30. Análise Estatística	45
4. RESULTADOS	46
4.1. Clonagem e caracterização do gene <i>PbGP70</i>	46
4.2. Expressão da proteína recombinante <i>PbGP70</i> parcial	61
4.3. Reatividade de <i>PbGP70</i> recombinante com soros de pacientes com paracoccidiodomicose (PCM)	66
4.4. Localização da proteína nativa e reatividade de anticorpos com a proteína recombinante	66
4.5. Análises <i>in silico</i> dos elementos de transcrição da região promotora do gene <i>PbGP70</i>	73
4.6. Expressão de <i>PbGP70</i> durante o crescimento do fungo e em situações de estresse oxidativo	77
5. DISCUSSÃO	84
6. CONCLUSÕES	93
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	94
8. ANEXOS	107

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Paracoccidioides brasiliensis*

O *Paracoccidioides brasiliensis* é o fungo termo-dimórfico causador da paracoccidioidomicose (PCM), doença endêmica da América Latina (San-Blas, 1993). A PCM é uma micose humana, sistêmica e de caráter granulomatoso que pode ser letal se não diagnosticada e tratada adequadamente. Foi descrita pela primeira vez por Adolpho Lutz (1908) que relatou a presença do fungo em lesões de dois pacientes. Somente após 22 anos desde a primeira descrição, Floriano Paulo de Almeida, em 1930, por meio de estudos sistemáticos, estabeleceu o novo gênero *Paracoccidioides* dentro do reino fungi e adotou o nome da espécie *brasiliensis*, anteriormente criado por Alfonso Splendore (1912) (revisado por Lacaz, 1994a).

Do ponto de vista taxonômico, o *P. brasiliensis*, durante muito tempo, foi considerado um fungo imperfeito, pois não é possível identificar sua fase telomórfica ou sexual. Recentemente, com o emprego de técnicas moleculares avançadas, esse fungo foi taxonomicamente classificado como *Eukaryota* do reino *Fungi*, filo *Ascomycota*, subfilo *Pezizomycotina*, classe *Eurotyomycetes*, ordem *Onygenales*, família *Onygenaceae*, gênero *Paracoccidioides* e espécie *brasiliensis* (Taxonomy ID: 121759, NCBI/ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/taxonomyhome.html/>).

Os fungos termo-dimórficos causadores de micoses sistêmicas *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis* e *Coccidioides immitis* tem sido relacionados como membros da família *Onygenaceae*, segundo análises de sequências do gene do RNA ribossomal (Peterson *et al.*, 1998; Untereiner *et al.*, 2004). Atualmente, foi proposta como uma nova família (*Onygenales*, *Ajellomycetaceae*). Essa clade engloba o grupo monofilético *Ajellomyces*, que inclui o gênero anamórfico *Blastomyces*, *Emmonsia*, *Histoplasma* e *Paracoccidioides* (Herr *et al.*, 2004; revisado por Bagagli *et al.*, 2008).

Quando cultivado à 25°C, o *P. brasiliensis* se apresenta na forma miceliana (saprofítica) e cresce na forma de colônias brancas aderidas ao meio, com aparência de “pelos de rato”. Ao microscópio óptico são observados longos filamentos septados com presença de artroconídeos terminais e/ou intercalares

(Lacaz, 1994b). Os artroconídeos podem se transformar em células leveduriformes à 37°C (McEwen *et al.*, 1987). Leveduras de *P. brasiliensis* produzem colônias do tipo cerebriformes, possuem múltiplos brotamentos, são multinucleadas e seu tamanho varia entre 4 e 30µm (Lacaz, 1994b; Brummer *et al.*, 1993).

Embora se acredite que o principal mecanismo de infecção por *P. brasiliensis* seja por meio da inalação dos conídeos presentes no ambiente, poucas vezes o fungo foi isolado diretamente do solo. Em áreas endêmicas de maior prevalência foi possível isolá-lo no Brasil (Silva-Vergara *et al.*, 1998; Theodoro *et al.*, 2005), na Argentina (Negroni 1966) e na Venezuela (De Albornoz, 1971). Além disso, existe um relato de seu isolamento em fezes de morcego (Grose e Tramsitt, 1965), em fezes de pinguins (Gesuele, 1989) e em ração de cães (Ferreira *et al.*, 1990).

Alguns casos esporádicos de infecção natural em animais selvagens e domésticos também foram relatados (Grose e Tramsitt, 1965, Johnson e Lang, 1977; Garcia *et al.*, 1993; Terçarioli *et al.*, 2007, Richini-Pereira *et al.*, 2008), inclusive em cães, nos quais a infecção foi demonstrada por estudos sorológicos (Ono *et al.*, 2001; Faria *et al.*, 2005; Silveira *et al.*, 2006), análise histopatológica e PCR (Ricci *et al.*, 2004).

Entretanto, os animais que apresentam a maior incidência da infecção por *P. brasiliensis* são tatus das espécies *Dasypus novemcinctus* (Bagagli *et al.*, 1998; Bagagli, *et al.*, 2003; Restrepo *et al.*, 2000, Richini-Pereira *et al.*, 2008) e *Cabassou centralis* (Corredor *et al.*, 2005). Diante desses dados, tem sido proposto que os tatus possam ser reservatórios naturais do fungo. Entretanto, o *habitat* natural do *P. brasiliensis* ainda não está definido.

1.2. Paracoccidioidomicose

A PCM é geograficamente limitada aos países da América Latina (Brummer *et al.*, 1993; Wanke e Londero, 1994), sendo prevalente na Argentina, Brasil, Colômbia e Venezuela, onde é endêmica em áreas rurais. Embora a doença não seja de notificação obrigatória, o Brasil apresenta o maior número de casos reportados e os estados de São Paulo, Paraná, Minas Gerais, e Rio Grande do Sul apresentam as áreas de maior prevalência e mortalidade da doença,

principalmente nas regiões não metropolitanas (Wanke e Londero, 1994; Coutinho *et al.*, 2002). Estima-se que a taxa de incidência anual seja de 3 casos a cada 100.000 habitantes nas áreas endêmicas (Restrepo, 2001; revisado por Coutinho *et al.*, 2002). De acordo com dados epidemiológicos recentes, a PCM representa a causa mais importante de morte entre as micoses sistêmicas (cerca de 51,2%) entre os casos relatados no Brasil de 1996 a 2006 (Prado *et al.*, 2009).

Não há referências da doença no Chile, Suriname, Guiana, Nicarágua e Belize (Wanke e Londero, 1994; Restrepo *et al.*, 2008). Alguns casos de PCM foram detectados nos Estados Unidos, Europa, África e Ásia, porém os pacientes já haviam residido ou trabalhado em países endêmicos, onde se acredita que eles tenham sido infectados (revisado em Lacaz, 1994a).

Características climáticas como temperaturas discretas em torno de 18 a 24 °C, chuvas abundantes (índice pluviométrico de 800 a 2000 mm por ano), altitude média de 47 – 1300 m, predomínio de florestas e árvores nativas, invernos secos e verões chuvosos locais parecem ser fatores determinantes para o estabelecimento do fungo em áreas onde a PCM é endêmica (Bagagli *et al.*, 1998)

O mecanismo de infecção por *P. brasiliensis* em humanos ainda não foi totalmente esclarecido, porém se acredita que os conídios produzidos pelo micélio saprofítico no ambiente, provavelmente os propágulos infecciosos, sejam inalados (McEwen *et al.*, 1987). Ao atingir os pulmões, o fungo pode ser rapidamente destruído ou transformar-se em leveduras patogênicas, formando o foco inicial da infecção. As lesões primárias podem: (I) regredir com destruição total do fungo; (II) regredir, porém com manutenção de fungos viáveis, formando focos latentes ou quiescentes que podem posteriormente ser reativados; (III) progredir rapidamente com o desenvolvimento dos sinais e sintomas da PCM (Montenegro e Franco, 1994). Além disso, a infecção pode atingir outros órgãos e sistemas pela via linfática e vasos sanguíneos.

Clinicamente, duas formas da Paracoccidioidomicose estão bem estabelecidas: a forma aguda ou subaguda (juvenil ou linfática) e a forma crônica (adulta ou pulmonar), porém as manifestações podem apresentar grandes variações um indivíduo para outro (Franco *et al.*, 1987). A forma aguda afeta principalmente crianças e adolescentes de ambos os sexos, é de rápida progressão por disseminação linfática e/ou hematogênica e provoca alta taxa de

mortalidade por comprometer o sistema retículo-endotelial (baço, fígado, linfonodos e medula óssea) (Benard *et al.*, 1994). A forma crônica é predominante, ocorre em 90% dos casos, acomete preferencialmente indivíduos do sexo masculino entre 30 e 60 anos, é de progressão lenta e manifesta-se principalmente nos pulmões, mas pode ser multifocal e disseminar-se para qualquer órgão, especialmente para tecidos mucocutâneos.

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

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

Testes sorológicos são comumente empregados para auxiliar o diagnóstico, monitorar a evolução da doença e a resposta ao tratamento desta

micose (Camargo, 2008; Camargo e Cano, 1994; Mendes-Giannini *et al.*, 1984). Imunodifusão radial usando filtrado de cultura da fase leveduriforme é utilizada mais frequentemente pela alta sensibilidade e especificidade (Restrepo, 1966; Camargo *et al.*, 1989). Métodos sensíveis como *immunoblotting*, para detecção de anticorpos específicos (Mendes-Giannini, 1989) e ELISA de competição, para pesquisa de antígeno na circulação (Gómez *et al.*, 1997; Marques *et al.*, 2003), têm sido desenvolvidos para monitoramento dos pacientes. Métodos moleculares utilizando a técnica de PCR também foram propostos para facilitar o diagnóstico definitivo do fungo (Sandhu *et al.*, 1997; Goldani e Sugar, 1998; Diez *et al.*, 1999; Gomes *et al.*, 2000; San-Blas *et al.*, 2005).

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

1.3. Relação parasita-hospedeiro

A diversidade de manifestações clínicas observadas na PCM é resultado de muitos fatores inerentes tanto à resposta do hospedeiro quanto à virulência do parasita, que juntos determinam a gravidade da doença (Musatti *et al.*, 1976; Biagione *et al.*, 1984; Franco, 1987; Mota *et al.*, 1985; Brummer *et al.*, 1993). Tanto na PCM, como em outras micoses profundas, a imunidade celular parece desempenhar papel fundamental nos mecanismos imunológicos de proteção do

hospedeiro (Brummer *et al.*, 1993; Borges-Walmsley *et al.*, 2002). Pacientes com a forma crônica apresentam imunidade celular preservada e baixos títulos de anticorpos específicos, ao passo que indivíduos com a forma aguda mostram altos títulos de anticorpos específicos, ativação policlonal de células B e resposta imune celular enfraquecida (Musatti *et al.*, 1976; Franco *et al.*, 1993; Benard *et al.*, 1997).

Uma das características da infecção por *P. brasiliensis* é a formação de granulomas, os quais parecem impedir a disseminação do parasita para tecidos saudáveis. O granuloma formado na PCM apresenta uma ou mais células fúngicas no centro e é composto por células gigantes e epitelióides. Células polimorfonucleares (PMNs) podem ser observadas na região central (próximas ao fungo) e, ao redor das células epitelióides, existe um halo de células mononucleares (Montenegro e Franco, 1994). Entretanto, os mecanismos pelos quais ocorre a migração celular que forma e mantém esses granulomas ainda não estão bem esclarecidos. Em pacientes com a forma menos grave da doença, a resposta imune do hospedeiro induz à formação de granulomas compactos com número reduzido de fungos no seu interior, já nos pacientes com a forma disseminada da doença os granulomas são frouxos, em menor quantidade e apresentam grande número de células fúngicas viáveis em seu interior (Montenegro e Franco, 1994).

Do ponto de vista imunológico, existe um consenso na literatura de que formas agudas ou subagudas da PCM estão associadas à modulação negativa do padrão de citocinas Th1 e expressão dominante da imunidade Th2, com altos níveis de citocinas IL-4, IL-5, IL-10 e TGF- β , maior quantidade de anticorpos IgG4, IgE e IgA, com eosinofilia e baixa produção de IFN- γ . Por outro lado, em pacientes com forma menos grave observa-se padrão de citocinas típico da resposta Th1, alta produção de TNF- α e IFN- γ e níveis basais de IL-4, IL-5 e IL-10 (Benard *et al.*, 2001; Oliveira *et al.*, 2002; Mamoni e Blotta, 2005; Mamoni e Blotta, 2006; Restrepo, *et al.* 2008).

Células dendríticas e macrófagos pulmonares são provavelmente as primeiras células a interagir com o fungo. Os macrófagos têm papel importante na doença, pois parecem participar tanto da disseminação quanto da contenção da infecção (revisto em Benard *et al.*, 2008). Estudos *in vitro* mostraram que o *P. brasiliensis* é capaz de sobreviver e se multiplicar dentro de macrófagos

peritoneais e pulmonares (Brummer *et al.*, 1989; Cano *et al.*, 1992). Por isso, acredita-se que essas células poderiam fazer o transporte do fungo pela via linfática. Entretanto, macrófagos ativados por IFN- γ tem alto potencial fungicida para a levedura internalizada (Brummer *et al.*, 1988). Macrófagos ativados por IFN- γ produzem TNF- α , este está envolvido no recrutamento e ativação de células inflamatórias e na formação do granuloma (Kindler *et al.*, 1989; Vigna *et al.*, 2006). Além disso, TNF- α e IFN- γ juntos podem participar da resistência ao *P. brasiliensis* por mecanismos que incluem aumento da expressão de moléculas MHC (classe I e II), moléculas coestimuladoras (CD80 e CD86) e *burst* oxidativo em macrófagos. Os PMNs exercem efeito fungistático e fungicida sobre *P. brasiliensis*, atividade que aumenta quando ativadas pelas citocinas IFN- γ , GM-CSF e IL-1 β (McEwen *et al.*, 1987; Kurita *et al.*, 1999; Kurita *et al.*, 2000).

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

O termodimorfismo celular do *P. brasiliensis* é essencial para o estabelecimento da PCM (Restrepo e Jiménez, 1980; San-Blas, 1982), uma vez que isolados que não se diferenciam em leveduras são incapazes de causar a doença (Moraes Borba e Shaffer, 2002). A associação entre morfogênese e virulência tem sido descrita em vários fungos dimórficos (*B. dermatitidis*, *C. immitis*, *H. capsulatum*, *P. brasiliensis*, *P. marneffeii* e *S. schenkii*) (Medoff *et al.*, 1987; San-Blas e Niño-Vega, 2001; Broges-Walmsley *et al.*, 2002; Rooney e Klein, 2002). Os mecanismos do controle da morfogênese são complexos e envolvem alterações na estrutura da parede celular, processos metabólicos e

cascatas de sinalização (revisado por San-Blas *et al.*, 2002). Durante a transição dimórfica, *P. brasiliensis* modifica os polímeros de glucana da parede celular de β -glucana, predominante na fase de micélio, para α -glucana, encontrada em maior quantidade na fase de levedura (San-Blas e San-Blas, 1994). Esse processo pode ser considerado como mecanismo de escape do fungo, já que β -glucanas podem induzir resposta pró-inflamatória e antimicrobiana através de receptores *Toll-like* (TLR) e dectina-1 (Brown e Gordon, 2003).

1.4. Componentes antigênicos de *P. brasiliensis*

Alguns componentes antigênicos de *P. brasiliensis* são capazes de induzir resposta imune humoral e celular. Entre esses componentes, o principal e melhor caracterizado é uma glicoproteína de 43kDa, secretada, denominada gp43 (Puccia *et al.*, 1986).

Anticorpos específicos para gp43 estão presentes em praticamente 100% dos soros de pacientes com PCM (Puccia *et al.*, 1986; Puccia e Travassos, 1991a; Camargo *et al.*, 1994). Esta glicoproteína é do tipo *high manose* e tem uma única cadeia oligossacarídica *N*-ligada (Puccia e Travassos, 1991b; Cisalpino *et al.*, 1996), a qual interage com receptores para manose em macrófagos murinos (Almeida *et al.*, 1998; Popi *et al.*, 2002).

O gene PbGP43 foi o primeiro gene caracterizado em *P. brasiliensis* e sua sequência apresenta grande similaridade com exo-1,3- β -glucanases fúngicas. Contudo, um dos sítios catalíticos conservados de atividade de glucanase apresentou a substituição do resíduo E para K, de NEP para NKP, o que provavelmente induziu a perda da atividade enzimática da gp43 (Cisalpino *et al.*, 1996). Estudos moleculares de 17 isolados do fungo mostraram polimorfismo no gene que codifica gp43 (Moraes *et al.*, 2000). Além disso, após a clonagem e caracterização foi possível realizar estudos objetivando o uso da proteína recombinante no diagnóstico da PCM (Carvalho *et al.*, 2008; Diniz *et al.*, 2002).

Além de induzir resposta imune humoral, a gp43 é capaz de estimular resposta imune celular em humanos (Benard *et al.*, 1997) e animais infectados experimentalmente (Rodrigues e Travassos, 1994). Taborda e colaboradores (1998) mostraram que um peptídeo de 15 aminoácidos da gp43 (P10) é o

responsável pela ativação de célula T CD4⁺ em animais imunizados. Camundongos BALB/c imunizados com a gp43, P10 ou com o gene da gp43 e infectados com *P. brasiliensis* apresentaram granulomas pulmonares epitelióides em pequeno número, com poucas células viáveis no seu interior e ausência de lesões no fígado e baço (Pinto *et al.*, 2000). Estudos mais recentes mostraram que a imunização com P10 associada à quimioterapia, em camundongos infectados com *P. brasiliensis* potencializa ainda mais a proteção contra fungo (Marques *et al.*, 2008).

A gp43 é considerada potencial fator de virulência, pois pode ligar-se à laminina murina, resultando no aumento da capacidade do fungo de invadir e destruir tecidos (Vicentini *et al.*, 1994) no modelo intratesticular. Esse efeito foi modulado por anticorpos monoclonais anti-gp43 (Gesztési *et al.*, 1996). Entretanto, no modelo de infecção pulmonar a ligação da laminina ao *P. brasiliensis* levou à diminuição da patogenicidade (Andre *et al.*, 2004). Mendes-Giannini e colaboradores (2000) mostraram que o fungo pode também se ligar a outros componentes da matriz extracelular e mais recentemente, este mesmo grupo mostrou a interação da gp43 com fibronectina humana, sugerindo que essa glicoproteína tem papel importante na adesão do fungo a diferentes componentes da matriz extracelular do hospedeiro (Mendes-Giannini *et al.*, 2006). O papel da gp43 como adesina foi reforçado por estudos que mostraram a participação direta da molécula na interação do fungo com pneumócitos da linhagem A549 e à células Vero (Hanna *et al.*, 2000; Mendes-Giannini *et al.*, 2004).

Outra característica da gp43 que tem sido bastante explorada é a capacidade que de modular negativamente a resposta imune, o que sugere sua possível participação nos mecanismos de evasão do fungo. Popi e colaboradores (2002) mostraram que gp43 inibiu a fagocitose de *P. brasiliensis* vivo ou morto pelo calor, de hemáceas de carneiro opsonizadas (via receptor Fc), de partículas de zimosan (via receptor de manose) e, além disso, inibiu a produção de NO e H₂O₂ de macrófagos peritoneais murinos. Mais recentemente, os mesmos resultados foram demonstrados com gp43 e macrófagos derivados de medula óssea e os epítomos da molécula responsáveis por esse efeito foram identificados (Konno *et al.*, 2009). Em experimentos com células dendríticas imaturas, gp43 inibiu a expressão de MHC, CD80 e CD54 (Ferreira *et al.*, 2004).

Outro antígeno relevante de *P. brasiliensis* é a gp70, uma glicoproteína de 70 kDa reconhecida por 96% dos soros de pacientes com PCM (Salina *et al.*, 1998). Por ser o foco do presente trabalho a gp70 será melhor detalhada no item 1.4.2 a seguir.

A Paracoccina possui massa molecular de 70kDa, é proteína secretada pelo fungo, mostrou capacidade de ligação à laminina murina e induziu alta produção de TNF- β e NO por macrófagos peritoneais murinos (Coltri *et al.*, 2006). Além disso, a proteína parece estar envolvida no crescimento de *P. brasiliensis* e localiza-se na região de brotamento (Ganiko *et al.*, 2007).

Outros antígenos com distintas massas moleculares também foram identificados e caracterizados. Dentre eles, destaca-se uma proteína de 87 kDa, encontrada no soro de pacientes com PCM (Gómez *et al.*, 1997) e com N-terminal apresentando homologia para Hsp70 de vários fungos, incluindo *P. brasiliensis* (Díez *et al.*, 2002).

A Hsp60, caracterizada e clonada por Cunha e colaboradores (2002), apresentou alto índice de reatividade com soros de pacientes com PCM e, posteriormente, a imunização com a Hsp60 recombinante conferiu imunoproteção frente à infecção experimental por *P. brasiliensis* (Soares *et al.*, 2008).

Recentemente foi identificada por meio de análises de gel-bidimensional uma proteína de 54kDa com propriedades de adesão a fibronectina e homóloga a uma enolase de *P. brasiliensis* (Donofrio *et al.*, 2009). Outra enolase, com propriedades semelhantes, porém ligante de laminina foi descrita em *Staphylococcus aureus* por nosso grupo. (Carneiro *et al.*, 2004). Proteínas antigênicas com massa molecular de 27 e 58 kDa também foram caracterizadas (McEwen *et al.*, 1996; Figueroa *et al.*, 1995).

Fonseca e colaboradores (2001) identificaram seis proteínas preferencialmente sintetizadas na fase de leveduriforme do fungo: catalase, frutose 1,6-bifosfato aldolase (aldolase), gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GADPH), malato desidrogenase e triosefosfato isomerase. As enzimas catalase, aldolase, triosefosfato isomerase e GADPH foram posteriormente clonadas e sequenciadas (Moreira *et al.*, 2004; Carneiro *et al.*, 2005; Pereira *et al.*, 2004; Barbosa *et al.*, 2004).

Além disso, a GADPH foi encontrada na parede celular do *P. brasiliensis* e a molécula recombinante correspondente ligou-se à laminina, fibronectina e colágeno tipo I e anticorpos policlonais anti-GADPH inibiram a adesão do fungo à linhagem de pneumócitos A549, demonstrando assim a importância biológica da molécula (Barbosa *et al.*, 2006).

Além dessas, proteínas como PbMdj1 encontrada na mitocôndria e parede celular do fungo (Batista *et al.*, 2006), gp75 presente na membrana e regiões de brotamento (Xander *et al.*, 2007) e a calnexina, presente no retículo endoplasmático das células leveduriformes (Feitosa *et al.*, 2007), também foram reconhecidas por soros de pacientes com PCM.

1.4.2. A Glicoproteína gp70

Puccia e colaboradores (1986) ao estudarem a natureza de antígenos extracelulares de *P. brasiliensis*, verificaram que componentes com grande reatividade nos testes de imunodifusão podiam ser isolados por exclusão em colunas de gel filtração, seguida pela passagem em coluna de sepharose acoplada à Concanavalina A e posterior eluição. Somente as frações que se ligavam a esta lectina continham antígenos que reagiam com soros de pacientes com PCM. A análise por SDS-PAGE do material eluído revelou a presença quatro componentes de 43, 55, 70 kDa e um componente de alto peso molecular, com migração difusa.

A fração de 70kDa obtida por gel filtração foi testada por ELISA em soros de pacientes com PCM e outras micoses sistêmicas, e foram observadas reações cruzadas intensas com soros de Jorge Lobo e Histoplasmoses (Unterkircher, 1988).

Posteriormente foi verificado por *immunoblotting* que soros de pacientes com PCM reconheciam predominantemente o componente de 43 KDa (gp43) e que 96% desse soros também reagiam com o componente de 70 kDa, a glicoproteína gp70. Em pacientes que se submeteram a terapia antimicótica, significativa diminuição nos títulos de anticorpos anti-gp70 foi observada, sugerindo que a gp70 possa ser considerada um marcador para a doença (Camargo *et al.*, 1989; Silva *et al.*, 2004).

Foi demonstrado por Benard e colaboradores (1997) que a gp70 é capaz de induzir resposta linfoproliferativa quando testada em pacientes com PCM. Salina e colaboradores (1998) demonstraram a presença da gp70 na urina de pacientes com PCM e, posteriormente, o antígeno circulante foi detectado em pacientes com Neuroparacoccidioidomicose, bem como anticorpos específicos anti-gp70 estavam presentes no fluido cerebrospinal desses pacientes (Silva *et al.*, 2005).

A gp70 vem sendo alvo de estudo em nosso laboratório há alguns anos. A primeira tentativa de se estudar essa molécula para caracterizá-la e entender melhor seu papel na PCM foi realizada por Grosso e colaboradores (2003). Nesse trabalho a proteína nativa foi capaz de modular funções de macrófagos peritoneais murinos como fagocitose (via receptor de manose e via receptor Fc) e produção de NO e H₂O₂. Além disso, foram produzidos anticorpos monoclonais anti-gp70 os quais conferiram proteção a animais infectados experimentalmente, pois a instalação do fungo nos pulmões foi diminuída assim como o desenvolvimento da PCM. Esses dados sugerem que a gp70 possa participar de mecanismos de evasão do fungo na instalação da infecção primária (Grosso *et al.*, 2003).

Uma das dificuldades encontradas no trabalho de Grosso e colaboradores (2003), foi a obtenção de maiores quantidades do antígeno, mesmo após a obtenção de anticorpos monoclonais específicos, visto que esse antígeno era pouco expresso e pouco secretado no sobrenadante de cultura do fungo. Devido aos baixos rendimentos na purificação desse antígeno, uma alternativa seria realizar a clonagem e caracterização do gene e posterior obtenção da proteína recombinante, o que possibilitaria a realização de mais ensaios para sua caracterização.

As primeiras tentativas de clonagem desse gene foram realizadas também em nosso laboratório. Feitosa e colaboradores (2007) realizaram microsequenciamento de peptídeos internos da gp70 de *P. brasiliensis* isolado 01, desenharam oligonucleotídeos iniciadores degenerados correspondentes a esses peptídeos e, posteriormente, obtiveram um fragmento de DNA genômico de 384 pb. Esse fragmento foi utilizado como sonda para realizar o rastreamento da biblioteca de cDNA de *P. brasiliensis* isolado 01, porém o resultado final desse trabalho resultou na clonagem fortuita do gene da calnexina (PbCNX), uma proteína também importante, como mencionado anteriormente.

1.5. Heterogeneidade de *P. brasiliensis*

A heterogeneidade entre os diferentes isolados de *P. brasiliensis* tem sido descrita por vários autores. Variações quanto às características de virulência, velocidade de crescimento, composição bioquímica, imunogenicidade, perfil de isoenzimas, cariótipo já foram descritas (Zacharias *et al.*, 1986, Burger *et al.*, 1996; Calcagno *et al.*, 1998; Molinari-Madlum *et al.*, 1999; Svidzinski *et al.*, 1999; Feitosa, *et al.*, 2003; Carvalho *et al.*, 2005). É possível que tal diversidade esteja correlacionada às diversas manifestações clínicas (Franco, 1987).

Estudos com diversos modelos experimentais da PCM demonstraram que os isolados de *P. brasiliensis* variam quanto à virulência (Zacharias *et al.*, 1986; Singer-Vermes *et al.*, 1989; Burguer *et al.*, 1996; Hebeler-Barbosa *et al.*, 2003). Singer-Vermes e colaboradores (1989) por meio da infecção de camundongos susceptíveis (B10.A) com diferentes isolados do fungo, observaram distintos padrões de virulência: (I) fracamente virulentos – isolados Pb265 e IVIC Pb267; (II) de virulência intermediária – isolados Pb192, IVIC Pb9 e Pb SN; (III) virulento – isolado Pb2052; (IV) altamente virulento – isolado Pb18. Alguns autores relacionaram essa diferença no padrão de virulência após à variabilidade genética entre os isolados de *P. brasiliensis* (Molinari-Madlum *et al.*, 1999; Sano *et al.*, 1998; Carvalho *et al.*, 2005).

Svidzinski e colaboradores (1999) avaliaram o comportamento de 30 amostras de *P. brasiliensis* isoladas de pacientes portadores de diferentes formas clínicas de PCM e observaram variabilidade fenotípica na morfometria, número de brotamentos, capacidade de transição de fase de micélio (M) para levedura (L) e velocidade de crescimento.

Isolados de *P. brasiliensis* também apresentam diferenças quanto a sua patogenicidade (Zacharias *et al.*, 1986; Burger, 1996).

Morais e colaboradores (2000) observaram polimorfismo genético no gene que codifica a gp43 em 17 isolados de *P. brasiliensis*. Nesse trabalho os autores conseguiram distinguir genótipos típicos de grupos distintos de isolados, nos quais as substituições ocorreram principalmente no exon 2 e na região promotora.

As sequências dos isolados Pb2, Pb3 e Pb4 apresentaram o maior número de substituições, formando um grupo distante filogeneticamente dos demais.

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

1.6. Transcriptoma e genoma de *P. brasiliensis*

1.6.1. Transcriptoma

Grande quantidade de dados transcricionais têm sido obtidas através do empenho de pesquisadores que trabalham com *P. brasiliensis*. (Almeida *et al.*, 2007; Ferreira *et al.*, 2006; Felipe *et al.*, 2005; Nunes, *et al.*, 2005; Goldman *et al.*, 2003).

A estratégia metodológica para a obtenção desses dados reuniu técnicas moleculares básicas e análises de bioinformática. Brevemente, todo o cDNA obtido à partir do RNA total de *P. brasiliensis* foi clonado em vetor de expressão, as porções 5' e 3' de cada clone foi sequenciada utilizando os oligonucleotídeos iniciadores do vetor. Os dados obtidos foram analisados e organizados em bancos de dados de sequências expressas, também chamados de Transcriptomas ou Bancos de ESTs (*Expressed Sequence Tags*) (Andrade *et al.*, 2005; Felipe *et al.*, 2005; Goldman *et al.*, 2003).

Goldman e colaboradores (2003) identificaram 4.692 genes expressos pelo fungo na fase de levedura e também analisaram por RT-PCR quantitativo a expressão de alguns deles durante a transição dimórfica levedura-micélio.

A partir do sequenciamento de ESTs de ambas as fases, Felipe e colaboradores (2005) encontraram 6.022 genes expressos, os quais provavelmente representam 80% do genoma estimado do *P. brasiliensis*.

As informações contidas nesses bancos de dados têm facilitado a identificação e clonagem de vários genes de *P. brasiliensis*.

1.6.2. Genoma

Quanto aos aspectos genéticos do *P. brasiliensis*, o tamanho inicial do genoma foi estimado entre 23 à 31Mb (Montoya *et al.*, 1997; Montoya *et al.*, 1999; Cano *et al.*, 1998; Feitosa *et al.*, 2003; Almeida *et al.*, 2007), com a presença de 4 ou 5 bandas cromossômicas variando entre 2 à 10Mb de tamanho (Feitosa *et al.*, 2003). No entanto, experimentos de microfluorometria utilizando marcação com 4',6'-diamidino-2-fenilindol (DAPI) obtiveram valores duas vezes maior que os obtidos por PGFE (*Pulsed Field Gel Electrophoresis*) (Cano *et al.*, 1998). Desta forma, a ploidia deste fungo ainda não está totalmente esclarecida, existindo evidências tanto de haploidia ou aneuploidia (Almeida *et al.*, 2007), quanto de diploidia (Cisalpino *et al.*, 1996; Morais *et al.*, 2000).

Recentemente, o crescente interesse no estudo molecular dos fungos, devido à sua importância econômica e em patologias humanas e veterinárias, levou o *Broad Institute* (MIT - *Massachusetts Institute of Technology*) em colaboração com diversos grupos de pesquisas no mundo, a desenvolver o projeto do “Estudo comparativo do genoma de *Coccidioides immitis* e outros fungos dimórficos patogênicos” (http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/dimorph_collab.1/MultiHome.html). Esse projeto teve o suporte do *Dimorphic Fungal Genomes Consortium* e disponibilizou para os pesquisadores os genomas dos fungos: *Blastomyces dermatitidis*, *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis*, *Lacazia loboi*, *Paracoccidioides brasiliensis*, isolados 18, 3 e 01 (Puccia *et al.*, 2008).

Os genomas de *P. brasiliensis* foram finalizados no início de 2008 e estão disponíveis em: http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/paracoccidioides_brasiliensis/MultiHome.html.

1.6.3. Análises moleculares e genes identificados

Após a obtenção e disponibilização dos dados do genoma e transcriptoma de *P. brasiliensis*, muitos estudos moleculares vem sendo realizados e o que têm possibilitado a identificação de muitos genes e suas funções.

Goldman e colaboradores (2003) analisaram *in silico* 4.692 genes do banco de ESTs comparando com genes relacionados à virulência e patogenicidade de *C. albicans*. Entre os putativos fatores de virulência foram encontrados genes relacionados ao metabolismo (isocitrato liase e malato sintase), à biossíntese da parede celular (β -Glucosiltransferase e quitina-sintase) e à sinalização intracelular (fatores das vias AMPc e MAPK). Neste mesmo trabalho, foram realizadas análises de expressão gênica, durante a transição micélio-levedura. Os genes codificadores de proteínas de choque térmico (*HSP70*, *HSP82* e *HSP104*, de poliubiquitina (*UBI1*) e de uma delta-9-desaturase (*OLE1*) apresentaram aumento na expressão do mRNA.

Por meio de técnicas de *Suppression Subtraction Hybridization* (SSH) e *Macroarray* foram identificados 20 genes preferencialmente expressos na fase patogênica, incluindo o *AGS1* (α -1,3-glucana sintase) e *TSA1* (antioxidante tiol específico) (Marques *et al.*, 2004). Nunes e colaboradores (2005) desenvolveram um *biochip* que possibilitou a análise de aproximadamente 4700 genes. Alguns destes estavam abundantemente expressos ao final da transição para levedura, entre os quais o gene *METR*, que codifica um fator de transcrição que ativa genes envolvidos na assimilação de sulfato, o gene da proteína álcool desidrogenase III e o gene da 4-hidroxifenil-piruvato desidrogenase (4-HPPD), as quais estão envolvidas no catabolismo de aminoácidos.

Na análise *in silico* feita por Felipe *et al.* (2003) os genes que codificam Hsp70, Hsp60, Hsp104 e calmodulina tiveram expressão significativamente aumentada na fase leveduriforme de Pb01. Posteriormente, foram identificados cerca de 30 ortólogos anteriormente descritos como genes de virulência ou essenciais para *C. albicans*, *C. neoformans* e *Aspergillus fumigatus*, sendo

subdivididos em genes relacionados ao metabolismo, parede celular ou transdução de sinais (Felipe *et al.*, 2005). Mais recentemente, Parente e colaboradores (2008) descreveram 43 genes envolvidos nos processos iniciais da transição micélio-levedura.

Outros modelos que mimetizam o ambiente no interior do hospedeiro foram utilizados nos estudos de transcriptoma. Bailão e colaboradores (2007) identificaram genes relacionados à aquisição de ferro, síntese de melanina e defesa celular regulados positivamente no modelo de infecção em camundongo. As leveduras incubadas com sangue humano modularam genes principalmente relacionados à síntese e remodelamento da parede celular.

Análises de *Microarray* identificaram 152 genes diferencialmente expressos em leveduras após a internalização por macrófagos murinos peritoneais *in vitro* e três desses genes foram validados por RT-PCR: *metG*, relacionado à produção de metionina e dois genes relacionados ao *stress* oxidativo *SOD3* e *HSP60* (Tavares *et al.*, 2007). Mais recentemente, três membros da família das catalases (*PbCatA*, *PbCatP* e *PbCatC*) (Chagas *et al.*, 2008) e genes relacionados ao ciclo do glioxilato foram regulados positivamente após passagem em macrófagos murinos (Derengowski *et al.*, 2008).

Foram identificados e caracterizados também os genes que codificam as proteínas de transição de fase e choque térmico *HSP70* (Silva *et al.*, 1999; Theodoro *et al.*, 2008), *HSP60* (Izaac *et al.*, 2001), *CLPB* (Jesuino *et al.*, 2002), *PbLON* (Barros e Puccia, 2001) e *PbHSP90* (Nicola *et al.*, 2008).

Apesar de todos esses avanços na clonagem e caracterização de genes, muitos genes em *P. brasiliensis* ainda permanecem sem função identificada e apresentam notação de “proteínas hipotéticas” nos bancos de dados existentes.

2. OBJETIVOS

Os objetivos do presente trabalho foram:

- Clonar o gene que codifica a glicoproteína gp70 de *P. brasiliensis*;
- Analisar a sequência de nucleotídeos do gene PbGP70 e a sequência deduzida de aminoácidos da proteína.
- Expressar e purificar a proteína recombinante.
- Analisar a antigenicidade da proteína recombinante em soros de pacientes com paracoccidiodomicose.
- Obter anticorpos anti-gp70 recombinante, analisar a localização celular da proteína nativa reconhecida por esses anticorpos;
- Analisar situações em que a expressão do gene PbGP70 poderia aumentar.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Soluções

As soluções descritas a seguir foram preparadas com água bidestilada ou filtrada em sistema Millipore (padrão Mili-Q) e armazenadas apropriadamente.

- **Solução estoque de Tampão fosfato-salina (PBS):** NaCl 2,7378 M, KCl 0,053 M, Na₂HPO₄ 0,1301 M e K₂HPO₄ 0,0229 M. A solução estoque foi diluída 20 vezes para o uso (PBS 1X).
- **PBS-Tween 0,2%:** 0,2% Tween-20 (v/v) em PBS para uso (PBS 1x).
- **Tampão de amostra para SDS-PAGE desnaturante:** Tris-HCl 62 mM, pH 8,8, contendo 0,2% (p/v) de SDS, β-mercaptanol 50mM, 0,005% (p/v) de azul de bromofenol e 10% (v/v) de glicerol.
- **Solução estoque de acrilamida/bis 30% para SDS-PAGE:** 30% de acrilamida, 0,8% de bis-acrilamida e água bi-destilada 100 mL q.s.p.
- **Tampão para gel de proteína (separação) desnaturante:** Tris-HCl 1,5M, pH 8,8, contendo 0,4% de SDS (p/v).
- **Tampão para gel de proteína (empacotamento) desnaturante:** Tris-HCl 0,5M, pH 6,8, contendo 0,4% de SDS (p/v).
- **Tampão de corrida para SDS-PAGE:** Tris 25 mM, glicina 190 mM, pH 8,3, e 0,1% de SDS (p/v).
- **Tampão para transferência de proteínas:** Tris-HCl 25 mM, glicina 192 mM e 20% de metanol (v/v).
- **Solução de Metaperiodato de sódio:** 45 mg de metaperiodato de sódio em 10 mL de tampão acetato de sódio 50 mM pH 4,5. Preparar na hora do uso.
- **Corante de azul de Coomassie:** 0,2% de coomassie R250 (p/v) em 50% de metanol e 10% de ácido acético (v/v).

- **Descorante forte para Coomassie:** 50% de metanol, 10% de ácido acético e 40% de água destilada (v/v).
- **Corante Ponceau:** 0,5% (p/v) de Ponceau S em 5% de ácido acético (v/v).
- **TBE 10x:** 108 g/L de Tris-base, 55 g/L de ácido bórico, 3,72 g/L de EDTA e água, pH 8,3.
- **TE:** 10 mM de Tris-HCl, 1 mM de EDTA, pH 8,0.
- **SSC 20x:** 0,15 M de cloreto de sódio, 0,015 M de citrato de sódio, pH 7,0-8,0.
- **Solução de pré-hibridização para hibridização de DNA:** 5% de dextran sulfato, líquido de bloqueio 1:20 (Gene Image - Amersham), SDS 0,1%, SSC 5x.
- **Solução de desnaturação (para ácidos nucléicos):** 1,5 M de cloreto de sódio e 0,5 M de hidróxido de sódio.
- **Solução de depurinação (para ácidos nucléicos):** 250 mM de ácido clorídrico.
- **Solução de neutralização (para ácidos nucléicos):** 1,5 M de cloreto de sódio, 0,5 M de Tris-HCl, pH 7,0.
- **Denharts:** Ficoll (Tipo 400) 1%, polivinilpirrolidona 1% e BSA 1%.
- **Tampão Tris-Ca²⁺:** Tris-HCl (pH 8,8) 20 mM, CaCl₂ 2 mM.
- **Tampão SM:** NaCl 100 mM, Tris-HCl (pH 7,5) 50 mM, MgSO₄ 10 mM.
- **Tampão de amostra para DNA 6X:** 0,25% azul de bromofenol, 0,25% de xileno-cianol e 30% de glicerol.
- **Tampão de amostra para RNA com uréia:** 0,25% azul de bromofenol, 0,25% de xileno-cianol, 30% de glicerol e 7 M de uréia.

3.2. Meios para cultivo de microrganismos

Os meios descritos a seguir foram preparados com água bidestilada e autoclavados por 15 min a 120°C. Para a formulação dos meios sólidos foram adicionados 1,5% de ágar.

- **Meio YPD modificado (YPDmod):** utilizado para crescimento e manutenção de culturas leveduriformes de *P. brasiliensis*. Composto de 0,5% de extrato de levedura (BioBrás), 1% de peptona de caseína (BioBrás) e 0,5% de dextrose (Sigma), pH 6,5.
- **Meio LB (Luria-Bertani):** Para crescimento e manutenção de bactérias. Composto de 1 % de triptona (BioBrás), 0,5 % de extrato de levedura (BioBrás) e 1 % de NaCl, pH 7,3.
- **Meio LB Ampicilina:** Meio LB acrescido de 100 µg/mL de ampicilina no momento do uso. Em meio LB sólido, o antibiótico foi adicionado quando a temperatura estava abaixo dos 60°C.
- **Meio LB Ampicilina/Cloranfenicol:** Meio LB acrescido de 100 µg/mL de ampicilina e 35 µg/mL de cloranfenicol no momento do uso. Em meio LB sólido, os antibióticos foram adicionados quando a temperatura estava abaixo dos 60°C.
- **Meio BHI (infusão de cérebro e coração) enriquecido:** 3,7% de DIFCO™ *Beef Heart for Infusion*. Quando a temperatura do meio atingia cerca de 60°C eram adicionados 4% de soro equino, 5% de sobrenadante de cultura de *P. brasiliensis* B-339, como fator de crescimento (Castañeda *et al.*, 1998) e ampicilina-estreptomicina (100 µg/mL e 100 UI/mL, respectivamente).

3.3. Meios de cultivo para células de mamíferos

Os meios seguintes foram preparados com água bidestilada e esterilizados por filtração positiva em filtros com poros de 0,22 µm.

- **Meio RPMI:** RPMI 1640 (Sigma) acrescido de ácido N-2-hiroxiethylpiperazina-N-2-etanosulfônico 10 mM (HEPES - Sigma), bicarbonato de sódio 24 mM (Sigma) e 40 µg/mL de gamicina (Schering).
- **Meio R-10 (RPMI suplementado):** meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB, Cultilab, Campinas).

3.4. Cepas Bacterianas

As cepas bacterianas selvagens e recombinantes foram mantidas em meio LB com repiques regulares ou congeladas a -70 °C na presença de glicerol (20 %).

Os plasmídios foram mantidos na bactéria *Escherichia coli* DH5α, genótipo F⁻, φ80d *lacZ*-ΔM15, *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *hsdR17* (r_k⁻, m_k⁺), *supE44*, *relA1*, *deoR*, Δ-(*lac ZYA-arg F*) U169, *phoA* (Hanahan, 1985).

A expressão de proteína recombinante foi feita em *E. coli* BL21pLysS, genótipo F⁻ *ompT*, *hsdS_B* (r_B⁻, m_B⁻), *gal*, *dcm*, λ(DE3), pLysS (Cm^r) (Studier e Moffatt, 1986).

3.5. Isolado de *Paracoccidioides brasiliensis*

3.5.1. *P. brasiliensis* isolado 18 (Pb18)

O isolado de Pb18, gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Zoilo Pires de Camargo (Disciplina de Biologia Celular – Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia (DMIP), UNIFESP, São Paulo) e caracterizado por Moraes *et al.*, 2000, foi utilizado em todos os ensaios.

3.5.2. Manutenção do Isolado

O isolado leveduriforme foi mantido em meio YPDmod sólido a 36°C e repicado semanalmente. Para os experimentos que se seguem foram utilizados fungos entre o 1º e 6º repiques consecutivos para evitar variação nas características do isolado.

3.6. Animais

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

3.7. Preparação do extrato celular de *P. brasiliensis*

O extrato celular foi obtido segundo descrito por Fonseca *et al.*, 2001. Células leveduriformes do isolado Pb18 foram crescidas por 7 dias em meio YPDmod a 36°C. As células foram retiradas do meio, lavadas com água bidestilada estéril e centrifugadas. Após centrifugação, o sobrenadante foi descartado e as células, trituradas das em gral de porcelana estéril na presença de nitrogênio líquido. O material triturado foi transferido para um tubo contendo tampão Tris-Ca²⁺ (20 mM Tris-HCl pH 8,8, 2 mM CaCl₂) com os inibidores de protease N- α -p-tosyl-L-lysine chloromethylketona (50 μ g/mL), phenylmethyl-sulfonylfluorida (4 mM), iodoacetamida (5 mM), EDTA (1 mM) e leupeptina (20 μ g/mL). A mistura foi homogeneizada vigorosamente por 15 min a 4°C e centrifugada a 12000 x g por 20 min. Após centrifugação, o sobrenadante foi retirado e estocado a -70°C. A dosagem protéica foi realizada segundo método de Bradford, 1976.

3.8. Extração de DNA

Para a extração de DNA de *P. brasiliensis*, células fúngicas leveduriformes com 5 dias de crescimento em YPDmod sólido foram utilizadas na obtenção de um pré-inóculo com 4 a 7 dias de crescimento em 100 mL de meio YPDmod líquido. Este foi transferido para 900 mL de meio fresco e cultivado por mais 10 dias. A cultura foi filtrada em filtro de papel comum (duas camadas) para separar as células do sobrenadante. A extração de DNA foi feita segundo o método descrito por Cisalpino *et al.* (1994) (com modificações). Células do fungo, aproximadamente 10 mL, foram lisadas mecanicamente por trituração em gral, na presença de nitrogênio líquido, até a formação de um pó. O triturado foi ressuspensionado em 25 mL de solução contendo 50 mM de Tris, 100 mM de EDTA, 5% de sarcosil, 500 µg/mL de proteinase K e lisado por 15 min em Potter-Elvehjen. A suspensão foi incubada por 2 h a 56°C e centrifugada para deposição dos resíduos de células. Em seguida, o DNA do sobrenadante foi semi-purificado com 2 extrações de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (50:49:1). À fase orgânica da segunda extração, foi adicionado igual volume de tampão contendo 100 mM de Tris-HCl pH 9,0, 100 mM de EDTA e de isopropanol. A solução foi mantida por 16-18 h a -20 °C, para facilitar a precipitação do DNA. O precipitado seco foi ressuspensionado em 0,5 mL de tampão Tris/EDTA (TE), dissolvido a 65 °C por 10 min e tratado com RNase (100 µg/mL) por 1 h a 37 °C. O produto final da extração foi dosado por espectrofotometria no aparelho DanoDrop (ThermoScientific, USA), e a integridade, analisada em gel de agarose 1%. As alíquotas foram armazenadas a -20 °C.

3.9. Extração de RNA

Células fúngicas de *P. brasiliensis* cultivadas por 5 dias em 50 mL de meio YPD mod a 36°C, sob agitação foram utilizadas para extração do RNA total.

O RNA total foi obtido pelo método do Trizol (Invitrogen), com modificações. Aproximadamente 1,5 - 2,0 mL de células fúngicas eram lisadas mecanicamente por agitação com pérolas de vidro durante 10 min na presença de 3,5 a 4 mL de

Trizol. Após 10 min de repouso à temperatura ambiente, a mistura foi centrifugada (1800 x g, por 10 min a 4°C) para remoção dos fragmentos celulares. Para cada 0,75 mL do sobrenadante foram acrescentados 0,2 mL de clorofórmio e a mistura agitada vigorosamente. Após 10 min em repouso à temperatura ambiente, as fases foram separadas por centrifugação (1800 x g, por 10 min a 4°C) e a fase superior aquosa, extraída com igual volume de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (50:49:1, v:v:v). À fase aquosa final foi adicionado um volume de isopropanol e acrescentado citrato de sódio 1,2 N / cloreto de sódio 0,8 N (0,25 mL de solução para cada 0,75 mL de Trizol inicial) para precipitação do RNA a -20 °C por um período de 16-18 h. O precipitado foi recolhido por centrifugação (1800 x g, por 10 min a 4°C), lavado com etanol 75%, seco e ressuspendido em água esterilizada.

Para a avaliação da expressão gênica no experimento de incubação de leveduras de *P. brasiliensis* com macrófagos, descrito mais detalhadamente no item 3.27 deste capítulo, utilizou-se a metodologia descrita por Batista *et al.*, 2007, salvo algumas modificações: aproximadamente 0,5 mL de células de *P. brasiliensis* coletadas foram congelados em nitrogênio líquido, transferidos para um gral (previamente gelado) e triturados até a obtenção de um pó fino. Este, foi ressuspendido em 3 mL de Trizol e novamente triturado em nitrogênio líquido até a formação de um pó de aspecto róseo. Após o descongelamento, este material foi distribuído em tubos de 1,5 mL (Eppendorf). A partir deste ponto, o procedimento de extração foi igual para todas as amostras obtidas nos experimentos para análise da expressão gênica (item 3.27 deste capítulo).

3.10. Tratamento do RNA com DNase I

Para a eliminação de DNA remanescentes nas preparações de RNA, 2-5 µg de RNA total, 1.1 – 3 U de DNase I (Promega) e 1 µL de tampão (200 mM de Tris, pH 8,3, 500 mM de KCl e 20 mM de MgCl₂) foram incubados à temperatura ambiente por 15 min. Em seguida, foi adicionado 1 µL de EDTA (25 mM) e, o material incubado por 10 min a 65°C. Todas as amostras de RNA livres de DNA foram quantificadas por espectrofotometria em aparelho NanoDrop (Thermo Scientific, USA), analisadas em gel de agarose, com tampão desnaturante

contendo uréia, para verificação da integridade do material extraído. Em seguida as amostras foram aliquotadas e armazenadas a -70°C (Sanbrook *et al.*, 1989).

A eficiência da hidrólise do DNA foi confirmada por PCR de regiões do gene *PbGP43* (Cisalpino *et al.*, 1996) ou *PbCAM* (calmodulina) intercaladas por intron. Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados estão descritos na Tabela 1.

3.11. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas reações de clonagem, sequenciamento, RT-PCR e RT-PCR quantitativo em tempo real (*Real-time PCR*).

Tabela 1 – Oligonucleotídeos iniciadores utilizados

Oligonucleotídeos	Direção	Sequência (5' -3')	Tm
PbGP70 384-pb	Senso	5' GAGGTAAACGAGCTGTTCGAT 3'	56°C
	Anti-senso	5' TATATTCACCTTCGTTTATGTAGAC 3'	
PbGP70 S1	Senso	5' GGGAAAAATTGGCCAAGG 3'	52,0°C
	Anti-senso	5' GACATATTATAC GGTTTTAGTGTTG 3'	
PbGP70 Expr1	Senso	5' ATACGAATTCAATGGGAAAAATTGGC 3'	55,0°C
	Anti-senso	5' TAGCGTCGACTTATACGGTTTTAGT 3'	
PbGP70 Expr3	Anti-Senso	5' TAGCACTAGTTTAGACCAAGGAAATG 3'	54,6°C
PbGP70 S4	Anti-senso	5' GGACTGGAAGGGAACCGAATCGCC 3'	57,0°C
PbGP70 SE3	Anti-senso	5' CGAGAATGCTCAAGAAAGCAATAG 3'	52,0°C
PbGP70 SE1/E2	Senso	5' AGA TTG AGC GAG GGC CATTTCCTT 3'	60°C
	Anti-senso	5' CAAGCGCTGCTCTTCTTCCATTCT 3'	
PbGP43	Senso	5' TGGGACACCTTTATCACT 3'	52°C
	Anti-senso	5' TTTGATCGTGTCCACCCTT 3'	
α -TUB	Senso	5' CGGCTAATGGAAAATACATGG C 3'	60,0°C
	Anti-senso	5' GTCTTGGCCTTGAGAGATGCA 3'	
PbCAM	Senso	5' ATCTCTCGCTATGGCCGACTCTTT 3'	60,0°C
	Anti-senso	5' TTTGTCCCAAAGACCGATCACAG 3'	
SP6	Senso	5' ATT TAG GTG ACA CTA TAG AA 3'	55,0°C
T7	Anti-senso	5' TAATACGACTCACTATAGGGCGA 3'	

3.12. Estratégia para clonagem do gene PbGP70

Foram obtidos, por meio de microsequenciamento protéico, dois peptídeos internos da glicoproteína gp70 de *P. brasiliensis* isolado 01 (Pb01). Oligonucleotídeos iniciadores degenerados correspondentes a esses peptídeos foram sintetizados e, posteriormente, um fragmento de DNA de 384 pb foi obtido por Feitosa e colaboradores (2007), em nosso laboratório.

A partir desses dados preliminares, foram desenhados e sintetizados oligonucleotídeos iniciadores específicos (PbGP70 384-pb - Tabela 1), os quais permitiram a amplificação do fragmento de 384-pb a partir do DNA genômico de *P. brasiliensis* isolado 18 (Pb18). Após o sequenciamento desse fragmento, foi realizado o alinhamento *in silico* da sequência frente ao banco de sequências expressas de Pb18 (*Expressed Sequence Tags databank – EST Databank*) (Goldman *et al.*, 2003). O fragmento apresentou 97% de similaridade com a EST 111-F10 e após análises no genoma de Pb18, foram desenhados oligonucleotídeos iniciadores específicos para as extremidades 5' e 3' da ORF que continha a sequência formada pelo alinhamento entre fragmento de 384 pb e a EST-111-F10 foram desenhados (PbGP70 S1 – Tabela 1).

3.13. PCRs e RT-PCRs

O DNA complementar foi feito com o *kit* SuperScript II RNase H RT Kit (Invitrogen). A primeira fita foi sintetizada em volume final de 20 µL, a partir de RNA total livre de DNA (2,5 µg) e com 1 µM do oligonucleotídeo iniciador (S1 R – Tabela 1) ou oligo DT (Invitrogen). A mistura foi incubada a 65°C por 5 min e em gelo por 1min. Em seguida, foram adicionados tampão de síntese do cDNA (0,05 M Tris-HCl, pH 8,3, 0,075 M KCl, 3 mM MgCl₂, 0,01 M DTT, 1 mM dNTP, 2 U/mL de RNaseOUT e 10 U da transcriptase reversa SuperScript II) e seguiu-se uma incubação a 55°C por 50 min e 85°C por 5 min. Após a síntese de cDNA, o RNA foi removido pela adição de 0,1 U/mL RNase e incubação a 37°C durante 20 min.

A primeira fita de cDNA ou o DNA genômico de Pb18 serviram como molde para as PCRs com os oligonucleotídeos PbGP70 S1, PbGP70 384 pb, PbGP70 Expr1/PbGP70 Expr 3, PbGP43, α -TUB e PbCAM, T7/SP6, descritos na Tabela 1. As reações, todas com volume final de 25 μ L, foram feitas em 50 mM de KCl, 1,5 mM de MgCl₂, 10 mM de Tris-HCl, pH 9,0, 200 μ M de cada dNTP, 1 μ M de cada iniciador e 5 U de *Taq* Platinum polimerase (Invitrogen). As amplificações foram realizadas em termociclador (Eppendorf MasterCycler Gradient) e as condições de ciclagem foram: 5 min a 94°C, seguidos de 35 ciclos a 94°C por 1 min, 52°C a 60,0°C (de acordo com a T_m dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados em cada reação) por 1 min e 72°C por 3 min e finalizados por um ciclo de 7 min de extensão. Para os experimentos de *Southern Blot*, foram realizadas reações como controle negativo na ausência da enzima transcriptase reversa com o objetivo de verificar a eficiência do tratamento com DNase I.

3.14. Clonagem e Transformação

Os produtos de PCR foram purificados a partir de gel de agarose por meio do *kit* de isolamento e purificação de ácidos nucleicos *Wizard PCR and Gel Cleanup* (Promega). O produto purificado foi quantificado em aparelho NanoDrop (Thermo Scientific, USA) por espectrofotometria e também pela avaliação da intensidade da banda em gel de agarose impregnado com brometo de etídio na concentração de 1 μ g/mL. A quantificação em gel de agarose foi estimada de acordo com a intensidade das bandas do padrão de peso molecular λ *Hind* III (DNA de fago λ digerido com *Hind*III).

As clonagens dos produtos de PCR foram feitas em vetor pGEM-T (Promega) com a enzima T4 DNA ligase de acordo com as especificações do fabricante e com a utilização dos reagentes fornecidos pelo *kit* pGEM-T *easy* (Promega). A melhor razão molar vetor:inserto foi de 1:3.

Bactérias competentes *E. coli* DH5 α (Invitrogen) foram transformadas por choque térmico com os produtos de ligações da seguinte maneira: 0,1 mL de bactérias competentes descongeladas em gelo foram transferidas para tubos estéreis de 0,5 mL e incubados em gelo por 30 min com os produtos de ligações.

Após incubação, os tubos foram submetidos a choque de 42°C por 90 seg, imediatamente colocados no gelo por 2 min. As reações foram diluídas com 0,4 mL de meio SOC e incubadas a 37°C sob agitação por 1h e 30 min. Em seguida, as culturas de bactérias resultantes foram semeadas em meio seletivo LB/amp impregnado com 87,5 µg/mL de X-Gal e 0,1 mM de IPTG, para a seleção de colônias transformadas com plasmídeo contendo o inserto (colônias brancas) ou sem inserto (colônias azuis).

3.15. Extração do DNA plasmidial por lise alcalina (Mini-Prep)

As preparações de plasmídeos pelo método da lise alcalina foram realizadas segundo o protocolo descrito em Sambrook *et al.*, 1999 (com modificações). Colônias foram removidas das placas contendo meio seletivo, semeadas em 10 mL de LB/amp líquido e incubadas a 37°C por 18 h, sob agitação. Em seguida as culturas foram centrifugadas a 2000 x g, por 5 min a 4°C e os *pellets* de células bacterianas foram ressuspensos em 0,1 mL de solução I contendo glicose 50 mM, Tris-base (pH 8,0) 25mM e EDTA (pH 8,0) 10 mM. Após esta etapa, foram adicionados 0,2 mL de solução II contendo NaOH 0,2 N e SDS 1% e as preparações foram submetidas a agitação lenta por 5 min à temperatura ambiente. Foram adicionados 0,2 mL de solução II contendo acetato de potássio 5M e ácido acético glacial 11,5 mL, q.s.p. 100 mL água, os tubos foram invertidos várias vezes e o material centrifugado à 12.000 g por 5 min a 4°C. Os sobrenadantes foram coletados e transferidos para outro tubo de 1,5 mL, em seguida, adicionou-se 0,45 mL de isopropanol por tubo e material foi agitado por 1 min. As misturas foram, então, centrifugadas a 12.000 x g por 5 min a 4°C e os sobrenadantes, desprezados. Os precipitados resultantes foram lavados com etanol 70% gelado e centrifugados novamente a 12.000 g por 10 min a 4°C. O material foi seco à temperatura ambiente por 30 min e ressuspensionado em 30 µL de TE. Seguiu-se o tratamento com 5µL de RNase na concentração de 10 mg/mL a 37°C por 30 min.

3.16. Digestão do DNA com enzimas de restrição

Os plasmídeos resultantes de mini-preparações foram digeridos com endonucleases de restrição para a verificação da presença do inserto. As condições de restrição foram as mesmas para todas as enzimas, a saber, 5 mM de Tris-HCl (pH 7,5), 10 mM de NaCl, 1 mM de MgCl₂ e 0,01 mg/mL de BSA. As digestões eram feitas por 1 h (no mínimo), seguindo a concentração de enzima sugerida pelo fabricante (Fermentas) a 37°C.

A análise do material digerido pelas enzimas de restrição foi feita por eletroforese horizontal em gel de agarose impregnado de brometo de etídeo (1 µg/mL), usando TBE como tampão em corrida. A eletroforese foi realizada a 5 V/cm durante aproximadamente uma hora. Foram utilizados como padrão de peso molecular os marcadores λ *Hind* III (Gibco) ou outros marcadores para fragmentos entre 100 e 5000pb (DNA *Mass Ladders*, Invitrogen).

3.17. Sequenciamento automático

As reações para o sequenciamento automático foram realizadas no Centro de Estudos do Genoma Humano da Universidade de São Paulo, no aparelho MegaBACE 1000, utilizando o DYEnamic ET Dye Terminator Kit (com Thermo Sequenase™ II DNA Polimerase), tendo como molde o DNA plasmidial dupla fita preparado pelo método da lise alcalina. Como controle das reações foi realizado sequenciamento de amostras com o plasmídeo vazio (sem inserto). Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados nessas reações foram T7 e SP6.

3.18. Análises *in silico* da sequência do gene PbGP70 e região promotora

As sequências recebidas do Centro de Estudos do Genoma Humano foram primeiramente analisadas o auxílio do programa de computador *Sequence Analyzer software Chromas 2.0*. Em seguida, as sequências foram comparadas

com aquelas obtidas do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), disponíveis no banco de dados universal GenBank com o intuito de encontrar sequências homólogas de outros organismos. Para a comparação e alinhamento dessas sequências foram utilizados algoritmos da ferramenta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool* - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>). Análises mais detalhadas da sequência gênica e da sequência deduzida de aminoácidos foram realizadas com o auxílio dos programas *EditSeq*, *SeqMan*, *MegaAlign* e *Protean* pertencentes ao *Lasergene System* (DNASTar Inc., Madison, Wis.).

Após o banco de dados *on-line* do genoma de *Paracoccidioides brasiliensis* ter sido disponibilizado ao público (http://www.broadinstitute.org/annotation/genomome/paracoccidioides_brasiliensis/MultiHome.html), análises adicionais foram realizadas a fim de comparar as sequências obtidas no presente estudo às aquelas disponíveis nesse banco de dados. Por meio dessas análises foi possível confirmar a sequência gênica de *PbGP70* no genoma de *Pb18* e obter informações sobre a localização desse gene, presença de íntrons e outras informações relevantes, nos genomas de outros isolados de *P. brasiliensis* (*Pb01* e *Pb3*).

A sequência deduzida de aminoácidos da *gp70* foi também analisada para a presença de peptídeo sinal de direcionamento a organelas com o auxílio dos algoritmos *SignalP* e *TargetP* (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/> e <http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>). Adicionalmente, a presença de domínios conservados nessa sequência foi investigada de acordo com o algoritmo *Conserved Domain Search* disponível na ferramenta BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>).

A sequência da região promotora 5' à montante da região codificadora do gene *PbGP70* foi extraída do banco de dados *on-line* do genoma de *Pb18* e analisada para a presença de regiões que poderiam ser alvo de ligação para diferentes fatores de transcrição comuns em eucariotos. Essa análise foi realizada com o emprego do programa computacional TFSEARCH (<http://molsun1.cbrc.aist.go.jp/research/db/TFSEARCH.html>).

3.19. Análises gráficas dos parâmetros antigênicos e estruturais da sequência deduzida da proteína codificada por PbGP70

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

3.20. Subclonagem da sequência parcial de PbGP70 em vetor de expressão

Um fragmento de 946-pb da região codificadora 5' do gene PbGP70, foi obtido por PCR do DNA genômico de Pb18 com os oligonucleotídeos iniciadores Expr1/Expr3 (Tabela 1), os quais incluem sítios de restrição para as enzimas *EcoRI* e *SpeI*. O amplicon foi clonado em vetor pGEM-T easy (Promega). Para expressão em bactérias, o fragmento de PbGP70 foi subclonado no vetor pHIS3 (Sheffield *et al.*, 1999). Este vetor contém o promotor T7, uma sequência de seis histidinas que é transcrita no início da proteína e o gene que confere resistência à ampicilina.

O inserto de 946-pb do gene PbGP70 foi clonado nos sítios *EcoRI* e *SpeI* de pHIS3, e a ligação foi feita na presença de T4 ligase na proporção 1:3

(vetor:inserto). O produto de ligação foi usado para transformar bactérias competentes *E. coli* DH5 α , as quais foram selecionadas pela resistência à ampicilina. Algumas colônias recombinantes foram selecionadas, o DNA plasmidial purificado em pequena escala pelo método de lise alcalina (item 3.15 deste capítulo) e os plasmídeos testados para a presença de inserto por restrição com as enzimas *EcoRI* e *SpeI*. Clones contendo o fragmento de PbGP70 (pHIS3gp70) foram sequenciados para confirmar se a sequência do fragmento estava inserida na mesma fase de leitura da sequência codificadora das seis histidinas presente no vetor. Após essa confirmação, alguns clones foram selecionados para as etapas seguintes.

3.21. Expressão e purificação da proteína recombinante PbGP70 parcial

Para a expressão da proteína PbGP70 parcial, o plasmídeo pHIS3gp70 foi introduzido em bactérias *E. coli* BL21 pLysS e algumas colônias recombinantes pHIS3gp70 foram induzidas para a verificação da produção da proteína recombinante. Colônias isoladas foram incubadas a 37°C em meio LB/amp-cloranfenicol, sob agitação, por 18 h. Esse pré-inóculo foi diluído 100 vezes em LB/amp-cloranfenicol e cultivado sob agitação até atingir A_{600} de 0.6. Em seguida, foi adicionado IPTG (0,5 mM) para a indução da expressão por 1 a 6 h. Alíquotas das culturas foram a cada hora recolhidas e centrifugadas (10.000 x *g*, 1 min), as células ressuspensas em tampão de amostra (Tris 0,065 M, pH 6,8, glicerol 10 %, SDS 2%, β -mercaptoetanol 5% e 0,002% de azul de bromofenol) e fervidas por 5 min. A análise eletroforética das proteínas foi feita em géis de 12% de poliacrilamida com SDS, no aparato MiniProtean (BIO RAD). Os géis foram corados pelo *Coomassie brilliant blue* (Laemmli, 1970).

Para análise da solubilidade das proteínas recombinantes em SDS-PAGE, as bactérias induzidas com IPTG foram precipitadas a 10.000 x *g* por 5 min e ressuspensas em 50 mM de Tris-HCl (pH 7,0), 0,2 M de NaCl e 10% de sacarose. Em pequena escala, as bactérias foram lisadas com lisozima (300 μ g/mL) por 1 h no gelo e 5 - 15 min a 37°C. A lise foi feita na presença de 1 mM de PMSF (phenyl methyl-sulphonyl fluoride). A mistura foi centrifugada por 5 min a

10.000 x *g* e tanto o sobrenadante, como o precipitado foram analisados em géis de SDS-PAGE 12 %.

Bactérias transformantes contendo o gene para expressão de Pbgp70 parcial recombinante eram crescidas em larga escala, induzidas com IPTG (0,5 mM) por 4 h, centrifugadas e lisadas por sonicação. Após essa etapa, o precipitado foi ressuspenso em tampão (100 mM de NaH₂PO₄, 10 mM de Tris-HCl, pH 8,0) contendo 8 M de uréia, centrifugado e o sobrenadante foi submetido a cromatografia de afinidade em coluna de Ni-NTA (Qiagen), que suporta altas concentrações do sal. As proteínas ligadas à coluna foram eluídas com tampões de pH ácido (6,4; 5,9; 4,5). A purificação da proteína foi realizada seguindo protocolos sugeridos pelo fabricante (Qiagen). O teor protéico da preparação foi estimado por meio da comparação entre quantidades conhecidas de BSA e os eluatos da proteína recombinante aplicados no mesmo gel de SDS-PAGE. Os géis foram corados por *Coomassie brilliant blue*.

3.22. Obtenção e purificação de anticorpos policlonais anti-Pbgp70 recombinante

Aproximadamente 300 µg da proteína Pbgp70 recombinante (Pbgp70r) purificada foram fracionados em gel de SDS-PAGE 12 %. O gel foi corado com *Coomassie brilliant blue* e a banda de ~35 kDa, referente à proteína purificada, foi excisada, descorada, triturada e homogenizada em PBS. O homogenizado de gel foi inoculado por via subcutânea em vários pontos no dorso de um coelho. Esse procedimento foi repetido por mais 2 vezes a cada 20 dias. O soro do animal foi coletado 30 e 45 dias após a primeira imunização para utilização nos experimentos subsequentes.

Para preparação da fração IgG, soro de coelho foi purificado em coluna de Sepharose-Proteína A (Pharmacia). Para tanto, o soro foi diluído 1:5 (v/v) em tampão PBS pH 7,4 e aplicado à coluna. Após lavagem com 10 volumes de tampão PBS, o material foi eluído da coluna com 50 mM de glicina pH 3,0. Os eluatos foram imediatamente neutralizados com 50 µL de Tris-HCl 1 M, pH 9,0. Os tubos contendo anticorpos foram dializados em PBS e a concentração em mg/mL

estimada pelo valor do comprimento de onda a 280 nm, de acordo com a proporção $1,3 A_{280} = 1 \text{ mg/mL}$ de IgG.

3.23. Obtenção de anticorpos monoclonais C5F11 anti-gp70 nativa de *P. brasiliensis*

Hibridomas produtores de anticorpos monoclonais específicos anti-gp70 nativa (MAb C5F11) foram originalmente produzidos em nosso laboratório (Grosso *et al.*, 2003).

Para obtenção de grande quantidade desses anticorpos monoclonais, camundongos BALB/c foram injetados intraperitonealmente com 0,5 mL de óleo mineral e, após 24 h, aproximadamente 2×10^6 células de hibridoma produtoras desse anticorpo suspensas em 0,5 mL de RPMI foram injetadas na cavidade peritoneal dos animais para produção de ascite. Após 7-10 dias, o líquido ascítico foi coletado, centrifugado e ao sobrenadante foi adicionado fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF), em concentração final de 1 mM. O líquido ascítico foi armazenado a -20°C .

3.24. Purificação de anticorpos monoclonais C5F11 anti-gp70 nativa de *P. brasiliensis*

A purificação do anticorpo monoclonal específico anti-gp70 nativa C5F11 (MAb C5F11) foi realizada segundo protocolo descrito por Grosso *et al.*, 2003.

Anticorpos do isotipo IgG1 foram purificados por afinidade em coluna de Sepharose[®] acoplada a proteína G (Pharmacia). A coluna foi equilibrada em tampão fosfato 0,02M pH 7,0 com aproximadamente 30 mL e o líquido ascítico diluído 1:15 (2 mL de ascite e 28 mL de tampão) no mesmo tampão. A ascite diluída foi aplicada lentamente em circuito fechado à coluna de afinidade e após a passagem de todo o material a ser purificado, a coluna foi exaustivamente lavada com 100 mL do tampão fosfato em fluxo rápido para remoção de proteínas irrelevantes. Os anticorpos foram eluídos com tampão glicina 0,15 M contendo 0,5

M de NaCl, pH 2,8. Frações de 2 mL foram coletadas em tubos contendo 50 µL de tampão Tris-HCl 1M, pH 9,0. O eluato da coluna foi então dialisado exaustivamente contra PBS e analisado por SDS-PAGE, após determinação do conteúdo protéico em espectrofotômetro a 280 nm.

Os anticorpos monoclonais purificados foram sempre testados por *Immunoblotting* para verificar se mantinham o reconhecimento da proteína em exoantígeno de *P. brasiliensis*.

3.25. Experimentos de *Immunoblotting*

3.25.1 Detecção da proteína gp70 nativa em Pb18

As preparações do extrato celular do fungo a serem analisadas foram submetidas à eletroforese em gel de poli(acrilamida) (10 %) contendo SDS (Laemmli, 1970). Após a eletroforese, foi feita a transferência das moléculas para membrana de nitrocelulose (Amersham) 0,45 µm (Towbin *et al.*, 1979). As proteínas foram transferidas em tampão contendo 25 mM de Tris, 192 mM de glicina e 20 % de metanol, pH 8,3, por 1 h, com voltagem constante de 100 V, em aparelho Mini-Trans Blot (BIO RAD). A eficácia da transferência foi verificada pela coloração reversível com Ponceau S (0,5 %, p/v, em ácido acético 5 %, v/v) para visualização das bandas. Os sítios inespecíficos das membranas foram bloqueados com solução de PBS contendo leite Mólico (Nestlé) 5 % por 1h e, em seguida, as membranas foram incubadas com 20 µg/mL do anticorpo monoclonal C5F11 ou com o soro policlonal anti-gp70 recombinante ou pré-imune na diluição 1:200 por 2 h, sob agitação. Após 5 lavagens de 10 min com PBS-Tween 20 0,2 %, as membranas foram incubadas com anticorpo espécie-específico anti-IgG-peroxidase (Bio-Rad), durante 1 h, sob agitação e protegidas da luz. A revelação era feita por quimioluminescência com o *kit* ECL (Pierce).

Alternativamente, para verificar se o anticorpo monoclonal C5F11 era capaz de reconhecer a porção peptídica da molécula gp70, o extrato foi tratado com a enzima Endoglicosidase H (para remoção das cadeias sacarídicas *N*-ligadas) ou as membranas, após a transferência, foram tratadas com

Metaperiodato de sódio, para o bloqueio sítios de ligação à açúcares O-ligados que pudessem estar presentes na molécula.

O protocolo utilizado para deglicosilação do extrato celular de Pb18 com Endoglicosidase H (endoH, BioLabs) seguindo instruções do fabricante: 10 µg do extrato foram desnaturados por meio de incubação a 100°C por 10 min em tampão de desnaturação e em seguida, incubados por 1 hora à 37°C com tampão de reação contendo endoH (BioLabs), na concentração de 0,1U/µg de extrato.

O protocolo de tratamento com metaperiodato de sódio foi realizado da seguinte forma: as membranas foram lavadas com 50 mM de acetato de sódio pH 4,5 por 2 vezes durante 10 min. Após as lavagens, foram incubadas protegidas da luz com 10 mM de Metaperiodato de sódio (Sigma) em tampão 50 mM de acetato de sódio pH 4,5 e em seguida foram feitas três lavagens com PBS 1x e a reação foi bloqueada por meio da incubação das tiras com 50 mM de boroidreto de sódio por 30 min e três lavagens subsequentes em PBS 1x.

Após esses tratamentos, foram realizados *immunoblotting* conforme descrito acima.

3.25.2. Detecção da proteína Pbgp70 recombinante pelo anticorpo monoclonal anti-gp70 nativa (MAb C5F11)

As preparações contendo a proteína recombinante purificada foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida (12 %) contendo SDS e, em seguida, à transferência das moléculas para membrana de nitrocelulose (Amersham), conforme descrito anteriormente no item 3.25.1 deste capítulo.

Para avaliar se a proteína recombinante era reconhecida pelo soro do coelho ao longo das imunizações ou pelo MAb C5F11 anti-gp70 nativa, as membranas foram incubadas com soro policlonal anti-gp70 recombinante ou pré-imune na diluição 1:100, 1:200 ou 1:400 (após padronização, utilizou-se apenas a diluição 1:200) ou ainda, com 20 µg/mL do anticorpo monoclonal C5F11 por 2 h, sob agitação. Deste ponto em diante seguiu-se o mesmo protocolo descrito em 3.25.1.

3.25.3. Detecção da proteína Pbgp70 recombinante por soros de pacientes com PCM

Experimentos de *immunoblotting* foram realizados para avaliar se a proteína recombinante era reconhecida por soros de pacientes com PCM.

Membranas contendo a proteína recombinante purificada foram incubadas com soros pacientes na diluição 1:100, soro policlonal anti-gp70 recombinante na diluição 1:200 (controle positivo) e soros de indivíduos normais na diluição 1:100 (controle negativo) por 2h sob agitação. A partir desse ponto os experimentos seguiram o protocolo descrito no item 3.25.1 deste capítulo.

3.26. Imunolocalização da Pbgp70 recombinante por microscopia confocal

A marcação das células leveduriformes de *P. brasiliensis* foi realizada conforme descrito em Batista *et al.*, 2006, com algumas modificações.

Leveduras de *P. brasiliensis* crescidas em meio YPDmod líquido por 7 dias foram coletadas em tubos de 15 mL (Costar) contendo 5 mL de PBS estéril. As partículas maiores foram separadas por sedimentação e a porção superior, contendo células isoladas ou com poucos brotamentos foi utilizada. As células foram lavadas 3 vezes com o mesmo tampão e contadas em câmara de Neubauer. A viabilidade das células foi determinada por meio de contagem com o corante de exclusão *trypan blue* (Svidzinski *et al.*, 1999). Aproximadamente 3×10^6 células foram distribuídas por tubo de 1,5 mL, fixadas e permeabilizadas em 1,0 mL de metanol gelado por 30 min a 4°C. O bloqueio dos sítios remanescentes foi realizado com 1,0 mL de PBS acrescido de 3 % de albumina bovina (PBS-BSA 3 %) por toda a noite a 4°C. Após 6 lavagens de 5 min com PBS, as leveduras foram incubadas por 3 h a temperatura ambiente com 500 µL de PBS-BSA 3% contendo 20 µg/mL do MAb C5F11 (anti-gp70 nativa). Foram realizadas mais 6 lavagens de 5 min em PBS e em seguida, as células foram incubadas por mais 3 h à temperatura ambiente com 100 µg/mL de anticorpos policlonais anti-gp70 recombinantes purificados por cromatografia de afinidade. Como controle negativo foram utilizados IgGs policlonais purificadas do soro pré-imune do coelho utilizado

nos experimentos de imunização. Novamente foram realizadas 6 lavagens de 5 min com PBS e finalmente as células foram marcadas com anticorpos secundários espécie-específicos. Para a marcação dos anticorpos anti-gp70 recombinante, utilizou-se anti-IgG de coelhos conjugado à isotiocianato de fluoresceína (*goat anti-IgG rabbit* – FITC, Jackson Immoreasearch, WestGrove, PA) e para a marcação dos anticorpos monoclonais anti-gp70 nativa, utilizou-se anti-IgG murino conjugado à isotiocianato de tetrametilrodamina (*goat anti-IgG mouse* – TRITC, Jackson Immoreasearch, WestGrove, PA). Para marcação nuclear foi adicionado DAPI (4',6'-diamidino-2-phenylindole, Sigma). Todos os anticorpos secundários foram utilizados na diluição 1:50 em solução de PBS-BSA 3% com volume final de 100µL e incubados à temperatura ambiente por 1 h protegidos da luz. Após incubação, as leveduras foram lavadas com PBS, ressuspensas em 50 µL do mesmo tampão e aplicadas a lâminas montadas com VectaShield (Vector) para análise em microscópio de fluorescência e confocal. As marcações foram analisadas em microscópio de fluorescência (microscópio NIKON Eclipse E800, Japan) utilizando objetivas de 40x e 100x e/ou em microscópio confocal (microscópio LSM-510 NLO - Carl Zeiss, Jena, *Germany*). As análises e aquisições de imagens de microscopia confocal foram feitas no Laboratório de Multiusuários – Instituto Nacional de Farmacologia (INFAR).

Em alguns experimentos, foi utilizado como controle o anticorpo anti-gp75 produzido em nosso laboratório (Xander *et al.*, 2007), o qual marca as regiões de brotamento e superfícies de células leveduriformes de *P. brasiliensis*. Nesses experimentos utilizou-se 30 µg/mL do MAb 5E7C (anti-gp75) como anticorpo primário e, como secundário um anti-IgG murino conjugado à Rodamina (Invitrogen) na diluição 1:200. Esta etapa foi realizada em substituição à incubação com anticorpo monoclonal anti-gp70 nativa e o restante do protocolo experimental foi o mesmo descrito acima.

3.27. Experimentos para análise da expressão gênica

3.27.1. Análise da expressão do gene *PbGP70* durante o crescimento

As amostras de Pb18 utilizadas para a extração de RNA total foram crescidas em 50 mL de meio YPD modificado a 36 °C, sob agitação, por 4 – 7 dias. Após isso, alíquotas iguais das células crescidas a 36 °C foram transferidas para frascos contendo 120 mL de meio fresco, crescidas durante 4, 6, 8, 10 e 14. Após esses períodos, as células foram coletadas por centrifugação (10 min a 1800 x g), a viabilidade celular, verificada pela adição do corante de exclusão *trypan blue*. O RNA total foi extraído e processado de acordo com a metodologia descrita anteriormente (itens 3.9 e 3.10 deste capítulo) para posterior detecção dos níveis de expressão gênica por RT-PCR quantitativo em tempo real.

3.27.2. Análise da expressão do gene *PbGP70* em condições de estresse oxidativo

Para extração do RNA em condições de estresse oxidativo foram feitos pré-inóculos em 100 mL de YPDmod e após 4-7 dias de crescimento a 36°C foram transferidos para 500 mL de meio fresco e cultivados por mais 5 dias. Após esse período, as células foram centrifugadas (10 min a 1800 x g) e ressuspensas em 500 mL de meio fresco e divididas em alíquotas iguais. Em seguida foram adicionados 1,0 mM, 2,5mM ou 5mM de H₂O₂ à cada alíquota. A indução do estresse oxidativo foi promovido por meio da incubação dessas alíquotas à 36°C por 1 h sob agitação (Batista *et al.*, 2007, modificado). Após a incubação as células foram coletadas por centrifugação (10 min a 1800 x g) e verificada sua viabilidade celular. O RNA total foi extraído e processado de acordo com a metodologia descrita anteriormente (itens 3.9 e 3.10 deste capítulo) para posterior detecção dos níveis de expressão gênica por RT-PCR quantitativo em tempo real.

3.27.3. Análise da expressão do gene *PbGP70* após a incubação com macrófagos derivados de medula óssea

3.27.3.1. Cultura de macrófagos derivados de medula óssea

Células não diferenciadas foram extraídas da medula óssea de camundongos BALB/c com 2 a 3 meses de idade. Para tanto, os fêmures destes animais foram extraídos e deixados por 3 min em álcool iodado; após este período as epífises do fêmur foram cortadas e a medula foi lavada delicadamente utilizando uma seringa de 10 mL acoplada a uma agulha de insulina. A medula foi lavada com aproximadamente 3 mL de meio RPMI-1640 (Sigma) para cada fêmur e a extração das células de medula pode ser observada pelas gotas turvas que saem do fêmur após as lavagens. As células foram recolhidas em tubos de 15 mL (Costar) em banho de gelo. Em seguida foram lavadas e ressuspensas em 10 mL de meio de diferenciação composto por RPMI-1640 (Sigma) e suplementado com 30% de sobrenadante de cultura de células da linhagem L929 (grandes produtores de GM-CSF) e 20% de soro fetal bovino (Gibco BRL). Essas células foram colocadas em garrafas de cultura (Costar) e mantidas em atmosfera úmida com 5% de CO₂ a 37°C por 4 dias. Após esse período foram adicionados à cultura mais 10 mL de meio de diferenciação e as células foram mantidas por mais sete dias nas mesmas condições.

Ao final destes sete dias considera-se que as células estejam diferenciadas em macrófagos e prontas para uso (Zamboni e Rabinovitch, 2003).

3.27.3.2. Incubação de macrófagos murinos com *P. brasiliensis*

Para avaliação da expressão do gene *PbGP70* em leveduras de Pb18 após serem incubadas com macrófagos murinos, foi seguido o protocolo descrito por Tavares et al, 2007 (com modificações). Macrófagos diferenciados (2×10^6 células) foram plaqueados e mantidos a 37°C na presença de 5% de CO₂ em meio R-10. As monocamadas celulares foram infectadas, como descrito previamente (Brummer *et al.*, 1989), com células leveduriformes de Pb18. As

células foram coletadas em tubos de 50 mL (Costar) contendo 30 mL de PBS estéril. As partículas maiores foram separadas por sedimentação e a porção superior, contendo células isoladas ou com poucos brotamentos, foi utilizada. As células foram lavadas 3 vezes com o mesmo tampão e contadas em câmara de Neubauer. A viabilidade das células foi determinada por meio de contagem com *trypan blue*. Os macrófagos foram infectados com as células leveduriformes na proporção de 1:5 (macrófago:levedura) e incubados a 37°C na presença de 5% de CO₂ em meio R-10. Como controle deste ensaio foram incubados, nas mesmas condições de cultivo, macrófagos não infectados e leveduras sem macrófagos. Para cada um dos tempos de análise (6, 12, 24 ou 48 h), leveduras extracelulares ou fracamente aderidas foram coletadas separadamente por lavagem com RPMI pré-aquecido e subsequente centrifugação e reservadas para extração do RNA total. Os macrófagos foram então lisados com água padrão MiliQ (solução hipotônica) por 30 min e as leveduras intactas foram coletadas por centrifugação e imediatamente processadas para extração do RNA e síntese de cDNA (itens 3.9 e 3.10 deste capítulo) para posterior detecção dos níveis de expressão gênica por RT-PCR quantitativo em tempo real. Como controle deste experimento foi extraído o RNA total dos macrófagos não infectados bem como das células leveduriformes de Pb18 não incubadas com macrófagos.

3.28. RT-PCR quantitativo em tempo real

A quantificação dos níveis de expressão gênica de PbGP70 foi realizada com protocolo de detecção do sistema Syber Green® (*Applied Biosystems*), seguindo as instruções do fabricante. Este sistema utiliza um fluoróforo que intercala nas moléculas de cDNA dupla fita no momento da polimerização. Para a síntese de cDNA foram utilizados 600 ng de RNA total (livre de DNA), para amostras obtidas pela incubação de macrófagos murinos com *P. brasiliensis* ou 2,5µg de RNA total (livre de DNA) e para as demais amostras, 100 µM de oligodT e 200U de transcriptase reversa (SuperScript II – Invitrogen), para um volume final de 20 µL, os quais foram diluídos para 50 µL ao final da reação. Para cada reação de quantificação foram adicionados 2 µM de cada um dos oligocleotídeos SE1/E2 (Tabela 1), 10 µL da Master Mix do sistema Sybr Green® (*Applied Biosystems*) e 3 µL de cDNA. As condições de ciclagem foram: um ciclo de 50°C por 2min, outro

de 95°C por 1 min e 40 ciclos alternados de 95°C por 15seg. e 60°C por 1min em aparelho *ABI Prim 7000 “Sequence Detector System”*. O normatizador utilizado nestas análises foi o gene da α - tubulina de *P. brasiliensis* (α -TUB – Tabela 1). Ao final da reação foi realizado um ciclo adicional de 95°C por 15seg, 60°C por 20seg e 95°C por 15seg, para determinação da curva de dissociação. A fluorescência dos sistemas foi monitorada durante as etapas de anelamento a 60°C e analisadas com relação aos seus correspondentes ciclos. Reações de padronização foram feitas para os conjuntos de oligonucleotídeos iniciadores. Diluições do cDNA pré-definadas foram utilizadas para obtenção da curva padrão de amplificação para os oligonucleotídeos iniciadores comparados sempre contra o normatizador.

Os resultados foram visualizados utilizando o programa *Sequence Detector Software* e então exportados para o programa Microsoft Excel, no qual os ciclos lineares (Ct) foram analisados em relação ao logaritmo da quantidade inicial de moléculas alvos. A equação da reta foi determinada pela de análise de regressão linear. O valor do R^2 para cada conjunto dos oligonucleotídeos também foi calculado (Semighini *et al.*, 2002).

3.29. Southern blot

As condições para análises de *Southern blot* foram seguidas de acordo com Sambrook *et al.* (1989). Produtos de PCRs realizados com oligonucleotídeos iniciadores SE1/E2 (Tabela 1) e DNA genômico de *P. brasiliensis* (controle) ou cDNA obtido do RNA total proveniente leveduras de *P. brasiliensis* coletas após 5 e 14 dias de cultivo, foram hibridizados com a sonda SE1/SE2 de 384 pb.

Primeiramente, os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (1 %) e após a separação das bandas o gel foi tratado com tampão de depurinação por 20 min, tampão de desnaturação por 30 min, tampão de neutralização por 30 min. Após os tratamentos, géis foram transferidos por capilaridade para membranas de náilon (Hybond N+ Amershan) em tampão SSC 20x por 16 h. O DNA foi fixado às membranas sob a luz UV no aparelho “GS Gene linker” (BioRad).

A sonda SE1/E2 utilizada nos experimentos foi obtida por meio de purificação do produto de PCR do DNA genômico de *P. brasiliensis* com os oligonucleotídeos

iniciadores SE1/E2. Foi realizada a radiomarcagem da sonda (25-50 ng/ μ L) com [α^{32} P] dCTP segundo instruções do fabricante do *kit Gene Images Random Prime Labelling Module* (Amersham) seguida de desnaturação por fervura durante 10 min.

As membranas foram incubadas com solução de pré-hibridização por 4 h à 42°C para bloqueio dos sítios remanescentes e, em seguida, adicionou-se a sonda radiomarcada. A hibridização ocorreu por cerca de 16 h a 42°C sob lenta agitação. Após esse período, as membranas foram lavadas em condições de alta estringência com SSC 2x / SDS 0,1% a 42 °C por 15 min e SSC 1x / SDS 0,1% a 56 °C por duas vezes de 30 min e então, colocadas sobre papel de filtro e expostas a filmes de raio X (X-Omat, Kodak) em cassete com tela intensificadora a -70 °C por 16h. Após esse período, os filmes foram revelados.

3.30. Análise Estatística

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

4. RESULTADOS

Tentativas de clonagem do gene que codifica a proteína gp70 de *P. brasiliensis* tinham sido realizadas anteriormente em nosso laboratório.

Inicialmente, foi feito o microssequenciamento protéico da Pbgp70 nativa *P. brasiliensis* isolado 01 (Pb01) o que possibilitou desenhar oligonucleotídeos iniciadores degenerados correspondentes aos peptídeos obtidos. Esses oligonucleotídeos foram utilizados para amplificar e sequenciar um fragmento de 384-pb a partir do DNA gênomico de Pb01 (Feitosa *et al.*, 2007). A partir desses resultados anteriores foi iniciado o presente estudo.

4.1. Clonagem e caracterização do gene PbGP70

Oligonucleotídeos iniciadores específicos flanqueadores do fragmento de 384-pb foram desenhados e sintetizados (PbGP70 384-pb - Tabela 1) e um fragmento similar foi amplificado a partir do DNA genômico de *P. brasiliensis* isolado 18 (Figura 1). Esse fragmento foi sequenciado e analisado *in silico* frente ao banco de sequências expressas de Pb18 (*Expressed Sequence Tags databank* – *EST Databank*) (Goldman *et al.*, 2003). Nesse banco de dados estão depositadas as sequências da maioria dos genes expressos na fase leveduriforme de *P. brasiliensis*, porém para cada gene anotado apenas as regiões das extremidades 5' e 3' foram sequenciadas. Dessa maneira, as regiões sequenciadas (extremidades 5' e 3' – “Tags”) são muito úteis para identificar e estimar o tamanho de pequenos genes, porém não é possível avaliar o tamanho real de genes ou transcritos maiores que os das regiões analisadas.

O resultado das análises *in silico* mostrou que a porção 3' do fragmento 384 apresentou 97% de similaridade com a porção 5' da EST 111-F10 e alinhou com a sequência conhecida da EST (424 nucleotídeos), formando um *Contig* de 708 nucleotídeos, conforme representado no desenho esquemático do alinhamento de 100 pb (Figura 2A). Após análises no genoma de Pb18, novos oligonucleotídeos iniciadores específicos correspondentes à extremidade 5' da ORF que continha a sequência de 384 nucleotídeos e à porção 3' da sequência da EST-111-F10 foram desenhados (PbGP70 S1 – Tabela 1 e Figura 2B) a fim de

se obter o fragmento correspondente à sequência completa do gene. Para tanto, os oligonucleotídeos iniciadores S1F/S1R foram utilizados em reação de PCR com DNA genômico do isolado Pb18 como molde. O produto de amplificação desta reação foi um amplicom de 2.154 bp. Este fragmento foi clonado no vetor p-GEM-T (Figura 3) e sequenciado a partir de oligonucleotídeos flanqueadores do vetor (T7 e SP6) e internos do inserto (SE1/SE2, SE3 e S4) através da estratégia de *primer walking* (Figura 2B).

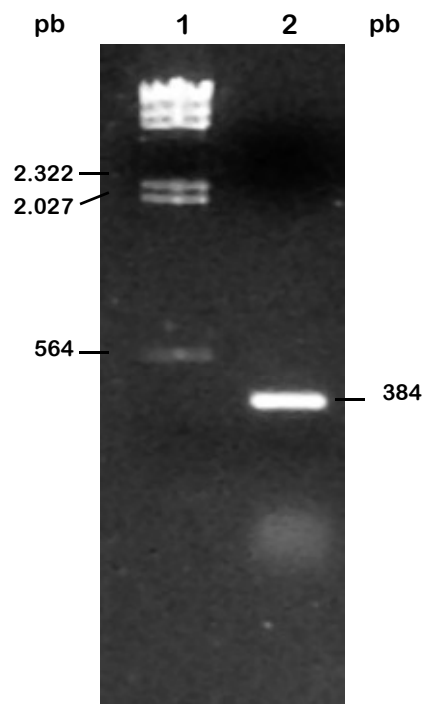
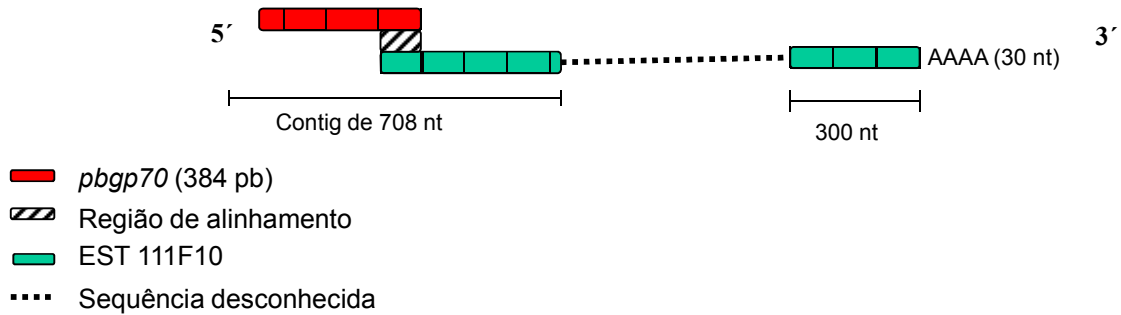


Figura 1 - Gel de Agarose 1% corado com brometo de etídio mostrando o marcador de peso molecular λ *Hind III* (coluna 1) e o fragmento PbGP70 (384 pb) amplificado a partir do DNA genômico de Pb18 com os oligonucleotídeos iniciadores 384F/384R (coluna 2).

A



B

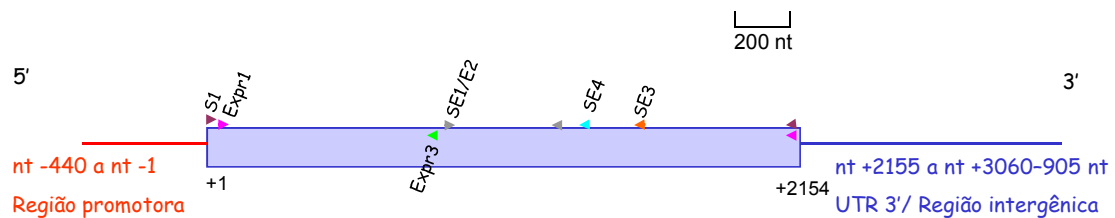


Figura 2 – A: Representação esquemática do alinhamento entre a sequência do amplicom de 384-pb (sequenciado de Pb18) e as porções 5' e 3' da EST-111-F10, obtido pelo rastreamento *in silico* do banco de ESTs de Pb18 EST DataBank. As linhas pontilhadas representam a sequência da EST não conhecida no momento do alinhamento. Cada quadrado equivale aproximadamente a 100 nucleotídeos **B:** Representação esquemática da ORF PbGP70 e regiões flangeadoras 5' e 3' analisadas. As cabeças de seta indicam a posição dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados nesse trabalho. A barra de 200 nucleotídeos (200 nt) representa a escala utilizada no esquema.

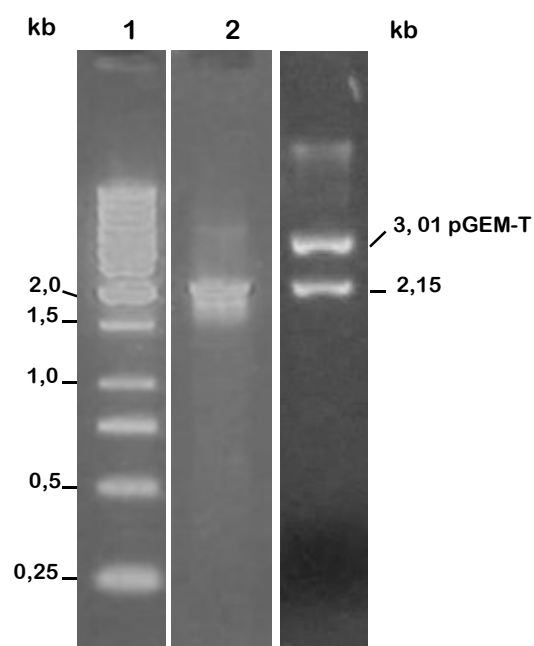


Figura 3 - Gel de agarose 1% corado por brometo de etídio mostrando o fragmento de 2,154 kb, amplificado por PCR do DNA genômico de *P. brasiliensis* com os oligonucleotídeos iniciadores S1F/S1R (coluna 2) e o mesmo fragmento clonado em vetor pGEM-T após digestão enzima *EcoRI* (coluna 3). A coluna 1 indica o padrão de peso molecular λ Hind III.

Após exaustivas análises *in silico* das sequências obtidas, pode-se verificar que o gene PbGP70 apresenta uma ORF de 2.154-pb sem íntrons (Figura 4), corroborando com as sequências recentemente depositadas do banco de dados dos Genomas de Pb18– lócus PADG_06694.1 e Pb3- locus PABG_06019.1 (http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/paracoccidioides_brasiliensis/GeneDetails.html?sp=S7000001960945371n e http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/paracoccidioides_brasiliensis/MultiHome.html, respectivamente). Em Pb01, isolado que vem sendo classificado como a nova espécie *Paracoccidioides lutzii* (Teixeira *et al.*, 2009), o gene homólogo (lócus PAAG_05352) apresentou um íntron na porção 5' da sequência.

Diante desses achados e da dificuldade em se amplificar o gene PbGP70 a partir de cDNA, foram utilizados para os experimentos seguintes amplicons obtidos a partir do DNA genômico de Pb18.

Foram analisadas também sequências flaqueadoras 5' (nt- 440 a nt-1) e 3' da ORF de PbGP70, conforme representado no desenho esquemático (Figura 2B). Mediante essas análises foi possível identificar sequências de elementos putativos de promotor de eucariotos (as quais serão mais bem detalhadas no item 4.5 deste capítulo), um elemento TATA (TATATAT) na posição -212 e um motivo GGGGG na posição -104 da extremidade 5', os quais marcam início da transcrição em eucariotos (Dobson *et al.*, 1982). A região não traduzida da extremidade 3' pode conter sequências consenso para término da transcrição e poliadenilação. Após análise dessa região, foi possível encontrar no gene PbGP70 (posição +2456) um hexanucleotídeo 5'- AATAAA -3' idêntico aos já descritos próximos a sítios de poliadenilação em muitos mRNAs de eucariotos (Proudfoot e Brownlee, 1976). Esses achados, bem como a sequência de 384-pb utilizada no início do presente trabalho para a identificação do gene em estudo estão evidenciados na Figura 4.

	GATTCAGATGAGCTTCTCGTTTTGTTGATTTTATTTTTAAATTGTTAAATTTTACATTGGGGAAC TGCTACATCTTATCCGGGAGTGAGATAGGGAAC TACTATGCCATCCT																														
	TGTTTTTTGTACAGAATACCAGGTTACATGCATTTACCGCTATATATATGATCGATTTTGTGAACCTTCAAAGCATTGACTAGATCTCTTATACTTTCTCGACGATCTCCGCACCG																														
	AAACACCCCAACAGTATTTGGGGGCCCGCAATAAAGCACAGACCGTGATATTCTTTAAGTTAAGTATACCGAGACCGCGTTGAACAAAGAAATACGAAGGAAAAGGCAGTT																														
	AGATATGGCATGTTTAGGATCAGACATGGCAGCAACGGATGTCTTAGAAGCAACAGCTGTGGCAATAGTGAAATCGATCAATCGCCATCTCCACACA																														
1	ATG	GGA	AAA	ATT	GGC	CAA	GGC	GAA	TCT	CAT	CCA	CGG	GAG	GAG	GCT	ACA	GAT	GGG	ACA	GTT	GAA	CAA	GAC	ACA							
1	M	G	K	I	G	Q	G	E	S	H	P	W	E	E	A	T	D	G	T	V	E	Q	D	T							
73	TCT	TCC	CAG	AAG	AAA	ACT	GAG	GAA	ACT	GAT	GCC	CAT	GAG	CGA	CCT	CGT	TCC	TCC	TCT	TCC	TCG	TCC	CAT	CCC							
25	S	S	Q	K	K	T	E	E	T	D	A	H	E	R	P	R	S	S	S	S	S	S	H	P							
145	TCC	GAA	ACA	TTT	ACG	GGT	GAA	GAA	AAT	GAT	CAT	TTC	GAT	CGG	AGG	AGT	GAA	ATA	GGA	CGA	ACT	GCA	AGA	ACG							
49	S	E	T	F	T	G	E	E	N	D	H	F	D	R	R	S	E	I	G	R	T	A	R	T							
217	ATG	TCG	AGC	CGC	ACT	TCC	ATA	TCT	TCA	TTA	CCA	GGA	TCC	GTC	ATC	GTA	TGC	CCA	CCC	GAA	AAG	TAT	GAT	GGC							
73	M	S	S	R	T	S	I	S	S	L	P	G	S	V	I	V	C	P	P	E	K	Y	D	G							
289	AGT	GGC	ACC	ATA	ACG	CCG	AGT	TTC	CGG	GGG	CAT	TAC	ATG	CAG	CAT	TAC	TCC	GAA	CGC	AAT	ACC	AAT	GAC	GGC							
97	S	G	T	I	T	P	S	F	R	G	H	Y	M	Q	H	Y	S	E	R	N	T	N	D	G							
361	CCA	ATG	CCC	GTG	AAC	GGA	AAC	AGG	CCG	AAA	AGG	AAC	AAT	TAC	TCT	TCC	CGA	CTT	TCT	AAA	ATT	GCG	CCT	AGT							
121	P	M	P	V	N	G	N	R	P	K	R	N	N	Y	S	S	R	L	S	K	I	A	P	S							
433	GTG	CGC	GAT	CAT	GAT	TCG	CCG	TTT	AGA	CAC	CCC	AGT	TCT	GTT	CGC	GCA	ATG	CAG	ATG	GGA	GAC	GAG	GAT	GAG							
145	V	R	D	H	D	S	P	F	R	H	P	S	S	V	R	A	M	Q	M	G	D	E	D	E							
505	TAT	GAT	GGG	TAT	GGC	TAT	GGC	TAC	AAC	AAC	GAG	GAT	CTG	ATG	CCT	TCG	AAG	TCA	TGG	AGG	AAT	CAC	AGT	GGA							
169	Y	D	G	Y	G	Y	G	Y	N	N	E	D	L	M	P	S	R	S	W	R	N	H	S	G							
577	GGG	CGT	GGG	CAT	TCA	TGT	CAG	AGC	GTA	TCG	GGG	ATG	TCT	ATG	CGC	TCG	CTG	GGT	TCA	TCA	CCA	GTA	TCT	GCC							
193	G	R	G	H	S	C	Q	S	V	S	G	M	S	M	R	S	L	G	S	S	P	V	S	A							
649	AAG	CGG	AGC	TAC	AAA	TCG	CCC	CGG	GCA	AAA	GAG	GCA	GCT	GTC	CAG	AAG	GAG	TAC	CCG	CTT	ATC	CTG	CTT	CAT							
217	K	R	S	Y	K	S	P	R	A	K	E	A	A	V	Q	K	E	Y	P	L	I	L	L	H							
721	TGC	ACT	CTG	TTA	CCA	CCA	TCT	CTT	TCC	CTA	CCT	CAG	GGT	TTG	GGA	CTG	CCC	AGC	GCC	CAA	ATT	TTA	AAA	GAG							
241	C	T	L	L	P	P	S	L	S	L	P	Q	G	L	G	L	P	S	A	Q	I	L	K	E							
793	GTG	TTG	CCC	CCT	AAG	CTC	TGG	GCA	AGA	TGG	AAA	TTA	CTC	GAG	GAT	AAA	ATC	ATT	AAT	TCG	GGG	GTG	TTG	CGG							
265	V	L	P	P	K	L	W	A	R	W	K	L	L	E	D	K	I	I	N	S	G	V	L	R							
865	GAT	CGT	GGA	TTG	CTG	ATA	TCA	CAT	CCA	CAG	GAA	ATG	TAT	GAC	ATG	CTT	GAA	GAG	CGT	TTG	TTG	GAG	AGT	CTA							
289	D	R	G	L	L	I	S	H	P	Q	E	M	Y	D	M	L	E	E	R	L	L	E	S	L							
937	GAA	CTA	GTC	CGG	CCG	AGA	TTG	AGT	GAG	GGC	CAT	TTC	CTT	GGT	CGA	GAA	AAT	GAT	GAT	GAC	CCC	GAC	GGA	GGT							
313	E	L	V	R	P	R	L	S	E	G	H	F	L	G	R	E	N	D	D	D	P	D	D	G							
1009	GGA	GGG	GGC	TCT	GAG	AAA	GAA	GGT	ATT	GGA	TAT	GTC	AGT	GAC	GGA	TGT	GAT	GGA	GAG	AAA	TGC	GCT	GAC	TGC							
337	G	G	G	G	S	E	K	E	G	I	G	Y	V	S	D	C	D	G	E	K	C	A	D	C							
1081	GGC	GCA	AGG	CTC	ATG	AAG	CAT	TTG	GAG	GGG	GAG	AAG	AGG	CGA	TGG	GAT	GTC	AGA	GTT	TAT	GCT	GCC	AAC	GGT							
361	G	A	R	L	M	K	H	L	E	G	E	K	R	R	W	D	V	R	V	Y	A	A	N	G							
1153	CTG	ATG	GGA	GCT	GGG	GCC	TGG	GCA	GCA	GCC	TGG	AGA	GAT	ATG	GAA	AAA	GTC	GAT	GTC	GAG	GTT	GGA	TTA	GCT							
385	L	M	G	A	G	A	W	A	A	A	W	R	D	M	E	K	V	D	V	E	V	G	L	A							
1225	CTG	CCA	GTT	GAG	ATC	AGG	CGG	GAA	CTG	GAG	CGG	AGG	ATT	GTC	GAG	GAA	AAT	ACG	TTA	AGA	ATG	GAA	GAA	GAG							
409	L	P	V	E	I	R	R	E	L	E	R	R	I	V	E	E	N	T	L	R	M	E	E	E							
1297	CAG	CGC	TTG	GTG	GAG	GAG	GAG	AAA	CGA	AGG	CGG	GAG	ATA	TAT	GGA	GTG	CCA	ACG	GCT	CCG	ACA	CAG	GAA	GCT							
433	Q	R	L	V	E	E	E	K	R	R	R	E	I	Y	G	V	P	T	A	P	T	Q	E	A							

```

1369 ATT GAT GGA CTG GAG GAT GGC GAT TCG GTT CCC CGC TTC CAG TCC AAA TTT GAC CAG TCA TCG CCT CCG CTT
457 I D G L E D G D S V P R F Q S K F D Q S S P P L
1441 TTA TTT ACA CGC CCA GAG CCA CCG CCG ATA ATG CCC TCT ACT GAC TTC TAT GAG CGT GAG CGA GAG TCT ATC
481 L F T R P E P P P I M P S T D F Y E R E R E S I
1513 TAC ACC AAG GAA GTT AAC CTC CAG ATA CTA TTA TCA AAT TAT ATC CGT ATC CTT GCC AGC GAC AGA CGG AAC
505 Y T K E V N L Q I L F S N Y I R I L A S D R R N
1585 GTT GCT ATT GCT TTC TTG AGC ATT CTC GTC CTC TAC TTC TCT ATG GGT ATG GCA AAA CAA GGT GAG ATT TTC
529 V A I A F L S I L V L Y F S M G M A K Q G E I F
1657 GCC TCT CAC GCC ATT ACT AGC CCG CCA CAT GTC GTT CCT CCC ACT GTT TCC TCC CCA ATG GTT CTG GAG CAT
553 A S H A I T S P P H V V P P T V S S P M V L E H
1729 AAC CTG CCT TCA ATT GTT AAC TCT CCT GTC ATG GTT TCC ATG GAA CCT CGC ACC CAA ATA CAC TCC GGG GCT
577 N L P S I V N S P V M V S M E P R T Q I H S G A
1801 GAA AAT AAA ATT ACC CCC ACA ATA TCT GGA TGT GGG GTG CTT GCT ACC GAA CCC CGG TCC GTC GGT CAA ACA
601 E N K I T P T I S G C G V L A T E P R S V G Q T
1873 ATG GCA CGA CAG CTA GGC GCG TCG CAC CCG GCT GAG AGC GAC TCC ATT TAT CAT TGC CAA GAT CTC TCT ACT
625 M A R Q L G A S H P A E S D S I Y H C Q D L S T
1945 AAA GCA TCA ACA CAA CCT CAA CCA CAA CCA TCC CCA GCG AAA TCC ACC GAC GTG GCC GAG TCA AGC TAT TGC
649 K A S T Q P Q P Q P S P A K S T D V A E S S Y C
2017 GCA ACA GAG ACT CAA CTT CAT GTA GCT CCA CCA CCT GCG GAA GCA GCA GCA CAT CAC GAG ACA CCG CCT ACC
673 A T E T Q L H V A P P P A E A A A H H D T P P T
2088 ATG TCG AAG TTA AGC GCA GTA GTG AAG GAC GAC GAT CCT GCA CTC AAC ACT AAA ACC GTA TAA
697 M S K L S A V V K D D D P A L N T K T V *
TATGTCCAATTACCTTTAGCGTCAGATCATCGACCTTGCCGTCACCTAATACCAGCAGTTGTTGAATGCCGACCCACAAACACAGCAACAAGCCCCACCGTGTGTATCTTCTC
AGATTGCTGTTGATGAATAACATAATCCTTTCATGGATGATACGAGCATTGGGAAATTATTGCCACACATGACAGAGGAAGGAGAGGAAGACGCGAATGCTCCAGACCTTAC
GTTGGAATCACAAGAGGTCCATTTCCTCCGATATTACATATTTAGACCTATACCCCTGTTATTTCGCTTATTTCCCCACCTACTTTCTGTTCTTTGAAGCATCACGGC
CAGCACATGATTTTCCCCCGCCCCCAACAACCGGAGCGGGCAGTGTTTCGCACCTCACAATCCACAGGGCACTATACTACTCTTCTCCCGTAGTATACCTCCTTAATTCA
GTCATTGAGTTTTGACCAACATCCCCTTCATTCCATTCTTCTTTGCCCGCTGATCTTCGCGCGGGAGGGGATATATGCGTATCAAGAATAGCTTACTTAGCATGTTTAGC
ATTTCAATTTTGTATCTTTTGATTATCATTTTGTATATTCGCAAGCTGATAATATCTCTTTACGTGATGCTCTACTCTTTCCTAAGCAAGAGTATGAATTGATGAAATAGTT
TGTGACATTGATGGATAGATAGATGTTTCATAGATGTATTCAGGATATCTAGATTAGTAGATAGGAAATATTGAAACAATGAGTTTAACTTCATGAAGAAAAATGGGGTGG
ATAATTGCCTTCCCTTGCTTCCGGTGTGGTAAGCCTGCGATCCCGTGCCGCGAGATATAATCCCTACCGCAAGGCCATTGAAACGGATATCCACGATTTTAA

```

Figura 4 - Sequência de nucleotídeos (1-2154) do gene *PbGP70* e sequência deduzida de aminoácidos (1-718). As regiões flanqueadoras 5' e 3' não apresentam numeração. Em destaque (laranja) está a sequência de 384pb utilizada para o rastreamento *in silico* do banco de ESTs de *Pb18*. As regiões marcadas em amarelo correspondem a putativos sítios de início da transcrição e as regiões sublinhadas são os possíveis sinais de poliadenilação.

Análises adicionais da sequência de PbGP70 no banco de dados GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>) mostraram alto grau de identidade com proteínas hipotéticas de *Coccidioides immitis*, *Aspergillus fumigatus* e *Aspergillus clavatus* (Tabela 2), fungos filogeneticamente próximos ao *P. brasiliensis*. O gene homólogo em *Histoplasma capsulatum* apresenta dois íntrons, porém nos fungos *C. immitis*, *A. fumigatus* e *A. clavatus* não são encontrados íntrons nas sequências. As proteínas deduzidas apresentam maior grau de conservação na região central da proteína enquanto que as regiões N-terminal e C-terminal da molécula são menos conservadas. Na região central da proteína existem dois domínios conservados entre os aminoácidos 105 e 404 (Figura 5)

Tabela 2 - Homologia do gene PbGP70 com sequências de nucleotídeos de outros fungos no banco de dados GeneBank (NCBI)

Homologia/ Número de acesso no GenBank	Notação	BLAST E-value/ %identidade/ %positividade	mRNA	Tamanho (kDa)	pI
<i>Ajellomyces capsulatus</i> Nam1/XP_001542128.1	Predicted protein	1e-126 /63/76	1,6 Kb	62	5,51
<i>Coccidioides immitis</i> /XP_001243766.1	Hypotetical protein	1e-30/51/63	1,9 Kb	70	5,37
<i>Aspergillus fumigatus</i> /XP_75906.1	Hypotetical protein	3e-24/45/58	2,1 Kb	76	5,19
<i>Aspergillus clavatus</i> NRRL1/XP_001264221.1	Conserved hypotetical protein	4e-23/45/58	2,3 Kb	84	4,47

Fonte: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>

Recentemente, por meio de comparações entre sequências homólogas, a proteína deduzida codificada pelo gene em estudo foi anotada como sendo pertencente à família das flavoproteínas monoxigenases no banco de dados do genoma de Pb18, Pb3 e Pb01 (http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/paracoccidioides_brasiliensis/GeneDetails.html?sp=S7000001960945371).

Corroborando estas informações, foi encontrado na sequência deduzida da proteína um motivo GXGXGX (Figura 5 – sublinhado roxo). Esse motivo foi reportado na literatura como sendo o domínio conformacional que permite a ligação dos co-fatores NAD ou FAD às flavoproteínas oxigenases (Van Berkel *et al.*, 2006).

A proteína deduzida codificada por PbGP70, contém 718 aminoácidos, massa molecular estimada em 79kDa e ponto isoelétrico (pI) de 5,87 (Figura 5 e Figura 6). Além disso, foi possível identificar na sequência dois potenciais sítios para *N*-glicosilação Asp-X-Ser/Thr (Figura 5 – sublinhado vermelho) (Chang *et al.*, 2007). Um sítio semelhante foi encontrado na sequência da gp43 de *P. brasiliensis* por Cisalpino *et al.*, 1996.

Peptídeos internos identificados previamente por Feitosa *et al.*, 2006, por meio do microsequenciamento da molécula de gp70 nativa, foram encontrados na sequência protéica deduzida (Figura 5 – retângulos azuis).

A análise do perfil de hidrofiliidade (Kyte-Doolittle *Hydrophilicity-Plot*) da sequência deduzida de PbGP70 (Figuras 6 e 7) mostrou a prevalência de segmentos hidrofílicos, com alta probabilidade de expressão na superfície e distribuídos ao longo da sequência. Essas regiões têm maior probabilidade de conter epítomos para células B. Nesta análise também foi possível identificar dois peptídeos de 12 aminoácidos (ARTMSSRTSISS e LSLPQGLGLPSA – Figura 5, retângulos verdes), localizados na região N-terminal da proteína entre os resíduos 70 e 270 (Figura 6), que têm as características de epítomo para células T murinas (apresentada pelo MHC tipo II). Esses epítomos apresentam pelo menos 12 aminoácidos compostos por um segmento hidrofóbico localizado entre regiões hidrofílicas. Os dois epítomos são conservados em *H. capsulatum* e um deles em *C. immitis* e *A. fumigatus* (Figuras 5 e 7). Esta análise foi feita através do módulo Protean do programa Lasergene (DNASTAR Inc.).

Além disso, a proteína PbGP70 deduzida tem alto índice antigênico principalmente na porção N-terminal (Figura 6), corroborando com o perfil de hidrofiliidade. Esses altos índices antigênicos eram esperados uma vez que, a proteína nativa é reconhecida por 96% dos soros de pacientes com PCM (Silva *et al.*, 2004).

A partir de análises feitas pelos programas de computador *SignalP* e *TargetP* (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/> e <http://www.cbs.dtu.dk/services>

/TargetP/) (Nielsen *et al.*, 1997; Emanuelsson *et al.*, 2000), não foram identificados peptídeos de direcionamento à organelas nem sítios putativo de clivagem de peptídeos-sinal, corroborando os dados de Grosso *et al.*, 2003 que mostraram a localização predominantemente citopasmática da gp70 nativa.

Como apresentado acima, Pbgp70 apresenta dois sítios putativos de *N*-glicosilação Asp-X-Ser/Thr (Figura 5 – sublinhado vermelho). Dessa forma buscou-se verificar se a proteína nativa de fato era glicosilada. Para tanto, experimentos de *immunoblotting* com extrato celular de Pb18 tratados com Endoglicosidase-H e revelados com anticorpo monoclonal específico anti-gp70 nativa (MAb C5F11) foram realizados e confirmaram que a proteína nativa é *N*-glicosilada e que a forma deglicosilada da proteína possui massa molecular estimada de 61 kDa (Figura 8). Em experimentos nos quais membranas contendo extrato celular de Pb18 foram submetidas a tratamento prévio com metaperiodato de sódio (o qual bloqueia os sítios de ligação a sacarídeos O-ligados), o MAb C5F11 também foi capaz de reconhecer a banda correspondente à Pbgp70, mostrando que o anticorpo monoclonal se liga a porção peptídica da molécula (Figura 8).

1 MADLAPKAE **E**SDAVDASARDFNEDTDLSSQSCAI **M**NE **G**ESHQ **F**ANATASTPEPETASSDQQVETGITEYHAF *H. capsulatum*
1 -----MEHLTKESLDGSIHSPDLRSYFFSGEINEDG----- *C. immitis*
1 -----MED**E**SDAPHLTEFANFTPNGLFGSSPSADGPAPINGTKTASDEDSPHREEERRLSD-----A *A. fumigatus*
1 -----MGKIGQ**G**ESHPW**E**-ATDGTVEQDTSSQKKTEETD-----AH *P. brasiliensis*

73 DHN**H**ERPH**S**SSSHASATFTGDE-DYEDQ--**G**RHAARSTSSRSSTSSLPGSVVVY**F**CK**H**YNCTITPS**N** *H. capsulatum*
60 LIY**H**-----PSSEEGPGGIPPKD-DYNEG--LVSDNGGRSSHRSSISSLPGSVVVH-----RADT-- *C. immitis*
60 HMPVQDCGYNSSESSSTQHSTSTSSHDMDDDLAPSDSRASSRSSTSS**F**TSVLIHPP-----SELKS- *A. fumigatus*
37 ER--PRSS**S**SSSH**S**ETFTG**E****N**D**H**FRRS**E**IGRT**A**RT**M**SSRT**S**SSLPGSVI**V**C**P**EE**K**YDGSSTITPS-**F** *P. brasiliensis*

142 **R**GHYMQHY**E**SN-NDQ**F**IPVDSKDF**K**KN**T**TSRLSKIAPGVRRDSPPFRHPSSVLAMQMGGDEDCD**G**YGY**P**Y *H. capsulatum*
86 -**H**-----HHCNDVLS**C**PLAGCASL**N**K**K**---NKPHSPITHVRD**E**SPFRHPSSSVRAMQMGGDE--SELD**A** *C. immitis*
123 -ATG--CGTDERIRHSHW**N**QNS**P**GHGR--MEAQ**F**SIQT**L**REBA**A**FR**K**SSSVRAMQMHTD----- *A. fumigatus*
105 **R**GHYMQHY**S**RTNTD**G**HPVNGNR**P**K**R**N**S**SRLSKIAPSVRRD**S**PPFRHPSSSVRAMQMGGDE**E**YD**G**YGY**G**Y *P. brasiliensis*

213 **D**NEKTT**P**SYRKRRCNGRGHS-**C**QSVSGMSMRSTV**E**TF-PSARWN**Y**KSP**P**TK-----G**P**PVQKEYPLVLLH *H. capsulatum*
146 LSPSS**M**TLKGKQ**R**GP**R**GQ**S**PL**S**EM**S**EMRSSTASPSSSAK**Y**YRSPHTRSPQMIVQ**E**EV**K**DYPLVLLH *C. immitis*
180 -EDDDEF**L**TPPKRRRG**H**R-----MSD**S**TSRSAGSSP--LKRSP**V**YSP**T**GSTG-----RQKV**K**KEYPLVLLH *A. fumigatus*
177 **N**ED**L**MP**S**SWRN**H**S**G**RGHS-**C**QSVSGMSMRSLGSSP-VSAR**S**SVKSP**R**AK-----E**A**AVQKEYPL**L**LLH *P. brasiliensis*

277 CTLLPPSL**L**PHGLGRPSAQL**L**SH**L**FEKYWARWKLEDDK**I**VNSGVLRDRGL**L**LISHPQEMYD**L**LEERLLESL *H. capsulatum*
431 **C**N**L**APSLSLPPRL**G**TP**S**PELL**R**EVLPDVYWR**R**WKLEDDKV**V**SGVLRDRGVLISHPQ**E**AYD**V**LEERLLESL *C. immitis*
238 CTLLPPSL**P**VG**L**IG**V**DDQKILKEVLPP**E**VWR**R**WKLE**E**KVG-**S**SVVRDRGVLISH**E**DMYD**L**LEERLLESL *A. fumigatus*
241 CTLLPPS**L**S**L**P**G**LG**L**PSA**Q**ILKEVLPP**K**WARWKLEDDK**I**NSGVLRDRGL**L**LISHPQEMYD**M**LEERLLESL *P. brasiliensis*

349 ELVRPRL**G**YGHFLGREDE**D**SA**D**DG-----*H. capsulatum*
290 EL**L**RPRLAYGHFFGSDGKGSSGDNDSDDEESE--**C**VIDAGE**K**ACRDCCHTVL**K**NEGGGERKWEVR**H**YAA**N** *C. immitis*
309 EL**Q**RPRLHGHFLGHEDTESDKQDSAT**E**DS-----ATDGEQ**G**EC**P**DCCGGRFP**H**HDSS--**R**KWE**I**K**V**EA**N** *A. fumigatus*
313 ELVRPRL**S**GHFLGREND**D**DP**D**DGGGGSG**K**EGIGY**V**SDGC**D**GEK**A**DCGAR**L**M**K**HEGE**K**R**W**DVRVYAA**N** *P. brasiliensis*

373 -----**A**WREMEKVDVEVGLALPVE**I**KRELERRIT**E**EKG**M**KIE**Q**ELRLLEEE**Q**RRREIYGE**P**PPPT**Q**E *H. capsulatum*
359 GLMRAGAWAAAWK**D**MEKVDVEVGLWLPV**T**RRDLERR**M**LEE**A**FR**M**E**A**EL**S**IEEEKRR**K**EV**G**DAGC**S**Q**E** *C. immitis*
374 GLMRAGAWAAAWK**E**MEKVDVEVGLWLP**S**ETRRELE**K**L**L**DND--**R**PSTDR**L**QVP**Q**REPATSIT**P**E**L**YD**Q**P *A. fumigatus*
385 **C**LM**G**CAGAWAAAW**R**DMEKVDVEVGLALPVEIRRELE**R**IVEENT**L**R**M**EE**Q**RLV**E**EEKRRREIY**Q**V**T**APT**Q**E *P. brasiliensis*

435 **A**TDGL**G**D-DVVPFFQSD**F**DRP**S**PPPT**F**RO**E**PRATVLSVST**K**HGH**E**H**M**IF**A**KSD**E**IDLOT**C**ANYIRV**L**A *H. capsulatum*
431 **E**LDGYMD-----SLDAGIPGEDH**Q**QSSAH**A**PYPIQSDSN--GVGFL**I**K**K**FONMEF**H**AL**H**THY**K**RV**L**E *C. immitis*
444 LRTNTPT-----**F**LIHEPSLFV**P**DEAAR**F**SS**P**APATTT**P**AKATGMPPPT**Y**TS**R**SV**E**ID**L**HT**L**L**I**NYIRV**L**A *A. fumigatus*
457 **A**TDGLE**D**GD**S**V**P**RF**Q**SK**F**D**Q**SS**P**PL**L**TR**E**EPPT**I**NPST**D**FER--**E**RS**T**Y**T**K--**E**VN**L**Q**T**FSNYIR**V**LA *P. brasiliensis*

506 **S**D--TRNV**A**L**A**FL**S**SKLSHRNT-HQT**V**L**H**TE**K**VN**L**T--LV**S**ER**F**S-----**K** *H. capsulatum*
492 **R**DFVVT**L**LAGV**L**L**V**LA**M**TY**G**PSRAP**S**IA**P**AG**S**AP**S**S-**P**NN**V**TV**A**T**T**TP**P**-----**A**YT *C. immitis*
511 **S**D--RRNV**T**V**L**LSV**V**V**L**AL**G**V**K**PT**S**SHLR**P**EG**M**IES**I**PVLS**S**TV**S**LE**Q**HP-----**T**PSWT**K**HS**F** *A. fumigatus*
525 **S**D--RRNV**A**IA**F**LS**E**V**L**Y**F**SM**G**MA**K**Q**G**E**T**FA**S**HA**T**TS**P**PH**V**VP**T**VS**S**PM**V**LE**H**N**L**PS**I**V**N**S**P**VM**V**MS**M**ER *P. brasiliensis*

549 **H**QL**H**L**N**L**R**Y *H. capsulatum*
546 **T**TVFTSS**P**AK**S**KW**P**S**P**V**I**PA**A**T**V**AVNC**S**IPT**G**LI**A**AE**P**S**S**EP**K**P**V**LD**M**RP**M**S**P**GT**N**G**Q**D**G**DE**P**SP**N**AE**S**C *C. immitis*
576 **S**TVLS**L**TA**E**PA**M**EN**S**IL**Q**ET**V**RE**T**SS**R**TT**A**T**P**SV**A**EP**I**TVSS**S**TA**E**TP**Q**V**S**V**P**VS**T**SS**S**MS *A. fumigatus*
595 **Q**I**H**SGA**E**N**K**IT**P**TS**G**CG**V**LA**T**EP**R**SV**G**QT**M**AR**Q**LG**A**SH**P**AE**S**DS**I**Y**H**C**Q**DL**S**TR**A**ST**Q**P**Q**P**Q**EP**S**PA**N**ST**D** *P. brasiliensis*

557 *H. capsulatum*
518 **S**DD**K**LD**S**LF**S**AP**K**W**E**ES**L**GR**P**LE**E**IE**H**SPA *C. immitis*
648 **I**AN**S**KS**P**EAK**L**Q**E**W**L**SP**A**N**D**LV**I**ER**S**GT**P**CP**A**SP**L**AK**D**E**I**ET**I**AP**T**D**L**EAD *A. fumigatus*
667 **V**AE**S**SY**C**AT**E**T**Q**L**H**VA**P**PA**E**AA**A**HH**D**TP**P**TM**S**KL**S**AV**V**K**D**DD**P**AL**N**KT**V** *P. brasiliensis*

Figura 5 – Alinhamento da sequência de aminoácidos deduzida de PbGP70 de *P. brasiliensis* com sequências homólogas de outros fungos. Comparação feita pelo método (MegaAlign module, DNASTar Inc.) da sequência de aminoácidos deduzida de PbGP70 de *P. brasiliensis* e sequências de outros fungos depositadas no GeneBank (NCBI-BLAST): *H. capsulatum* (XP_001542128.1), *C. immitis* (XP_001243766.1) e *A. fumigatus* (XP_75906.1). Os retângulos pretos indicam aminoácidos conservados; retângulos azuis indicam aminoácidos da gp70 nativa obtidos por microsequenciamento; retângulos verdes indicam putativos epítomos para células T murinas presentes na sequência de *P. brasiliensis*. O sublinhado vermelho indica putativos sítios de N-glicosilação e o sublinhado roxo, aponta o motivo GxGxG característico das flavoproteínas.

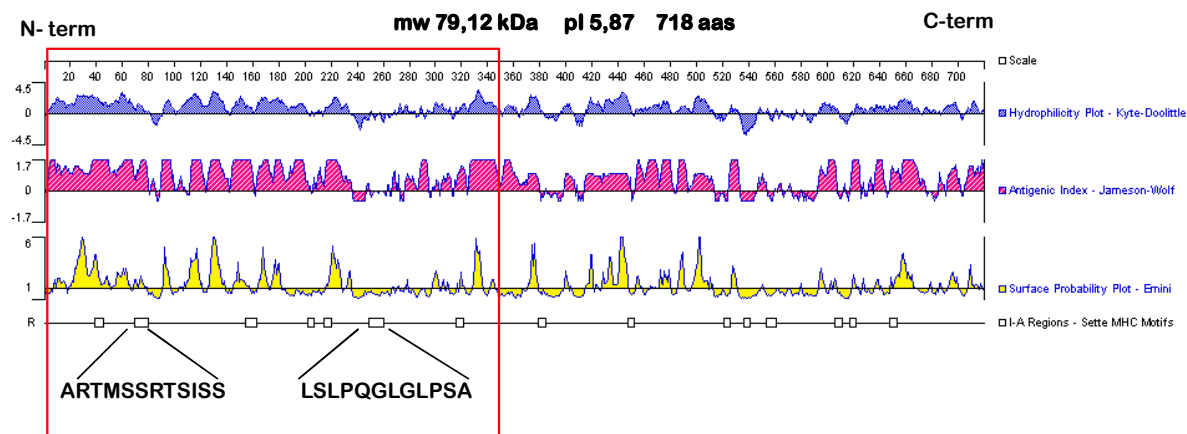


Figura 6 – Representação esquemática da Pbgp70 deduzida. A análise foi realizada utilizando o programa Lasergene, módulo protean (DNASTar Inc.). Os gráficos mostram perfis de hidrofiliidade de Kyte-Doolittle (valores negativos indicam hidrofobicidade), em azul; probabilidade de localização na superfície, em amarelo; índices antigênicos, em magenta. O retângulo vermelho marca a região da sequência utilizada na expressão da proteína Pbgp70 recombinante (Pbgp70r). As regiões destacadas na linha inferior indicam os possíveis epítomos para apresentação de células T murinas, o qual está localizado entre duas regiões hidrofóbicas. A posição dos aminoácidos está indicada na parte superior da figura.

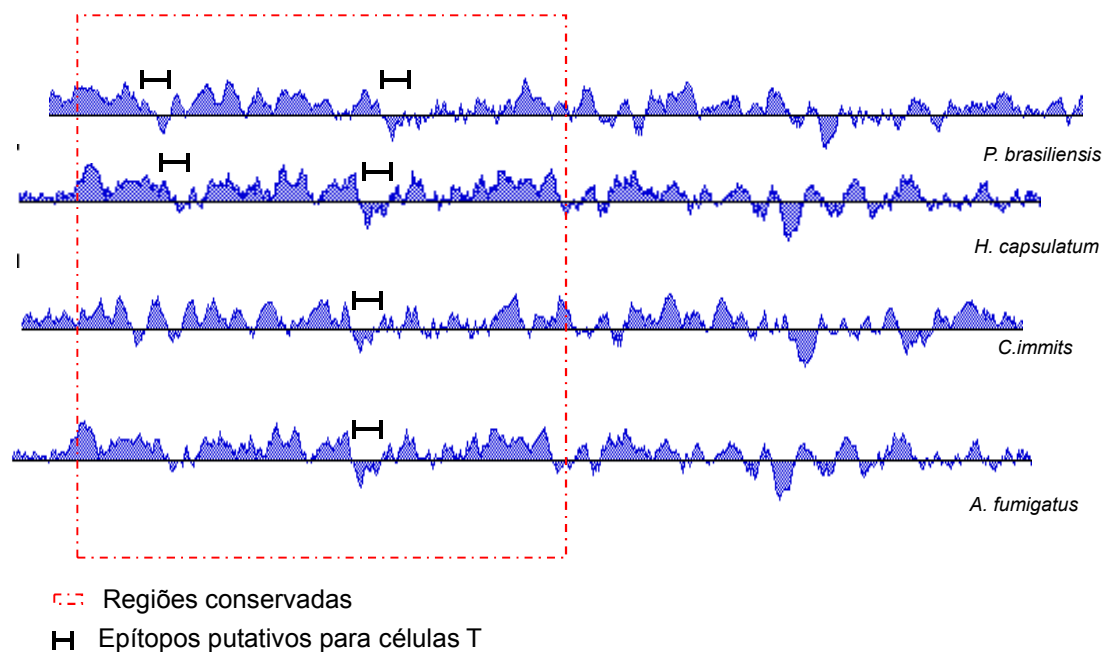


Figura 7 - Perfil de hidrofiliidade Kite-Doolittle (Protean module; DNASTar Inc.) de sequências homólogas à Pbgp70 dos seguintes fungos: *H. capsulatum* (http://genome.wustl.edu/BLAST/blasto_client.cgi); *C. immitis* (http://www.broad.mit.edu/annotation/fungi/coccidioides_immitis); *A. Fumigatus* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>). As barras horizontais mostram a localização do epítipo de célula T com um mínimo de 12 aminoácidos, como predito pelo programa Sette major histocompatibility complex motif (Protean module; DNASTar Inc). O retângulo vermelho indica as regiões mais conservadas.

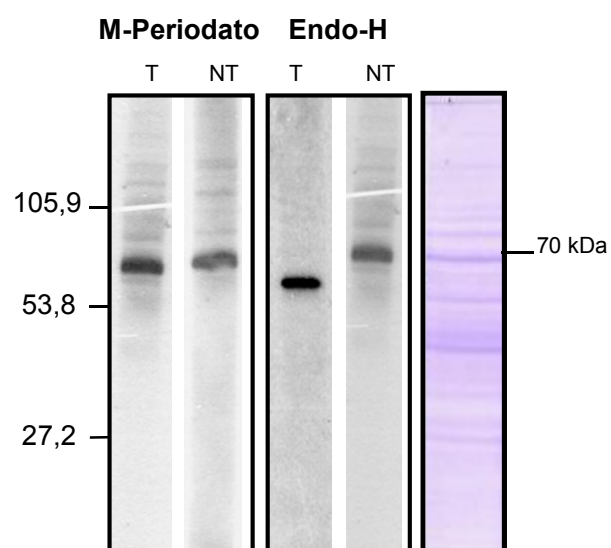


Figura 8 – Reações de *immunoblotting* do extrato celular de Pb18 (20 ug/poço) tratados (T) ou não (NT) com Metaperiodato de Sódio (10mM) – **M-periodato** ou Endoglicosidase-H (0,1U/ug de proteína) – **Endo-H** e MAb C5F11 anti-gp70 (10ug/mL). Como controle o extrato celular(20 ug/poço) foi corado por *Comassie blue* (coluna da direita). A migração da proteína gp70 está indicada na altura de 70 kDa..

4.2. Expressão da proteína recombinante Pbgp70 parcial

Para expressão heteróloga foi escolhida a porção N-terminal da sequência deduzida de aminoácidos. A escolha desta região levou em consideração os seguintes aspectos: os altos índices de antigenicidade da molécula, os putativos epítomos para células T, os peptídeos identificados no microssequenciamento da gp70 nativa e prováveis sítios de *N*-glicosilação, como mostrado na Figura 6 (região assinala pelo retângulo vermelho).

Um fragmento de DNA genômico com 946 pb em fase de leitura aberta, foi subclonado nos sítios *EcoRI* e *SpeI* do vetor pHIS3 (Figura 9A). O fragmento clonado corresponde aos aminoácidos 1 ao 315 de proteína Pbgp70 deduzida. Para verificar a presença do inserto no vetor de expressão (pHIS3), alguns clones recombinantes foram digeridos com as mesmas enzimas utilizadas para a construção do plasmídeo pHIS3Pbgp70 (Figura 9B). O inserto de clones positivos foi sequenciado e verificou-se que a fase aberta de leitura estava correta.

Os mesmos plasmídeos foram introduzidos em bactérias *E. coli* BL21pLysS, apropriadas para expressão heteróloga de proteínas recombinantes. A indução da expressão foi feita após a adição de 0,5 mM de IPTG e foi monitorada ao longo do tempo de incubação a 37°C. Nestas condições, observou-se o aparecimento de uma banda de aproximadamente 35 kDa após 4 e 6h de indução, a qual não foi observada no extrato total das bactéria não induzidas (0 h) ou contendo o vetor sem inserto (Figura 9C).

Foi realizada em seguida a análise da solubilidade da proteína recombinante por SDS-PAGE 12%. Para tal, as bactérias foram induzidas à expressão com IPTG por 4 horas e em seguida, foram lisadas. As porções solúvel e insolúvel foram analisadas separadamente e, como observado na Figura 10, a maior parte da proteína foi expressa na forma de corpos de inclusão insolúveis. Diante desses resultados, a purificação da proteína recombinante (Pbgp70r) em coluna de afinidade foi feita após solubilização com agente desnaturante (uréia).

Para a purificação de Pbgp70r, as bactérias foram induzidas em larga escala e processadas como descrito em Materiais e Métodos para a obtenção do extrato total bacteriano. O precipitado insolúvel foi ressuspenso em tampão contendo 8 M de uréia e o sobrenadante foi analisado em SDS-PAGE (Figura 11).

O material foi aplicado em coluna de Ni-NTA e eluído em tampão 8 M de uréia em pH ácido e os eluatos foram analisados em SDS-PAGE 12%. Na Figura 11, é possível observar que a proteína recombinante foi melhor eluída nas frações de pH 4,5.

Após purificação em coluna de níquel, a proteína recombinante resultante foi utilizada na produção de anticorpos policlonais anti-Pbgp70r de coelhos. Aproximadamente 300 µg da proteína foram aplicados em gel de SDS-PAGE 12% para separar a proteína recombinante da uréia e de traços de outras proteínas bacterianas ligantes de níquel. O gel foi corado por *Comassie blue* e a banda correspondente à proteína recombinante foi excisada do gel, descorada, ressuspensa em PBS e homogeneizada pela passagem em seringa e agulha de diferentes calibres. Esse material foi aplicado por via subcutânea em vários pontos no dorso de coelho.

Após 30 e 45 dias de imunização, o soro do animal apresentou reatividade com a proteína recombinante purificada em reações de *immunoblotting* (Figura 12). O soro anti-gp70 recombinante mostrou títulos de 1:800 quando testado contra pequenas quantidades da proteína recombinante purificada (Figura 12). A partir desses resultados foi padronizado o uso do soro coletado 45 dias após a primeira imunização na diluição 1:200 para ensaios de *immunoblotting*.

Para a realização de alguns experimentos foi realizada a purificação de IgG total do coelho imunizado em coluna de proteína A, como descrito em Materiais e Métodos.

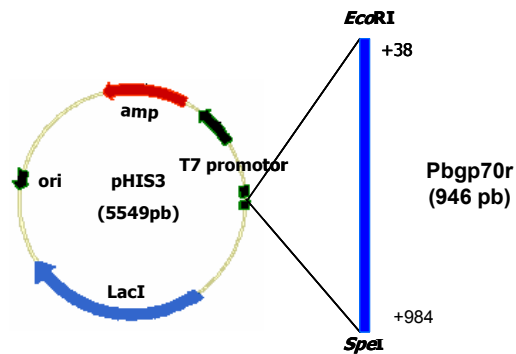
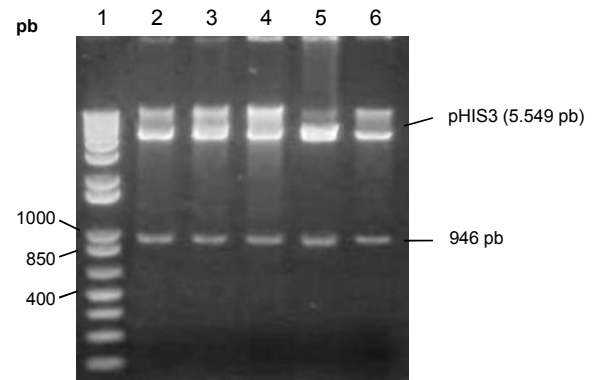
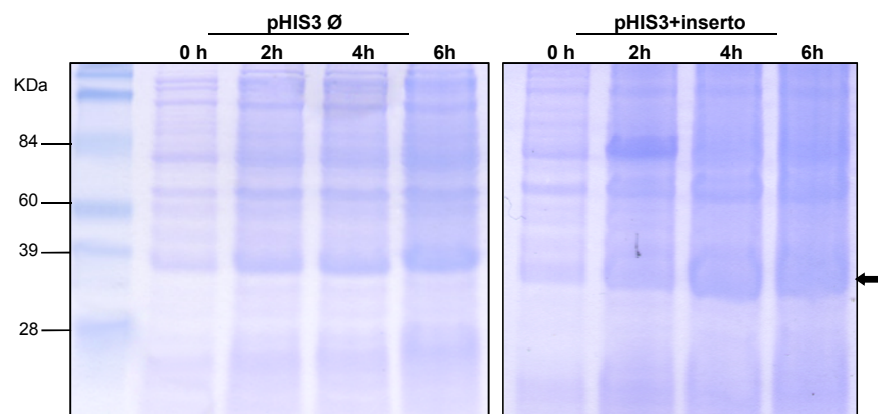
A**B****C**

Figura 9 – Expressão da proteína Pbgp70 recombinante parcial. **A** – Representação esquemática do plasmídeo de expressão pHis3 contendo o inserto o PbGP70 truncado (nt 38 a 984, oligoiniciados por Expr1/Expr3). **B** – Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo, mostrando a digestão da construção pHis3gp70 (colunas 2 a 6) com as enzimas *EcoRI* e *SpeI*. A banda de 946pb corresponde ao inserto. Coluna 1- Padrão de peso molecular 1Kb (Invitrogen). **C** – Gel de poliácridamida 12%, corado por *Comassie blue*, mostrando o perfil do extrato total de bactérias *E. coli* BL21pLysS contendo o vetor pHis3gp70 (pHis+inserto) ou o controle sem inserto (pHis3 Ø), antes (0 h) e após indução com IPTG por 2 a 6 h. A proteína recombinante (massa aparente de 35 kDa) está indicada pela seta.

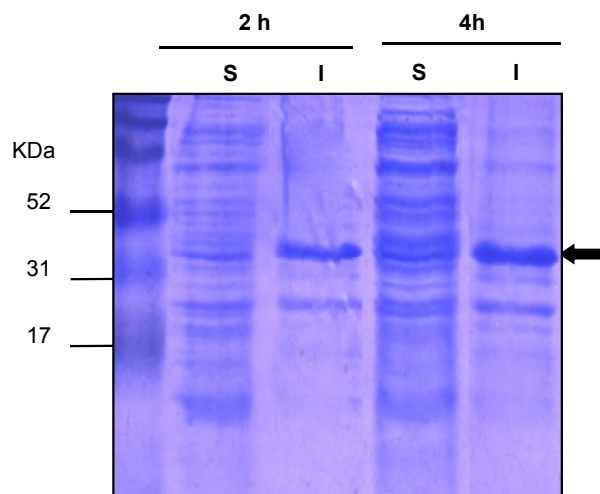


Figura 10 – Solubilidade da proteína Pbgp70 recombinante parcial. Gel de poliacrilamida 12%, corado com o corante *Coomassie blue*, apresentando o perfil dos lisados de bactérias (BL21pLysS) transformadas com o plasmídeo pHIS3gp70 após 2 e 4h de indução com IPTG (0,5mM). **S**, fração solúvel e **I**, fração insolúvel. A primeira coluna representa o padrão de massa molecular em kDa. A seta indica a proteína Pbgp70 recombinante.

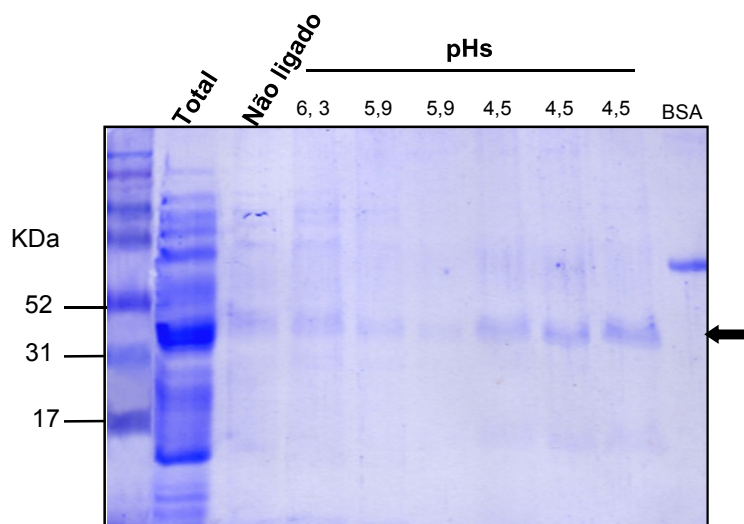


Figura 11 - Purificação da Pbgp70 recombinante (seta, 35 kDa) em coluna Ni-NTA, a partir do extrato bruto de proteínas expressas em bactérias *E. coli* BL21pLysS, solubilizado em 8M de uréia. O extrato total de proteínas (Total), proteínas não ligantes (Não Ligados), proteínas eluídas pelos tampões com pH 6,3, 5,9 e 4,5, bem como a migração do padrão de peso molecular em kDa estão indicados.

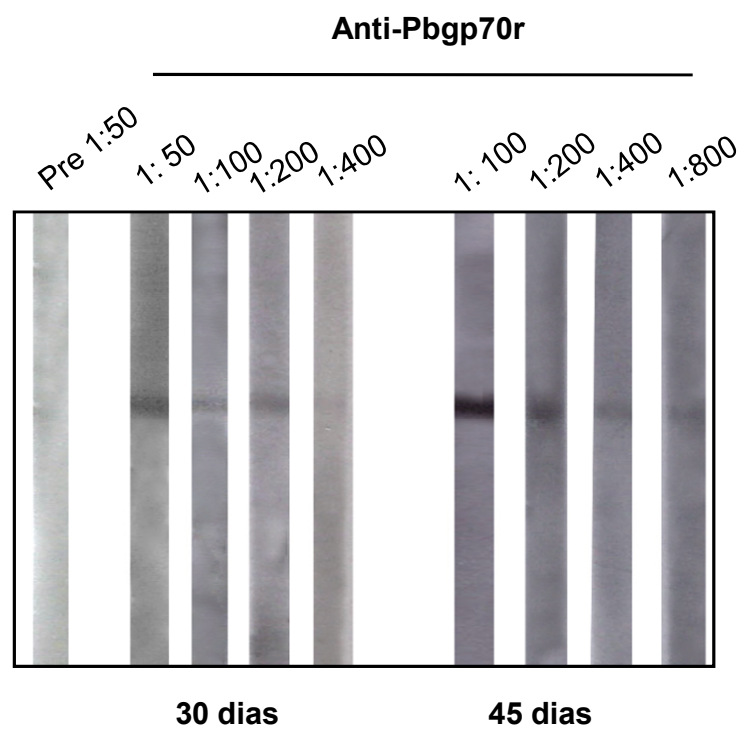


Figura 12 – Reações de *immunoblotting* da proteína recombinante purificada de 35 kDa frente as diluições 1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800 dos soros de coelho obtido após 30 e 45 de imunização. A primeira coluna representa a reação como soro Pré-imune na diluição 1:50.

4.3. Reatividade de Pbgp70 recombinante com soros de pacientes com paracoccidioidomicose (PCM)

A reatividade da proteína recombinante com soro de pacientes com PCM das formas aguda e crônica foi testada por *immunoblotting*. Como controle positivo, foi utilizado o anticorpo policlonal anti-gp70r e como controle negativo, soro de indivíduo normal.

Cinco dos sete soros testados apresentaram reação positiva na diluição 1:100 (Figura 13). Esses achados corroboram com dados da literatura que mostram que 96,5 % dos soros de pacientes com PCM reconhecem a gp70 nativa (da Silva et al., 2004; Camargo et al., 1989). Devido às análises *in silico* terem demonstrado regiões altamente conservadas entre a sequência deduzida da proteína Pbgp70r e as homólogas em outros fungos, foi testada a reatividade da proteína recombinante com alguns soros de outras micoses. Dois soros de paciente com histoplasmose e um de paciente com aspergilose na diluição 1:100, foram testados por *immunoblotting* com a proteína recombinante purificada. A reação foi positiva para um dos soros de histoplasmose e para o soro de aspergilose (dados não mostrados).

4.4. Localização da proteína nativa e reatividade de anticorpos com a proteína recombinante

Para determinar se o soro policlonal anti-Pbgp70r era capaz de reconhecer a glicoproteína nativa de 70 kDa (gp70), o extrato celular de Pb18 foi testado por *immunoblotting* com soros pré-imune ou hiperimune anti-Pbgp70r (1:200) e como controle positivo foi utilizado o anticorpo monoclonal C5F11 o qual reconhece a proteína nativa.

Na figura 14, observa-se a reatividade do soro com a proteína de 70 kDa cuja migração no gel foi similar àquela reconhecida pelo MAb C5F11 anti-gp70 nativa.

Uma vez que proteína deduzida possui alto índice de antigenicidade, principalmente na porção escolhida para expressão, foi testada a reatividade do MAb C5F11 anti-gp70 nativa com preparações contendo proteína recombinante purificada. A reação foi positiva para as duas concentrações testadas (Figura 15). Esses achados sugerem que o gene clonado e caracterizado no presente trabalho corresponde ao gene que codifica a proteína gp70 de *P. brasiliensis*.

Grosso et al. (2003) demonstraram por microscopia confocal que a proteína gp70 nativa de *P. brasiliensis* é predominantemente citoplasmática. Portanto, para verificar a localização celular da proteína reconhecida pelo anticorpo policlonal anti-gp70r e para confirmar os achados apresentados neste estudo, foi realizada a microscopia confocal de células leveduriformes de Pb18 incubadas com anticorpos policlonais anti-Pbgp70r e com anticorpos monoclonais anti-gp70 nativa.

Para a realização desses ensaios as imunoglobulinas (IgGs) totais foram purificadas dos soros pré e hiperimune por cromatografia de afinidade conforme descrito em Material e Métodos.

Primeiramente foi realizado um ensaio de microscopia confocal com o anticorpo anti-Pbgp70r e IgGs do soro pré-imune (nas concentrações de 100 µg/mL), como controle adicional foi utilizado o anticorpo anti-gp75 (MAb 5E7C), que sabidamente marca a região de brotamento e a superfície de células leveduriformes de *P. brasiliensis* (Xander et al., 2007). Os anticorpos policlonais anti-Pbgp70r foram marcados com anti-IgG de coelhos conjugados à FITC (verde) e os monoclonais anti-gp75 com anti-IgG de camundongo conjugado a Rodamina (vermelho), o corante nuclear DAPI foi utilizado como controle (Figura 16). Pode-se observar na Figura 16 que não houve sobreposição da marcação com o anticorpo anti-gp70r em relação ao anticorpo monoclonal MAb 5E7C. A localização da marcação do anti-Pbgp70r foi predominantemente citoplasmática (Figura 16).

Em seguida foi realizado outro experimento de microscopia confocal, agora com o intuito de demonstrar se a marcação observada com o anticorpo anti-gp70r seria igual ao observado por Grosso et al., 2003. Dessa forma, foram utilizados os anticorpos anti-Pbgp70r e o anticorpo monoclonal anti-gp70 nativa (MAb C5F11).

Primeiramente as células foram incubadas com o MAb C5F11 (20 µg/mL) marcado com anti-IgG de camundongo conjugado a TRITC (vermelho). Após incubação e lavagens, as células foram então incubadas com os anticorpos policlonais anti-Pbgp70r (100 µg/mL) marcados com anti-IgG de coelho conjugado à FITC (verde). O corante nuclear DAPI foi utilizado como controle de marcação nuclear (Figura 17). A localização citoplasmática da proteína nas células leveduriformes foi evidenciada em dois planos de imagens longitudinais, um 3 µm, mostrando forte marcação azul no núcleo (DAPI) (Figura 17, painel superior), e outro a 7 µm, o qual mostra forte marcação citoplasmática das células com cada um dos anticorpos utilizados (Figura 17, painel inferior). A sobreposição das imagens mostrou forte co-localização no compartimento citoplasmático, resultando na marcação cor de laranja observada na Figura 17. No compartimento citoplasmático, podem ser vistos pontos mais fortemente marcados pelos dois anticorpos de maneira similar, o que sugere um acúmulo da gp70 em algumas regiões. Esses achados confirmam experimentalmente que o gene caracterizado no presente trabalho corresponde ao gene que codifica a proteína gp70 em *P. brasiliensis*.

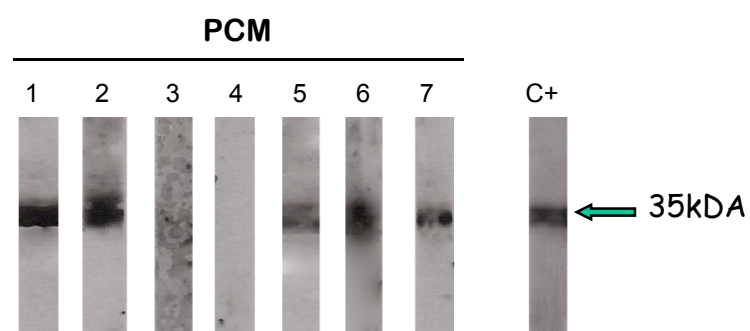


Figura 13 – Sete amostras de soro de pacientes com PCM (1 to 7) testadas por *immunoblotting* contra proteína Pbgp70r purificada. C+, reação com soro hiperimune anti-Pbgp70r na diluição 1:200. Não houve reação entre soros de indivíduos saudáveis e Pbgp70r. A seta indica a banda reativa de 35kDa.

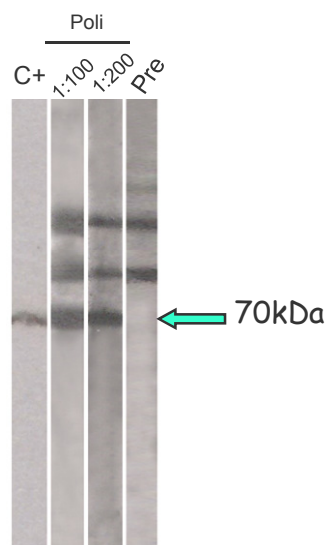


Figura 14 – Reações de *immunoblotting* do soro policlonal anti-Pbgp70r (Poli 1:100 e 1:200) ou soro pre-imune (1:100) com 150 μ g de extrato celular total de *P. brasiliensis*; C+, reação do extrato com MAbC5F11 (20 μ g/mL) anti-gp70 nativa. A seta indica a banda reativa de 70kDa.

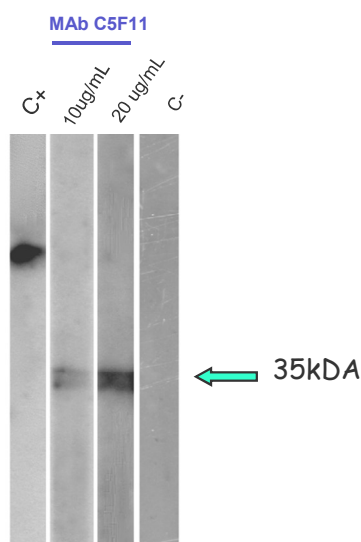


Figura 15 - *Immunoblotting* da proteína recombinante purificada de 35 kDa (Pbgp70r) com MAb C5F11 anti-gp70 (10 μ g/mL ou 20 μ g/mL). C+, extrato celular de Pb18 (20 μ g) com MAb C5F11 anti-gp70 (20 μ g/mL). C – proteína de 35kDa purificada com anti-IgG de coelhos conjugado à peroxidase (anticorpo secundário). A seta indica a banda reativa de 35kDa

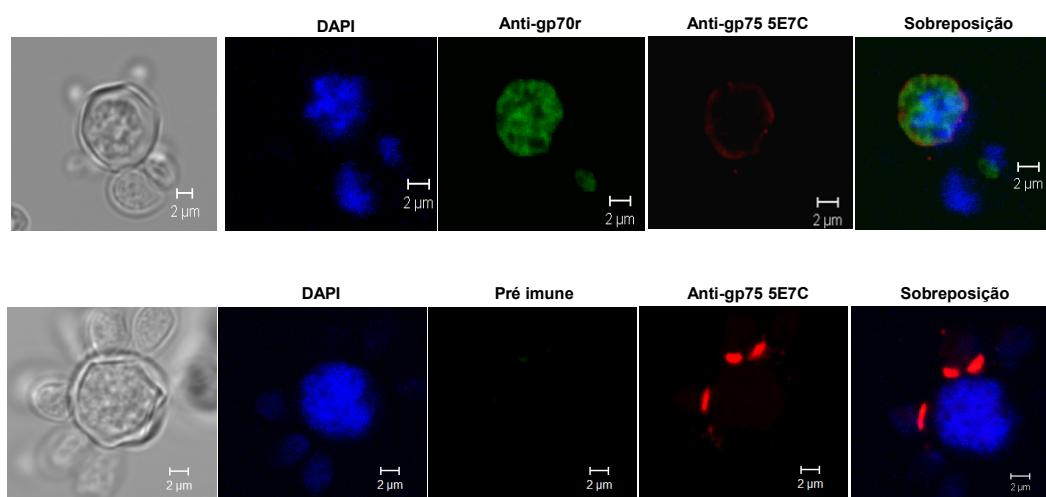


Figura 16 – Localização da gp70 em células leveduriformes de *P. brasiliensis* por microscopiaconfocal. Em vermelho, reação com MAb 5E7C, anti-gp75 a conjugado à Rodamina; em verde, reação com anti-Pbgp70r ou IgGs purificadas do soro pré-imune conjugados com FITC; em azul, marcação do núcleo das células leveduriformes com o corante DAPI. Painel superior, reação com anti-Pbgp70r; Painel inferior, reação com IgGs purificadas do soro pré-imune.

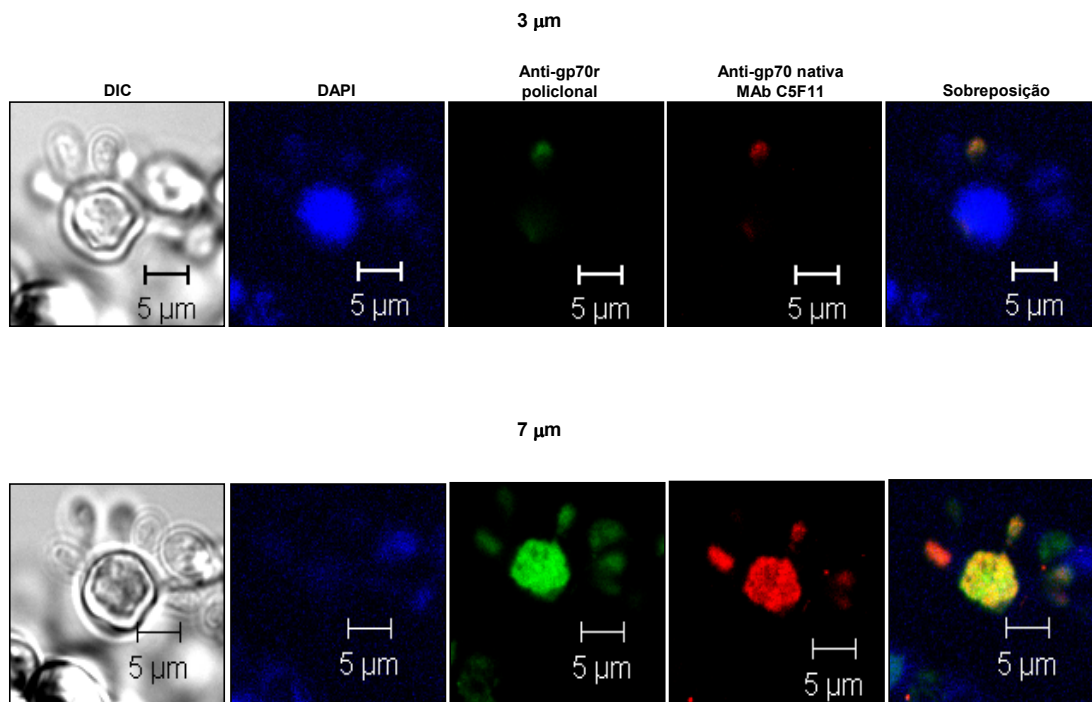


Figura 17 - Localização da gp70 em células leveduriformes de *P. brasiliensis* por microscopia confocal. Em vermelho, reação com MAb C5F11 anti-gp70 nativa conjugado à TRITC; em verde, reação do anti-Pbgp70r conjugado à FITC; amarelo-laranja, co-localização da marcação os anticorpos anti-gp70 nativa e anti-Pbgp70r; em azul, marcação do núcleo das células leveduriformes com o corante DAPI. Painel superior, plano de imagem a 3 μm evidenciando a marcação nuclear; Painel inferior, plano de imagem a 7 μm evidenciando a marcação citoplasmática e co-localização.

4.5. Análises *in silico* dos elementos de transcrição da região promotora do gene PbGP70

A região 5' flanqueadora do gene PbGP70 (nucleotídeos – 440 a -1) foi analisada pelo programa de computador TFSEARCH (<http://molsun1.cbrc.aist.go.jp/research/db/TFSEARCH.html>), o qual detecta putativos sítios conservados em eucariotos para ligação de fatores de transcrição. Nessa análise, foi possível verificar que a sequência contém motivos conservados para fatores de transcrição como HSF (*heat shock factor*), indicados na Figura 18 pelas setas azuis. Uma das sequências identificadas como sendo putativo sítio de ligação para HSF, o HSE (elemento de choque térmico) – **TTGAACCAAGAAATACGAAGGAAAGGC** - encontrado entre as posições -101 e -130 (Figura 18, sublinhados vermelhos) foi similar ao um elemento não clássico (HSE não clássico) encontrado em *P. brasiliensis* no promotor do gene PbMDJ1-**ACTTGATCAACTCGGAGAACCTCGTCGAATAG** (Batista *et al.*, 2007). Em leveduras HSEs não clássicos estão presentes nas regiões promotoras de genes expressos não apenas sob condições de estresse térmico, mas principalmente, sob estresse nutricional e oxidativo (Ruis e Schüller, 1995).

Outro putativo elemento de ligação encontrado na região 5' UTR do gene PbGP70 foi para o fator de transcrição ADR-1 (*Alcohol Deshydrogenase-1*). Este fator está relacionado, em eucariotos, com a expressão de genes envolvidos nas vias metabólicas do glicerol, etanol e ácidos graxos. Motivos de ligação para ADR-1 também estão presentes nos promotores de genes que são super-expressos em condições de estresse nutricional e oxidativo, de acordo com análises de *microarray* realizadas por Gasch *et al.* (2000). Motivos conservados para ligação de ADR1 foram encontrados na sequência analisada e os principais resultados estão indicados pelas setas verdes na Figura 18.

Também foi possível detectar nessa análise sequências para possível ligação de fatores GATA os quais, entre outras funções, regulam genes envolvidos na resposta ao metabolismo do nitrogênio e ao estresse nitrosativo (Scazzocchio, 2000; Marzluf, 1997). Os principais resultados de homologia a

elementos de ligação de fatores GATA estão indicados pelas setas magenta na Figura 18.

Esses dados e a recente notação do gene *PbGP70* como sendo da família das flavoproteínas monoxigenases nos levou a investigar a modulação da expressão gênica de *PbGP70* sob condições de estresse oxidativo e nutricional.

TFMATRIX entries with High-scoring:

- 440	1 GATTCAGATG AGCTTCTCCT TTGTTTGATT TTATTTTITA AATTGTTAAA	entry score
	<-----	M00028 HSF 95.3
	<-----	M00042 Sox-5 94.8
	<-----	M00029 HSF 93.7
	<-----	M00094 BR-C 2 88.7
	<-----	M00100 CdxA 88.5
	<-----	M00148 SRY 87.3
	<-----	M00094 BR-C 2 86.8
	<-----	M00160 SRY 86.4
	<-----	M00093 BR-C 2 86.2
	<-----	M00101 CdxA 85.7
- 390	51 TTTTACATT GGGGAAGTGC TACATCTTAT CCGGGAGTGA GATAGGGAAC	entry score
	<-----	M00077 GATA-3 100.0
	<-----	M00142 NIT2 98.8
	<-----	M00253 cap 94.9
	<-----	M00076 GATA-2 94.1
	<-----	M00048 ADR1 93.8
	<-----	M00033 p300 93.1
	<-----	M00083 MZF1 93.0
	<-----	M00075 GATA-1 91.0
	<-----	M00029 HSF 90.9
	<-----	M00029 HSF 90.9
	<-----	M00128 GATA-1 88.4
	<-----	M00048 ADR1 87.7
	<-----	M00253 cap 87.6
	<-----	M00203 GATA-X 87.4
	<-----	M00076 GATA-2 86.2
	<-----	M00076 GATA-2 86.2
- 340	101 CTACTATGCC ATCCTTGTTT TTGTACAGA ATACCAGGTT ACATGCATT	entry score
	<-----	M00028 HSF 95.4
	<-----	M00028 HSF 94.3
	<-----	M00148 SRY 90.9
	<-----	M00022 Hb 88.4
	<-----	M00253 cap 85.1
	<-----	M00101 CdxA 85.0
- 290	151 ACCGCTATAT ATGATCGATT TTGTGAACT TCAAAGCATT GACTAGATCT	entry score
	<-----	M00012 CF2-II 89.6
	<-----	M00102 CDP 88.3
	<-----	M00147 HSF2 87.8
	<-----	M00106 CDP CR 87.2
	<-----	M00101 CdxA 87.1
	<-----	M00147 HSF2 86.5
	<-----	M00101 CdxA 86.4
	<-----	M00029 HSF 86.3
	<-----	M00146 HSF1 85.5
	<-----	M00106 CDP CR 85.4
	<-----	M00104 CDP CR 85.4
	<-----	M00103 Clex 85.3
- 240	201 GTTATACCTT CCTGACGAT CTCGACCGG AAGACCCCA ACAGTATTC	entry score
	<-----	M00048 ADR1 100.0
	<-----	M00048 ADR1 96.9
	<-----	M00101 CdxA 92.1
	<-----	M00028 HSF 91.1
	<-----	M00028 HSF 91.1
	<-----	M00148 SRY 89.1
	<-----	M00271 AML-1a 87.4
	<-----	M00253 cap 87.1
	<-----	M00075 GATA-1 86.9
	<-----	M00029 HSF 86.9
	<-----	M00048 ADR1 86.2
	<-----	M00028 HSF 85.9
	<-----	M00094 c-Myb 85.2

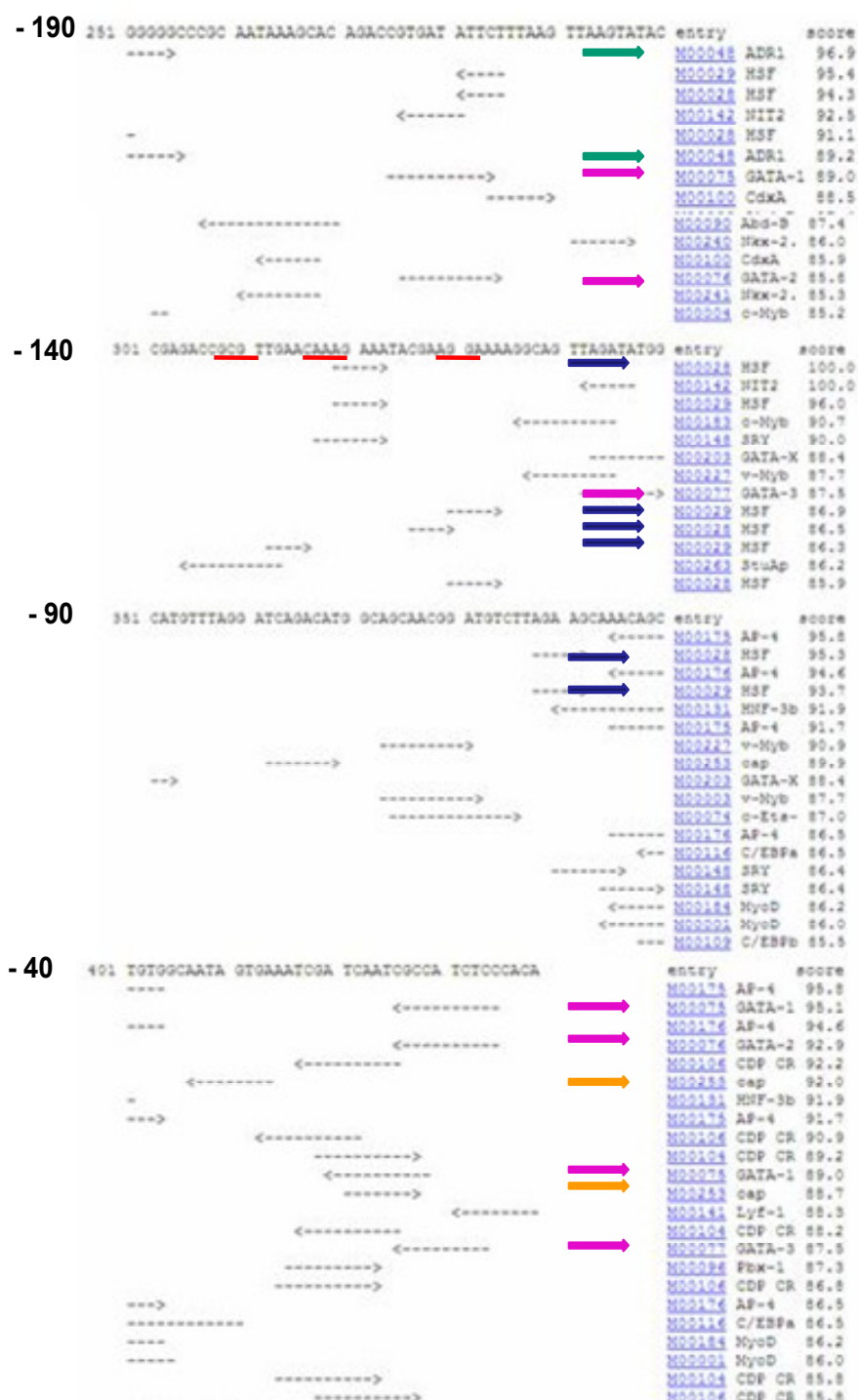


Figura 18 – Análise da região promotora de PbGP70 de *P. brasiliensis* pelo programa TFSEARCH (<http://molsun1.cbrc.aist.go.jp/research/db/TFSEARCH.html>), frente a uma matriz ampla de elementos de transcrição. As setas laranja indicam as sequências CAP (sítios possíveis para de início da transcrição). Setas azuis, melhores resultados de identidade com HSEs, região sublinhada em vermelho – sequência homóloga aos HSEs não clássicos; Setas magenta, melhores resultados de identidade com elementos de ligação aos fatores GATA; Setas verdes, melhores resultados de identidade com elementos de ligação aos fatores ADR1.

4.6. Expressão de PbGP70 durante o crescimento do fungo e em situações de estresse oxidativo.

A técnica de RT-PCR quantitativo em tempo real consiste no monitoramento da fluorescência liberada durante a reação de PCR permitindo quantificar um produto específico presente em na fase logarítmica da reação (Tyagi *et al.*, 1998; Bonnet *et al.*, 1999). O Sistema de Sybr Green[®], utiliza um agente intercalante de DNA fluorescente, que vai sendo incorporado às novas fitas de DNA formadas.

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

Experimentos de RT-PCR quantitativo em tempo real foram realizados para monitorar os níveis de transcrição do gene PbGP70 após a indução de estresse oxidativo com a adição de diferentes concentrações de H₂O₂ (1,0; 2,5 e 2,5 mM) durante uma hora em culturas de Pb18, a 37°C e o RNA foi extraído para posterior avaliação da expressão gênica.

A Figura 19 exibe significativo aumento de expressão gênica de PbGP70, cerca de 12,5 vezes, com a adição de 1mM de H₂O₂. Porém para as amostras tratadas com concentrações maiores, a expressão diminuiu de maneira dose-dependente. Esses resultados permitem especular que concentrações maiores que 2,5mM de H₂O₂ podem ser tóxicas para fungo e bloquear funções celulares após uma hora de contato, embora não tenha sido observada diminuição da viabilidade celular nessas amostras. Esses dados sugerem que a gp70 possa participar da resposta do fungo ao estresse oxidativo.

O próximo passo foi investigar se o crescimento do fungo e, consequente estresse nutricional, poderiam estimular a expressão de PbGP70. Para tanto, os níveis de acúmulo do transcrito foram avaliados ao longo de 14 dias de cultivo do

fungo em meio complexo (YPDmod). Alíquotas com igual quantidade de células de um mesmo pré-inóculo foram postas em cultura e a expressão gênica foi avaliada após o 4º, 6º, 8º, 10º e 14º dias de cultivo.

Na figura 20 podemos observar um significativo aumento da expressão gênica após o 8º dia de cultura e pico da expressão foi atingido no 14º (aumento de 11 vezes) (Figura 20).

Ensaio de *Southern blot* foi realizado com o objetivo de confirmar o resultado apresentado anteriormente. Para tanto, foi feita uma amplificação por RT-PCR, a partir de outras amostras de cDNA de 5 e 14 dias de crescimento do fungo, utilizando os mesmos oligonucleotídeos iniciadores do ensaio de RT-PCR quantitativo em tempo real (Figura 20, painel inferior). Nesta figura é possível notar que a banda de 356-pb, correspondente ao cDNA amplificado, apresentou maior intensidade nas amostras crescidas por 14 dias quando comparada com a amostra de 5 dias de crescimento. Esses resultados sugerem a participação do gene estudado no crescimento do fungo. Possivelmente o estresse nutricional devido alterações químicas no meio durante o cultivo prolongado pode ser um estímulo para a expressão do gene, uma vez que esta aumenta significativamente em períodos maiores de cultivo do fungo.

A fim de investigar o papel do gene *PbGP70* em situação de estresse oxidativo, contexto no qual o fungo encontra-se durante a resposta imunológica do hospedeiro, leveduras de *Pb18* foram incubadas com macrófagos não ativados derivados de medula óssea, para que as células fúngicas fossem fagocitadas. Dados da literatura mostram que mesmo em estágios iniciais da fagocitose, 6 e 12 h após a internalização de leveduras de *P. brasiliensis* por macrófagos, ocorre intensa modulação da expressão gênica no fungo (Tavares *et al.*, 2007). Dessa forma avaliou-se a modulação da expressão gênica de *PbGP70* durante estágios iniciais e tardios de fagocitose ou ainda apenas pelo contato do fungo com macrófagos. Para tanto, o RNA total foi extraído após 6, 12, 24 e 48 h de incubação com os macrófagos murinos. Para melhor avaliar a modulação na expressão foram extraídos os RNAs das células fúngicas não aderidas (ou fracamente aderidas) aos macrófagos separadamente das células que se encontravam aderidas ou fagocitadas.

De acordo com dados recentes, fatores presentes no soro são capazes de modular a expressão gênica em *P. brasiliensis* logo após o início do contato (Bailão *et al.*, 2007). Por isso, para avaliar se a modulação na expressão de PbGP70 ocorria em resposta apenas aos estímulos do soro presente no meio de cultura utilizado nesse experimento, foram utilizados como controle os RNAs de células fúngicas mantidas por 6, 12, 24 ou 48 horas em meio-R10 na ausência de macrófagos. Além disso, a expressão gênica também foi avaliada antes da troca de meio de cultura de YPD (pré-inóculo) para R-10. Esse grupo foi chamado de YPD T=0 e logo após as células serem incubadas com R-10, grupo R-10 T=0.

Finalmente, com a intenção de garantir a especificidade da análise da expressão gênica das células do *P. brasiliensis* neste experimento, foram utilizados como controle RNAs extraídos de macrófagos incubados na ausência de *P. brasiliensis* durante os períodos estabelecidos.

A Figura 21 mostra a integridade do RNA total extraído para cada grupo experimental. É possível notar que para o grupo de células aderidas ou fagocitadas a quantidade de RNA obtida é bem menor, principalmente nos períodos iniciais de incubação (6 e 12 h). Isto ocorreu devido ao baixo índice de adesão e fagocitose das células leveduriformes de *P. brasiliensis* aos macrófagos neste curto período do ensaio.

Para garantir que as amostras de RNA utilizadas estivessem livres de contaminação por DNA genômico, foi realizada a reação de RT-PCR para o gene da Calmodulina de *P. brasiliensis* (PbCAM), uma vez que é possível diferenciar a banda de amplificação genômica (310pb) daquela amplificada a partir do cDNA (120 pb), como mostrado na Figura 22.

Por fim, as amostras foram utilizadas no experimento de PCR quantitativo em tempo real para avaliar a modulação de PbGP70 após o contato e/ou fagocitose do *P. brasiliensis* por macrófagos. Os dados obtidos nesse experimento estão expressos no gráfico de quantificação relativa. Na Figura 23 podemos observar aumento significativo no acúmulo de mRNA nas células internalizadas ou aderidas aos macrófagos com 12 e 24 h após o estímulo, em 48 h houve diminuição nos valores, mostrando possivelmente uma tendência de queda na expressão PbGP70 (Figura 23, barras magenta). Em contrapartida, os níveis de expressão em leveduras não aderidas aumentaram significativamente

com 48 h após o contato com os macrófagos (Figura 23, barras verdes). É possível observar ainda que, após 6 h de cultura houve aumento significativo na expressão de *PbGP70* nas leveduras incubadas na ausência de macrófagos (Figura 23, barras azuis). Uma provável explicação para esse efeito pode ser a ocorrência de modulação inicial induzida pela troca de meio de cultura de YPDmod para R-10, o qual contém 10% de soro fetal bovino.

Os resultados observados nesse experimento reforçam a idéia de que o gene *PbGP70* é modulado sob estresse oxidativo tanto em condições artificiais, pela adição de compostos oxidantes, quanto em situações mais próximas da realidade, como durante o contato com macrófagos.

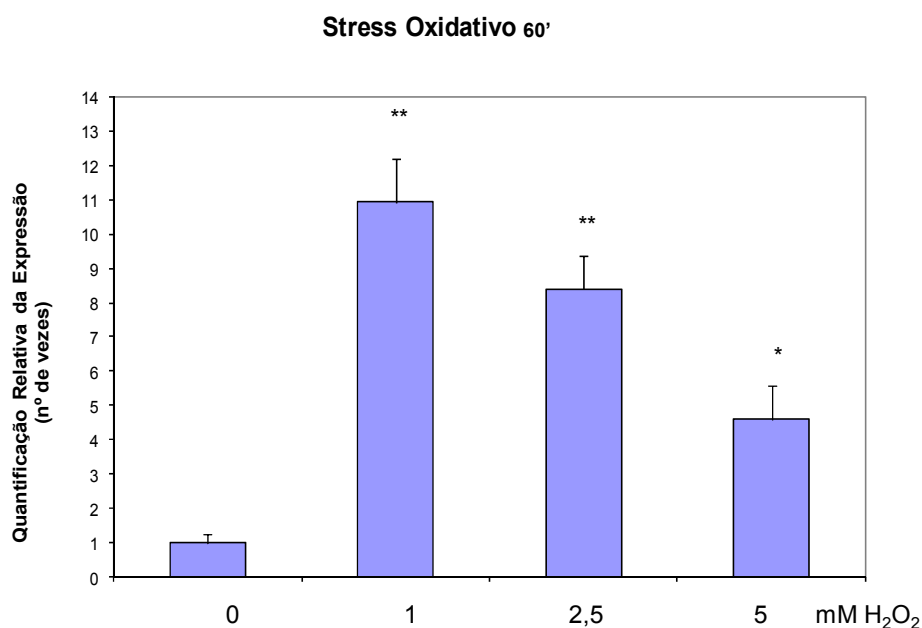


Figura 19 - Expressão do gene *PbGP70* após uma hora de indução de estresse oxidativo pela adição das concentrações indicadas de H_2O_2 às culturas leveduriformes de *P. brasiliensis*. Significância: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, obtida por comparação com os valores do grupo que não recebeu H_2O_2 .

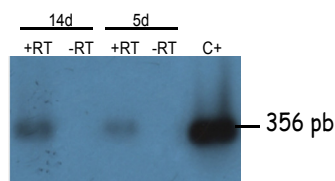
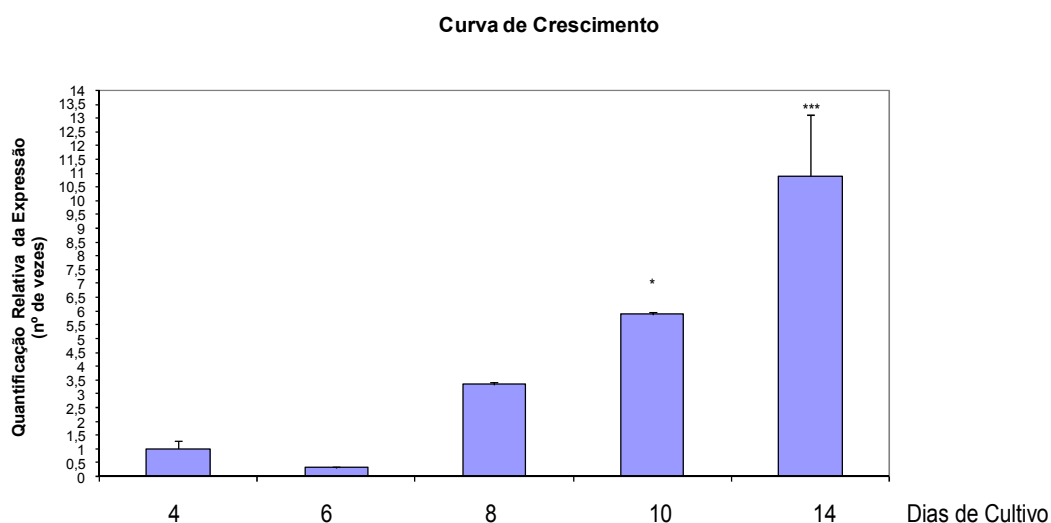


Figura 20 – Gráfico: Expressão do gene *PbGP70* durante a curva de crescimento de células leveduriformes de *P. brasiliensis* em cultura líquida. Significância: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$ obtida por comparação com os valores do grupo de 4 dias de cultivo. Os resultados são representativos de dois experimentos individuais. Painel inferior: Análise de *Southern blot* dos produtos de RT-PCR com os oligonucleotídeos iniciadores SE1/E2 e RNA total de *P. brasiliensis* extraído no 5º e 14º dias de cultivo; (–RT), reações realizadas na ausência de transcriptase reversa (controle negativo); (+ RT), reações realizadas na presença de transcriptase reversa. (C+), produto de PCR com DNA genômico e os oligonucleotídeos iniciadores SE1/E2 (controle positivo). O fragmento SE1/E2 produzido por PCR foi utilizado como sonda.

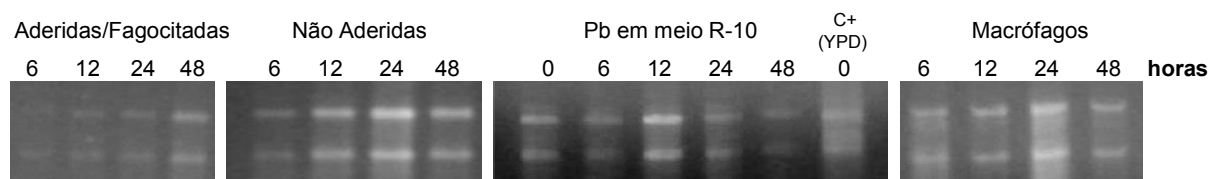


Figura 21 - Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio, no qual as subunidades 28S (banda superior) e 18S (banda inferior) do rRNA estão visualizadas, demonstrando a integridade dos RNAs utilizados. Foram aplicados 3 μ L de RNA de cada amostra.

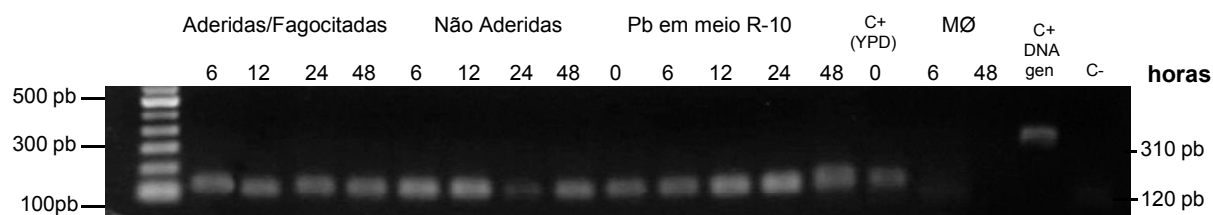


Figura 22 – Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio, mostrando produto de RT- PCR do gene *PbCAM*. O C+ corresponde à banda amplificada a partir do DNA gênomico, o C- corresponde ao mix utilizado na reação sem adição de amostra. Foram aplicados 2 μ L de amostra no gel.

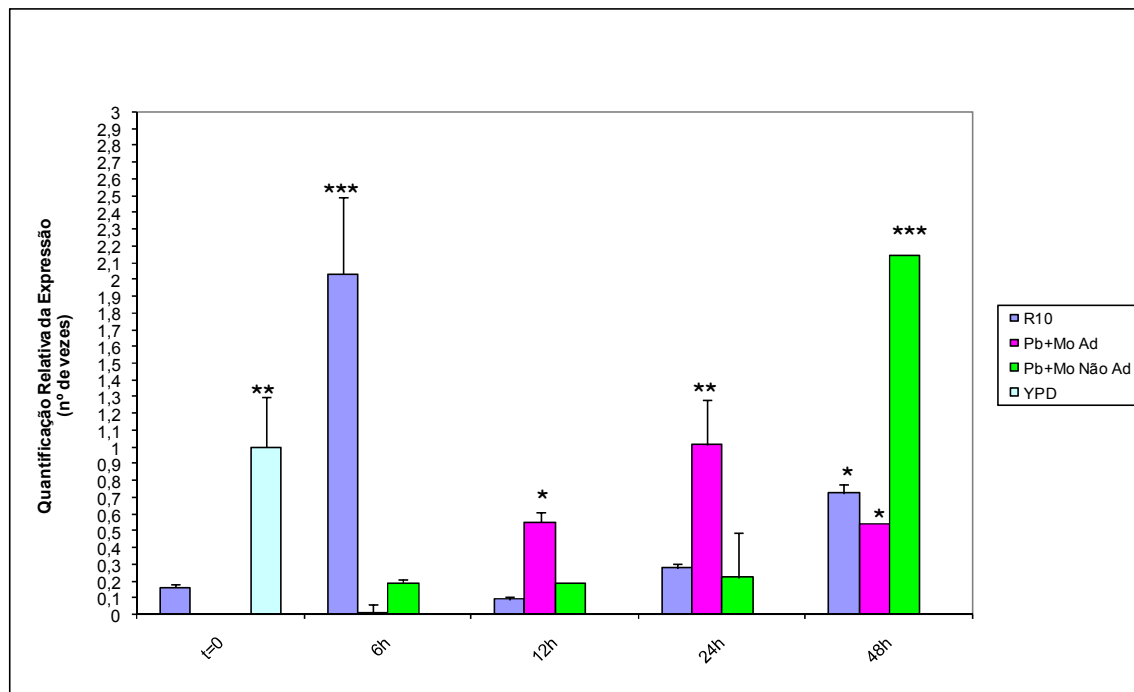


Figura 23 - Expressão do gene *PbGP70* após a incubação de leveduras de *P. brasiliensis* com macrófagos murinos derivados de medula óssea por 6, 12, 24 ou 48 horas. YPD, expressão em leveduras de *P. brasiliensis* crescidas em YPD antes da incubação em meio R-10 (controle). R10, expressão gênica nas células leveduriformes incubadas em meio R-10 na ausência de macrófagos (controle). Pb+Mo Não Ad, expressão em células de *P. brasiliensis* não aderidas aos macrófagos. Pb+Mo Ad, expressão em células de *P. brasiliensis* aderidas/internalizadas por macrófagos. Significância: * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$ e *** $p < 0.001$ foi obtida por comparação com os valores do grupo R10 T=0. Os resultados são representativos de dois experimentos individuais.

5. DISCUSSÃO

O *Paracoccidioides brasiliensis*, assim como muitos outros parasitas eucarióticos, expressa moléculas antigênicas que podem ser reconhecidas pelo sistema imunológico do hospedeiro, além de exercer funções imunomoduladoras.

O uso de ferramentas computacionais para análises genéticas e técnicas moleculares como clonagem, expressão e produção de proteínas recombinantes tem ajudado na caracterização e entendimento do papel dessas moléculas na interação parasita-hospedeiro.

A glicoproteína de 70 kDa de *P. brasiliensis* (gp70), foco do presente trabalho, vem sendo alvo de estudo em nosso laboratório há alguns anos devido à sua importância. Essa molécula é reconhecida por 96% dos soros de pacientes com PCM (Camargo *et al.*, 1989) e possui propriedades imunomoduladoras como capacidade de induzir resposta linfoproliferativa quando testada *in vitro* com linfócitos de pacientes com PCM (Benard *et al.*, 1997).

Grosso e colaboradores (2003), os primeiros a estudarem a gp70 em nosso laboratório, mostraram que a molécula é capaz de modular negativamente funções de macrófagos peritoneais (fagocitose, produção de NO e H₂O₂) e produziram anticorpos monoclonais anti-gp70 que conferiram proteção em animais infectados experimentalmente. No entanto, uma das dificuldades encontradas nesse trabalho foi a obtenção de maiores quantidades do antígeno para a realização de mais ensaios na tentativa de melhor caracterizar a molécula. Para tentar contornar esse problema, uma alternativa seria realizar a clonagem e caracterização do gene e posterior obtenção da proteína recombinante.

As primeiras tentativas de clonagem desse gene em nosso laboratório foram realizadas por Feitosa e colaboradores (2007); esse trabalho, porém resultou na clonagem do gene da calnexina (PbCNX) de *P. brasiliensis*.

Finalmente, no presente estudo, foi possível desvendar a natureza do antígeno gp70 por meio da clonagem e caracterização do gene que o codifica. A porção N-terminal da proteína deduzida Pbgp70 foi expressa em bactérias (Pbgp70r) e anticorpos policlonais anti-Pbgp70r foram obtidos e utilizados como ferramentas biológicas na confirmação de sua identidade imunológica. Anticorpos monoclonais anti-gp70 nativa (MAb C5F11) reconheceram a proteína parcial recombinante de 35 kDa, assim como, anticorpos policlonais anti-Pbgp70r

reconheceram o componente de 70 kDa correspondente à gp70 no extrato celular total de *P. brasiliensis*.

Estruturalmente, o gene PbGP70 não apresenta íntrons nos isolados Pb18 e Pb3 e codifica uma proteína de 718 aminoácidos. Na sequência protéica deduzida foram encontrados: (i) peptídeos da gp70 nativa; (ii) dois possíveis sítios para *N*-glicosilação; (iii) alto índice antigênico e de hidrofiliidade; (iv) dois possíveis epítomos para apresentação por células T murinas. Esses elementos estavam situados na porção *N*-terminal expressa, a qual parece ter domínios conservados entre as proteínas correspondentes de outros fungos.

Um plasmídeo com a construção para a expressão da proteína recombinante inteira também foi obtido (pHIS3Pbgp70-2, dados não mostrados).

A Pbgp70r foi reconhecida em ensaios de *immunoblotting* por 5 de 7 soros de pacientes com PCM. Mattos-Grosso (2003) mostrou resultados semelhantes utilizando a técnica de EIA (imunoensaio enzimático) e a gp70 nativa purificada, que foi reconhecida por soro de pacientes com PCM e histoplasmoses. A proteína recombinante produzida (Pbgp70r) também foi reconhecida por soros de histoplasmoses e aspergilose por *Immunoblotting* (dados não mostrados), sugerindo que essa proteína possa vir a ser utilizada em ensaios biológicos ou, eventualmente, em experimentos de *screening* para o diagnóstico de micoses sistêmicas. Esses resultados também confirmam deduções apontadas nas análises *in silico* que mostraram que região expressa possui alto índice antigênico e é conservada entre os fungos homólogos ao *P. brasiliensis* (Figuras 5, 6 e 7).

A imunidade celular específica (células T) e a imunidade celular não-específica (macrófagos, células NK e neutrófilos) são consideradas os principais mecanismos homeostáticos do hospedeiro frente à maioria, senão a todas as infecções fúngicas (Levitz, 1992).

Foi possível identificar na sequência deduzida de Pbgp70 dois potenciais epítomos para células T murinas. Está bem estabelecido que a resposta imune celular ao *P. brasiliensis* é protetora em humanos (Brummer *et al.*, 1993; Franco *et al.*, 1993) e em modelos murinos (Cano *et al.*, 1995; Calich *et al.*, 1985; Travassos *et al.*, 2004b). Estudos com epítomos para células T derivados da molécula gp43 são promissores para o desenvolvimento de novas estratégias

para imunoterapia na PCM (Marques *et al.*, 2008; Taborda *et al.*, 2004) e de uma possível vacina para a doença (Braga *et al.*, 2009; Travassos *et al.*, 2008).

Dessa maneira, estudos futuros utilizando os peptídeos correspondentes aos dois epítomos para células T identificados na sequência de Pbgp70 seriam importantes. É possível especular que esses epítomos são conservados entre as proteínas correspondentes em outras espécies de fungos homólogos ao *P. brasiliensis*, o que reforça ainda mais a necessidade de estudos com esses peptídeos, objetivando o desenvolvimento de tratamento ou vacina, os quais podem ser polivalentes para micoses sistêmicas.

Um ponto intrigante entre os presentes achados é que o peso molecular estimado da proteína deduzida Pbgp70 é cerca de 79 kDa. Além disso, a gp70 nativa perde cerca de 9 kDa após a *N*-deglicosilação mediada por endoglicosidase H (Figura 8).

Uma possível explicação para essas diferenças é o fato de que algumas proteínas sofrem modificações pós-traducionais, resultando na perda de resíduos de aminoácidos, como no caso das modificações do tipo GPI nas proteínas que possuem âncora de glicosil-fosfatidil-inositol (GPI) na membrana. Nesse caso, cerca de 13 a 25 resíduos hidrofóbicos da porção C-terminal são substituídos por uma âncora constituída de glicosil fosfatidilinositol (GPI) pela qual a proteína se liga à membrana (Ikezawa, 2002, Yan *et al.*, 1998, Caras *et al.*, 1989).

Outro tipo de processamento pós-traducional que leva a perda de resíduos de aminoácido é a clivagem endoproteolítica. Esse processo é requerido para gerar a forma madura e biologicamente ativa de algumas proteínas, principalmente enzimas (revisado por Rehemtulla e Kaufman, 1992). Essa clivagem geralmente ocorre em sítos que contêm motivos com pares de aminoácidos básicos (lisina, histidina, arginina) (Devi, 1991).

A primeira enzima eucariótica conhecida com essa capacidade de clivagem foi a kexina (EC 3.4.21.61), uma serina-protease subtilisina-*like* que é codificada pelo gene *kex2* em *Saccharomyces cerevisiae* (Van de Ven *et al.*, 1993). Em *Phanerochaete chrysosporium*, um basidiomiceto ambiental, os pares de aminoácidos di-básicos que são sítios de clivagem para a kex estão presentes na sequência deduzida da enzima 1,4-bezoquinona redutase, a qual, assim como a proteína estudada neste trabalho, faz parte da família das flavoproteínas. Nessa

proteína o processamento via kex resulta na perda de 71 aminoácidos (Akileswaran *et al.*, 1999).

Em *P. brasiliensis* o gene que codifica a proteína kex-like foi identificado recentemente e apresenta funções homólogas às da kexina de *S. cerevisiae* (Torres *et al.*, 2008). Desse modo, pode-se especular que a gp70 seja um potencial alvo para a proteína kex.

A notação da proteína PbGP70 deduzida no genoma de *P. brasiliensis* foi, recentemente, atualizada de proteína hipotética para proteína pertencente à família das flavoproteínas monoxigenases. Antes de essa informação ser liberada tentou-se, no presente estudo, entender um possível papel para a gp70 na biologia de *P. brasiliensis*, por meio da investigação da regulação do gene PbGP70, uma vez que, em condições normais, esse gene é pouco expresso e a proteína gp70 é pouco encontrada nos antígenos celulares (Figura 8) e exoantígenos do fungo (Grosso *et al.*, 2003).

Uma abordagem inicial, na tentativa de verificar em que condições os níveis de expressão de PbGP70 poderiam aumentar foi a utilização de análises computacionais da região 5' flanqueadora do gene. Por meio dessas análises foi possível identificar na sequência a presença de elementos de ligação para os fatores de transcrição HSF, ADR-1 e GATA, entre outros. Todos esses fatores são relacionados a uma grande variedade de respostas ao estresse em fungos (Ruis e Schüeller, 1995; Yamamoto *et al.*, 2005; Gasch *et al.*, 2000; Scazzocchio, 2000; Marzluf, 1997).

Os resultados de RT-PCR quantitativo em tempo real mostraram que o gene PbGP70 aumenta sua expressão após exposição a peróxido de hidrogênio (estresse oxidativo) bem como durante o crescimento do fungo (estresse nutricional), corroborando as análises *in silico*.

O isolado Pb18 tem o pico de sua viabilidade celular após o 8º dia de cultivo e que a fase exponencial do crescimento está entre o 4º e 10º dias após o início do cultivo (Kashino *et al.*, 1985). Durante o crescimento, devido ao metabolismo do fungo, o meio de cultivo sofre alterações químicas, limitando os nutrientes disponíveis. Dessa maneira, o fungo pode ser induzido a modificar seu metabolismo para continuar obtendo energia. Tal fato também ocorre quando o fungo cresce em meios de cultivo controlados contendo diferentes fontes de carbono, como no trabalho de Derengowski e colaboradores (2008) que mostrou

aumento na expressão de genes do ciclo do glioxilato em condições de estresse nutricional. Esse ciclo permite que compostos que contenham dois carbonos, como aqueles derivados do metabolismo de ácidos graxos, sejam utilizados na gluconeogênese.

Mattos-Grosso (2003) demonstrou em sua tese de doutoramento que a gp70 nativa está presente no extrato de *P. brasiliensis* a partir do 4º dia de cultivo até, pelo menos, o 12º segundo dia.

Em conjunto, esses dados reforçam os presentes achados (aumento de expressão do gene PbGP70 durante a curva de crescimento do fungo a partir do 4º dia) e a importância dessa molécula na fase exponencial do crescimento fungo.

Uma proteína intracelular citoplasmática específica da fase leveduriforme de *P. brasiliensis*, a Pby20, foi recentemente caracterizada como membro da família das flavina mononucleotídeo flavodoxinas WrbA -like (Daher *et al.*, 2005). Nesse estudo foi demonstrado que o gene PbY20 também aumenta sua expressão em leveduras sob estresse oxidativo induzido pela adição de H₂O₂, também corroborando os resultados encontrados no presente trabalho.

Intermediários reativos de oxigênio e nitrogênio têm extrema importância no mecanismo fungicida de macrófagos. Diante dos resultados obtidos com as proteínas nativas gp43 e gp70 as quais parecem inibir a fagocitose, liberação de NO e H₂O₂ por macrófagos peritoneais não ativados (Poppi *et al.*, 2002; Grosso *et al.*, 2003), uma abordagem mais fisiológica para avaliação da expressão gênica de PbGP70 sob condições estressoras foi investigada por meio da incubação de leveduras de Pb18 com macrófagos derivados de medula óssea não ativados.

Após 12 h de incubação, foi possível detectar aumento dos níveis de acúmulo do transcrito o que estava diretamente relacionado à interação do fungo com os macrófagos. Após 48 h, as leveduras não aderidas e não internalizadas pelos macrófagos também apresentaram expressão aumentada de PbGP70. Os grupos controle mostraram que o gene também é regulado por fatores presentes no soro, como sugerido pelo aumento da expressão após 6 h de contato com meio R-10 na ausência de macrófagos.

Esses achados permitem-nos inferir que leveduras internalizadas ou aderidas aos macrófagos têm aumento na expressão de PbGP70 em resposta a níveis basais de NOS e ROS produzidos pelos macrófagos. Após 48 h de contato,

esses compostos reativos podem ter sido liberados no sobrenadante induzindo a expressão de *PbGP70* nas células não aderidas.

Análises de *microarray* de células leveduriformes de Pb01 aderidas ou internalizadas por macrófagos também mostraram o aumento de genes comumente relacionados a estresse oxidativo e nutricional como os genes da Cu, Zu superóxido dismutase (*SOD*) e cistationina beta-liase (*MET-G*) (Tavares *et al.*, 2007).

Como mencionado acima, o gene em estudo foi anotado como membro da família das flavoproteínas monoxigenases. As flavoproteínas são a classe de proteínas mais estudadas na bioquímica e participam dos mais diversos processos biológicos entre eles bioluminescência, combate ao estresse oxidativo, reparo do DNA e outros. Quimicamente, flavoproteínas são definidas como enzimas dependentes dos co-fatores FAD (Flavina-adenina dinucleotídeo) ou FMN (Flavina mononucleotídeo) (Massey, 2000).

Uma das primeiras flavoproteínas descobertas foi uma proteína de aspecto amarelado isolada de levedura, cuja função era essencial para a respiração celular. Por meio de cromatografia foi possível separar a apoproteína do co-fator FMN e então determinar que esse co-fator era essencial para a atividade enzimática (Theorell, 1935). Desde então essas enzimas também são chamadas de *Old Yellow Enzymes* (OYEs).

Flavoproteínas monoxigenases são uma classe de flavoproteínas que catalisam reações de oxigenação por meio da transferência de um átomo de oxigênio ($O^{\cdot}$) para um determinado substrato. Para essas reações pode-se utilizar o NADH ou NADPH como doadores de elétrons para seus co-fatores (Alfieri *et al.*, 2007; Suske *et al.*, 1999). Essa classe de flavoproteínas é dividida em subclasses de acordo com a natureza química das reações de oxigenação que catalizam (hidroxilações, sulfoxidações, oxidações de Baeyer-Villiger, etc) (van Berkel *et al.*, 2006).

As flavoproteínas monoxigenases pertencentes à classe A, possuem as seguintes características gerais: são codificadas por um único gene; utilizam o FAD como co-fator; dependem do NADH e NADPH como co-enzimas e estruturalmente possuem uma sequência GxGxGx característica na região *N*-terminal que é um domínio de ligação para o ADP conhecido como *Rossmann*

fold (van Berkel *et al.*, 2006). Essa sequência foi identificada na proteína deduzida Pbgp70r (GYGYGY – Figura 5).

Biologicamente, as flavoproteínas monoxigenases participam de inúmeros processos importantes como: síntese e degradação de compostos antimicrobianos, metabolismo oxidativo de drogas, biossíntese de compostos antitumorais e outros compostos bioativos e processos de resposta ao estresse oxidativo (Alfieri *et al.*, 2007; van Berkel *et al.*, 2006).

Haarer e Amberg (2004) mostraram que OYEs protegem o citoesqueleto de *S. cerevisiae* de danos causados pelo estresse oxidativo induzido por compostos oxidantes, incluindo o H₂O₂. Em *Bacillus subtilis* a enzima OYE YqjM, está envolvida no combate ao estresse oxidativo também gerado por nitrocompostos (Fitzpatrick *et al.*, 2003).

Os dados apresentados reforçam a idéia de que a proteína estudada pertença à família das flavoproteínas monoxigenases e participe da resposta de *P. brasiliensis* a situações de estresse oxidativo. Porém, estudos futuros são necessários para a completa caracterização da proteína gp70 como flavoproteína monoxigenase e identificação de possíveis substratos. Para isso, as construções contendo o inserto correspondente à proteína inteira necessitariam ser expressas na forma solúvel em um sistema mais eficiente do que o utilizado. Isso possibilitaria a produção da proteína recombinante em maior escala e seu emprego na realização de ensaios biológicos.

Os experimentos de microscopia confocal mostraram co-localização da proteína gp70 com o componente reconhecido pelos anticorpos anti-Pbgp70r. Houve intensa marcação com padrão predominantemente citoplasmático similar, tanto com o anticorpo anti-Pbgp70r quanto com o anticorpo monoclonal anti-gp70. Esses dados confirmam os achados prévios (Grosso *et al.*, 2003) e fornecem fortes evidências de que o gene *PbGP70* clonado codifica o antígeno gp70 anteriormente estudado.

Existem evidências de que proteínas citoplasmáticas de fungos que não apresentam o peptídeo sinal de direcionamento alcançam a superfície celular e eventualmente são liberadas para o meio extracelular (Nombela *et al.*, 2006). Esse processo parece ser o que ocorre com a gp70, devido sua localização celular, a ausência de peptídeo sinal de direcionamento a organelas na sequência

codificadora e, ao fato de ser pouco secretada no sobrenadante de cultura do fungo como demonstrado por Grosso e colaboradores (2003).

Especula-se ainda que essas proteínas possam ser *moonlighting*, ou seja, realizar dupla ou multifunções dependendo da localização celular. Como exemplo, a proteína Tsa1, proteína nuclear de *C. albicans* que conhecidamente está envolvida no controle da homeostase durante o estresse oxidativo e que pode localizar-se na parede celular e participar da sua biogênese (Urban *et al.*, 2005). Conforme demonstrado por Batista e colaboradores (2006), em *P. brasiliensis* a proteína mitocondrial Mdj1 também pode ser encontrada na parede celular das leveduras, porém sua função nessa estrutura ainda não foi bem definida.

Apesar de ser localizada predominantemente no citoplasma, a gp70 possui alto potencial imunogênico. Além disso, experimentos realizados *in vivo* mostraram que anticorpos monoclonais anti-gp70 (MAbC5F11) conferiram imunoproteção quando administrados no início e durante o curso da PCM em camundongos (Grosso *et al.*, 2003). Estes achados sugerem que, de alguma forma, o bloqueio da gp70 inibe a infecção, o que reforça sua importância, principalmente nos estágios iniciais da patogênese.

Seguindo essa linha de raciocínio e diante dos dados apresentados, pode-se especular que a gp70 seja secretada pela célula, ou permaneça na membrana (possivelmente ancorada por GPI), realize funções imunomoduladoras e tenha efeito antioxidativo também fora da célula, modulando o ambiente extracelular em prol do fungo.

Em conjunto, os resultados apresentados neste trabalho sugerem que a gp70 pode desempenhar papel duplo na infecção e biologia de *P. brasiliensis*. Por um lado, poderia induzir a resposta imune do hospedeiro devido ao potencial de antigenicidade e putativos epítomos protetores. Por outro lado, poderia atuar protegendo o fungo do estresse oxidativo gerado durante o crescimento ou durante os mecanismos da resposta imune do hospedeiro, como por exemplo, na fagocitose.

O gene *PbGP70* gene poderia, ainda, apresentar uma função biológica importante na fase miceliana do fungo, talvez participando da manutenção da sobrevivência do fungo no ambiente hostil encontrado no solo, como ocorre com

diversos genes em outros fungos dimórficos patogênicos como *C. neoformans*, *H. capsulatum* e *Sporothrix schenckii* (Casadeval *et al.*, 2003; Steenbergen *et al.*, 2003; Steenbergen *et al.*, 2004).

Além disso, este estudo abre um novo campo de investigação, não só voltado para a biologia do *P. brasiliensis*, mas como sobre as possíveis implicações na patogenia da PCM. No entanto, estudos futuros são necessários para ratificar cada uma destas suposições.

6. CONCLUSÕES

- O gene PbGP70 de *P. brasiliensis* foi clonado e caracterizado. A ORF do gene está contida em um fragmento de 2.154 pb.
- PbGP70 apresenta alto índice de homologia com genes de fungos filogeneticamente próximos ao *P. brasiliensis*;
- Foram encontrados na sequência da proteína Pbgp70 deduzida aminoácidos presentes na sequência da gp70 nativa, putativos epítomos de apresentação para células T murinas e alto índice antigênico;
- A proteína Pbgp70 recombinante parcial de 35 kDa foi reconhecida por 5 de 7 soros de pacientes com PCM e pelo anticorpo monoclonal específico (MAb C5F11) anti-gp70 nativa;
- Anticorpos anti-gp70 recombinante reconheceram a banda de 70 kDa correspondente à gp70 no extrato citoplasmático de *P. brasiliensis*;
- Anticorpos anti-gp70 recombinante reconheceram uma proteína predominantemente citoplasmática que se co-localiza com a gp70 nativa;
- A expressão do gene PbGP70 aumenta durante o crescimento e após exposição do fungo a estresse oxidativo;
- O gene clonado e caracterizado no presente trabalho corresponde ao que codifica a glicoproteína gp70 de *P. brasiliensis*. Esse gene é possivelmente membro da família das flavoproteínas monoxigenases.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akileswaran,L., Brock,B.J., Cereghino,J.L., Gold,M. H. 1999. 1,4-benzoquinone reductase from *Phanerochaete chrysosporium*: cDNA cloning and regulation of expression. Appl Environ Microbiol. 65, 415-421.
- Alfieri,A., Fersini,F., Ruangchan,N., Prongjit,M., Chaiyen, P., Mattevi,A. 2007. Structure of the monooxygenase component of a two-component flavoprotein monooxygenase. Proc. Natl. Acad. Sci. 104(4), 1177-82.
- Almeida, A.J., Matute,D.R., Carmona, J.A., Martins, M., Torres, I., McEwen,J.G., Restrepo, A., Leao,C., Ludovico,P., Rodrigues,F. 2007. Genome size and ploidy of *Paracoccidioides brasiliensis* reveals a haploid DNA content: flow cytometry and gp43 sequence analysis. Fungal Genet Biol. 44(1), 25-31.
- Amaral,A.C., Bocca,A.L., Ribeiro,A.M., Nunes,J., Peixoto,D.L., Simioni,A.R., Primo, F.L., Lacava,Z.G., Bentes,R., Titze-de-Almeida,R., Tedesco, A.C., Moraes,P.C., Felipe,M.S. 2009. Amphotericin B in poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) and dimercaptosuccinic acid (DMSA) nanoparticles against paracoccidioidomycosis. J Antimicrob Chemother. 63(3), 526-33.
- Andrade,R.V., Da Silva,S.P., Torres,F.A., Poças-Fonseca,M.J., Silva-Pereira,I., Maranhão, A.Q., Campos,E.G., Moraes,L.M., Jesuino,R.S., Pereira,M., Soares,C.M., Walter,M.E., Carvalho,M.J., Almeida,N.F., Brigido,M.M., Felipe,M.S. 2005. Overview and perspectives the transcriptome of *Paracoccidioides brasiliensis*. Rev. Iberoam. Micol. 22(4), 203-12.
- Andre,D.C., Lopes,J.D., Franco,M.F., Vaz,C.A.C. & Calich,V.L.G. 2004. Binding of laminin to *Paracoccidioides brasiliensis* induces a less severe pulmonary paracoccidioidomycosis caused by virulent and low-virulence isolates. Microbes and Infection 6, 549-558.
- Aristizabal,B.H., Clemons,K.V., Stevens,D.A., Restrepo A. 1998. Morphological transition of *Paracoccidioides brasiliensis* conidia to yeast cells: *in vivo* inhibition in females. Infect Immun. 66(11), 5587-91.
- Bagagli E, Theodoro RC, Bosco SM, McEwen JG. *Paracoccidioides brasiliensis*: phylogenetic and ecological aspects. Mycopathologia. 2008 Apr-May;165(4-5):197-207. Review.
- Bagagli,E., Franco,M., Bosco, S. M., Hebel-Barbosa, F., Trinca,L.A., Montenegro, M.R. 2003. High frequency of *Paracoccidioides brasiliensis* infection in armadillos (*Dasypus novemcinctus*): an ecological study. Med Mycol. 41(3), 217-23.
- Bagagli,E., Sano,A., Coelho,K. I., Alquati,S., Miyaji,M., de Camargo, Z.P., Gomes,G. M., Franco,M., Montenegro,M.R. 1998. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillos (*Dasypus novemcinctus*) captured in an endemic area of paracoccidioidomycosis. Am J Trop Med Hyg. 58(4), 505-512.
- Bailão,A.M., Shrank,A., Borges,C.L.,Parente,J.A.,Dutra,V., Felipe,M.S.,Fiúza,R.B., Pereira,M.,de Almeida Soares,C.M. 2007. The transcriptional profile of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast cells is influenced by human plasma.FEMS Immunol Med Microbiol. 51(1), 43-57.
- Barbosa,M.S., Bao,S.N., Andreotti,P.F., de Faria,F.P., Felipe,M.S.S., Feitosa,L.D., Mendes-Giannini,M.J.S. e Soares,C.M.D. 2006. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Paracoccidioides brasiliensis* is a cell surface protein involved in fungal adhesion to extracellular matrix proteins and interaction with cells. Infection and Immunity 74, 382-389.
- Barbosa,M.S., Cunha Passos,D.A., Felipe,M.S., Jesuino,R.S., Pereira,M., de Almeida Soares,C.M. 2004. The glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase homologue is differentially regulated in phases of *Paracoccidioides brasiliensis*: molecular and phylogenetic analysis. Fungal Genet Biol. 41(7), 667-75.

- Barros,T.F., Puccia, R. 2001. Cloning and characterization of a *LON* gene homologue from the human pathogen *Paracoccidioides brasiliensis*. *Yeast*. 18(10), 981-8.
- Batista,W.L., Barros,T.F., Goldman,G.H., Morais,F.V., Puccia, R. 2007. Identification of transcription elements in the 5' intergenic region shared by *LON* and *MDJ1* heat shock genes from the human pathogen *Paracoccidioides brasiliensis*. Evaluation of gene expression. *Fungal Genet Biol*. 44, 347-356.
- Batista,W. L., Matsuo,A.L., Ganiko,L., Barros,T.F., Veiga,T.R., Freymuller, E., Puccia, R., 2006. The *PbMDJ1* gene belongs to a conserved *MDJ1/LON* locus in thermotolerant pathogenic fungi and encodes a heat shock protein that localizes to both the mitochondria and cell wall of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Eukaryot Cell* 5, 379-390.
- Benard,G. An overview of the immunopathology of human paracoccidioidomycosis. 2008. *Mycopathologia* 165(4-5), 209-221. Review.
- Benard,G., Romano,C.C., Cacere,C.R., Juvenale, M., Mendes-Giannini,M.J., Duarte, A.J. 2001. Imbalance of IL-2, IFN-gamma and IL-10 secretion in the immunosuppression associated with human paracoccidioidomycosis. *Cytokine* 13(4), 248-52.
- Benard,G., Mendes-Giannini,M.J.S., Juvenale,M., Miranda,E.T., Duarte,A.J. S., 1997. Immunosuppression in paracoccidioidomycosis: T cell hyporesponsiveness to two *Paracoccidioides brasiliensis* glycoproteins that elicit strong humoral immune response. *Journal of Infectious Diseases* 175, 1263-1267.
- Benard,G., Orii,N.M., Marques,H.H., Mendonca,M., Aquino,M.Z., Campeas,A.E., del Negro,G.B., Durandy,A., Duarte,A.J. 1994. Severe acute paracoccidioidomycosis in children. *Pediatr Infect Dis J*. 13(6), 510-5.
- Biagione,L., Souza,M.J., Chamma, L.G., Mendes,R.P., Marques,S.A., Mota,N.G, Franco,M. 1984. Serology of paracoccidioidomycosis. II. Correlation between class-specific antibodies and clinical forms of the disease. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 78(5), 617-21.
- Bonnet,F., Vigneron,M., Bensaude,O., Dubois,M.F. 1999. Transcription-independent phosphorylation of the RNA polymerase II C-terminal domain (CTD) involves ERK kinases (MEK1/2). *Nucleic Acids Res*. 27(22), 4399-404.
- Borges-Walmsley,M.I., Chen,D.L., Shu,X.H. e Walmsley,A.R. 2002. The pathobiology of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Trends in Microbiology* 10, 80-87.
- Bradford,M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem*. 72, 248-254.
- Braga,C.J., Rittner,G. M., Muñoz-Henao,J. E., Teixeira, A.F., Massis,L.M., Sbrogio-Almeida,M. E., Taborda,C.P., Travassos,L.R., Ferreira,L.C. 2009. *Paracoccidioides brasiliensis* vaccine formulations based on the gp43-derived P10 sequence and the *Salmonella enterica* FljC flagellin. *Infect Immun*. 77, 1700-1707.
- Brown,G.D., Gordon,S. 2003. Fungal beta-glucans and mammalian immunity. *Immunity*. 19(3), 311-5.
- Brummer,E., Castañeda,E., Restrepo, A., 1993. Paracoccidioidomycosis - An Update. *Clinical Microbiology Reviews* 6, 89-117.
- Brummer,E., Restrepo,A., Hanson,L.H., Stevens,D.A. 1990. Virulence of *Paracoccidioides brasiliensis*: the influence of *in vitro* passage and storage. *Mycopathologia* 109, 13-7.
- Brummer,E., Hanson,L.H., Restrepo,A., Stevens,D.A. 1989. Intracellular multiplication of *Paracoccidioides brasiliensis* in macrophages: killing and restriction of multiplication by activated macrophages. *Infect Immun*. 57(8), 2289-94.
- Brummer, E., Hanson,L.H., Stevens,D.A. 1988. Gamma-interferon activation of macrophages for killing of *Paracoccidioides brasiliensis* and evidence for nonoxidative mechanisms. *Int J Immunopharmacol*. 10(8), 945-52.

Burger,E., Vaz,C.C., Sano,A., Calich,V.L., Singer-Vermes,L.M., Xidieh,C.F., Kashino, S.S., Nishimura,K., Miyaji,M. 1996. *Paracoccidioides brasiliensis* infection in nude mice: studies with isolates differing in virulence and definition of their T cell-dependent and T cell-independent components. Am J Trop Med Hyg. 55(4), 391-8.

Calcagno,A.M., Nino-Vega,G., San-Blas,F., San-Blas,G. 1998. Geographic discrimination of *Paracoccidioides brasiliensis* strains by randomly amplified polymorphic DNA analysis. J. Clin. Microbiol. 36, 1733–1736.

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

Camargo,Z.P. 2008. Serology of paracoccidioidomycosis. Mycopathologia. 165(4-5), 289-302.

Camargo, Z. P., Gesztesi,J. L., Saraiva, E. C. O., Taborda, C. P., Vicentini, A. P., Lopes, J. D., 1994. Monoclonal-antibody capture enzyme-immunoassay for detection of *Paracoccidioides brasiliensis* antibodies in Paracoccidioidomycosis. Journal of Clinical Microbiology 32, 2377-2381.

Camargo, Z. P., Unterkircher, C., Travassos, L. R., 1989. Identification of antigenic polypeptides of *Paracoccidioides brasiliensis* by immunoblotting. J Med Vet Mycol 27, 407-412.

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

Cano, L. E., Singer-Vermes, L.M., Vaz,C.A.C., Russo,M., Calich,V.L.G., 1995. Pulmonary Paracoccidioidomycosis in resistant and susceptible mice - Relationship among progression of infection, bronchoalveolar cell activation, cellular immune-response, and specific isotype patterns. Infection and Immunity 63, 1777-1783.

Cano,L.E., Brummer,E., Stevens,D.A., Restrepo,A. 1992. Fate of conidia of *Paracoccidioides brasiliensis* after ingestion by resident macrophages or cytokine-treated macrophages. Infect Immun. 60(5), 2096-100.

Cano,M.I., Cisalpino,P.S., Galindo,I., Ramirez,J.L., Mortara,R.A., da Silveira,J.F. 1998. Electrophoretic karyotypes and genome sizing of the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. J Clin Microbiol. 36(3), 742-7.

Caras,I.W., Weddell,G.N., Williams,S.R. 1989. Analysis of the signal for attachment of a glycopospholipid membrane anchor. J Cell Biol. 108(4), 1387-1396.

Carneiro,C.R.W., POSTÓL,E., NOMIZO,R., REIS,L.F.L; BRENTANI,R.R. 2004. Identification of enolase as a laminin-binding protein on the surface of *Staphylococcus aureus*. Microbes and Infection. 6, 604-608.

Carneiro,L.C., de Faria,F.P., Felipe,M.S., Pereira,M., de Almeida Soares,C.M. 2005. *Paracoccidioides brasiliensis* presents two different cDNAs encoding homologues of the fructose 1,6-biphosphate aldolase: protein isolation, cloning of the cDNAs and genes, structural, phylogenetic, and expression analysis. Fungal Genet Biol. 42(1), 51-60.

Carrero,L.L., Niño-Veja,G., Teixeira,M.M., Carvalho, M. J. A., Soares, C.M., Pereira, M., Jesuino, R.S.A., McEwen, J.G., Mendoza, L., Taylor,J.W., Felipe,M.S., San-Blas,G., 2008. New *Paracoccidioides brasiliensis* isolate reveals unexpected genomic variability in this human pathogen. Fungal Genet Biol. 45, 605-612.

Carvalho,K.C., Ganiko,L., Batista, W.L., Morais,F.V., Marques,E.R., Goldman,G.H., Franco,M.F., Puccia,R. 2005. Virulence of *Paracoccidioides brasiliensis* and gp43 expression in isolates bearing known PbGP43 genotype. Microbes Infect. 7(1), 55-65.

Casadevall,A., Steenbergen,J.N., Nosanchuk,J.D. 2003. *Ready made* virulence and 'dual use' virulence factors in pathogenic environmental fungi - the *Cryptococcus neoformans* paradigm. Curr Opin Microbiol. 6(4), 332-7.

Castañeda,E., Brummer,E., Pappagianis,D., Stevens,D.A., 1988. Impairment of cellular but, not humoral response in chronic pulmonary and disseminated paracoccidioidomycosis in mice. *Infect. Immun.* 56, 1771-1777.

Chagas,R.F., Bailão,A.M., Pereira,M., Winters,M.S., Smullian,A.G., Deepe,G.S.Jr., de Almeida Soares,C.M. 2008. The catalases of *Paracoccidioides brasiliensis* are differentially regulated: protein activity and transcript analysis. *Fungal Genet Biol.* 45(11), 1470-8.

Chang,V.T., Crispin,M., Aricescu,A.R., Harvey,D.J., Nettleship,J.E., Fennelly,J.A., Yu, C., Boles,K.S., Evans,E.J., Stuart,D.I., Dwek,R.A., Jones,E.Y., Owens,R.J., Davis,S.J. 2007. Glycoprotein structural genomics: solving the glycosylation problem. *Structure* 5(3), 267-73.

Cisalpino,P.S., Puccia,R., Yamauchi,L.M., Cano,M. I.N., da Silveira,J. F., Travassos, L. R. 1996. Cloning, characterization, and epitope expression of the major diagnostic antigen of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Journal of Biological Chemistry* 271, 4553-4560.

Clemons,K.V., Feldman,D., Stevens,D.A. 1989. Influence of oestradiol on protein expression and methionine utilization during morphogenesis of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Gen Microbiol.* 135(6), 1607-17.

Coltri,C.C., Casabona-Fortunato,A.S., Gennari-Cardoso,M.L., Pinzan,C.F., Ruas,P.L., Mariano, V.S., Martinez, R., Rosa, J.C., Panunto-Castelo, Roque-Barreira, M.C. 2006. Paracoccin, a GLnNAc-binding lectin from *Paracoccidioides brasiliensis*, binds to taminin and induces TNF- α production by macrophages. *Microb. and Infect.* 8, 704-713.

Corredor,G.G., Peralta,L.A., Castano,J.H., Zuluaga,J.S., Henao,B., Arango,M., Tabares,A.M., Matute,D. R., McEwen,J.G., Restrepo,A. 2005. The naked-tailed armadillo *Cabassous centralis* (Miller 1899): a new host to *Paracoccidioides brasiliensis*. *Molecular identification of the isolate. Medical Mycology* 43, 275-280.

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

Cunha,D.A., Zancopé-Oliveira,R.M., Felipe,M.S.S., Salem-Izacc,S.M., Deepe Jr.,G.S., Soares, C.M.A. Heterologous expression, purification, and immunological reactivity of a recombinant HSP60 from *Paracoccidioides brasiliensis*. 2002. *Clin Diagn Lab Immunol.* 9(2), 374–377.

Daher,B.S., Venancio,E.J., de Freitas,S.M., Bão,S.N., Vianney,P.V., Andrade,R.V., Dantas,A.S., Soares,C.M., Silva-Pereira,I., Felipe,M.S., 2005. The highly expressed yeast gene PbY20 from *Paracoccidioides brasiliensis* encodes a flavodoxin-like protein. *Fungal Genet Biol.* 42, 434-443.

De Albornoz,M.B. 1971. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from rural soil in Venezuela. *Sabouraudia.* 9(3), 248-53.

Derengowski,L.S., Tavares,A.H., Silva,S., Procópio,L.S., Felipe,M.S., Silva-Pereira,I. 2008. Upregulation of glyoxylate cycle genes upon *Paracoccidioides brasiliensis* internalization by murine macrophages and in vitro nutritional stress condition. *Med Mycol.* 46(2), 125-34.

Devi,L. 1991. Consensus sequence for processing of peptide precursors at monobasic sites.FEBS Lett. 1991 Mar 25;280(2):189-94. Review.

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

Diez,S., Gomez,B.L., Restrepo,A., Hay,R.J., Hamilton,A.J. 2002. *Paracoccidioides brasiliensis* 87-kilodalton antigen, a heat shock protein useful in diagnosis: characterization, purification, and detection in biopsy material via immunohistochemistry. *J Clin Microbiol.* 40(2), 359-65.

Dobson,M.J., Tuite,M.F., Roberts,N.A., Kingsman,A.J., Kingsman,S.M., Perkins,R.E., Conroy,S.C., Fothergill,L.A. 1982. Conservation of high efficiency promoter sequences in *Saccharomyces cerevisiae*. Nucleic Acids Res. 10(8), 2625-37.

Donofrio,F.C., Calil,A.C., Miranda,E.T., Almeida,A.M., Benard,G., Soares,C.P., Veloso, S.N., Soares,C.M., Mendes Giannini,M.J. 2009. Enolase from *Paracoccidioides brasiliensis*: isolation and identification as a fibronectin-binding protein. J Med Microbiol. 58(Pt 6), 706-13.

Emanuelsson,O., Nielsen,H., Brunak,S. & von Heijne,G. 2000. Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. Journal of Molecular Biology 300, 1005-1016.

Farias,M.R., Werner,J., Muro,M.D., Marques,S.A., Marques,M.E.A., Franco,M.F., Ribeiro,M.G., Custodio,C.C., Condas,L.A.Z., Bosco,S.M.G., Bagagli,E. 2005. Canine Paracoccidioidomycosis: case report of generalized lymphadenitis. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo. 47 (Supl. 14), 64.

Feitosa,L.S., Soares,C.M.A., dos Santos,M.R.M., Bailão, A.M., Xander,P., Mortara, R.A., Lopes,J. D. 2007. Cloning, characterization and expression of a calnexin homologue from pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. Yeast 24, 79-87.

Feitosa,L.S., Cisalpino,P.S., dos Santos,M.R., Mortara,R.A., Barros,T.F., Morais,F.V., Puccia,R., da Silveira,J.F., de Camargo ZP. Chromosomal polymorphism, syntenic relationships, and ploidy in the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. 2003. Fungal Genet Biol. 39(1), 60-9.

Felipe, M. S., Andrade, R. V., Arraes, F. B., Nicola, A. M., Maranhao, A. Q., Torres, F. A., Silva-Pereira, I., Pocas-Fonseca, M. J., Campos, E. G., Moraes, L. M., Andrade, P. A., Tavares, A. H., Silva, S. S., Kyaw, C. M., Souza, D. P., Network, P., Pereira, M., Jesuino, R. S., Andrade, E. V., Parente, J. A., Oliveira, G. S., Barbosa, M. S., Martins, N. F., Fachin, A. L., Cardoso, R. S., Passos, G. A., Almeida, N. F., Walter, M. E., Soares, C. M., Carvalho, M. J., Brígido, M. M., 2005. Transcriptional profiles of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* in mycelium and yeast cells. J Biol. Chem. 280, 24706-24714.

Felipe,M.S., Andrade,R.V., Petrofeza,S.S., Maranhão,A.Q., Torres,F.A., Albuquerque P., Arraes,F.B., Arruda,M., Azevedo,M.O., Baptista,A.J., Bataus,L.A., Borges,C.L., Campos E.G., Cruz,M.R., Daher,B.S., Dantas,A., Ferreira,M.A., Ghil,G.V., Jesuino,R.S., Kyaw,C.M., Leitão,L., Martins,C.R., Moraes,L.M., Neves,E.O., Nicola,A.M., Alves,E.S., Parente,J.A., Pereira,M., Poças-Fonseca,M.J., Resende,R., Ribeiro,B.M., Saldanha,R.R., Santos,S.C., Silva-Pereira,I., Silva,M.A., Silveira,E., Simões,I.C., Soares,R.B., Souza,D.P., De-Souza,M.T., Andrade,E.V., Xavier,M.A., Veiga,H.P., Venancio,E.J., Carvalho,M.J., Oliveira A.G., Inoue,M.K., Almeida,N.F., Walter,M.E., Soares,C.M., Brígido,M.M. 2003. Transcriptome characterization of the dimorphic and pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* by EST analysis. Yeast. 20(3), 263-71.

Ferreira,K.S., Lopes,J.D., Almeida,S.R. 2004. Down-regulation of dendritic cell activation induced by *Paracoccidioides brasiliensis*. Immunol Lett. 94(1-2), 107-14.

Ferreira,M.E., Marques,E. dos R., Malavazi,I., Torres,I., Restrepo,A., Nunes,L.R., de Oliveira,R.C., Goldman,M.H., Goldman,G.H. 2006. Transcriptome analysis and molecular studies on sulfur metabolism in the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. Mol Genet Genomics. 276(5), 450-63.

Ferreira,M.S., Freitas,L.H., Lacaz, C. da S., del Negro,G.M., de Melo,N.T., Garcia,N. M., de Assis,C.M., Salebian,A., Heins-Vaccari, E.M. 1990. Isolation and characterization of a *Paracoccidioides brasiliensis* strain from a dogfood probably contaminated with soil in Uberlândia, Brazil. J Med Vet Mycol. 28(3), 253-256.

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

- Fitzpatrick,T.B., Amrhein,N., Marcheroux,P., 2003. Characterization of YqjM, an old yellow enzymw homolog from *Bacillus subtilis* involved in the oxidative stress response. The Journal of Biol. Chem. 278, 19891-19897.
- Fonseca,C.A., Jesuino,R.S., Felipe,M.S., Cunha,D.A., Brito,W.A., Soares, C.M. 2001. Two-dimensional electrophoresis and characterization of antigens from *Paracoccidioides brasiliensis*. Microbes Infect. 3, 535-542.
- Franco,M., Peracoli,M.T., Soares,A., Montenegro,R., Mendes,R.P., Meira,D.A. 1993. Host-parasite relationship in paracoccidioidomycosis. Curr Top Med Mycol. 5, 115-149. Review.
- Franco,M. Host-parasite relationships in paracoccidioidomycosis. 1987. J Med Vet Mycol. 25(1), 5-18.
- Franco,M., Montenegro,M.R., Mendes,R.P., Marques,S.A., Dillon,N.L., Mota, N.G.S., 1987. Paracoccidioidomycosis: a recent proposed classification of its clinical forms. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 20, 129.
- Ganiko,L., Puccia,R, Mariano,V.S., Sant'Anna,O.A., Freymüller,E., Roque-Barreira,M.C. and Travassos,L.R. 2007. Paracoccin, an N-acetyl-glucosamine-binding lectin of *Paracoccidioides brasiliensis*, is involved in fungal growth. Microbes Infect. 9, 695-703.
- Garcia,N.M., Del Negro, G.M., Heins-Vaccari, E.M., de Melo,N.T., de Assis,C.M., Lacaz,C. 1993. Paracoccidioides brasiliensis, a new sample isolated from feces of a penguin (*Pygoscelis adeliae*) Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 35(3), 227-35.
- Gesule, E. 1989. Aislamento de *Paracoccidioides sp.* de heces de pinguino de la Antártida. In: Proceedings of the 4th International Meeting on Paracoccidioidomycosis; 1989; Caracas, Venezuela. Abstract.
- Gesztesi, J.L., Puccia, R. Travassos, L.R., Vicentini,A.P., de Moraes, J.Z., Franco, M.F., Lopes, J.D. 1996. Monoclonal antibodies against the 43,000 Da glycoprotein from Paracoccidioides brasiliensis modulate laminin-mediated fungal adhesion to epithelial cells and pathogenesis. Hybridoma. 15(6), 415-422.
- Goldani,L.Z., Sugar,A.M. 1998. Short report: use of the polymerase chain reaction to detect *Paracoccidioides brasiliensis* in murine paracoccidioidomycosis. Am J Trop Med Hyg. 58(2), 152-3.
- Goldman, G. H., Marques, E. D., Ribeiro, D. C. D., Bernardes, L. A. D., Quiapin, A. C., Vitorelli, P. M., Savoldi, M., Semighini, C. P., de Oliveira, R. C., Nunes, L. R., Travassos ,L. R., Puccia, R., Batista, W. L., Ferreira, L. E., Moreira, J. C., Bogossian, A. P., Tekai, F., Nobrega, M. P., Nobrega, F. G., Goldman, M. H. S., 2003. Expressed sequence tag analysis of the human pathogen *Paracoccidioides brasiliensis* yeast phase: Identification of putative homologues of Candida albicans virulence and pathogenicity genes. Eukaryotic Cell 2, 34-48.
- Gomes,G.M., Cisalpino,P.S., Taborda,C.P., de Camargo,Z.P. 2000. PCR for diagnosis of paracoccidioidomycosis. J Clin Microbiol. 38(9), 3478-80.
- Gomez,B.L., Figueroa,J.I., Hamilton,A.J., Ortiz,B., Robledo,M.A., Hay,R.J., Restrepo A. 1997. Use of monoclonal antibodies in diagnosis of paracoccidioidomycosis: new strategies for detection of circulating antigens. J Clin Microbiol. 35(12), 3278-83.
- Grose,E., Tamsitt,J.R. 1965. Paracoccidioides brasiliensis recovered from the intestinal tract of three bats (*Artibeus lituratus*) in Colombia, S.A. Sabouraudia. 4(2), 124-5.
- Grosso, D. de M., de Almeida, S.R., Mariano,M., Lopes,J.D., 2003. Characterization of gp70 and anti-gp70 monoclonal antibodies in *Paracoccidioides brasiliensis* pathogenesis. Infect. Immun. 71, 6534-6542.
- Haarer,B.K., Amberg,D.C., 2004. Old Yellow enzyme protects the actin cytoskeleton from oxidative stress. Mol. Biol. of the Cell, 15, 4522-4531.

- Hanhan,D. 1985. Techniques for transformation of *E. Coli* in: DNA cloning: A practical approach (D,M, Glover, eds.). Vol I. 1985. p109-175.
- Hanna,S.A., Monteiro da Silva,J.L., Giannini,M.J. 2000. Adherence and intracellular parasitism of *Paracoccidioides brasiliensis* in Vero cells. *Microbes Infect.* 2(8), 877-84.
- Hebeler-Barbosa,F., Montenegro,M.R., Bagagli,E. 2003. Virulence profiles of ten *Paracoccidioides brasiliensis* isolates obtained from armadillos (*Dasypus novemcinctus*).*Med Mycol.* 41(2), 89-96.
- Herr,R.A., Tarcha,E.J., Taborda,P.R., Taylor,J.W., Ajello,L., Mendoza,L. 2004. Phylogenetic analysis of *Lacazia loboi* places this previously uncharacterized pathogen within the dimorphic *Onygenales*. *J Clin Microbiol.* 39, 309-14.
- Ikezawa, H. Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored proteins. 2002. *Biol Pharm Bull.* 25(4), 409-417. Review.
- Izacc,S.M., Gomez,F.J., Jesuino,R.S., Fonseca,C.A., Felipe,M.S., Deepe,G.S., Soares, C.M. 2001. Molecular cloning, characterization and expression of the heat shock protein 60 gene from the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Med Mycol.* 39(5), 445-55.
- Jesuino,R.S., Azevedo,M.O., Felipe,M.S., Pereira,M., De Almeida Soares,C.M. 2002. Characterization of a chaperone *ClpB* homologue of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Yeast.* 19(11), 963-72.
- Johnson,W.D., Lang,C.M. 1977. Paracoccidioidomycosis (South American blastomycosis) in a squirrel monkey (*Saimiri sciureus*). *Vet Pathol.* 14(4), 368-71.
- Kashino,S.S., Calich,V.L., Burger,E., Singer-Vermes,L.M. 1985. *In vivo* and *in vitro* characteristics of six *Paracoccidioides brasiliensis* strains. *Mycopathologia.* 92(3), 173-8.
- Kindler,V., Sappino,A.P., Grau,G.E., Piguet,P.F., Vassalli,P. 1989. The inducing role of tumor necrosis factor in the development of bactericidal granulomas during BCG infection. *Cell.* 56, 731-740.
- Konno,A.Y., Maricato,J.T., Konno,F.T., Mariano,M., Lopes,J.D. 2009. Peptides from *Paracoccidioides brasiliensis* gp43 inhibit macrophage functions and inflammatory response. *Microbes Infect.* 11(1), 92-9.
- Kurita,N., Oarada,M., Miyaji,M., Ito,E. 2000. Effect of cytokines on antifungal activity of human polymorphonuclear leucocytes against yeast cells of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Med Mycol.* 38(2), 177-82.
- Kurita,N., Biswas,S.K., Oarada,M., Sano,A., Nishimura,K., Miyaji,M. 1999. Fungistatic and fungicidal activities of murine polymorphonuclear leucocytes against yeast cells of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Med Mycol.* 37(1):19-24.
- Lacaz,C.S. 1994a. Historical Evolution of the knowledge on paracoccidioidomycosis ant its etiologic agent, *Paracoccidioides brasiliensis*. In: Franco M, Lacaz CS, Restrepo-Moreno A, Del Negro G, eds. Paracoccydioidomycosis. London: Boca Raton, 1-11.
- Lacaz,C.S. 1994b. *Paracoccidioides brasiliensis*: morphology; evolutionary; maintenance during saphophytic life; biology, virulence, taxonomy. In: Franco M, Lacaz CS, Restrepo-Moreno A, Del Negro G, eds. Paracoccydioidomycosis. London: Boca Raton, 13-25.
- Laemmli,U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Leclerc,M.C., Philippe,H., Guého,E. 1994. Phylogeny of dermatophytes and dimorphic fungi based on large subunit ribosomal RNA sequence comparisons. *J Med Vet Mycol.* 32, 331-341.
- Levitz, S.M. 1992. Overview of host defenses in fungal infections. *Clin Infect Dis*, 14 Suppl 1, S37-42.

Loose,D.S., Stover,E.P., Restrepo,A., Stevens,D.A., Feldman,D. 1983. Estradiol binds to a receptor-like cytosol protein and initiates a biological response in *Paracoccidioides brasiliensis*. Proc Natl Acad Sci USA. 80, 7659–7663.

Mamoni,R.L., Blotta,M.H. 2006. Flow-cytometric analysis of cytokine production in human paracoccidioidomycosis. Cytokine 35(3-4), 207-16.

Mamoni,R.L., Blotta, M.H. 2005. Kinetics of cytokines and chemokines gene expression distinguishes *Paracoccidioides brasiliensis* infection from disease. Cytokine 32(1), 20-9.

Marques da Silva,S.H., Colombo,A.L., Blotta,M.H., Lopes,J.D., Queiroz-Telles,F., Pires de Camargo Z. 2003. Detection of circulating gp43 antigen in serum, cerebrospinal fluid, and bronchoalveolar lavage fluid of patients with paracoccidioidomycosis. J Clin Microbiol. 41(8), 3675-80.

Marques,A.F., da Silva,M.B., Juliano,M. A., Munhöz, J. E., Travassos, L. R., Taborda, C.P., 2008. Additive effect of P10 immunization and chemotherapy in anergic mice challenged intratracheally with virulent yeasts of *Paracoccidioides brasiliensis*. Microbes Infect. 10, 1251-1258.

Marques,E.R., Ferreira,M.E.S., Drummond,R.D., Felix,J.M., Menossi,M., Savoldi,M., Travassos,L.R., Puccia,R., Batista,W.L., Carvalho,K.C., Goldman,M.H.S., Goldman,G.H. 2004. Identification of genes preferentially expressed in the pathogenic yeast phase of *Paracoccidioides brasiliensis*, using suppression subtraction hybridization and differential macroarray analysis. Mol Gen Genome 271, 667–77.

Massey,V. 2000. The chemical and biological versatility of riboflavin. Biochem Soc. Trans. 28, 283-296.

Mattos-Grosso, D. de. 2003. Importância Biológica da gp70 na Paracoccidioidomicose experimental. Doutorado. Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP.

Matute,D.R., McEwen,J.G., Puccia,R., Montes,B.A., San-Blas,G., Bagagli,E., Rauscher,J.T., Restrepo,A., Morais,F., Niño-Vega,G., Taylor,J.W., 2006. Cryptic speciation and recombination in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* as revealed by gene genealogies. Mol Biol. Evol. 23, 65-73.

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

McEwen,J.G., Bedoya,V., Patino,M.M., Salazar,M.E., Restrepo,A. 1987. Experimental murine Paracoccidioidomycosis induced by the inhalation of conidia. J. Med. Vet. Mycol. 25, 165-175.

Medoff,G., Painter,A., Kobayashi,G.S. 1987. Mycelial- to yeast-phase transitions of the dimorphic fungi *Blastomyces dermatitidis* and *Paracoccidioides brasiliensis*. J Bacteriol. 169(9), 4055-60.

Mendes-Giannini,M.J., Andreotti,P.F., Vincenzi,L.R., da Silva,J.L., Lenzi,H.L., Benard, G., Zancopé-Oliveira,R., de Matos Guedes,H.L., Soares,C.P. 2006. Binding of extracellular matrix proteins to *Paracoccidioides brasiliensis*. Microbes Infect. 8(6), 1550-9.

Mendes-Giannini,M.J., Hanna,S.A., da Silva,J.L., Andreotti,P.F., Vincenzi,L.R., Benard,G., Lenzi,H.L., Soares,C.P. 2004. Invasion of epithelial mammalian cells by *Paracoccidioides brasiliensis* leads to cytoskeletal rearrangement and apoptosis of the host cell. Microbes Infect. 6(10), 882-91.

Mendes-Giannini,M.J., Taylor,M.L., Bouchara,J.B., Burger,E., Calich,V.L., Escalante, E.D., Hanna,S.A., Lenzi,H.L., Machado,M.P., Miyaji,M., Monteiro Da Silva,J.L., Mota, E.M., Restrepo,A., Restrepo,S., Tronchin,G., Vincenzi,L.R., Xidieh,C.F. e Zenteno,E. 2000. Pathogenesis II: fungal responses to host responses: interaction of host cells with fungi. Med Mycol, 38 Suppl 1, 113-23.

Mendes-Giannini,M.J., Bueno,J.P., Shikanai-Yasuda,M.A., Ferreira,A.W., Masuda A. 1989. Detection of the 43,000-molecular-weight glycoprotein in sera of patients with paracoccidioidomycosis. J Clin Microbiol. 27(12), 2842-5.

Mendes-Giannini,M.J., Camargo,M.E., Lacaz,C.S. e Ferreira,A.W. 1984. Immunoenzymatic absorption test for serodiagnosis of paracoccidioidomycosis. J Clin Microbiol, 20, 103-8.

- Molinari-Madlum, E.E., Felipe, M.S., Soares, C.M. 1999. Virulence of *Paracoccidioides brasiliensis* isolates can be correlated to groups defined by random amplified polymorphic DNA analysis. *Med Mycol.* 37(4), 269-276.
- Montenegro, M.R. e Franco, M. 1994. Pathology. 131-150. In M. Franco, C. S. Lacaz, A. Restrepo, and G. del Negro (ed.), *Paracoccidioidomycosis*. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Montoya, A.E., Alvarez, A.L., Moreno, M.N., Restrepo, A., McEwen, J.G. 1999. Electrophoretic karyotype of environmental isolates of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Med Mycol.* 37(3), 219-22.
- Montoya, A.E., Moreno, M.N., Restrepo, A., McEwen, J.G. 1997. Electrophoretic karyotype of clinical isolates of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Fungal Genet Biol.* 21(2), 223-7.
- Moraes Borba, C., Schäffer, G.M. 2002. *Paracoccidioides brasiliensis*: virulence and an attempt to induce the dimorphic process with fetal calf serum. *Mycoses.* 45(5-6), 174-9.
- Morais, F.V., Barros, T.F., Fukada, M.K., Cisalpino, P.S., Puccia, R., 2000. Polymorphism in the gene coding for the immunodominant antigen gp43 from the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *J. Clin. Microbiol.* 38, 3960-3966.
- Moreira, S.F., Bailao, A.M., Barbosa, M.S., Jesuino, R.S., Felipe, M.S., Pereira, M., de Almeida Soares, C.M. 2004. Monofunctional catalase P of *Paracoccidioides brasiliensis*: identification, characterization, molecular cloning and expression analysis. *Yeast.* 21(2), 173-82.
- Musatti, C.C., Peraçoli, M.T.S., Soares, A.M.V., C., Rezkallah-Iwasso, M.T., 1994. Cell-mediated immunity in patients with paracoccidioidomycosis, in M. Franco, C. S. Lacaz, A. Restrepo, and G. Del Negro, *Paracoccidioidomycosis*, Boca Raton, London, 175-186.
- Musatti, C.C., Rezkallah, M.T., Mendes, E., Mendes, N.F. 1976. In vivo and in vitro evaluation of cell-mediated immunity in patients with paracoccidioidomycosis. *Cell Immunol.* 24(2):365-78.
- Negroni, R., Negroni, P. 1966. Serological study of cases of histoplasmosis observed in Buenos Aires. *Prensa Med Argent.* 53(28), 1521-1525.
- Nicola, A.M., Andrade, R.V., Dantas, A.S., Andrade, P.A., Arraes, F.B., Fernandes, L., Silva-Pereira, I., Felipe, M.S. 2008. The stress responsive and morphologically regulated hsp90 gene from *Paracoccidioides brasiliensis* is essential to cell viability. *BMC Microbiol.* 8, 158.
- Nielsen, H., Engelbrecht, J., Brunak, S. e von Heijne, G. 1997. Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Eng* 10, 1-6.
- Nombela, C., Gil, C., Chaffin, W.L. Non-conventional protein secretion in yeast. 2006. *Trends Microbiol.* 14(1), 15-21.
- Nunes, L.R., Costa de Oliveira, R., Leite, D.B., da Silva, V.S., dos Reis Marques, E., da Silva Ferreira, M.E., Ribeiro, D.C., de Souza Bernardes, L.A., Goldman, M.H., Puccia, R., Travassos, L.R., Batista, W.L., Nóbrega, M.P., Nobrega, F.G., Yang, D.Y., de Bragança Pereira C.A., Goldman, G.H. 2005. Transcriptome analysis of *Paracoccidioides brasiliensis* cells undergoing mycelium-to-yeast transition. *Eukaryot Cell.* 4(12), 2115-28.
- Oliveira, S.J., Mamoni, R.L., Musatti, C.C., Papaiordanou, P.M., Blotta, M.H. 2002. Cytokines and lymphocyte proliferation in juvenile and adult forms of paracoccidioidomycosis: comparison with infected and non-infected controls. *Microbes Infect.* 4(2), 139-44.
- Ono, M.A., Bracarense, A.P., Morais, H.S., Trapp, S.M., Belitardo, D.R., Camargo, Z.P. 2001. Canine paracoccidioidomycosis: a seroepidemiologic study. *Med Mycol.* 39(3), 277-82.
- Parente, J.A., Borges, C.L., Bailão, A.M., Felipe, M.S., Pereira, M., de Almeida Soares, C.M. 2008. Comparison of transcription of multiple genes during mycelia transition to yeast cells of *Paracoccidioides brasiliensis* reveals insights to fungal differentiation and pathogenesis. *Mycopathologia.* 165(4-5), 259-73.
- Pereira, L.A., Pereira, M., Felipe, M.S., Zancoppe-Oliveira, R.M., Soares, C.M. 2004. Proteomic identification, nucleotide sequence, heterologous expression and immunological reactivity of the triosephosphate isomerase of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Microbes Infect.* 6(10), 892-900.

Peterson,S.W., Sigler,L., 1998. Molecular genetic variation in *Emmonsia crescens* and *Emmonsia parva*, etiologic agents of adiaspiromycosis, and their phylogenetic relationship to *Blastomyces dermatitidis* (*Ajellomyces dermatitidis*) and other systemic fungal pathogens. Journal of Clinical Microbiology 36, 2918-2925.

Pinto, A. R., Puccia, R., Diniz, S. N., Franco, M. F., Travassos, L. R., 2000. DNA-based vaccination against murine paracoccidioidomycosis using the gp43 gene from *Paracoccidioides brasiliensis*. Vaccine 18, 3050-3058.

Popi,A. F., Lopes,J. D., Mariano,M., 2002. Gp43 from *Paracoccidioides brasiliensis* inhibits macrophage functions. An evasion mechanism of the fungus. Cell Immunol. 218, 87-94.

Prado,M., da Silva,M.B., Laurenti,R., Travassos,L. R., Tadorda,C.P., 2009. Mortality due to systemic mycoses as a primary cause of death or in association with AIDS in Brazil: a review from 1996 to 2006. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 104, 513-521.

Proudfoot,N.J., Brownlee,G.G. 1976 3'noncoding sequences in eukaryotic mRNA. Nature 263, 211-214.

Puccia,R., McEwen,J.G., Cisalpino,P.S., 2008. Diversity in *Paracoccidioides brasiliensis*. The PbGP43 gene as a genetic marker. Mycopathologia 165, 275-287.

Puccia,R., Travassos,L.R. 1991a. 43-kilodalton glycoprotein from *Paracoccidioides brasiliensis*: immunochemical reactions with sera from patients with paracoccidioidomycosis, histoplasmosis, or Jorge Lobo's disease. J Clin Microbiol. 29(8), 1610-5.

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

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

Rehemtulla,A., Kaufman,R.J. 1992. Protein processing within the secretory pathway. Curr Opin Biotechnol. Oct;3(5):560-5. Review.

Restrepo,A., Benard,G., de Castro,C.C., Agudelo,C.A., Tobón,A. M. 2008. Pulmonary paracoccidioidomycosis. Semin Respir Crit Care Med. 29(2), 182-97.

Restrepo,A., McEwen,J.G., Castañeda,E. 2001. The habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*: how far from solving the riddle? Med Mycol. 39(3), 233-41.

Restrepo,A. 1994. Ecology of *P. brasiliensis*. In: Franco M, Da Silva-Lacaz C, Restrepo-M. A, Del Negro G, editors. Paracoccidioidomycosis. Boca Raton, Fla: CRC Press, 121–128.

Restrepo,A., Jiménez,B.E. 1980. Growth of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast phase in a chemically defined culture medium. J Clin Microbiol. 12(2), 279-81.

Restrepo,A. 1966. La prueba de inmunodifusion en el diagnosticode la paracoccidioidomicose. Sabouraudia. 4, 223.

Ricci,G., Mota,F.T., Wakamatsu,A., Serafim,R.C., Borra,R.C., Franco,M. 2004. Canine paracoccidioidomycosis. Med Mycol. 42(4), 379-83.

Richini-Pereira, V.B., Bosco, S. de M., Griesse, J., Theodoro, R. C., Macoris, S. A., da Silva, R. J., Barrozo, L., Tavares, P. M., Zancopé-Oliveira, R. M., Bagagli E. 2008. Molecular detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in road-killed wild animals. Med Mycol. 46(1), 35-40.

Rodrigues,E.G., Travassos,R. 1994. Nature of the reactive epitopes in *Paracoccidioides brasiliensis* polysaccharide antigen. Journal of Medical and Veterinary Mycology 32, 77-81.

- Rooney,P.J., Klein,B.S. 2002. Linking fungal morphogenesis with virulence. *Cell Microbiol.* 4(3), 127-37. Review.
- Ruis,H. and Schüller,C. 1995. Stress signaling in yeast. *Bioessays* 17, 959-965.
- Salazar,M.E., Restrepo,A., Stevens,D.A. 1988. Inhibition by estrogens of conidium-to-yeast conversion in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Infect Immun.* 56(3), 711-3.
- Salina,M.A., Shikanai-Yasuda,M.A., Mendes,R.P., Barraviera,B., Giannini,M.J.S.M. 1998. Detection of circulating *Paracoccidioides brasiliensis* antigen in urine of paracoccidioidomycosis patients before and during treatment. *Journal of Clinical Microbiology* 36, 1723-1728.
- Sambrook,J., Fritsch,E.F., Maniatis,T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor laboratory Press, New York.
- San-Blas, G., 1993. Paracoccidioidomycosis and its etiologic agent *Paracoccidioides brasiliensis*. *J.Med.Vet.Mycol.* 31, 99-113.
- San-Blas,G. e Niño-Vega,G. 2001. *Paracoccidioides brasiliensis*: virulence and host response. In: R.L. Cihlar and R.A. Calderone (eds.), *Fungal pathogenesis: principles and clinical applications*, Marcel Dekke. Inc. New York.
- San-Blas,G., Niño-Vega,G., Barreto,L., Hebel-Barbosa,F., Bagagli,E., Olivero de Briceño,R., Mendes,R.P. 2005. Primers for clinical detection of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Clin Microbiol.* 43(8), 4255-7.
- San-Blas,G., Niño-Vega,G. and Iturriaga,T. 2002. *Paracoccidioides brasiliensis* and paracoccidioidomycosis: molecular approaches to morphogenesis, diagnosis, epidemiology, taxonomy and genetics. *Med Mycol.* 40, 225-42.
- San-Blas,G. 1982. The cell wall of fungal human pathogens: its possible role in host-parasite relationships. *Mycopathologia.* 79(3), 159-84
- Sandhu,G.S., Aleff,R.A., Kline,B.C., da Silva Lacaz,C. 1997. Molecular detection and identification of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Clin Microbiol.* 35(7), 1894-6.
- Sano,A., Defaveri,J., Tanaka,R., Yokoyama,K., Kurita,N., Franco,M., Coelho,K.I., Bagagli,E., Montenegro,M.R., Miyaji,M. e Nishimura, K. 1998. Pathogenicities and GP43kDa gene of three *Paracoccidioides brasiliensis* isolates originated from a nine-banded armadillo (*Dasypus novemcinctus*). *Mycopathologia.* 144, 61-5.
- Semighini,C.P., de Camargo,Z.P., Puccia,R., Goldman,M.H., Goldman,G.H., 2002. Molecular identification of *Paracoccidioides brasiliensis* by 5' nuclease assay. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 44, 383-386.
- Sheffield,P., Garrard,S. e Derewenda,Z. 1999. Overcoming expression and purification problems of RhoGDI using a family of "parallel" expression vectors. *Protein Expr. Purif.* 15, 34-39.
- Shikanai-Yasuda,M.A., Telles Filho, F.Q., Mendes, R.P., Colombo, A.L., Moretti, M.L. 2006. Consenso em paracoccidioidomicose (Guidelines in paracoccidioidomycosis) *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 39(3), 297-310.
- Silva,S.H.M. da, Colombo,A.L., Blotta,M.H.S.L., Telles, F.Q., Lopes, J.D., Camargo, Z.P. de. 2005. Diagnosis of neuroparacoccidioidomycosis by detection of circulating antigen and antibody in cerebrospinal fluid. *J. Clin. Microb.* 43(9), 4680–4683
- Silva, S.H.M., Grosso,D.deM., Lopes,J.D., Colombo,A.L., Blotta,M.H., Queiroz-Telles, F., de Camargo, Z. P., 2004. Detection of *Paracoccidioides brasiliensis* gp70 circulating antigen and follow-up of patients undergoing antimycotic therapy. *J Clin Microbiol.* 42, 4480-4486.
- Silva,S.P., Borges-Walmsley,M.I., Pereira,I.S., Soares,C.M., Walmsley,A.R., Felipe MS. 1999. Differential expression of an hsp70 gene during transition from the mycelial to the infective yeast form of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Mol Microbiol.* 31(4), 1039-50.
- Silva-Vergara,M.L., Martinez,R., Chadu,A., Madeira,M., Freitas-Silva,G., Leite Maffei, C.M. 1998. Isolation of a *Paracoccidioides brasiliensis* strain from the soil of a coffee plantation in Ibia, State of Minas Gerais, Brazil. *Med Mycol.* 36(1), 37-42.

Silveira,L.H., Domingos,I.H., Kouchi,K., Itano,E.N., Silva,E.A., Landgraf,V.O., Werneck,S.M., Camargo,Z.P., Ono,M.A. 2006. Serological detection of antibodies against *Paracoccidioides brasiliensis* in dogs with leishmaniasis. *Mycopathologia*162(5), 325-9.

Singer-Vermes,L.M., Burger,E., Franco,M.F., Di-Bacchi,M.M., Mendes-Giannini,M.J., Calich VL. 1989. Evaluation of the pathogenicity and immunogenicity of seven *Paracoccidioides brasiliensis* isolates in susceptible inbred mice. *J Med Vet Mycol.* 27(2), 71-82.

Soares,R. de B.A., Gomez,F.J., Soares,C.M.A., Deepe Jr,G.S. 2008. Vaccination with Heat Shock Protein 60 induces a Protective immune response against experimental *Paracoccidioides brasiliensis* pulmonary infection. *Infect Immun.* 76(9), 4214–4221.

Steenbergen,J.N., Nosanchuk,J.D., Malliaris,S.D., Casadevall A. 2004. *Interaction of Blastomyces dermatitidis, Sporothrix schenckii, and Histoplasma capsulatum with Acanthamoeba castellanii.* *Infect Immun* 72(6), 3478-88.

Steenbergen,J.N., Casadevall,A. 2003. The origin and maintenance of virulence for the human pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Microbes Infect.* 5(7), 667-75. Review.

Studier,F.W., Moffat,B.A. 1986. Use of T7 RNA polymerase to direct expression high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* 189, 113-30.

Suske,W.A., van Berkel,W.J., Kohler,H.P. 1999. Catalytic mechanism of 2-hydroxybiphenyl 3-monooxygenase, a flavoprotein from *Pseudomonas azelaica* HBP1. *J. Biol. Chem.* 274(47), 33355-65.

Svidzinski,T. I., Miranda Neto,M.H., Santana,R.G., Fischman,O., Colombo, A.L. 1999. *Paracoccidioides brasiliensis* isolates obtained from patients with acute and chronic disease exhibit morphological differences after animal passage. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 41(5), 279-83.

Taborda,C.P., Nakaie,C.R., Cilli,E.M., Rodrigues,E.G., Silva,L.S., Franco,M.F., Travassos,L.R. 2004. Synthesis and immunological activity of a branched peptide carrying the T-cell epitope of gp43, the major exocellular antigen of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Scand J Immunol.* 59, 58-65.

Taborda,C.P., Juliano,M.A., Puccia,R., Franco,M., Travassos,L.R. 1998. Mapping of the T-cell epitope in the major 43-kilodalton glycoprotein of *Paracoccidioides brasiliensis* which induces a Th-1 response protective against fungal infection in BALB/c mice. *Infection and Immunity* 66, 786-793.

Takayama,A., Itano,E.N., Sano,A., Ono,M.A., Kamei,K. 2009. An atypical *Paracoccidioides brasiliensis* clinical isolate based on multiple gene analysis. *Med Mycol.* 19, 1-9.

Tavares,A.H., Silva,S.S., Dantas,A., Campos,E.G., Andrade,R.V., Maranhão,A.Q., Brígido,M.M., Passos-Silva,D.G., Fachin,A.L., Teixeira,S.M., Passos,G.A., Soares,C.M., Bocca,A.L., Carvalho,M.J., Silva-Pereira,I., Felipe,M.S. 2007. Early transcriptional response of *Paracoccidioides brasiliensis* upon internalization by murine macrophages. *Microbes Infect.* 9, 583-590

Teixeira,M.M., Theodoro,R.C., de Carvalho,M.J., Fernandes,L., Paes,H.C., Hahn,R. C., Mendoza, L., Bagagli, E., San-Blas, G., Felipe,M.S. 2009. Phylogenetic analysis reveals a high level of speciation in the *Paracoccidioides* genus. *Mol Phylogenet Evol.* 52, 273-283.

Terçarioli,G. R., Bagagli,E., Reis,G.M., Theodoro,R.C., Bosco,S.de M., Macoris,S.A., Richini-Pereira, V. B. 2007. Ecological study of *Paracoccidioides brasiliensis* in soil: growth ability, conidia production and molecular detection. *BMC Microbiol.* 22(7), 92.

Theodoro,R.C., de Moraes Gimenes Bosco,S., Araújo,J.P. Jr., Candeias,J.M., da Graça Macoris SA, Trinca LA, Bagagli E. 2008. Dimorphism, thermal tolerance, virulence and heat shock protein 70 transcription in different isolates of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Mycopathologia.* 165(6), 355-65.

Theodoro,R.C., Candeias,J.M., Araújo,J.P.Jr., Bosco,M., Macoris,S.A., Padula,L.O., Franco,M., Bagagli,E. 2005. Molecular detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in soil. *Med Mycol.* 43(8), 725-729.

Theorell,H. 1935. Preparation in pure state of the effect group of yellow enzymes. *Biochemische Zeitschrift* 275, 344-346.

Torres,F.A., Vilaça,R., Pepe de Moraes,L.M., Reis,V.C., Felipe,M.S. 2008. Expression of a kexin-like gene from the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* in *Saccharomyces cerevisiae*. *Med. Mycol.* 46, 385-388.

Towbin,H., Staehelin,T., Gordon,J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76(9), 4350-4354.

Travassos,L.R., Taborda,C.P., Iwai,L.K., Cunha-Neto, E., Puccia, R. 2004. The gp43 from *Paracoccidioides brasiliensis*: a major diagnostic antigen and vaccine candidate. In: Dömer, J. E. and Kobayashi, G.S., *Mycota XII - Human Fungal Pathogens*, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, 279-296.

Travassos,L.R., Casadevall,A., Taborda,C.P., 2004b. Immunomodulation and immunoprotection in fungal infections: humoral and cellular immune responses, in: San-Blas, G., Calderoni, R. A., *Pathogenic fungi: Host interactions and emerging strategies for control*, Caister Academic Press, Norfolk, England, 241-283.

Travassos,L.R., Rodrigues,E.G., Iwai,L.K., Taborda,C.P. 2008. Attempts at a peptide vaccine against paracoccidioidomycosis, adjuvant to chemotherapy. *Mycopathologia* 165, 341-352.

Travassos, L. R. 1994. Immunochemistry of *Paracoccidioides brasiliensis* antigens. In: Franco, M., Lacaz, C. S., Restrepo-Moreno, A., Del Negro, G., *Paracoccidioidomycosis*. Boca Raton, London, pp. 309-331.

Tyagi,S., Bratu,D.P., Kramer,F.R. Multicolor molecular beacons for allele discrimination. *Nat Biotechnol.* 1998 16(1), 49-53.

Untereiner,W.A., Scott,J.A., Naveaus,F.A., Sigler,L., Bachewich, J., Angus,A. 2004. The Ajellomycetaceae, a new family of vertebrate-associated Onygenales. *Mycology* 96, 812-861.

Unterkircher, C. 1988. Antigenos de *Paracoccidioides brasiliensis* e sua aplicacao no diagnostico sorologico da Paracoccidioidomicose. In *In Departament of Biologia Celular*. Federal University of Sao Paulo: Sao Paulo.

Urban,C., Xiong,X., Sohn,K., Schröppel,K., Brunner,H., Rupp,S. 2005. The moonlighting protein Tsa1p is implicated in oxidative stress response and in cell wall biogenesis in *Candida albicans*. *Mol Microbiol.* 57(5), 1318-41.

van Berkel,W.J., Kamerbeek,N.M., Fraaije,M.W. 2006. Flavoprotein monooxygenases, a diverse class of oxidative biocatalysts. *J Biotechnol.* 124, 670-689.

van de Ven,W.J., Roebroek,A.J., van Duijnhoven,H. L. 1993. Structure and function of eukaryotic proprotein processing enzymes of the subtilisin family of serine proteases. *Crit Rev Oncog.* 4, 115-136.

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

Vigna,A.F., Almeida,S.R., Xander,P., Freymuller,E., Mariano,M., Lopes,J.D. 2006. Granuloma formation in vitro requires B-1 cells and is modulated by *Paracoccidioides brasiliensis* gp43 antigen. *Microbes Infect.* 8(3), 589-97.

Wanke,B., Londero,A.T. 1994. Epidemiology and paracoccidioidomycosis infection. In: Franco M, Da Silva-Lacaz C, Restrepo-M. A, Del Negro G, editors. *Paracoccidioidomycosis*. Boca Raton, Fla: CRC Press, 109–120.

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

Yamamoto,A., Mizukami,Y., Sakurai,H. 2005. Identification of a novel class of target genes and a novel type of binding sequence of heat shock transcription factor in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* 280, 11911-11919.

Yan,W., Shen,F., Dillon,B., Ratnam,M.J. 1998. The hydrophobic domains in the carboxyl-terminal signal for GPI modification and in the amino-terminal leader peptide have similar structural requirements. *Mol. Biol.* 275, 25-33.

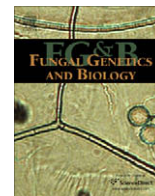
Zacharias,D., Ueda,A., Moscardi-Bacchi,M., Franco,M., San-Blas,G. 1986. A comparative histopathological, immunological, and biochemical study of experimental intravenous paracoccidioidomycosis induced in mice by three *Paracoccidioides brasiliensis* isolates. *J Med Vet Mycol.* 24(6), 445-454.

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



Contents lists available at ScienceDirect

Fungal Genetics and Biology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/yfgbi

The *Paracoccidioides brasiliensis* gp70 antigen is encoded by a putative member of the flavoproteins monooxygenase family

Juliana T. Maricato^a, Wagner L. Batista^b, Érika S. Kioshima^a, Luciano S. Feitosa^a, Ronni R. Novaes e Brito^a, Gustavo H. Goldman^c, Mário Mariano^{a,d}, Rosana Puccia^e, José D. Lopes^{a,*}

^aDiscipline of Immunology, Department of Microbiology, Immunology and Parasitology, Federal University of São Paulo, UNIFESP, Rua Botucatu, 862, São Paulo, SP, Brazil

^bDepartment of Biological Sciences, Federal University of São Paulo, Diadema, Brazil

^cFaculty of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto, São Paulo University, USP, Ribeirão Preto, Brazil

^dInstitute of Health, Paulista University, São Paulo, Brazil

^eDiscipline of Cell Biology, Department of Microbiology, Immunology and Parasitology, Federal University of São Paulo, UNIFESP, Rua Botucatu, 862, São Paulo, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 10 September 2009

Accepted 6 October 2009

Available online xxxx

Keywords:

Paracoccidioides brasiliensis

Antigen

Flavoprotein

Oxidative stress

ABSTRACT

Glycoprotein gp70 is an important intracellular antigen from *Paracoccidioides brasiliensis* that elicits both humoral and cellular immune responses. Herein, the PbGP70 gene cloning from isolate Pb18 using internal peptide sequence information is reported. The deduced protein sequence bears two *N*-glycosylation sites, antigenic sites and two mouse T-cell epitopes. Anti-recombinant gp70 (rPbGP70) polyclonal antibodies reacted with a 70-kDa component in total cell extract of *P. brasiliensis*, while MAbC5F11 and paracoccidioidomycosis patients' sera recognized rPbGP70. Confocal microscopy with anti-rPbGP70 and MAbC5F11 showed intense staining and cytoplasmic co-localization. The protein sequence belongs to the flavoprotein monooxygenase family which groups important anti-oxidative bioactive compounds. We found increased PbGP70 transcript accumulation under oxidative stress induced by H₂O₂, during fungal growth and in macrophage phagocytized/bound yeasts. Therefore, gp70 might play a dual role in *P. brasiliensis* by both eliciting immune cellular and humoral responses in the host and protecting the fungus from oxidative stress generated by phagocytic cells.

© 2009 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Paracoccidioides brasiliensis is a thermomorph fungus that causes paracoccidioidomycosis (PCM), a human systemic granulomatous mycosis prevalent in Latin America (San-Blas, 1993). According to recent epidemiological reports, PCM represents the most important cause of deaths among systemic mycoses (about 51.2%) between 1996 and 2006 in Brazil (Prado et al., 2009).

P. brasiliensis grows at 25 °C as a saprophytic mycelium and as multi-budding yeasts when incubated at 36 °C or in parasitism. Infection in humans occurs by inhalation of propagules present in the soil and can be established when the fungus undergoes transformation to the yeast parasitic phase (McEwen et al., 1987). Clinical manifestations and prognosis of PCM depend on the balance between fungal and host's factors (Brummer et al., 1993).

According to sequence analysis of the ribosomal RNA gene locus, *P. brasiliensis* is phylogenetically related to other thermomorph fungi, such as *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis* and *Coccidioides immitis* (Leclerc et al., 1994; Peterson

and Sigler, 1998), which have been classified as *Ascomycetes* of the *Onygenaceae* family (Untereiner et al., 2004).

Phylogenetic analysis using 65 isolates of *P. brasiliensis* (Matute et al., 2006) allowed separation of three distinct phylogenetic species: S1 (a major paraphyletic group that contains isolates from Brazil, including Pb18, Argentina Peru and Venezuela); phylogenetic species PS2 (monophyletic group with six isolates that include Pb3) and PS3 (monophyletic group with 21 isolates from Colombia). Recently, Pb01 and 17 other isolates from central Brazil ("Pb01-like") have been grouped in a new clade, which is very distant from S1/PS2/PS3 (Teixeira et al., 2009). Consequently, the "Pb01-like" group has been proposed as a new species named *Paracoccidioides lutzii* in a tribute to Adolpho Lutz, discoverer of *P. brasiliensis* in 1908.

P. brasiliensis transcriptional data are organized for Pb18 and Pb01 in Expressed Sequence Tags (EST) Databanks (Goldman et al., 2003; Felipe et al., 2005). The Pb18 EST Databank assembles over 50% (4692 genes) of annotated Pb18 genes in the yeast phase (Goldman et al., 2003). The Pb01 ESTs overlap 6022 expressed genes from the yeast and mycelial phases (Felipe et al., 2005), which represent 67% of annotated genes for this isolate. About 40–50% of the expressed genes in *P. brasiliensis* remain classified as hypothetical proteins. In 2008, with the efforts from the Broad

* Corresponding author. Fax: +55 11 5572 3328.

E-mail address: jdlopes@unifesp.br (J.D. Lopes).

Institute (MIT) supported by the Dimorphic Fungal Genomes Consortium, the comparative genomes of *Coccidioides* and other pathogenic dimorphic fungi became available (http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/dimorph_collab.1/MultiHome.html). It includes the Pb18, Pb03 and Pb01 *P. brasiliensis* genomes (URL: http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/paracoccidioides_brasiliensis/MultiHome.html).

Clinically, two forms of PCM are well characterized: acute/subacute and chronic. In acute/subacute forms, both genders are equally affected, and primarily the reticuloendothelial/lymphatic system is involved. The chronic form manifests mainly in male adults and is characterized by pulmonary and/or mucocutaneous commitment (Franco et al., 1987). Cell-mediated immunity is more effective than humoral to protect hosts against *P. brasiliensis* in experimental and human PCM, in which high levels of specific antibodies were associated with severe forms of the disease (Calich et al., 1998; Benard et al., 1997; Castañeda et al., 1988). Besides, there is a correlation between the severity of disease and impairment of delayed type hypersensitivity (DTH) response (Musatti et al., 1994). Some antigenic components of *P. brasiliensis* elicit cellular and humoral immune responses, and the main diagnostic antigen so far characterized in *P. brasiliensis*, the secreted glycoprotein gp43, presents antigenic and immunomodulatory properties (Travassos et al., 2004).

Another relevant antigen from *P. brasiliensis* is glycoprotein gp70 whose molecular mass is estimated to be 70 kDa. This is a concanavalin A-binding component (Puccia et al., 1986) that is recognized by about 96% of sera from untreated patients with PCM; in patients undergoing chemotherapy this percentage was reduced, pointing to its role in the disease prognosis (Camargo et al., 1989; Silva et al., 2004). Isolated gp70 was also able to induce lymphoproliferative responses when tested with PCM patients' lymphocytes (Benard et al., 1997) and down-regulate peritoneal macrophage functions such as phagocytosis, NO and H₂O₂ production. In addition, monoclonal antibody anti-gp70 (MAbC5F11) conferred immunoprotection when administrated in the beginning and during PCM infection in mice, as previously demonstrated by our group (Grosso et al., 2003).

To date, the nature of gp70 is unknown, and the glycoprotein is expressed in very low amounts by yeast cells, preventing further characterization (Grosso et al., 2003). Hence, due to the potential importance of gp70 in immune modulation of PCM, our group has been trying to clone and characterize the PbGP70 gene. The first attempts to achieve this goal resulted in the fortuitous characterization of a calnexin gene PbCNX from Pb01 (Feitosa et al., 2007). The strategy employed microsequences of internal peptides from native Pb01 gp70 to design degenerated primers, with which a 384-bp PCR probe was obtained to screen a Pb01 cDNA library.

In the present work, this PCR probe sequence information was used to design specific primers and obtain a PCR amplicon from *P. brasiliensis* isolate 18 (Pb18). Using this probe, we have been able to characterize the PbGP70 gene, which has been annotated as a member of the flavoproteins monooxygenase family. We expressed the protein in bacteria and demonstrated the immunological identity between the gene product and native gp70. Furthermore, we showed that the gene expression is increased during fungal growth and oxidative stress.

2. Materials and methods

2.1. Fungal strains and culture conditions

We worked with *P. brasiliensis* isolate 18 (Pb18), provided by Zoilo P. Camargo (Brazil), whose characteristics are detailed elsewhere (Morais et al., 2000). Cultures were maintained at 36 °C

(yeast phase) in solid, modified YPD (0.5% casein peptone, 0.5% yeast extract, 1.5% glucose, pH 6.3).

2.2. Isolation of total DNA and RNA

For DNA extraction, Pb18 was expanded for 10 days at 36 °C in liquid modified YPD under agitation (100 rpm). Total DNA was extracted from a 10-mL pellet of nitrogen-frozen cells, which were mechanically broken in a mortar and then briefly in a pestle, as described previously (Cisalipino et al., 1996). Total RNA was isolated from fresh cells disrupted by vortexing with glass beads for 10 min in the presence of TRIzol reagent (Invitrogen), following the manufacturer's instructions. Contaminating DNA in these preparations was eliminated by digestion with RNase-free DNase I (Promega), as described previously (Goldman et al., 2003). The efficiency of hydrolysis was confirmed by PCR with primers of the PbGP43 gene (Cisalipino et al., 1996) or PbCAM (calmodulin) gene (Table 1).

For gene expression analysis by real-time reverse transcriptase-PCR during growth, cells growing at 36 °C under shaking in modified YPD were collected at 4, 6, 8, 10 and 14 days and processed for RNA purification. For oxidative stress induction with 0, 1.0, 2.5 or 5.0 mM of H₂O₂, cells were grown logarithmically at 36 °C under shaking in modified YPD and processed as described (Batista et al., 2007). For evaluation of gene expression after incubation with macrophages, yeast cells were recovered from the culture media or from macrophage pellets as described previously (Tavares et al., 2007) with some modifications; fungal RNA was extracted following mechanical disruption of cells with maceration in liquid N₂; the resulting powder was defrosted in TRIzol (Invitrogen) and processed as already described. All DNA-free RNA samples were quantified using a NanoDrop apparatus (Thermo Scientific, USA), analyzed for integrity in formaldehyde agarose gels and stored at –70 °C in DEPC-treated water.

2.3. PbGP70 gene cloning and sequence analysis

A 384-bp genomic DNA fragment from the *P. brasiliensis* isolate 01 (Pb01) was amplified using degenerated oligonucleotides corresponding to peptides obtained by microsequencing of the 70 kDa glycoprotein (gp70) from Pb01 (Feitosa et al., 2007). After sequencing, specific primers for the 384-bp flanking regions were designed (Table 1), and a similar-sized fragment was amplified using genomic DNA from Pb18. The 3' end of this amplicon showed 97% similarity with the 5' end of EST 111-F10 from the Pb18 Expressed Sequence Tags databank (Goldman et al., 2003). A specific primer

Table 1
Primers used in PCR, cloning and quantitative RT-PCR.

<i>P. brasiliensis</i> genes	Primer sequence (5'–3')
PbGP70 384-pb	5' GAG GTA AAC GAG CTG TTC GAT 3' forward 5' TAT ATT CAC TTC GTT TAT GTA GAC 3' reverse
PbGP70 S1	5' GGG AAA AAT TGG CCA AGG 3' forward 5' GAC ATA TTA TAC GGT TTT AGT GTT G 3' reverse
PbGP70 Expr1	5' ATA CGA ATT CAA TGG GAA AAA TTG GC 3' forward 5' TAG CGT CGA CTT ATA CGG TTT TAG T 3' reverse
PbGP70 Expr3	5' TAG CAC TAG TTT AGA CCA AGG AAA TG 3' reverse
PbGP70 S4	5' GGA CTG GAA GGG AAC CGA ATC GCC 3' reverse
PbGP70 SE3	5' CGA GAA TGC TCA AGA AAG CAA TAG 3' reverse
PbGP70 SE1/E2	5' AGA TTG AGC GAG GGC CAT TTC CTT 3' forward 5' CAA GCG CTG CTC TTC CAT TCT 3' reverse
PbGP43	5' TGG GAC ACC TTT ATC ACT 3' forward 5' TTT GAT CGT GTC ACC CTT 3' reverse
α-TUB	5' CGG CTA ATG GAA AAT ACA TGG C 3' forward 5' GTC TTG GCC TTG AGA GAT GCA 3' reverse
PbCAM	5' ATCTCTCGTATGGCCGACTCTT 3' forward 5' TTTGTCCCAAGACCGATCACAG 3' reverse

pair S1 (Fig. 1B and Table 1) was then designed corresponding to the 5' end of the 384-bp fragment and the 3' end of EST-111-F10 (Fig. 1A). Primer pair S1 was used to obtain genomic and cDNA sequences. We managed to amplify a genomic PCR product of 2154 bp, which was fully sequenced by primer-walking from the end to the middle of the sequence using specific overlapped primers SE1/SE1, SE3 and S4 (Table 1 and Fig. 1B). The PCR products were purified using Wizard PCR and Gel Clean-up Kit (Promega) and cloned into pGEM-T Easy Vector (Promega), according to the manufacturer's instructions, for maintenance and sequencing. Nucleotide sequencing was carried out in the facilities of the Center of Human Genome at São Paulo University. The sequences were analyzed with Sequence Analyzer software Chromas 2.0. Sequences were compared with those of the National Center for Biotechnology Information (NCBI) through the GenBank database and the BLAST network service and analyzed with the EditSeq, SeqMan, MegaAlign and Protean programs of the Lasergene System (DNASTAR Inc., Madison, Wis.). After exhaustive sequence analysis, it was clear that there were no introns in the gene, as recently confirmed in the PADG_06694.1 locus of the Pb18 Genome databank (URL: http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/paracoccidioides_brasiliensis/GeneDetails.html?sp=S7000001960945371). Therefore, genomic inserts were used for heterologous expression of the corresponding protein. On the other hand, reverse transcription reactions were carried out using SuperScript II RNase H RT Kit (Invitrogen), 2.5 µg of DNA-free RNA from Pb18 and either oligo-DT or 3' S1 to amplify the first strand. Despite many efforts, we never managed to clone the corresponding cDNA.

2.4. In silico analysis of the PbGP70 gene sequence and 5' intergenic region

Sequences retrieved from the National Center for Biotechnology Information (NCBI) through the GenBank database and the BLAST networks were analyzed with the EditSeq and MegaAlign programs of the Lasergene System (DNASTAR Inc., Madison, Wis.) using ClustalW alignment. Jameson-Wolff antigenic index, Kyte-Doolittle hydrophilicity plot, Eisenberg's alpha helix amphipathic regions, Emini's surface probability plot and the Sette major histocompatibility complex (MHC)II motif method were analyzed and graphically shown by the Protean program (protein sequence analysis) of Lasergene biocomputing (DNASTAR Inc., Madison, Wis.).

The putative gp70 amino acid sequence was also analyzed for the presence of signal peptide using SignalP and TargetP algo-

ritms (URL: <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/> and <http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>) and for the presence of conserved domains according to Conserved Domain Search in BLAST network service (URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>). Analyses of the 5' promoter region in the PbGP70 gene were carried out using the TFSEARCH computer program (<http://molsun1.cbrc.aist.go.jp/research/db/TFSEARCH.html>).

2.5. P. brasiliensis cell extracts

Yeast cells were scraped from solid medium and washed in Tris-Ca²⁺ buffer (20 mM Tris-HCl, pH 8.8, 2 mM CaCl₂) containing protease inhibitors *N*-α-p-tosyl-L-lysine chloromethylketone (50 µg/mL), 4 mM phenylmethyl-sulfonylfluoride (PMSF), 5 mM iodoacetamide, 1 mM EDTA and leupeptin (20 µg/mL). Cells were collected by centrifugation at 5000 g for 5 min, frozen in liquid nitrogen and disrupted by maceration. The cellular extract was agitated in a vortex for 15 min at 4 °C, centrifuged at 12,000g during 20 min, and the supernatant was kept at -70 °C (Feitosa et al., 2007).

2.6. Expression of recombinant Pbgp70 partial protein

A 946-bp fragment from the 5' coding region from PbGP70 (boxed in Fig. 3A) was obtained by PCR with primers Expr1/Expr3 (Fig. 1B; Table 1), which contained *EcoRI* and *SpeI* restriction sites. The amplicon was cloned into pGEM-T and subcloned in the *EcoRI*/*SpeI* sites of the expression vector pHIS3 (Sheffield et al., 1999), in-frame with the sequence encoding a H₆ tag. The resulting construct was called pHISgp70. Plasmid pHISgp70 was used to transform *Escherichia coli* DH5α for maintenance and amplification, from which positive clones were selected for resistance to ampicillin. Correct in-frame ligation was checked by endonuclease restriction and sequencing. Selected plasmids were inserted into *E. coli* BL21/pLysS (Novagen) for IPTG (isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside)-induced protein expression. For purification of recombinant protein Pbgp70 (rPbGP70), individual bacterial clones were cultivated overnight at 37 °C under agitation in LB medium (Merck) containing ampicillin (100 µg/mL) and chloramphenicol (37 µg/mL). An aliquot of this initial culture was diluted 1:100 in fresh medium and grown to an A₆₀₀ of 0.6. At this point, protein expression was induced for 4 h with 0.5 mM IPTG. Bacterial cells were centrifuged (10,000g, 5 min) and resuspended in 50 mM Tris-HCl (pH 7.0), 0.2 M NaCl, 10% sucrose, 1 mM PMSF and disrupted by sonication

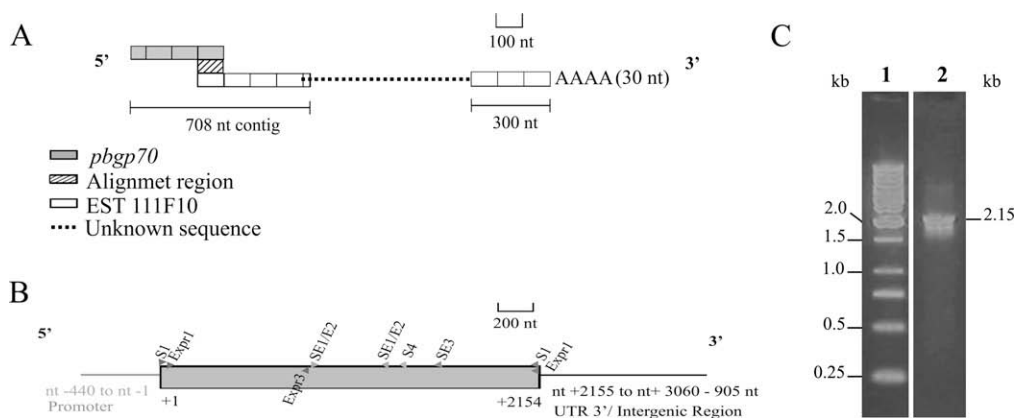


Fig. 1. PbGP70 cloning strategy. (A) Schematic representation of the alignment between the 384-bp amplicon from Pb18 (*pbgp70*), obtained with specific primers encoding gp70 peptides, and EST 111-F10 5' and 3' fragments, as achieved by *in silico* screening of the Pb18 EST DataBank. Dotted lines represent the missing sequence of EST 111-F10. (B) Schematic representation of the PbGP70 ORF, 5' and 3' intergenic regions; head arrows indicate the localization of the primers used in this work. (C) Agarose gel stained with ethidium bromide showing the PCR genomic product with the primers S1F/S1R corresponding to the PbGP70 gene. Lane 1, DNA ladder and lane 2, 2.15-kb fragment (PbGP70 gene).



Fig. 2. Alignment of the deduced amino acid sequence of PbGP70 gene and fungal homologs. Comparison, by ClustalW method (MegaAlign module, DNASTar Inc.), of the deduced amino acid sequence of PbGP70 from *P. brasiliensis* and reported sequences from other fungi in the GenBank (NCBI-BLAST): *H. capsulatum* (XP_001542128.1), *C. immitis* (XP_001243766.1) and *A. fumigatus* (XP_75906.1). Black-filled boxes indicate conserved amino acids and blue boxes indicate amino acids from native gp70 obtained by microsequencing; putative A-cell epitopes in *P. brasiliensis* sequence are green-boxed. Red underline indicates putative N-glycosylation sites, and purple underline indicates the GXGXGX motif that is characteristic of flavoproteins.

for 5 min (15-s pulses alternated with 15 s in ice). Precipitates were pelleted by centrifugation (10,000g, 5 min), suspended in 100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-HCl (pH 8.0) containing 8 M urea and centrifuged. The supernatant was chromatographed in Ni-nitrilotriacetic acid (NTA) columns (QIAGEN), according to the manufacturer's instructions. The rPbGP70 fractions eluted at pH 4.5 with NaH₂PO₄ (100 mM), Tris-Cl (10 mM) and 8 M urea buffer were pooled for further use. Fractions eluted at pH 6.3 and 5.9 were discarded.

2.7. Rabbit immunization, antibody purification and Western immunoblotting

Ni-NTA-eluted rPbGP70 (about 300 µg) was fractionated in preparative SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) (Laemmli, 1970) followed by Coomassie blue staining. The 35 kDa corresponding bands were excised from the gels, de-

stained, homogenized in PBS and immediately inoculated subcutaneously on the shaved backs of rabbits at several spots. The same procedure was followed twice every 20 days, and at 30 days and 45 days after the first immunization, rabbits were bled, and the serum was separated, tested and aliquoted at −20 °C. The rabbits were also bled before immunization to obtain pre-immune sera. Polyclonal rabbit immunoglobulin G (IgG) anti-rPbGP70 was purified from both pre-immune and immune sera in protein A-Sepharose (Pharmacia) and checked for purity as described (Basta et al., 2006). Western immunoblotting reactions with sera from hyperimmune rabbits or patients with PCM were carried out for 2 h at room temperature under agitation, after which membranes were washed, for 10 min each, five times with 0.2% Tween 20 in PBS and incubated for 1 h at room temperature with goat anti-rabbit or horse anti-human Ig conjugated to peroxidase (Bio-Rad). The reactions were developed with an enhanced chemiluminescence kit (Pierce). Total cell extracts of *P. brasiliensis*

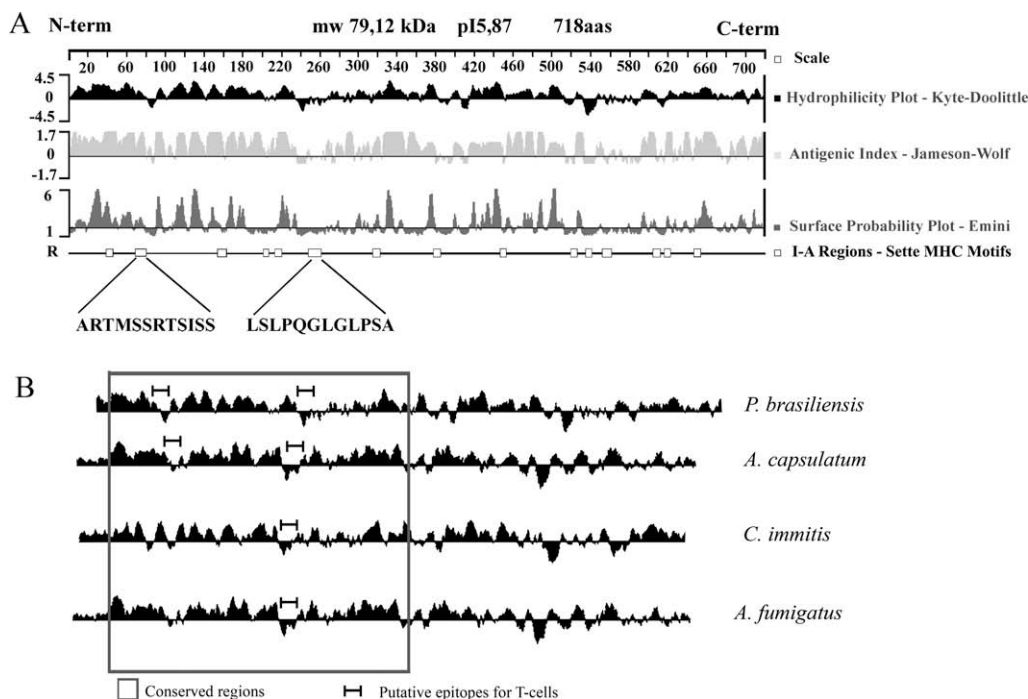


Fig. 3. Analysis of Pbgp70 deduced protein and homologs. (A) Schematic representation of Pbgp70 showing Kyte-Doolittle hydrophilicity plots (negative values indicate hydrophobicity), antigenic index and surface probabilities. Highlighted are the location and sequence of mouse T-cell epitopes with a minimum of 12 amino acids, as predicted by the Sette major histocompatibility complex motif. (B) Schematic representation of Pbgp70 showing homology in Kyte-Doolittle hydrophilicity plots with other fungal sequences from GenBank (NCBI-BLAST): *Ajellomyces capsulatus* (XP_001542128.1), *C. immitis* (XP_001243766.1) and *A. fumigatus* (XP_75906.1). Most conserved regions are boxed, and the horizontal bars indicate the location of mouse T-cell epitopes with a minimum of 12 amino acids, as predicted by the Sette major histocompatibility complex motif. Analyses by the Protean module, DNASTar Inc.

were tested at 150 µg/lane. As positive control, we used anti-native gp70 MAbC5F11 at 20 µg/mL and goat anti-mouse Ig conjugated to peroxidase (Bio-Rad). The reactions were developed with an enhanced chemiluminescence kit (Pierce).

2.8. Confocal analysis

Labeling for fluorescence microscopy was performed as previously described with modifications (Batista et al., 2006). *P. brasiliensis* yeast cells (3×10^6 , all viable) were fixed in cold methanol for 30 min in the dark and incubated with 3% (wt/vol) BSA in PBS (blocking buffer) for 16 h at 4 °C. Next, they were washed three times with PBS and then incubated with 20 µg/mL of anti-native gp70 MAbC5F11 for 3 h at room temperature followed by incubation with 100 µg/mL of affinity-purified anti-rPbgp70 or pre-immune polyclonal rabbit IgG (negative control) for 3 h at room temperature. Between each step, fungal cells were washed six times with PBS. The cells were incubated for 1 h in the dark with fluorescein iso-thiocyanate (FITC)-conjugated goat anti-rabbit IgG (Jackson ImmunoResearch, WestGrove, PA), tetramethyl rhodamine iso-thiocyanate (TRITC)-conjugated goat anti-mouse IgG (Jackson ImmunoResearch, WestGrove, PA) and DAPI (4'-6-Diamidino-2-phenylindole di-lactate, Invitrogen), all of them diluted 1:50 in blocking buffer. A drop of 10 µL of each suspension was mounted on glass slides with 80% glycerol, and the slides were sealed with nail polish. Labeling was analyzed in laser scanning confocal microscope LSM-510 NLO (Carl Zeiss, Jena, Germany).

2.9. Incubation of murine macrophages with *P. brasiliensis*

Murine bone marrow-derived macrophages (BMM) were generated as previously described (Zamboni and Rabinovitch, 2003) from 6- to 8-week-old BALB/c mice. Cultures were kept at 37 °C

in the presence of 5% CO₂ in RPMI supplemented with 10% fetal bovine (R10) serum and 5% of conditioned medium from cultures of L929 cells known to be high producers of GM-CSF. Differentiated macrophages were counted and plated at 2×10^6 cells per 75 cm² bottles and kept at 37 °C in the presence of 5% CO₂ in RPMI supplemented with 10% fetal bovine serum. Macrophage monolayers were infected, as previously described (Brummer et al., 1989), with Pb18 yeast cells at a ratio of 1:5 (macrophage/yeast) and incubated at 37 °C with 5% CO₂ atmosphere in R10 media. As controls, yeast cells were incubated as described earlier without macrophage monolayers and macrophage monolayers without yeast cells. At each time point of the assay (6 h, 12 h, 24 h or 48 h), extracellular and weakly adherent fungi were removed by washing with pre-warmed RPMI and collected by centrifugation for further RNA extraction. Macrophages were then lysed with H₂O MilliQ (hypotonic solution) for 30 min, and intact yeast cells were harvested by centrifugation and immediately processed for total RNA isolation, as described earlier (Tavares et al., 2007, with some modifications).

2.10. Quantitative real-time RT-PCR

For experiments of quantitative real-time RT-PCR, we used a Syber Green detection system (Applied Biosystems, USA). For detection of Pbgp70 expression levels, the reactions were carried out using 2 µM of SE1/E2 primers (as target) and alpha-chain tubulin (α-tub) primers as endogenous control (Table 1), 10 µL of the Syber Green PCR master mix (Applied Biosystems) and 3 µL of cDNA. Cycling was carried out in an ABI Prism 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystems, USA) starting with one cycle of 50 °C (2 min) and 95 °C (1 min), followed by 40 cycles at 95 °C (15 s) and 60 °C (1 min). The dissociation curve was determined with an additional cycle of 95 °C (15 s), 60 °C (20 s) and

95° (15 s). Reactions were performed in triplicates, and the endogenous control (α -tub) was used as calibrator. Basic procedures and calculations were performed as described by Semighini et al. (2002).

2.11. Southern blot analysis

Standard conditions for electrophoresis and Southern blotting analysis were used (Sambrook et al., 1989). Total PCR products from *P. brasiliensis* genomic DNA (control) or RT-PCR product from *P. brasiliensis* RNA extracted from 5-day-old and 14-day-old cultures were hybridized with radio labeled probe SE1/E2, a PCR product of genomic DNA with SE1/E2 primers (Table 1). High-stringency conditions were used. Hybridizations were carried out at 42 °C, 16 h, in formamide (50%), 1× SSC, NaCl (0.15 M), sodium citrate (0.015 M) buffer, 5× Denhardt's solution, herring sperm DNA (100 µg/mL) and SDS (0.1%), followed by washes in 2× SSC/SDS (0.1%) at 42 °C and 1× SSC/SDS (0.1%) at 56 °C (twice, for 30 min). Membranes were exposed to X-ray films for 16 h at –70 °C.

2.12. Statistical analysis

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

3. Results

3.1. Cloning and characterization of the PbGP70 gene

The strategy for cloning the PbGP70 gene is described in detail in materials and methods. A 384-bp PCR fragment from Pb18 was amplified using primers corresponding to internal peptides from purified gp70. The 3' sequence of this amplicon was then found within a 424-bp 5' fragment from EST 111-F10 deposited in the Pb18 EST databank (Goldman et al., 2003). A schematic drawing of the contig obtained is shown in Fig. 1A. Specific primers from the amplicon 5' sequence and the 3' end from EST 111-F10 were used to amplify the full sequence using total DNA from Pb18 as template and the primer-walking strategy to sequence the PCR product.

The putative PbGP70 ORF lies within a 2154-bp fragment without introns (Fig. 1B). This sequence has been later confirmed in the Pb18 (locus PADG_06694.1) and Pb3 (locus PABG_06019.1) sequences of the Genome Database (http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/paracoccidioides_brasiliensis/Multi-Home.html). In Pb01, which probably belongs to a different species (Teixeira et al., 2009), the homologous gene (locus PAAG_05352) has one intron at the 5' end. Fig. 1C shows the 2154-bp genomic DNA fragment from Pb18 amplified with the primer pair S1.

The original *in silico* analysis of the 2154-bp sequence at the GenBank database showed high identity of the deduced protein with hypothetical proteins from *H. capsulatum*, *C. immitis*, *Aspergillus fumigatus* and *A. clavatus*, which are phylogenetically closer to *P. brasiliensis* (Fig. 2). Recently, through comparative *in silico* analysis, this protein has been annotated as a member of the flavoprotein monooxygenase family in the Pb18 Genome Database (http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/paracoccidioides_brasiliensis/GeneDetails.html?sp=S7000001960945371). Accordingly, we found in the Pbgp70 deduced sequence a GXGXGX motif (purple underlined in Fig. 2) reported as conformational domain

that allows the co-factors NAD or FAD to bind to the flavoprotein-oxygenases (Van Berkel et al., 2006).

The translated Pbgp70 protein contains 718 amino acids, a deduced molecular mass of about 79 kDa and an acidic isoelectric point (pI) of 5.87 (Fig. 3A). In addition, we identified two potential *N*-glycosylation sites (Asp-X-Ser/Thr). Immunoblotting analysis using Pb18 cell extracts treated with endoglycosidase H and specific monoclonal antibodies anti-gp70 (MAbC5F11) confirmed that gp70 is *N*-glycosylated; in the deglycosylated form, gp70 has an estimated molecular mass of about 61 kDa (data not shown).

The alignment of the deduced Pbgp70 amino acid sequence with homologous sequences from *H. capsulatum*, *C. immitis* and *A. fumigatus* showed that the region between aa 105 and aa 404 contains conserved domains (Fig. 2). The internal peptides identified in the native gp70 protein can be seen in all sequences. There are two predicted mouse T-cell epitopes in the *N*-terminal half of the predicted protein (ARTMSSRTSIS and LSLPQGLGLPSA); both are conserved in *H. capsulatum*, and only one is conserved in *C. immitis* and *A. fumigatus* (Figs. 2 and 3). Besides, as shown by the Kyte–Doolittle hydrophilicity-plot, the molecule is predominantly hydrophilic. Therefore, the deduced Pbgp70 protein has high antigenic index mainly located at the *N*-terminal half (Fig. 3A). High antigenic index would be expected, since 96% of the PCM patients' sera can recognize native gp70 (Silva et al., 2004).

3.2. Heterologous expression of partial PbGP70 and localization of the corresponding protein

To achieve heterologous expression of the Pbgp70 recombinant protein, we chose to express the *N*-terminal half, considering that it includes the highest antigenic peaks, T-cell putative epitopes and conserved regions; it also includes the peptides identified in native gp70 and the putative *N*-glycosylation sites, as boxed in Fig. 3A. Therefore, a histidine-tagged *N*-terminal region of Pbgp70 (315 amino acids, 35.12 kDa) was expressed as a major insoluble cytoplasmic protein of estimated molecular mass of about 35 kDa, as demonstrated by SDS–PAGE (Fig. 4A). The recombinant protein (rPbgp70) was partially purified in Ni-NTA columns (Fig. 4A, lane 4), and the corresponding SDS–PAGE band was cut off the gel and used to immunize rabbits. Anti-rPbgp70 showed titers of 1:800 when tested by immunoblotting against small amounts of the corresponding recombinant protein (Fig. 4A – lower panel). More importantly, anti-rPbgp70 rabbit immune serum reacted with a 70-kDa component in total cell extract of Pb18, which migrated similarly to native gp70 reacting with anti-gp70 MAbC5F11 (Fig. 4B). Conversely, MAbC5F11 recognized the Pbgp70 recombinant protein (Fig. 4C). These results strongly suggested that the gene we here characterized corresponds to that encoding gp70. In addition, we observed that the recombinant protein was recognized by five out of seven PCM patients' sera (Fig. 4D).

To confirm these previous findings, we performed confocal microscopy of Pb18 yeast cells and both anti-rPbgp70 polyclonal IgG purified in protein A-Sepharose columns from rabbit's sera (labeled green with anti-IgG rabbit-FITC) and anti-native gp70 MAbC5F11 (labeled red with anti-IgG mouse-TRITC). Cytoplasm localization of the protein in yeast cells has been evidenced in two frames of longitudinal images, one at 3 µm, showing strong blue DAPI labeling in the nuclei (Fig. 5A), and another at 7 µm which shows strong labeling of the cell cytoplasm with each of the antibodies. Image merge resulted in strong co-localization at this compartment, as seen by the orange color (Fig. 5B). In a couple of regions of the cytoplasm, it was possible to observe some points strongly labeled in a similar manner by both antibodies (Fig. 5B), suggesting an accumulation of gp70 in some regions. These results experimentally confirm that the gene characterized in the present work corresponds to the PbGP70 gene.

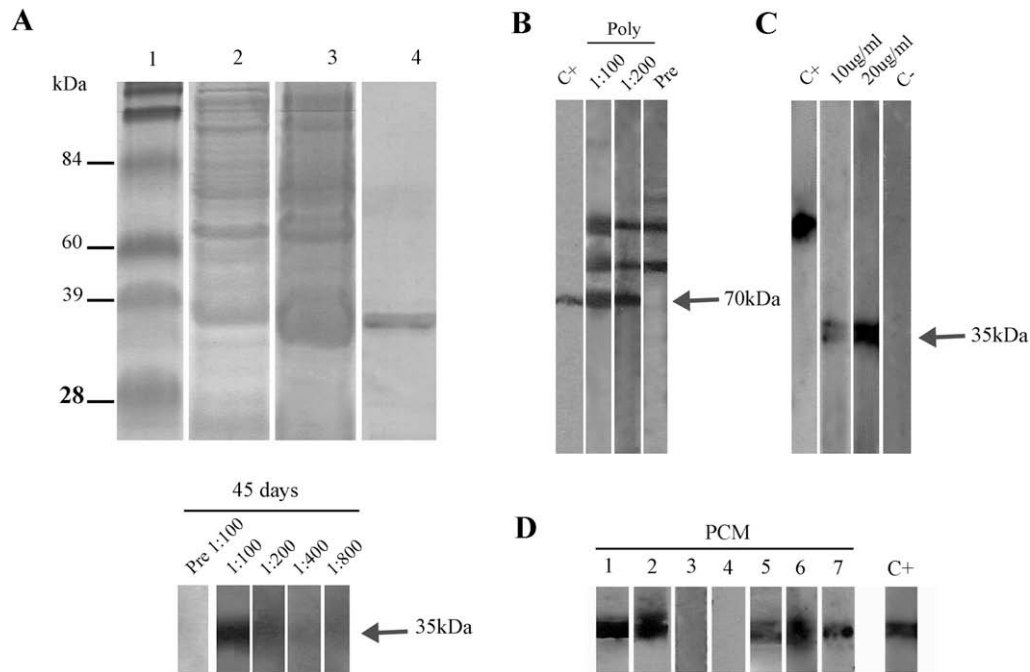


Fig. 4. Expression of partial Pbpg70 recombinant protein and immunological reactivity. (A) Upper panel shows Coomassie blue-stained 12% SDS-PAGE: lane 1, molecular weight marker (in kDa); total *E. coli* BL21/pLys extracts from bacteria transformed with pHISgp70 before (lane 2) and after 4 h (lane 3) expression induction; lane 4, rPbpg70 eluted from Ni-NTA columns with pH 4.5 buffer. Lower panel: titration of anti-rPbpg70 rabbit immune sera (1:100–1:800) in immunoblotting using rPbpg70 as substrate. Pre 1:100, pre-immune rabbit's serum at 1:100 used as control. (B) Immunoblotting reactivity of anti-rPbpg70 rabbit immune sera (Poly 1:100 and 1:200) or pre-immune serum (1:100) with 150 µg of *P. brasiliensis* total cell extract; C+, anti-native gp70 MAbC5F11 (20 µg/mL) reactivity with total cell extract; (C) Immunoblotting reactivity of anti-native gp70 MAbC5F11 (20 µg/mL and 10 µg/mL) with rPbpg70; C+, MAbC5F11 (20 µg/mL) reactivity with total cell extract from *P. brasiliensis*. (D) Seven serum samples from PCM patients (1–7) were tested in immunoblotting assays against rPbpg70. C+, anti-rPbpg70 rabbit immune serum at 1:200. There was no reaction between sera from healthy individuals and rPbpg70. Arrows indicate the 70 kDa or 35 kDa reacting bands.

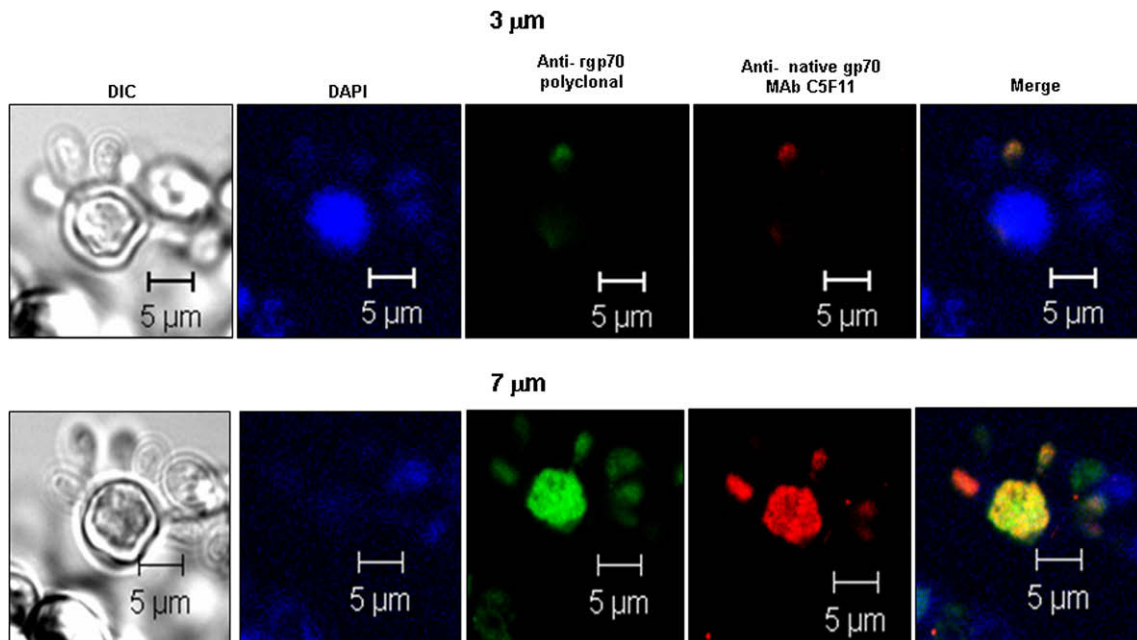


Fig. 5. Co-localization of native gp70 and the PbGP70 gene product by confocal microscopy of *P. brasiliensis* yeast cells. Upper (3 µm longitudinal image) and lower (7 µm longitudinal sections) panels evidence strong cytoplasm staining with both rabbit IgG anti-rPbpg70 conjugated with FITC (green) and anti-native gp70 mouse MAbC5F11 conjugated with TRITC (red). Merged images in both panels show co-localization of the labels (yellow-orange). Blue images are nuclei stained with DAPI. Controls with pre-immune rabbit serum and irrelevant MAb IgG were negative.

3.3. Role of PbGP70 gene in the oxidative stress and fungal growth

In silico analysis of the 5' intergenic region of the PbGP70 gene using the TFSEARCH computer program (<http://molsun1.cbrc>.

aist.go.jp/research/db/TFSEARCH.html) suggested the presence of predicted transcription elements conserved among eukaryotes, such as HSF, ADR-1 and GATA-binding sequences (data not shown). Active HSF (heat shock factors) binding elements in yeast are

present in promoter regions of genes expressed under stress conditions as thermal, nutritional, oxidative and/or nutritional privation (Ruis and Schüller, 1995). The ADR-1 (alcohol dehydrogenase-1) motif is involved in glycerol, ethanol and fat acid metabolism in eukaryotes. In addition, it is also present in the promoter region of genes up-regulated under nutritional and oxidative stress in yeast (Gasch et al., 2000). GATA elements act in fungi control, among other functions, of nitrogen metabolism and nitrosative stress responses (Scazzocchio, 2000; Marzluf, 1997). These data and the recent classification of *PbGP70* into the flavoprotein monooxygenase family prompted us to investigate whether the *PbGP70* mRNA accumulation would increase under oxidative and nutritional stress conditions.

Oxidative stress was induced by adding different concentrations of H_2O_2 in *Pb18* cultures, and 1 hour later total RNA was isolated for further real-time RT-PCR analyses. Fig. 6A shows that there was significant mRNA accumulation increase (about 12.5-fold) upon addition of 1 mM of H_2O_2 ; higher concentrations resulted in decrease in a dose-dependent way. We speculated if H_2O_2 concentrations higher than 2.5 mM could be toxic to the fungus and could impair cell functions after 1 hour of contact, although it has not been observed to decrease fungal viability. These results suggested that the *gp70* participates in the oxidative stress response of *P. brasiliensis*.

To investigate whether the fungal growth and consequent nutritional stress would stimulate *PbGP70* expression, mRNA accumulation was followed during 14 days of growth in complex medium (Fig. 6B). It is possible to observe significant mRNA increase after the 8th day of growth, but the peak was reached at 14 days (11-fold increase). To confirm this result, we carried out Southern blot assays with the *PbGP70* RT-PCR product obtained with mRNA from 5- and 14-day cultures, using the same real-time PCR primers used in Fig. 6A (Fig. 6C). Note that the *PbGP70* mRNA band was visibly more intense at 14 days (at least 10 times more than at 5 days), suggesting its participation in fungal growth.

In order to investigate the role of *PbGP70* in a more physiological stress situation, we incubated *Pb18* yeast cells with non-activated bone-marrow-derived macrophages and carried out phagocytosis assays. At the indicated time points in Fig. 6D, total RNA was isolated from the internalized or macrophage-bound and not-bound *Pb18* cells. In the internalized or macrophage-bound cells, an increase in mRNA accumulation could be observed at 12 h and 24 h after the beginning of the experiment, but there was a decrease at 48 h (Fig. 6D – white bars). Conversely, in not-bound yeasts, the expression levels enhanced significantly at 48 h (Fig. 6D – back bars). The remarkable accumulation of *PbGP70* transcript observed at 6 h in the *Pb18* + R10 group might be due to the culture medium exchange from YPD to R10, which contains

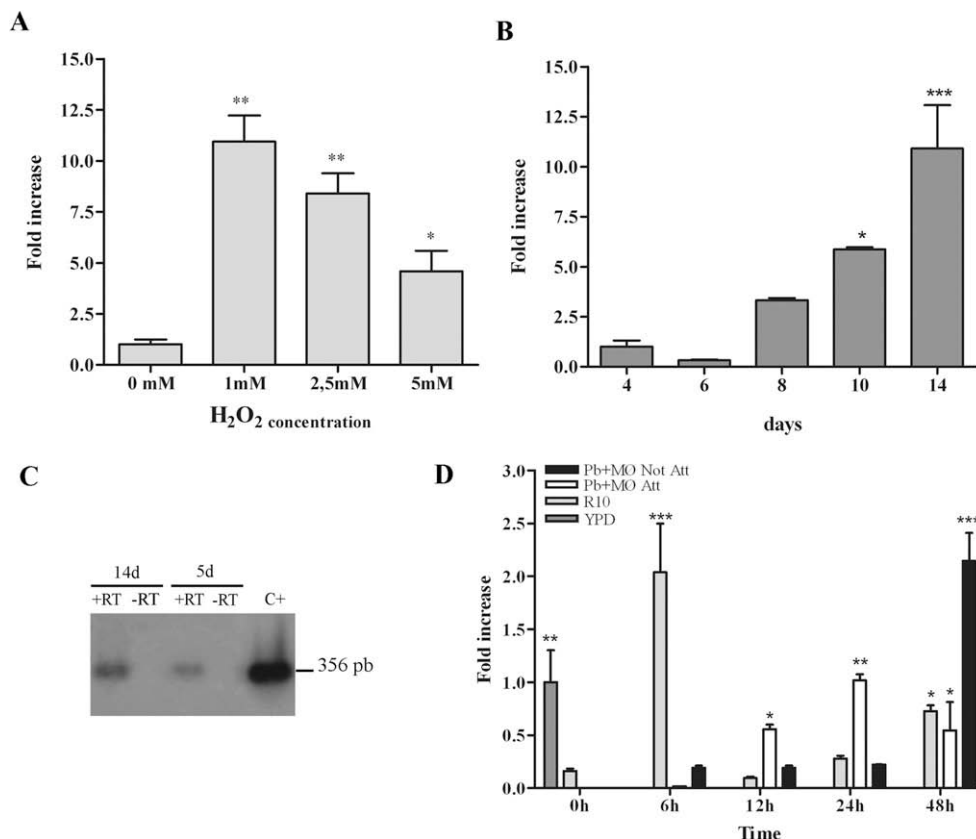


Fig. 6. *PbGP70* gene expression assays determined by real-time RT-PCR and Southern blot. (A) *PbGP70* gene expression evaluation under oxidative stress of 1 hour after the addition of the indicated concentrations of H_2O_2 to *P. brasiliensis* yeast cell cultures. Significance: * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ were obtained when comparing control groups not exposed to H_2O_2 . (B) *PbGP70* gene expression during growth of *P. brasiliensis* yeast cells in liquid cultures. Significance: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ were obtained when compared with the 4-day growth group. (C) Southern blot analysis of RT-PCR products with SE1/E2 primers and total RNA extracted from *P. brasiliensis* cells at 5 and 14 days of growth; (-RT), reactions carried out in the absence of reverse transcriptase (negative controls); (+RT), reactions carried out in the presence of reverse transcriptase. (C+), genomic PCR product with primers SE1/E2 (positive control). SE1/E2 fragment produced by PCR using genomic DNA was used as probe. (D) *PbGP70* gene expression after the incubation of *P. brasiliensis* yeast cells with murine BMM at the indicated time points. YPD, expression in *P. brasiliensis* yeast cells grown in YPD media prior to incubation in R10 medium (control). R10, expression in *P. brasiliensis* yeast cells incubated in R10 medium in the absence of BMM (control). Pb + MØ Not Att expression in non-bound *P. brasiliensis*; Pb + MØ Att expression in *P. brasiliensis* bound or internalized by BMM. Significance: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ were obtained when compared with the R10 0h group. Results are representative of at least two individual experiments.

10% FBS, suggesting that the serum itself probably stimulates PbGP70 gene expression in the early stages of the assay.

4. Discussion

The focus of the present work is the glycoprotein gp70 from *P. brasiliensis*, which is recognized by 96% of the sera from untreated patients suffering from PCM (Camargo et al., 1989). This important molecule not only is a marker for active disease, but also has *in vitro* immunomodulatory abilities, including induction of lymphoproliferative responses when tested with PCM patients' lymphocytes (Benard et al., 1997) and down-regulation of peritoneal macrophage functions such as phagocytosis, NO and H₂O₂ production, as demonstrated previously by our group (Grosso et al., 2003). *In vivo*, MAbC5F11 monoclonal antibody anti-gp70 conferred immunoprotection when administered in the beginning and during PCM infection in mice. Hence, gp70 blockade somehow prevents the infection, reinforcing its role in pathogenesis.

Presently, we managed to unravel the nature of the gp70 antigen by cloning and characterizing its gene. We expressed the N-terminal half of PbGP70 in bacteria (rPbgp70), raised polyclonal anti-rPbgp70 and used these biological tools to confirm immunological identity. Anti-native gp70 MAbC5F11 recognized the partial 35-kDa recombinant protein as much as polyclonal IgG anti-rPbgp70 recognized the 70-kDa component corresponding to gp70 in total cell extract from *P. brasiliensis*. More importantly, confocal microscopy showed co-localization of gp70 and the component recognized by anti-rPbgp70. There was intense and predominantly cytoplasm staining with both anti-rPbgp70 and MAbC5F11, confirming previous findings (Grosso et al., 2003) and providing strong evidence that the cloned PbGP70 gene encodes the gp70 antigen.

The PbGP70 has no introns in Pb18 and Pb3 and encodes a protein sequence of 718 amino acids. In that sequence, we found the presence of (i) gp70 native peptides; (ii) two putative sites for N-glycosylation; (iii) high antigenicity and hydrophilicity index; (iv) two putative T-cell epitopes. These features were concentrated in the expressed N-terminal half of Pbgp70. Hence, it was not surprising that rPbgp70 was recognized in immunoblotting by 5 out of 7 PCM patients' sera, showing its possible application as an additional tool in PCM diagnosis.

One important finding was the presence of two potential T-cell epitopes in the Pbgp70 sequence. It is well established that cellular immune response to *P. brasiliensis* is protective in humans (Brummer et al., 1993; Franco et al., 1993) and in murine models (Cano et al., 1995; Calich et al., 1985; Travassos et al., 2004b). Studies with T-cell epitopes derived from gp43 are promising to develop new strategies of PCM immunotherapy (Marques et al., 2008; Taborda et al., 2004), as well as a vaccine for PCM (Braga et al., 2009; Travassos et al., 2008). Thus, further studies using synthetic peptides corresponding to the two T-cell epitopes found in Pbgp70 sequence would be necessary. We speculate that as these epitopes are conserved among the protein homologs in other fungal species phylogenetically close to *P. brasiliensis*, it might be relevant to carry out studies aiming at the development of a polyvalent vaccine to systemic mycosis.

An intriguing point in the present findings is that the estimated molecular weight of the deduced Pbgp70 protein is about 79 kDa. In addition, gp70 loses about 9 kDa after endoglycosidase H-mediated N-deglycosylation (data not shown). One possible explanation for these differences is the fact that some proteins undergo post-translational modifications resulting in loss of amino acid residues. This is the case of GPI modifications in proteins having a glycosyl-phosphatidylinositol (GPI) membrane anchor (Yan et al., 1998) or even of endoproteolytic processing that is re-

quired to generate proteins in a mature and biologically active form. This cleavage generally occurs at sites containing motifs of basic amino acids often paired basic residues. The first known eukaryotic enzyme with this ability was kexin (EC 3.4.21.61), a subtilisin-like serine protease that is encoded by the *kex2* gene from *Saccharomyces cerevisiae* (Van de Ven et al., 1993). In *Phanerochaete chrysosporium*, an environmental basidiomycete, the dibasic pair of amino acids motifs, that are cleavage sites for kex, are present in the deduced sequence of the 1,4-benzoquinone reductase, which is also a member of the flavoprotein family. In this protein, kex processing results in loss of 71 amino acids (Akileswaran et al., 1999). In *P. brasiliensis*, the gene encoding a kexin-like protein was identified and presents homologous functions to *S. cerevisiae* kexin (Torres et al., 2008). Thus, gp70 may be a potential target for kexin protein.

The annotation of the Pbgp70 deduced protein in the *P. brasiliensis* genome at the Broad Institute site has recently been updated from hypothetical protein to a member of the flavoprotein monooxygenase family. Before that piece of information was released, we tried to understand a possible role for gp70 in the biology of *P. brasiliensis* by investigating the expression regulation of the PbGP70 gene. Computer analysis of the 5' intergenic region predicted the presence of transcription factor binding sites for, among others, HSF, ADR-1 and GATA sequences (data not shown), all of them related to a variety of stress responses in fungi (Ruis and Schüller, 1995; Yamamoto et al., 2005). Present real-time RT-PCR results suggested that the PbGP70 gene was overexpressed upon exposure to hydrogen peroxide (oxidative stress) and with time during growth (nutritional stress). It is of note that in *P. brasiliensis*, PbY20 is an intracellular, cytoplasmatic, yeast-phase specific molecule that has recently been characterized as a member of the flavin mononucleotide flavodoxin-like WrbA family (Daher et al., 2005). The gene encoding this protein also showed increased expression in cells under oxidative stress induced by H₂O₂.

A more physiological approach of stress situation was also investigated by incubating Pb18 yeast cells with non-activated bone-marrow-derived macrophages. After 12 h of incubation, it was possible to detect increased accumulation of the PbGP70 transcript that was directly related to interaction with macrophages. After 48 h, unbound yeasts also had up-regulated PbGP70 expression. Control assays showed that the gene was also probably regulated by serum factors, as suggested by the accumulation increase after 6 h in the absence of macrophages. These results could be explained as follows: the bound/internalized yeasts had an increased PbGP70 expression in response to basal intracellular levels of NOS and ROS produced by the macrophages. After 48 h of contact, these reactive compounds were released in the supernatant, which induced PbGP70 expression in not-bound cells. As mentioned above, the PbGP70 gene was annotated as a member of the flavoprotein monooxygenase gene family; since these proteins are mainly related to anti-oxidative stress in fungi and bacteria (Van Berkel et al., 2006; Haarer and Amberg, 2004; Fitzpatrick et al., 2003; Massey, 2000), this putative function of gp70 could be reinforced by our findings. Microarray analysis of Pb01 cells bound/internalized by macrophages showed increased expression of genes commonly related with oxidative and nutritional stresses as Cu, Zu superoxide dismutase (*sod*) and cystathionine beta-lyase (*metG*), respectively (Tavares et al., 2007).

Together, these findings suggest that gp70 might play a dual role in *P. brasiliensis* biology and infection. On the one hand, it would elicit immune response in the host due to antigenic and putative protective epitopes. On the other hand, gp70 might act protecting the fungus against the oxidative stress generated during growth or by the host immune responses, as in phagocytosis. Further investigation is necessary to prove these hypotheses.

Acknowledgments

We are indebted to Creuza Rosa de Oliveira, Geova Pereira, Caroline Z. Romera, Elizabeth N. Kanashiro and PhD. Patricia Xander Batista for generous technical assistance. This work was supported by FAPESP and CAPES.

References

- Akileswaran, L., Brock, B.J., Cereghino, J.L., Gold, M.H., 1999. 1,4-benzoquinone reductase from *Phanerochaete chrysosporium*: cDNA cloning and regulation of expression. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 415–421.
- Batista, W.L., Matsuo, A.L., Ganiko, L., Barros, T.F., Veiga, T.R., Freymuller, E., Puccia, R., 2006. The *PbMDJ1* gene belongs to a conserved MDJ1/LON locus in thermomimorphic pathogenic fungi and encodes a heat shock protein that localizes to both the mitochondria and cell wall of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Eukaryot. Cell* 5, 379–390.
- Batista, W.L., Barros, T.F., Goldman, G.H., Morais, F.V., Puccia, R., 2007. Identification of transcription elements in the 5' intergenic region shared by LON and MDJ1 heat shock genes from the human pathogen *Paracoccidioides brasiliensis*. Evaluation of gene expression. *Fungal Genet. Biol.* 44, 347–356.
- Benard, G., Mendes-Giannini, M.J.S., Juvenale, M., Miranda, E.T., Duarte, A.J.S., 1997. Immunosuppression in paracoccidioidomycosis: T cell hyporesponsiveness to two *Paracoccidioides brasiliensis* glycoproteins that elicit strong humoral immune response. *J. Infect. Dis.* 175, 1263–1267.
- Braga, C.J., Rittner, G.M., Muñoz-Henao, J.E., Teixeira, A.F., Massis, L.M., Sbrogio-Almeida, M.E., Taborda, C.P., Travassos, L.R., Ferreira, L.C., 2009. *Paracoccidioides brasiliensis* vaccine formulations based on the gp43-derived P10 sequence and the *Salmonella enterica* FlitC flagellin. *Infect. Immun.* 77, 1700–1707.
- Brummer, E., Hanson, L.H., Restrepo, A., Stevens, D.A., 1989. Intracellular multiplication of *Paracoccidioides brasiliensis* in macrophages: killing and restriction of multiplication by activated macrophages. *Infect. Immun.* 57, 2289–2294.
- Brummer, E., Castañeda, E., Restrepo, A., 1993. Paracoccidioidomycosis – An update. *Clin. Microbiol. Rev.* 6, 89–117.
- Calich, V.L., Singer-Vermes, L.M., Siqueira, A.M., Burger, E., 1985. Susceptibility and resistance of inbred mice to *Paracoccidioides brasiliensis*. *Br. J. Experiment. Pathol.* 66, 585–594.
- Calich, V.L., Vaz, C.A., Burger, E., 1998. Immunity to *Paracoccidioides brasiliensis* infection. *Res. Immunol.* 149, 407–417.
- Camargo, Z.P., Unterkircher, C., Travassos, L.R., 1989. Identification of antigenic polypeptides of *Paracoccidioides brasiliensis* by immunoblotting. *J. Med. Vet. Mycol.* 27, 407–412.
- Cano, L.E., Singer-Vermes, L.M., Vaz, C.A.C., Russo, M., Calich, V.L.G., 1995. Pulmonary Paracoccidioidomycosis in resistant and susceptible mice – Relationship among progression of infection, bronchoalveolar cell activation, cellular immune-response, and specific isotype patterns. *Infect. Immun.* 63, 1777–1783.
- Castañeda, E., Brummer, E., Pappagianis, D., Stevens, D.A., 1988. Impairment of cellular but, not humoral response in chronic pulmonary and disseminated paracoccidioidomycosis in mice. *Infect. Immun.* 56, 1771–1777.
- Cisalpino, P.S., Puccia, R., Yamauchi, L.M., Cano, M.J.N., da Silveira, J.F., Travassos, L.R., 1996. Cloning, characterization, and epitope expression of the major diagnostic antigen of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J. Biol. Chem.* 271, 4553–4560.
- Daher, B.S., Venancio, E.J., de Freitas, S.M., Bão, S.N., Vianney, P.V., Andrade, R.V., Dantas, A.S., Soares, C.M., Silva-Pereira, I., Felipe, M.S., 2005. The highly expressed yeast gene *PbY20* from *Paracoccidioides brasiliensis* encodes a flavodoxin-like protein. *Fungal Genet. Biol.* 42, 434–443.
- Feitoso, L.S., Soares, C.M.A., dos Santos, M.R.M., Bailão, A.M., Xander, P., Mortara, R.A., Lopes, J.D., 2007. Cloning, characterization and expression of a calnexin homologue from pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Yeast* 24, 79–87.
- Felipe, M.S., Andrade, R.V., Arraes, F.B., Nicola, A.M., Maranhão, A.Q., Torres, F.A., Silva-Pereira, I., Pocas-Fonseca, M.J., Campos, E.G., Moraes, L.M., Andrade, P.A., Tavares, A.H., Silva, S.S., Kyaw, C.M., Souza, D.P., Network, P., Pereira, M., Jesuino, R.S., Andrade, E.V., Parente, J.A., Oliveira, G.S., Barbosa, M.S., Martins, N.F., Fachin, A.L., Cardoso, R.S., Passos, G.A., Almeida, N.F., Walter, M.E., Soares, C.M., Carvalho, M.J., Brígido, M.M., 2005. Transcriptional profiles of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* in mycelium and yeast cells. *J. Biol. Chem.* 280, 24706–24714.
- Fitzpatrick, T.B., Amrhein, N., Marcheroux, P., 2003. Characterization of YqjM, an old yellow enzyme homolog from *Bacillus subtilis* involved in the oxidative stress response. *J. Biol. Chem.* 278, 19891–19897.
- Franco, M., Peracoli, M.T., Soares, A., Montenegro, R., Mendes, R.P., Meira, D.A., 1993. Host-parasite relationship in paracoccidioidomycosis. *Curr. Top. Med. Mycol.* 5, 115–149.
- Franco, M., Montenegro, R.M., Mendes, R.P., Marques, S.A., Dillon, N.L., Mota, N.G.S., 1987. Paracoccidioidomycosis: a recent proposed classification of its clinical forms. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 20, 129.
- Gasch, A.P., Spellman, P.T., Kao, C.M., Carmel-Harel, O., Eisen, M.B., Storz, G., Botstein, D., Brown, P.O., 2000. Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Mol. Biol. Cell.* 11, 4241–4257.
- Goldman, G.H., Marques, E.D., Ribeiro, D.C.D., Bernardes, L.A.D., Quiapin, A.C., Vitorelli, P.M., Savoldi, M., Semighini, C.P., de Oliveira, R.C., Nunes, L.R., Travassos, L.R., Puccia, R., Batista, W.L., Ferreira, L.E., Moreira, J.C., Bogossian, A.P., Tekaia, F., Nobrega, M.P., Nobrega, F.G., Goldman, M.H.S., 2003. Expressed sequence tag analysis of the human pathogen *Paracoccidioides brasiliensis* yeast phase: identification of putative homologues of *Candida albicans* virulence and pathogenicity genes. *Eukaryot. Cell* 2, 34–48.
- Grosso, D. de M., de Almeida, S.R., Mariano, M., Lopes, J.D., 2003. Characterization of gp70 and anti-gp70 monoclonal antibodies in *Paracoccidioides brasiliensis* pathogenesis. *Infect. Immun.* 71, 6534–6542.
- Haarer, B.K., Amberg, D.C., 2004. Old yellow enzyme protects the actin cytoskeleton from oxidative stress. *Mol. Biol. Cell* 15, 4522–4531.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.
- Leclerc, M.C., Philippe, H., Guého, E., 1994. Phylogeny of dermatophytes and dimorphic fungi based on large subunit ribosomal RNA sequence comparisons. *J. Med. Vet. Mycol.* 32, 331–341.
- Marques, A.F., da Silva, M.B., Juliano, M.A., Munhöz, J.E., Travassos, L.R., Taborda, C.P., 2008. Additive effect of P10 immunization and chemotherapy in anergic mice challenged intratracheally with virulent yeasts of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Microbes Infect.* 10, 1251–1258.
- Marzluf, G.A., 1997. Genetic regulation of nitrogen metabolism in the fungi. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61, 17–32.
- Massey, V., 2000. The chemical and biological versatility of riboflavin. *Biochem. Soc. Trans.* 28, 283–296.
- Matute, D.R., McEwen, J.G., Puccia, R., Montes, B.A., San-Blas, G., Bagagli, E., Rauscher, J.T., Restrepo, A., Morais, F., Niño-Vega, G., Taylor, J.W., 2006. Cryptic speciation and recombination in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* as revealed by gene genealogies. *Mol. Biol. Evol.* 23, 65–73.
- McEwen, J.G., Bedoya, V., Patino, M.M., Salazar, M.E., Restrepo, A., 1987. Experimental murine Paracoccidioidomycosis induced by the inhalation of conidia. *J. Med. Vet. Mycol.* 25, 165–175.
- Morais, F.V., Barros, T.F., Fukada, M.K., Cisalpino, P.S., Puccia, R., 2000. Polymorphism in the gene coding for the immunodominant antigen gp43 from the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *J. Clin. Microbiol.* 38, 3960–3966.
- Musatti, C. C., Peracoli, M. T. S., Soares, A. M. V., C., Rezakallah-Iwasso, M. T., 1994. Cell-mediated immunity in patients with paracoccidioidomycosis. In: Franco, M., Lacaz, C. S., Restrepo, A., Del Negro, G. Paracoccidioidomycosis, Boca Raton, London, pp. 175–186.
- Peterson, S.W., Sigler, L., 1998. Molecular genetic variation in *Emmonsia crescens* and *Emmonsia parva*, etiologic agents of adiaspiromycosis, and their phylogenetic relationship to *Blastomyces dermatitidis* (*Ajellomyces dermatitidis*) and other systemic fungal pathogens. *J. Clin. Microbiol.* 36, 2918–2925.
- Prado, M., da Silva, M.B., Laurenti, R., Travassos, L.R., Taborda, C.P., 2009. Mortality due to systemic mycoses as a primary cause of death or in association with AIDS in Brazil: a review from 1996 to 2006. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 104, 513–521.
- Puccia, R., Schenkman, S., Gorin, P.A., Travassos, L.R., 1986. Exocellular components of *Paracoccidioides brasiliensis*: identification of a specific antigen. *Infect. Immun.* 53, 199–206.
- Ruis, H., Schüller, C., 1995. Stress signaling in yeast. *BioEssays* 17, 959–965.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor laboratory Press, New York.
- San-Blas, G., 1993. Paracoccidioidomycosis and its etiologic agent *Paracoccidioides brasiliensis*. *J. Med. Vet. Mycol.* 31, 99–113.
- Scazzocchio, C., 2000. The fungal GATA factors. *Curr. Opin. Microbiol.* 3, 126–131.
- Semighini, C.P., de Camargo, Z.P., Puccia, R., Goldman, M.H., Goldman, G.H., 2002. Molecular identification of *Paracoccidioides brasiliensis* by 5' nuclease assay. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 44, 383–386.
- Sheffield, P., Garrard, S., Derewenda, Z., 1999. Overcoming expression and purification problems of RhoGDI using a family of "parallel" expression vectors. *Protein Expr. Purif.* 15, 34–39.
- Silva, S.H., Grosso, D. de M., Lopes, J.D., Colombo, A.L., Blotta, M.H., Queiroz-Telles, F., de Camargo, Z.P., 2004. Detection of *Paracoccidioides brasiliensis* gp70 circulating antigen and follow-up of patients undergoing antimycotic therapy. *J. Clin. Microbiol.* 42, 4480–4486.
- Taborda, C.P., Nakaie, C.R., Cilli, E.M., Rodrigues, E.G., Silva, L.S., Franco, M.F., Travassos, L.R., 2004. Synthesis and immunological activity of a branched peptide carrying the T-cell epitope of gp43, the major exocellular antigen of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Scand. J. Immunol.* 59, 58–65.
- Tavares, A.H., Silva, S.S., Dantas, A., Campos, E.G., Andrade, R.V., Maranhão, A.Q., Brígido, M.M., Passos-Silva, D.G., Fachin, A.L., Teixeira, S.M., Passos, G.A., Soares, C.M., Bocca, A.L., Carvalho, M.J., Silva-Pereira, I., Felipe, M.S., 2007. Early transcriptional response of *Paracoccidioides brasiliensis* upon internalization by murine macrophages. *Microbes Infect.* 9, 583–590.
- Teixeira, M.M., Theodoro, R.C., de Carvalho, M.J., Fernandes, L., Paes, H.C., Hahn, R.C., Mendoza, L., Bagagli, E., San-Blas, G., Felipe, M.S., 2009. Phylogenetic analysis reveals a high level of speciation in the *Paracoccidioides* genus. *Mol. Phylogenet. Evol.* 52, 273–283.
- Torres, F.A., Vilaça, R., Pepe de Moraes, L.M., Reis, V.C., Felipe, M.S., 2008. Expression of a kexin-like gene from the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* in *Saccharomyces cerevisiae*. *Med. Mycol.* 46, 385–388.
- Travassos, L.R., Taborda, C.P., Iwai, L.K., Cunha-Neto, E., Puccia, R., 2004. The gp43 from *Paracoccidioides brasiliensis*: a major diagnostic antigen and vaccine candidate. In: Dömer, J.E., Kobayashi, G.S. (Eds.), *Mycota XII – Human Fungal Pathogens*. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, pp. 279–296.

- Travassos, L.R., Casadevall, A., Taborda, C.P., 2004b. Immunomodulation and immunoprotection in fungal infections: humoral and cellular immune responses. In: San-Blas, G., Calderoni, R.A. (Eds.), *Pathogenic Fungi: Host Interactions and Emerging Strategies for Control*. Caister Academic Press, Norfolk, England, pp. 241–283.
- Travassos, L.R., Rodrigues, E.G., Iwai, L.K., Taborda, C.P., 2008. Attempts at a peptide vaccine against paracoccidioidomycosis, adjuvant to chemotherapy. *Mycopathologia* 165, 341–352.
- Untereiner, W.A., Scott, J.A., Naveaus, F.A., Sigler, L., Bachewich, J., Angus, A., 2004. The Ajellomycetaceae, a new family of vertebrate-associated Onygenales. *Mycology* 96, 812–861.
- Van Berkel, W.J., Kamerbeek, N.M., Fraaije, M.W., 2006. Flavoprotein monooxygenases, a diverse class of oxidative biocatalysts. *J. Biotechnol.* 124, 670–689.
- Van de Ven, W.J., Roebroek, A.J., Van Duijnhoven, H.L., 1993. Structure and function of eukaryotic proprotein processing enzymes of the subtilisin family of serine proteases. *Crit. Rev. Oncog.* 4, 115–136.
- Yamamoto, A., Mizukami, Y., Sakurai, H., 2005. Identification of a novel class of target genes and a novel type of binding sequence of heat shock transcription factor in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 280, 11911–11919.
- Yan, W., Shen, F., Dillon, B., Ratnam, M.J., 1998. The hydrophobic domains in the carboxyl-terminal signal for GPI modification and in the amino-terminal leader peptide have similar structural requirements. *Mol. Biol.* 275, 25–33.
- Zamboni, D.S., Rabinovitch, M., 2003. Nitric oxide partially controls *Coxiella burnetii* phase II infection in mouse primary macrophages. *Infect. Immun.* 71, 122.

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](#)