

ELLEN TIHE GRAVI

**IDENTIFICAÇÃO DE ATIVIDADE
METALO-OLIGOPEPTIDÁSICA THIMET-LIKE EM
Paracoccidioides brasiliensis: UM NOVO FATOR
DE PATOGENICIDADE FÚNGICA?**

Tese apresentada à Universidade
Federal de São Paulo, para
obtenção do título de Doutor em
Ciências.

São Paulo
2010

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

ELLEN TIHE GRAVI

**IDENTIFICAÇÃO DE ATIVIDADE
METALO-OLIGOPEPTIDÁSICA THIMET-LIKE EM
Paracoccidioides brasiliensis: UM NOVO FATOR
DE PATOGENICIDADE FÚNGICA?**

Orientadora: Profa Dra. Elaine Guadalupe Rodrigues

Co-orientadora: Profa Dra. Adriana K. Carmona

Tese apresentada à Universidade
Federal de São Paulo, para
obtenção do título de Doutor em
Ciências.

São Paulo
2010

Gravi, Ellen Tihe

Identificação de atividade metalo-oligopeptidásica Thimet-like em *Paracoccidioides brasiliensis*: um novo fator de patogenicidade fúngica?/ Ellen Tihe Gravi – São Paulo, 2010.
162 f.

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

Título em inglês: Identification of a metalo-oligopeptidasic TOP-like activity in *Paracoccidioides brasiliensis*: a novel factor of fungal pathogenicity?

1. *Paracoccidioides brasiliensis*
2. thimet oligopeptidase
3. peptidase intermediária de mitocôndria
4. saccharolisina
5. patogenicidade

Trabalho realizado na Unidade de Oncologia Experimental (UNONEX), no Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, da Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina – com auxílio financeiro concedido pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

Duas coisas são infinitas: o universo e a estupidez humana. Mas, no que respeita ao universo, ainda não adquiri a certeza absoluta.

Se A é o sucesso, então A é igual a X mais Y mais Z. O trabalho é X; Y é o lazer; e Z é manter a boca fechada.

O único lugar onde sucesso vem antes do trabalho é no dicionário.

Albert Einstein

A genialidade é 1% inspiração e 99% transpiração."

Thomas Edison

Nunca tenha medo de tentar algo novo. Lembre-se, os amadores construíram a arca e profissionais construíram o Titanic.

Autor Desconhecido

Aos meus pais, Walter e Margarete, por todo o amor, paciência, "pai-trocínios" e por mais esta oportunidade.

À Silvia, que representa todos os meus amigos, pelo apoio, pela paciência e pela ajuda para esta "filha" nascer.

Ao meu afilhado, Pietro, que um sorriso garante a felicidade da semana.

AGRADECIMENTOS

Dizem que na vida temos que escrever um livro, plantar uma árvore e ter um filho. Já plantei mais de uma árvore, uma tese é como um livro e dizem que é como ter um filho, ainda não sei se é igual, mas têm muitas alegrias, noites em claro, preocupações, mágoas, conhecimento e o “parto” é difícil...

Agradecer é complicado... É possível fazer isso só com palavras? Tenho a consciência de que vou esquecer de agradecer muitas pessoas que ajudaram diretamente ou indiretamente neste trabalho. Ainda bem que papai e mamãe me ensinaram a ser educadinha e pelo menos um “obrigada” as pessoas receberam.

De alguma maneira, as pessoas que ajudaram neste trabalho, ajudaram de várias formas, colocando a mão na massa, nas discussões científicas ou sobre outros temas, na construção do padrão de ética que adoto, nos relacionamentos profissionais e pessoais entre tantos outros exemplos

Ainda não decidi qual religião seguir. Acho que tento fazer uma mistura de todas, pois todas têm seu lado positivo e negativo, mas acredito que exista uma força (may the force be with you), algo que faça o mundo “acontecer”. Cada religião chama essa força de um nome, mas é a ela que tenho que agradecer.

À minha orientadora Profa. Dra. Elaine G. Rodrigues, pela orientação, conselhos, discussões e conversas. Eu no meu começo da carreira científica e ela na fase das primeiras orientações de doutorado. Espero que este tempo de convivência, as experiências aprendidas – com muitas tentativas e erros –

sirva para ambas no futuro, para não repetir os erros e continuar com os acertos e aprender sempre. Espero que tenha contribuído para o crescimento profissional e pessoal dela, assim como ela contribuiu para o meu.

À minha co-orientadora, Prof. Dra. Adriana K. Carmona, que entrou neste trabalho em um momento ótimo, com os experimentos “mágicos” (resultados que se vê na hora, porque tem horas que trabalhar com fungo dá vontade de chorar). Aprendi que é possível dar atenção a todos, fazer mil coisas ao mesmo tempo e conseguir ter vida “lá fora”. Além das várias sugestões científicas no meu trabalho, a paciência e os empurrões (pra frente, claro).

Ao “chefe”, Prof. Dr. Luiz Rodolpho Travassos, pelas boas histórias científicas ou não, pelos conselhos científicos, gastronômicos, etc. Um grande cientista.

À Thaysa, que se não fosse a ajuda, a tese teria umas dez páginas. Thá, obrigada por tudo, pelas reuniões gastronômicas em sua casa, pela companhia na viagem de 2007, pelos scraps, pela força, pela paciência (gafanhoto) e pelo nosso sobrinho científico foférrimo que é o Luiz Gustavo. Quando ficarmos gagazinhas, a gente abre o nosso restaurante.

À Márcia, além de oficialmente nossa secretária, dona do “fala que eu te escuto”, uma grande amiga, companheira de garfo, micos e risadas, muitas risadas (rir é o melhor remédio e tem gente que ainda duvida disso). Suuuuper obrigada.

À Profa. Dra. Olga Fischman Gompertz, uma “querida”, sempre com boas histórias e conselhos. Tenho muito carinho e admiração pela senhora.

À “velha-guarda” da UNONEX, Andrey, Bianca, Carla, Flávia, Luis (companheiro de LOST), Thaysa e alguns novos, Denise, Eliana, Fabiana, Filipe, Felipe, Karina, Natasha, entre tantos outros que passaram ou ainda estão por lá. Ao “adendo” da UNONEX por um tempo, o Dayson, pela ajuda nos experimentos de qPCR.

Aos alunos da Biocel dos outros laboratórios, Alexandre, Antônio, Kátia, Larissa, Milene, Wagner, Luciane, Rodrigo, Junior, Vivian, Rafael, Mococa, Sheila, Teresa, entre tantos outros.

À todos os funcionários da Biologia Celular, em especial ao Seu Américo e a Maria.

Aos vários professores que ajudaram neste trabalho: Rosana Puccia, Sérgio Schenkman, Adriana Carmona, Olga Fischman, Vitor Oliveira, Zoilo Camargo, Luiz Juliano e Maria Juliano por disponibilizarem seus laboratórios, equipamentos, reagentes e opiniões.

À Silvia, por ser minha amiga há tanto tempo, entender os “dramas” e dar os puxões de orelha quando precisava. Ao “abrigo” em PoA, uma cidade que aprendi a amar e é o meu refúgio. O quarteto não ficaria completo sem a Paula e a Cintia, amigas do coração também. Tem horas que eu não acredito seis meses de convivência podem fazer. Será que um dia, todas nós iremos morar de novo na mesma cidade?

À duas pessoas especiais que me acompanham desde a graduação: Carmen e Mariana (Dida). Ah, que saudades do nosso convívio diário, nossas conversas, discussões, troca de idéias... Ainda bem que existe a internet para diminuir a distância. As duas me ajudaram e me ajudam sempre.

À Amanda e o Daniel, por me darem o prazer de ser madrinha do Pietro, a pessoinha que me faz sorrir em qualquer situação, até quando apronta e eu tenho que fingir de brava, mas me derreto toda.

Ao pessoal "de Floripa", por ter a chance de conhecê-los, dar muitas risadas, "ampliar" o universo musical, restaurar a sanidade e viver um pouco no mundo "normal". Em especial ao Thiago (cunhadinho do coração), Cristiano, Carlos, João, Betinho, Marcio (Gato Querido), Rafaela (Fafi) , Vicky e ao Garcia (grandes lições de administração e como ganhar dinheiro).

Às Baddies/Troobies, Aline, Beta e Mari, por compartilharem comigo momentos especiais e serem "tri-queridas".

Aos professores e colegas de atividades "extras", do francês (Liza, Estela, Catherine, Daniel, Liliane, Lucie, Rosalie, Jeff, Juliano, Rafael, Roberto, Fernanda), do violão (Ricardo e Marcos Davi) e do curso de Micro (Vanessa, Juliana e Débora). Minha sanidade mental agradece, e muito.

Aos vários professores e alunos, pela atitude diante de determinada situação, por me mostrarem exatamente como eu não quero ser/agir.

Aos meus pais, sem eles este trabalho não seria completado. É muita paciência, patrocínio, amor e dedicação, já falei paciência? E também ao resto da minha família.

ÍNDICE

	ABREVIACÕES	i
	Abreviações de aminoácidos.....	i
	Outras abreviações.....	ii
	ABSTRACT	iii
	RESUMO	vi
1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Classificação das peptidases.....	3
1.2	Metalo-peptidases.....	5
1.2.1	Thimet oligopeptidase (TOP, EC 3.4.24.15) e neurolisina (NEL, EC 3.4.24.16).	8
1.2.2	Neprilisina (NEP, 3.4.24.11)	11
1.2.3	Sacarolisina (EC 3.4.24.37)	12
1.2.4	Peptidase intermediária de mitocôndria (MIP, EC 3.4.24.59)	14
1.3	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i> e paracoccidioidomicose.....	16
1.4	Metalo-peptidases fúngicas.....	22
1.5	Peptidases já descritas em <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	24
2	OBJETIVOS	26
3	MATERIAIS E MÉTODOS	27
3.1	Enzimas, anticorpos e plasmídeos recombinantes.....	27
3.2	Animais.....	27
3.3	Isolados fúngicos.....	28
3.4	Cultivo dos fungos na fase leveduriforme.....	28
3.5	Infecção de camundongos Balb/c com isolados de <i>P. brasiliensis</i>	28
3.6	Obtenção do lisado total e de frações citosólica e de membrana das leveduras do <i>P. brasiliensis</i>	29
3.7	Obtenção do sobrenadante de cultura das leveduras para determinação da cinética de secreção da enzima com atividade oligopeptidásica.	30
3.8	Determinação da atividade oligopeptidásica no lisado e sobrenadante de leveduras de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	30

3.9	Determinação dos pontos de clivagem da bradiginina e do substrato Abz-GFSPFRQ-EDDnp.....	32
3.10	Purificação de IgGs a partir de soro de pacientes com paracoccidiodomicose.....	33
3.11	Ensaio de inibição de atividade oligopeptidásica do lisado de <i>P. brasiliensis</i> por imunoglobulinas anti- <i>P. brasiliensis</i>	34
3.12	Purificação da enzima nativa.....	34
3.12.1	Separação dos componentes com atividade enzimática do lisado de leveduras de <i>P. brasiliensis</i> em cromatografia de filtração em gel	34
3.12.2	Seleção de peptídeos para imunização de camundongos e obtenção de soro policlonal específico.....	35
3.12.3	Ensaio de hemólise.....	38
3.12.4	Imunização de camundongos com peptídeos para produção de anticorpos específicos	38
3.12.5	ELISA-Q	39
3.12.6	Montagem de coluna de afinidade CNBr-Sepharose 4B com anticorpos policlonais monoespecíficos e purificação da peptidase nativa.....	40
3.13	Eletroforese vertical em gel de poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE)	41
3.14	<i>Immunoblotting</i>	42
3.15	Obtenção da enzima recombinante.....	43
3.15.1	Subclonagem para expressão da metalo-peptidase proveniente de biblioteca genômica de <i>P. brasiliensis</i>	43
3.15.2	Clonagem do gene para expressão da metalo-peptidase de <i>P. brasiliensis</i>	44
3.15.2.1	Extração de RNA total.....	44
3.15.2.2	Sequenciamento do cDNA dos homólogos de TOP e MIP de <i>P. brasiliensis</i>	46
3.15.2.3	Construção do vetor de expressão pHis3- PbTOP e pHis3-PbMIP.....	47
3.15.2.4	Mini-preparação por lise alcalina.....	48

3.15.2.5	Indução da expressão do homólogo de TOP de <i>P. brasiliensis</i> recombinante em <i>E. coli</i>	49
3.16	RT-PCR Quantitativo (REAL TIME-PCR, ou qRT-PCR)	49
3.16.1	Confiança dos genes endógenos.....	51
3.16.2	Análise REST2008.....	51
3.17	Cladograma.....	52
3.18	Análise estatística.....	53
4	RESULTADOS	54
4.1	Identificação e caracterização da atividade de metalo-oligopeptidases em leveduras do <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> ...	54
4.1.1	Hidrólise de substratos fluorogênicos.....	54
4.1.2	Inibição da atividade peptidásica.....	60
4.1.3	Determinação do ponto de clivagem da bradiginina (BK) e do substrato Abz-GFSPFRQ-EDDnp	62
4.2	Expressão de proteínas homólogas à TOP e MIP de mamíferos no lisado de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	65
4.3	Tentativas de obtenção da metalo-peptidase com atividade TOP-like de <i>P. brasiliensis</i> : peptidase recombinante ou nativa...	68
4.3.1	Purificação da proteína nativa por cromatografia filtração em gel.....	68
4.3.2	Obtenção da metalo-peptidase recombinante	70
4.4	Purificação da proteína nativa em coluna de afinidade com anticorpos específicos.....	78
4.5	Determinação do possível papel biológico da oligopeptidase com atividade TOP-like de <i>P. brasiliensis</i>	94
4.6	Expressão da oligopeptidase com atividade TOP-like e gp43 em isolados de <i>P. brasiliensis</i> com diferentes virulências.....	99
4.7	Análise filogenética de metalo-oligopeptidases de mamíferos, fúngicas e bacterianas.....	108
5	DISCUSSÃO	111
6	CONCLUSÕES	119
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	122

ABREVIÇÕES DE AMINOÁCIDOS

Aminoácidos	3 letras	1 letra
ÁCIDO ASPÁRTICO	Asp	D
ÁCIDO GLUTÂMICO	Glu	E
ALANINA	Ala	A
ARGININA	Arg	R
ASPARAGINA	Asn	N
CISTEÍNA	Cys	C
FENILALANINA	Phe	F
GLICINA	Gly	G
GLUTAMINA	Gln	Q
HISTIDINA	His	H
ISOLEUCINA	Ile	I
LEUCINA	Leu	L
LISINA	Lys	K
METIONINA	Met	M
PROLINA	Pro	P
SERINA	Ser	S
TIROSINA	Tyr	Y
TREONINA	Thr	T
TRIPTOFANO	Trp	W
VALINA	Val	V

OUTRAS ABREVIÇÕES

Abz	Ácido <i>orto</i> -aminobenzóico
BK	Bradicinina
cDNA	DNA complementar
Dcp	Dipeptidil carboxipeptidase, EC 3.4.15.5
E-64	L-trans-epoxisuccinil-L-leucilamido (4-guanidino)-butano
EDDnp	<i>N</i> -[2,4-dinitrofenil]etilenodiamino
Elisa-Q	Elisa quimioluminescente
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
IgG	Imunoglobulina isotipo G
IPTG	isopropil β -D-tiogalactosideo
JA-2	<i>N</i> -[1(R,S)-carboxi-3-fenilpropil]-Ala-Aib-Tyr- <i>p</i> -aminobenzoato
kDa	kilodalton
MIP	Peptidase intermediária de mitocôndria, EC 4.4.24.59
NEP	Neprilisina, EC 3.4.24.11
NT	Neurotensina
OpdA	Oligopeptidase A, EC 3.4.24.70
PBS	Tampão fosfato salina
Pb	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
Pb18NV	<i>P. brasiliensis</i> , isolado 18, não virulento
Pb18V	<i>P. brasiliensis</i> , isolado 18, virulento
PCM	paracoccidoidomicose
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonila
qPCR	PCR quantitativo
RT-PCR	Transcriptase reversa – Reação da Polimerase em Cadeia
SDS	N-dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS
TOP	Thimet oligopeptidase, EC 4.4.24.15
X e Xaa	Diferentes aminoácidos

Abstract

Paracoccidioidomycosis (PCM), caused by the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb) is a systemic mycosis with severe acute and chronic forms. Proteases or peptidases are proteolytic enzymes that occur in all organisms and constitute 1-5% of their genetic contents. These enzymes are involved in biological processes such as blood clotting, cell death and tissue differentiation. Several important proteolytic steps occur during the invasion of metastatic tumors, as well as in the infection of a large number of viruses and pathogens. To date, a small number of Pb proteases were isolated and characterized, also, their activities during the development of the disease was not determined, and an oligopeptidase activity was not detected in this fungus.

In the present work, we demonstrated a metallopeptidase thimet oligopeptidase (TOP)-like activity in the cytosolic extract of Pb18 yeasts. Our results shown a major hydrolysis of the fluorescence resonance energy transfer (FRET) peptide Abz-GFSPFRQ-EDDnp, preferentially cleaved by TOP from mammals, and the inhibition of the hydrolysis of this peptide by *ortho*-phenantrolin and JA-2, selective inhibitors of metalloproteases and TOP, respectively. The presence of neurolysin- *like* and neprilysin-*like*, serine-peptidases, cysteine-peptidases and angiotensin converting enzyme I was discarded by analyzing selective FRET peptides and inhibitors.

The higher peptidase activity of cytosolic extracts over the membrane/cell wall and total yeast lysate preparations may indicate that this enzyme is localized in the yeast cytosol. The metallo-oligopeptidase activity was not detected on *in vitro* culture supernatants, even after addition of fetal calf serum. However, the peptidase with TOP-like activity of

P. brasiliensis seems to be secreted *in vivo*, or released after fungal lysis by immune factors, since antibodies that can inhibit this enzymatic activity were found in sera from paracoccidioidomycosis patients, and serum with highest titer in immunodiffusion contains higher concentrations of enzyme-specific antibodies.

Bradykinin, an important inflammatory mediator *in vivo*, is cleaved by several enzymes from the M3 family. The same fragments observed after hydrolysis by TOP were observed after cytosolic extract hydrolysis of bradykinin and the substrate Abz-GFSPFRQ-EDDnp. MIP and bacterial OpdA hydrolysis of these peptides generate different fragments, and this is an additional indicator of a major TOP-like activity in *P. brasiliensis* yeast cells

Bradykinin hydrolysis by the TOP-like metallopeptidase of *P. brasiliensis* may occur in inflammatory processes and this suggests that the enzyme may be involved in the inhibition of a protective anti-fungal response induction, limiting fungal elimination.

We also observed that the expression of the TOP homologous gene in *P. brasiliensis* has almost a two-fold increased in the virulent isolate 18 compared to the non-virulent isolate. Increased hydrolysis of the substrate Abz-GFSPFRQ-EDDnp was also observed in the most virulent isolate compared to the non-virulent. The possible correlation between TOP-like peptidase expression and fungal virulence suggests that this peptidase could be classified as a fungal virulence factor, however, additional experiments are needed to confirm this hypothesis. Gp43 expression was also analyzed in both isolates, and it was observed a thirteen-fold increase in the expression on the virulent isolate.

In order to better characterize the *P. brasiliensis* TOP-like activity, we

attempted to obtain the purified recombinant or the native protein, isolated from fungal lysate. However, we were not successful in the expression of recombinant proteins and neither on the isolation of the native protein using chromatographic methods.

Our results suggest the presence of a TOP-like activity in the cytosolic fraction of *P. brasiliensis* yeasts. *In vivo* release of this enzyme after fungal lysis, or host factors-stimulated secretion, may have a role in inflammation and development of the disease.

Resumo

A paracoccidioidomicose (PCM), causada pelo fungo patogênico *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb), é uma micose sistêmica grave com formas aguda e crônica. As proteases ou peptidases são enzimas proteolíticas que ocorrem em todos os organismos e correspondem a 1-5% de seus conteúdos genéticos. Estas enzimas estão envolvidas em processos biológicos essenciais, como a coagulação sanguínea, morte celular e diferenciação de tecidos. Várias etapas proteolíticas importantes ocorrem durante a invasão metastática de tumores, assim como no ciclo de infecção de um grande número de vírus e microrganismos patogênicos. Um número reduzido de proteases do Pb já foram isoladas e caracterizadas, tampouco sua atividade durante o desenvolvimento da doença foi determinado, e até o momento, nenhuma atividade oligopeptidásica foi descrita nesse fungo.

No presente trabalho foi demonstrada a presença de uma atividade metalo-peptidásica thimet oligopeptidase (TOP)-like no extrato citosólico de leveduras de *P. brasiliensis*, isolado 18 (Pb18). Nossos resultados mostraram a hidrólise do peptídeo com supressão intramolecular de fluorescência Abz-GFSPFRQ-EDDnp pelo extrato citosólico de leveduras de *P. brasiliensis*. Esse substrato é clivado preferencialmente pela TOP de mamíferos, e corroborando esse resultado, observou-se a inibição da hidrólise desse peptídeo por *o*-fenantrolina e JA-2, inibidores seletivos de metalo-proteases e TOP, respectivamente. Utilizando-se peptídeos e inibidores seletivos para diferentes proteases, não se detectou a presença de atividade neurolisina-like ou neprilisina-like, e também se descartou a presença de serino-peptidases, cisteíno-peptidases e enzima conversora da angiotensina I.

A maior atividade enzimática do extrato citosólico sobre os outros preparados (membrana/parede celular ou lisado total das leveduras) pode indicar uma localização citosólica dessa enzima. Não foi observada a secreção da peptidase no sobrenadante de cultura *in vitro*, mesmo após adição de soro fetal bovino. Todavia, a peptidase com atividade TOP-like de Pb parece ser secretada *in vivo*, ou liberada após lise do fungo por componentes efetores da resposta imune, uma vez que anticorpos capazes de inibir a atividade peptidásica são encontrados em soros de pacientes com paracoccidiodomicose, e soros com maior título em imunodifusão contém maiores concentrações de anticorpos enzima-específicos.

Várias enzimas da família M3 clivam bradicinina, importante mediador inflamatório *in vivo*. A hidrólise da bradicinina e do substrato Abz-GFSPFRQ-EDDnp pelo extrato citosólico de *P. brasiliensis*, gera os mesmos fragmentos observados após clivagem pela TOP de mamíferos, que são diferentes dos gerados pela clivagem com MIP de mamíferos e OpdA bacteriana, sendo mais um indicador da presença majoritária de uma peptidase com atividade TOP-like em *P. brasiliensis*. A clivagem da bradicinina pela metalo-oligopeptidase com atividade TOP-like de Pb, poderia ocorrer no sítio inflamatório e poderia estar envolvida na inibição da indução de uma resposta imune protetora contra o fungo, favorecendo a permanência do mesmo no hospedeiro.

Observamos ainda que o gene homólogo de TOP em *P. brasiliensis* é quase duas vezes mais expresso no virulento em comparação ao não virulento. O aumento da hidrólise do substrato Abz-GFSPFRQ-EDDnp também foi observado no isolado de maior virulência quando comparado ao de menor virulência. A possível relação entre a expressão da metalo-

oligopeptidase com a virulência do fungo sugere que essa peptidase possa ser classificada como um fator de virulência fúngica, no entanto experimentos complementares são necessários para sua confirmação. A expressão da gp43 também foi analisada no isolado virulento e não virulento e observou-se uma expressão aumentada em até treze vezes no primeiro.

Para melhor caracterização dessas metalo-oligopeptidases é necessária a obtenção da proteína recombinante, ou da proteína purificada nativa, isolada do lisado fúngico. Não obtivemos sucesso na expressão das proteínas recombinantes, tampouco no isolamento da peptidase nativa por métodos cromatográficos.

Nossos resultados sugerem a presença de uma atividade metalo-oligopeptidásica TOP-like na fração citosólica de leveduras de *P. brasiliensis*. Liberação *in vivo* dessa enzima após a lise de fungos ou secreção estimulada por fatores do hospedeiro, pode ter um papel na inflamação e desenvolvimento da micose.

1. Introdução

As proteases ou peptidases são enzimas proteolíticas que ocorrem em todos os organismos e correspondem a 1-5% de seus conteúdos genéticos. Estas enzimas estão envolvidas em processos biológicos essenciais, como a coagulação sanguínea, morte celular e diferenciação de tecidos. Várias etapas proteolíticas importantes ocorrem durante a invasão metastática de tumores, assim como no ciclo de infecção de um grande número de vírus e microorganismos patogênicos. Estes fatos tornam as proteases um alvo quimioterápico valioso para o desenvolvimento de novos compostos farmacêuticos. As enzimas proteolíticas também participam no catabolismo de proteínas, tanto nas vias degradativas como nas biossintéticas, e na liberação de peptídeos hormonais farmacologicamente ativos a partir de proteínas precursoras. Certas modificações específicas e seletivas de proteínas durante a ativação de enzimas ocorrem via proteólise, que também colaboram no transporte de proteínas secretórias na membrana.

As proteases têm também uma variedade de aplicações principalmente na indústria de detergentes e de alimentos. Com os recentes acordos mundiais para uso de tecnologias não poluentes, as proteases começaram a ser usadas em larga escala no tratamento do couro, em substituição aos compostos tóxicos e poluentes até então usados. Na indústria farmacêutica, as proteases são usadas em pomadas cicatrizantes e têm uso potencial para outros medicamentos. As proteases hidrolisam as proteínas em peptídeos e aminoácidos, facilitando a sua absorção pelas células e devido a seu papel despolimerizante, as enzimas extracelulares têm um papel importante na nutrição (revisto em Rao et al, 1998).

Proteases são encontradas em vários microorganismos, como vírus, bactérias, protozoários e fungos. A impossibilidade das proteases de plantas e animais atenderem à demanda mundial de enzimas tem levado a um interesse cada vez maior pelas proteases de origem microbiana. Os microorganismos representam uma excelente fonte de proteases devido a sua grande diversidade bioquímica e facilidade de manipulação genética (revisto em Rao et al, 1998).

Numerosas proteinases são produzidas por microorganismos distintos, dependendo da espécie, ou mesmo por diferentes cepas de uma mesma espécie. Proteases diferentes também podem ser produzidas pela mesma cepa, variando as condições de cultura (Naglik et al, 2003). As espécies fúngicas oportunistas *Candida albicans* e *C. tropicalis*, de importância médica, causam infecções em pacientes imunocomprometidos, possuem aspartil-proteases extracelulares, que são consideradas seus principais fatores de virulência (Naglik et al, 2003). O vírus da imunodeficiência humana (HIV), agente etiológico da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), apresenta também uma aspartil-protease essencial para o ciclo de vida do retrovírus, e que tem sido um excelente alvo para o tratamento desta doença, através do uso de inibidores específicos (Kato et al, 1985). Cisteíno-proteases são muito distribuídas em protozoários da família *Trypanosomatidae*, assim como as metalo-proteases que foram descritas em vários gêneros como *Crithidia*, *Phytomonas*, *Herpetomonas*, *Trypanosoma*, *Leishmania* e *Endotrypanum*. Neste grupo de microorganismos, estas enzimas estão envolvidas na nutrição, ciclo de vida e na diferenciação morfológica destes parasitas (Branquinha et al, 1996). *Trichomonas vaginalis*, protozoário flagelado responsável pela tricomoníase,

uma das mais comuns doenças sexualmente transmitidas, apresenta algumas metalo-proteases e uma cisteíno-protease que está envolvida com o dano causado pelo parasito no hospedeiro (Alvarez-Sanches et al, 2000). Os dermatófitos possuem diversas proteases que são importantes na degradação da queratina e conseqüentemente na invasão desses fungos (Monod, 2008). As proteases possuem um papel importante no ciclo de vida do parasita da malária, com interesse nas serino-proteases da família da subtilisina produzidas por várias espécies de *Plasmodium spp*, que podem estar relacionadas à invasão das hemáceas (Withers-Martinez et al, 2004).

1.1. Classificação das peptidases

As enzimas proteolíticas, também chamadas de proteinases, proteases ou peptidases, são capazes de hidrolisar ligações peptídicas constituindo-se em um dos maiores e mais importantes grupos de enzimas. As peptidases podem ser classificadas de acordo com a reação catalisada, com a natureza química do sítio catalítico ou pela origem filogenética com base na estrutura primária (Barret, 1994). Em seguida, apresentamos as classificações das peptidases:

A) Classificação pela reação de catálise: são enzimas da classe 3, as hidrolases, e subclasse 3.4, as peptídeo-hidrolases ou peptidases. Estas enzimas constituem uma grande família (EC 3.4), dividida em endopeptidases ou proteinases (EC 3.4. 21-99) e exopeptidases (EC 3.4.11-19), de acordo com a posição da ligação a ser clivada na cadeia peptídica.

As exopeptidases atuam somente nos finais das cadeias polipeptídicas, na região N ou C terminal. Aquelas que atuam na região

amino-terminal livre podem liberar um único resíduo de aminoácido (aminopeptidases 3.4.11), um dipeptídeo (dipeptidil-peptidases 3.4.14) ou um tripeptídeo (tripeptidil-peptidases 3.4.14). As exopeptidases que atuam na região carboxi-terminal livre podem liberar um único aminoácido (carboxi-peptidases 3.4.16-18) ou um dipeptídeo (peptidil-dipeptidases 3.4.15). Algumas exopeptidases são específicas para dipeptídeos (dipeptidases 3.4.13) ou removem resíduos terminais que são substituídos, ciclizados ou ligados por ligações isopeptídicas. Ligações isopeptídicas são ligações peptídicas diferentes daquelas entre uma α -carboxila e um α -amino grupo, e estes tipos de enzimas são denominados omega-peptidases (3.4.19).

As endopeptidases (3.4.21-24) atuam preferencialmente nas regiões internas da cadeia polipeptídica, entre as regiões N e C terminal. A presença de grupos α -amino ou α -carboxila tem um efeito negativo na atividade da enzima. As endopeptidases que possuem restrição quanto ao tamanho do substrato, hidrolisando apenas polipeptídeos menores e não proteínas são conhecidas como *Oligopeptidases*.

B) Classificação pela natureza química do sítio catalítico: é possível classificar estas enzimas em serino-peptidases (3.4.21) que possuem um resíduo de serina diretamente envolvido no processo catalítico, cisteíno-peptidases (3.4.22) que apresentam um resíduo de cisteína importante para a atividade catalítica, aspartil-peptidases (3.4.23) dependem de dois resíduos de ácido aspártico para a atividade catalítica, metalo-peptidases (3.4.24) que utilizam um íon metálico (geralmente zinco) no mecanismo catalítico, treonino-peptidases (3.4.25) que precisam de um resíduo de treonina e enzimas com o mecanismo de catálise desconhecido (3.4.99)

C) Classificação pela origem filogenética com base na estrutura primária: com a sequência de aminoácidos determinada para muitas peptidases, as semelhanças estruturais dentro de uma família de peptidases geralmente refletem semelhanças na função catalítica e outras propriedades, estendendo essas semelhanças para funções biológicas.

As peptidases são agrupadas em famílias e clãs. Em uma família de peptidases estão agrupadas as peptidases homólogas. A homologia é mostrada pela similaridade na sequência de aminoácidos da região responsável pela atividade proteolítica ou similaridade a outra proteína que já tenha sido demonstrada como membro da família. Membros de uma família derivam de um ancestral comum. Um clã contém todas as peptidases atuais que surgiram a partir de um único ancestral. Ele representa uma ou mais famílias que mostram evidência de sua relação evolutiva através de suas estruturas terciárias ou, quando suas estruturas ainda não estão disponíveis, a similaridade entre as sequências de aminoácidos na região do centro ativo (Rawlings & Barret, 1993; Rawlings et al, 2008).

1.2. Metallo-peptidases

As metallo-peptidases são hidrolases que possuem no sítio ativo um íon metálico divalente (geralmente Zn^{2+}) indispensável para o processo catalítico, ligado a 3 resíduos de aminoácidos. Estão amplamente distribuídas em procariotos e eucariotos e são classificadas em quatro grupos baseado na sequência em torno dos resíduos ligantes de zinco: DD-

carboxipeptidase (HXH), carboxipeptidases (HXXE), zincinas (HEXXH) e inverzincinas (HXXEH) (Miyoshi & Shinoda, 2000).

As metalo-peptidases estão subdivididas em aproximadamente 50 famílias e são enzimas que apresentam alto grau de conservação na sequência de aminoácidos da região responsável pela atividade proteolítica. Aproximadamente metade das famílias compreende enzimas contendo o motivo HEXXH, característico da superfamília das zincinas. Dois dos três ligantes do íon Zn^{2+} estão no motivo HEXXH, podendo ser os aminoácidos His, Glu, Asp e Lys. Há ainda um terceiro ligante importante para a atividade enzimática, um resíduo de ácido glutâmico localizado de 18 a 72 resíduos após este motivo, que pode ter um papel eletrofílico (Barrett, 1994).

As metalo-peptidases estão divididas em 15 clãs denominados MA, MC, MD, ME, MF, MG, MH, MJ, MK, MM, MN, MO, MP, MQ e M-. O clã MA é constituído de um sub-clã que inclui o extinto clã MB (Rawlings et al, 2008). A família M3 das metalopeptidases, pertencente ao clã MA, subclã E [MA(E)], é constituída pela thimet oligopeptidase (TOP), neurolisina, MIP (mitochondrial intermediate peptidase), oligopeptidase A, dipeptidil carboxidipeptidase (Dcp) e também por oligopeptidases fúngicas, como a sacarolisina, a oligopeptidase MepB, e oligopeptidases bacterianas, como oligopeptidases F e PepB, entre outras (Rawlings et al, 2008).

A presença de oligopeptidases metal-dependentes em praticamente todas as células estudadas parece indicar uma importante função intrínseca dessas enzimas. Em *Escherichia coli*, Paschoalin et al (2005) identificaram uma enzima com capacidade hidrolítica equivalente a thimet oligopeptidase e neurolisina que foi descrita como oligopeptidase A (OpdA)

Proteínas são degradadas nas células de mamíferos principalmente através do sistema ubiquitina-proteasoma o qual gera uma série de fragmentos de aproximadamente 2-25 aminoácidos. Esses fragmentos devem ser completamente metabolizados ou utilizados pelas células, como por exemplo na apresentação peptídica em complexos de histocompatibilidade. Fragmentos não metabolizados podem ser tóxicos para as células, uma vez que estes pequenos peptídeos podem ser mediadores de respostas biológicas, interferindo em uma série de reações enzimáticas, como por exemplo, aquelas envolvidas no ciclo celular e biossíntese de precursores. Portanto, a degradação desses fragmentos é fundamental para a sobrevivência da célula. Oligopeptidases, as quais podem ser encontradas no citoplasma, núcleo e organelas, podem ter um papel fundamental neste processo de degradação, gerando peptídeos menores, alvos de degradação por amino e carboxipeptidases. Logo, é possível que a inativação das oligopeptidases celulares venha a inviabilizar as células, pelo acúmulo intracelular de peptídeos potencialmente tóxicos (York et al, 2003; Saric et al, 2004; Ferro et al, 2004; Cunha et al, 2008).

A seguir, descrevemos as enzimas desta família envolvidas na presente tese.

1.2.1. Thimet oligopeptidase (TOP, EC 3.4.24.15) e neurolisina (NEL, EC 3.4.24.16).

A thimet oligopeptidase (TOP, thiol-sensitive metallopeptidase) é uma peptidase primariamente citosólica, tiol-dependente com aproximadamente 78 kDa, inicialmente descrita em animais superiores, capaz de clivar peptídeos de 6-17 aminoácidos (Barret & Rawlings, 1995; Rawlings et al, 2008). Foi descrita pela primeira vez em cérebro de coelho (Camargo et al, 1973) e posteriormente identificada em inúmeros tecidos de aves e mamíferos sendo provável a sua presença em outros organismos (Tisljar, 1993).

A TOP está presente em diferentes localizações subcelulares dependendo da célula. Apesar de primariamente citosólica, foram descritas formas secretadas da enzima (Jeske et al, 2004; Ferro et al, 1999; Garrido et al., 1999), associadas à membrana plasmática (Crack et al, 1999; Jeske et al., 2003; Fontenele-Neto et al, 2001) e ao núcleo (Healy & Orłowski, 1992; Fontenele-Neto et al, 2001; Massarelli et al, 1999). Consistente com essa ampla distribuição tecidual e subcelular, a TOP está envolvida em uma variedade de funções fisiológicas (Ray et al, 2004). A enzima está relacionada com o metabolismo de peptídeos bioativos no sistema nervoso central e periférico, incluindo neurotensina, bradicinina, somatostatina, opióides, angiotensina I, encefalina e luliberina (Chu & Orłowski, 1985; Lasdun & Orłowski, 1989; Molineaux & Ayala, 1990; Dando et al., 1993; Schriefer et al, 1993; Yang et al., 1994; Wu et al., 1997; Lew et al., 1997).

Cunha et al (2008) mostraram que TOP é fisiologicamente importante na degradação de peptídeos intracelulares que auxiliam no controle da

transdução do sinal de GPCR (receptor acoplado à proteína G). Em algumas condições patológicas, uma mudança significativa na composição dos peptídeos intracelulares pode alterar a homeostase celular. Alguns peptídeos intracelulares podem mimetizar o sítio de ligação de proteínas e interferir na sinalização intracelular (Burns-Hamuro et al, 2003) ou modular a atividade enzimática atuando como inibidores competitivos (Fruitier-Arnaudin et al, 2002).

Uma grande atividade de TOP é observada na fração solúvel do citoplasma de várias células, onde se verificou seu envolvimento na degradação de peptídeos provenientes do proteossoma, além de limitar o número de peptídeos para apresentação via MHC classe I. Foi verificado que a inibição de TOP com siRNA (*small interfering RNA*) aumenta a apresentação de peptídeos antigênicos (York et al, 2003; Saric et al, 2004).

A TOP e a neurolisina são capazes de hidrolisar bradicinina (Rioli et al, 1998). A bradicinina é um nonapeptídeo (RPPGFSPFR) capaz de induzir inflamação promovendo vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular e dor. O peptídeo é gerado pela ação de caliceínas a partir do cininogênio (Del Rosso et al, 2008, revisão).

Aliberti et al (2003) relataram que bradicinina induz a produção de IL-12 por células dendríticas. Essa citocina estimula a polarização da resposta imune para Th1. No caso do *P. brasiliensis*, a produção, eventual secreção ou liberação de enzimas TOP-like após lise, poderia impedir tal efeito da bradicinina, constituindo-se em um mecanismo pró-fúngico importante.

A neurolisina foi inicialmente descrita em cérebro de rato e caracterizada por sua capacidade de degradar a neurotensina (NT -

pELYENKPRRPYIL), um peptídeo biologicamente ativo presente no sistema nervoso central (Checler et al, 1995;Barelli et al, 1993). Também é capaz de hidrolisar diversos peptídeos biologicamente ativos como bradiginina e dinorfina A 1-8 e está distribuída em diversos tecidos de mamíferos como cérebro, rim e fígado (Dauch et al, 1992). A determinação da estrutura tridimensional da neurolisina pode confirmar a seletividade desta enzima por substratos de no máximo 17 aminoácidos (Brown et al, 2001), assim como observado para a TOP.

TOP e neurolisina possuem aproximadamente 60% de similaridade e clivam a maioria dos peptídeos bioativos e sintéticos (Barret et al, 1995; Checler et al, 1995), sendo difícil a sua distinção. Apesar de apresentarem especificidades semelhantes, alguns substratos são clivados em diferentes sítios por TOP e neurolisina (Barrett et al., 1995; Rioli et al., 1998; Vincent et al., 1995; Camargo et al., 1997; Oliveira et al., 2001a e 2001b). Por exemplo, a neurotensina, é clivada pela TOP entre Arg-Arg gerando NT₁₋₈ e NT₉₋₁₃ e neurolisina hidrolisa entre Pro-Tyr, gerando NT₁₋₁₀ e NT₁₁₋₁₃. Estudos com enzimas recombinantes ou purificadas e substratos sintéticos e bibliotecas de inibidores revelaram sutis diferenças na especificidade da neurolisina em relação a TOP (Lew et al., 2000; Jiracek et al., 1995 e 1996). A bradiginina é clivada por ambas em Phe-Ser (Rioli et al, 1998).

A distinção entre as duas enzimas também pode ser feita pelo uso de inibidores. A neurolisina é inibida pelo dipeptídeo Pro-Ile, que é pouco ativo na inibição da TOP (Dauch et al, 1991) enquanto que o JA-2 (N-[1-(R,S)-carboxy-3-phenylpropyl]-Ala-Aib-Tyr-p-aminobenzoate) é um inibidor seletivo para a TOP (Shrimpton et al, 2000).

A cristalização de TOP e da neurolisina (Brown et al., 2001; Ray et al., 2004), mostram que ambas possuem quase o mesmo dobramento global, com um desvio de 1,19 Å quando as enzimas são sobrepostas. Ambas possuem o seu sítio ativo ao fundo de um canal estreito e profundo, explicando a sua especificidade por pequenos peptídeos com menos do que 17 resíduos de aminoácidos; acredita-se então que todos integrantes da subfamília M3 possuam esse mesmo tipo de sítio (Brown et al, 2001).

A clivagem da neurotensina em diferentes pontos pela TOP e neurolisina pode ser explicada comparando-se o potencial eletrostático do fundo do canal das duas enzimas. A superfície do piso próximo à abertura final do canal na TOP é fortemente eletronegativa, promovendo uma ligação da neurotensina com as duas argininas adjacentes deslocadas em direção à abertura final do canal a fim de otimizar interações eletrostáticas. Na neurolisina, por sua vez, existem muitos pontos básicos, deslocando o sítio de ligação da neurotensina em direção ao final fechado do canal para minimizar repulsão eletrostática entre a enzima e os resíduos básicos do peptídeo (Ray et al, 2004).

1.2.2. Neprilisina (NEP, 3.4.24.11)

A endopeptidase neutra (NEP, EC 3.4. 24.11) é uma zinco metalo-peptidase ligada à membrana de várias células. A NEP está presente em cérebro de mamíferos e devido a sua ação sobre as encefalinas a enzima é também denominada "encefalinaase". Foi demonstrado o envolvimento da NEP na inativação de outros neuropeptídeos, tais como as dinorfinas, endorfinas e neurotensina. Além disso, a NEP hidrolisa de maneira eficaz a

bradicinina, o fator natriurético do átrio, angiotensinas I e II e substância P. (Roques et al., 1993; Koehne et al. 1998).

Em 2001, Iwata et al. mostraram que a NEP está envolvida na degradação do peptídeo β -amilóide que é um metabólito fisiológico presente no cérebro e cujo acúmulo leva ao desenvolvimento da Doença de Alzheimer. Esta descoberta tornou ainda maior o interesse no estudo da enzima e na definição de suas reais funções fisiológicas (revisto por Turner, 2003).

A NEP tem semelhanças com endopeptidases bacterianas em termos de especificidade, tal como a termolisina. No entanto, a NEP prefere peptídeos pequenos, (menores do que 15 aminoácidos) e devido à presença de um resíduo de Arg no centro ativo, direciona o sítio de clivagem para extremidade C-terminal do peptídeo. A enzima tem uma clara preferência por resíduos hidrofóbicos em P1' sendo Leu e Phe os amino ácidos preferidos nesta posição (Pozsgay et al., 1986). A atividade endopeptidásica da enzima foi bem estudada, entretanto sua atividade como carboxipeptidase ainda não foi caracterizada.

Devido à importância farmacológica da NEP e ao interesse no desenvolvimento de inibidores, esta enzima foi a primeira desta classe de peptidases a ter a sua estrutura tridimensional descrita (Oefner et al., 2000).

1.2.3. Sacarolisina (EC 3.4.24.37)

A sacarolisina foi inicialmente descrita em *Saccharomyces cerevisiae* e apresenta alta similaridade com a thimet oligopeptidase de mamífero,

além da capacidade de degradar substratos também clivados pela TOP. Sacarolisina cliva bradicinina entre Phe-Ser e, em contraste com a TOP, sua atividade não é afetada por DTT, N-ethylmaleimida, ácido iodoacético ou iodoacetamina, sugerindo que ela não é uma metalo-peptidase tiol-dependente (Hrycyna & Clark, 1993).

A sacarolisina é uma proteína de cadeia única, constituída por 712 aminoácidos com uma massa molecular de aproximadamente 81,8 kDa, apresentando sequência proteica similar à MepB oligopeptidase de *Aspergillus fumigatus*, TOP e neurolisina (Büchler et al, 1994; Ibrahim-Granet & d'Enfert, 1997). A principal região de similaridade ocorre na proximidade do motivo **His**-Glu-Leu-Gly-**His** (HELGH) na posição 501 e Asp-Phe-Val-**Glu**-Ala-Pro (NFVQAP) na posição 528, que corresponde a dois motivos encontrados em termolisina e que contribuem para a atividade catalítica pela ligação do zinco aos dois resíduos de His e ao resíduo de Glu (Büchler et al, 1994; Ibrahim-Granet & d'Enfert, 1997).

A sua localização é primariamente citosólica, entretanto uma pequena atividade (3-5%) foi observada no espaço intermembranas da mitocôndria. O *Saccharomyces cerevisiae* mutante para o gene da sacarolisina não apresenta atividade citoplasmática e nem mitocondrial e seu fenótipo não é alterado, indicando que a sacarolisina não é uma enzima envolvida em processos proteolíticos essenciais ao fungo. No entanto, o acúmulo de peptídeos observados no mutante, indica que a sacarolisina é a oligopeptidase intracelular mais importante, responsável pela degradação de peptídeos de proteólise não vacuolar (Büchler et al, 1994).

Uma característica da sacarolisina é não ser tiol-dependente, uma característica compartilhada com a neurolisina. Isto pode estar relacionado

com o pequeno número de cisteínas presentes na sacarolisina (4 resíduos), em contraste com a thimet oligopeptidase (14 resíduos) (Barrett et al, 2004).

1.2.4. Peptidase intermediária de mitocôndria (MIP, EC 3.4.24.59)

A peptidase intermediária de mitocôndria foi caracterizada pela primeira vez em mitocôndrias de fígado de rato (Kalousek et al, 1988) e também foi descrita em *S. cerevisiae* (Isaya et al, 1994), *Schizophillum commune* (Isaya et al, 1995), e no homem (Chew et al, 1997). A MIP humana apresenta 92% de identidade com a MIP de rato e 54% de identidade com a MIP de *S. cerevisiae*. Todas as MIPs identificadas apresentam um tamanho aproximado de 75 kDa, com o motivo conservado (HEXXH); são codificadas por genes nucleares e transportadas para a mitocôndria após síntese (Chew et al, 2000).

A MIP é a principal enzima mitocondrial que cliva proteínas de tamanhos intermediários, inicialmente processadas por MPPs - peptidases processadoras de mitocôndria (Isaya et al, 1991). A MIP remove 8 resíduos do N-terminal do fragmento recém-formado pela ação das MPPs (Gavel et al, 1990; Isaya et al, 1991; Kalousek et al, 1988; Branda & Isaya, 1995). Chew e colaboradores (1997) relataram que ambas as MIPs, humana e fúngica, estão primariamente envolvidas na maturação de proteínas relacionadas à fosforilação oxidativa (OXPHOS). A MIP é diferencialmente expressa nos tecidos humanos. Coração, músculo esquelético e pâncreas apresentam aumento de expressão, e esses três órgãos são frequentemente afetados em doenças relacionadas à OXPHOS.

Em um estudo recente, a bradicinina e peptídeos fluorogênicos derivados de bradicinina (Abz-RPPGFSPFRQ-EDDnp e Abz-GFSPFRQ-EDDnp) foram utilizados para verificar a especificidade de hMIP (Marcondes et al, 2009). A hMIP hidrolisou a bradicinina entre Phe-Ser, mesmo ponto de clivagem descrito anteriormente para MIP, TOP e NEL (Rawlings et al, 2008; Oliveira et al, 2001a e 2001b). A hidrólise dos peptídeos fluorogênicos derivados de bradicinina por hMIP ocorreu entre Phe-Ser, enquanto TOP e NEL clivam esses substratos entre Pro-Phe (Marcondes et al, 2009). A bradicinina e os substratos fluorogênicos derivados de bradicinina podem, portanto, ser utilizados para diferenciar essas metalopeptidases. Ainda não foram identificados inibidores específicos para essa enzima (Marcondes et al, 2009)

1.3. *Paracoccidioides brasiliensis* e paracoccidioidomicose

O *Paracoccidioides brasiliensis* é um fungo dimórfico que causa no homem a paracoccidioidomicose (PCM) e foi inicialmente descrito por Lutz em 1908. Conídios formados na fase miceliana agem como propágulos infecciosos após inalação e fixação nos alvéolos pulmonares. O fungo sofre então uma transformação termo-dependente dando origem a leveduras que causam a doença (Brummer et al, 1993). Atualmente o *P. brasiliensis* é classificado como Eukaryota, do reino Fungi, sub-reino Dikarya, filo Ascomycota, sub-filo Pezizomycotina, classe Eurotiomycetes, sub-classe Eurotiomycetidae, ordem Onygenales, gênero *Paracoccidioides*, espécie *brasiliensis* (Taxonomy ID: 121759 NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/taxonomyhome.html>).

A PCM distribui-se em regiões tropicais e subtropicais da América Latina, desde o México, até a Argentina. É uma doença endêmica no Brasil atingindo principalmente trabalhadores rurais, afetando suas atividades normais (Lacaz et al, 2002). No Brasil, as taxas de mortalidade das micoses sistêmicas mostram que elas são a décima causa de morte mais comum entre as doenças infecciosas e parasitárias. Entre 1996 e 2006, a PCM foi responsável por aproximadamente metade do número de mortes relacionadas a micoses sistêmicas, sendo que os Estados de SP e PR apresentaram as maiores taxas de mortalidade, com índices decrescentes em relação ao primeiro e último período da década estudada (Prado et al, 2009).

Embora ainda não completamente definido, a PCM não é uma doença transmitida de homem a homem. A ocorrência de casos entre familiares é

um evento raro (Londero & Ramos 1972). Esta micose profunda ou sistêmica apresenta várias formas de manifestação clínica e patológica, abrangendo desde formas benignas e localizadas a formas severas e disseminadas (Lacaz et al, 2002). A doença é caracterizada por uma infecção granulomatosa crônica e na forma multifocal, há o envolvimento de vários órgãos. A regressão da lesão é geralmente acompanhada de fibrose residual (Mendes-Gianini et al, 2000; Miyoshi & Shinoda, 2000).

Há duas formas clínicas principais da PCM: a forma aguda ou sub-aguda (tipo juvenil) e a forma crônica (tipo mais comum em adulto), embora tanto a apresentação clínica como o curso da doença varie de paciente para paciente (Brummer et al, 1993; Franco, 1994).

A forma crônica da paracoccidioidomicose, que é responsável por mais de 90% dos casos, principalmente nos indivíduos do sexo masculino, progride lentamente e pode demorar meses ou anos para se desenvolver plenamente, caracterizando uma doença crônica. A PCM crônica atinge principalmente os pulmões, levando a uma significativa morbidade devido à insuficiência grave da função pulmonar. Posteriormente, a doença pode se disseminar para outros órgãos e tecidos, formando lesões secundárias nas membranas mucosas, pele, gânglios linfáticos e glândulas supra-renais. Em contrapartida, o tipo de PCM juvenil ou aguda, que se desenvolve em um período muito curto, é mais grave, levando a taxas significativas de mortalidade devidas principalmente à hipertrofia do sistema reticuloendotelial. Independentemente dos órgãos envolvidos, as lesões na PCM após tratamento cicatrizam geralmente por fibrose, com a formação de lesões fibróticas, que podem interferir permanentemente com o bem-estar do paciente (Borges-Walmsley et al, 2002).

A principal defesa do hospedeiro contra o *P. brasiliensis* é a resposta mediada por células, com formação de granulomas. O granuloma característico da PCM é composto de células gigantes epitelióides, podendo ser observados polimorfonucleares (PMN) próximos aos fungos. Ao redor das células epitelióides há um halo de células mononucleares (Franco, 1987). Em pacientes com formas menos graves da doença, a resposta imune induz à formação de granulomas compactos contendo número reduzido de células fúngicas. Pacientes com formas mais graves da doença frequentemente apresentam granuloma frouxo, com um influxo celular com capacidade reduzida de combater o fungo, que tende a se desenvolver em grande número. Entre os dois extremos ocorrem diferentes manifestações clínicas e imunológicas (Benard et al, 1994).

Calich e colaboradores (2008) revisaram o papel da imunidade inata na infecção por *P. brasiliensis*. O macrófago é a principal célula de defesa contra o fungo e o *P. brasiliensis* é capaz de se multiplicar dentro de macrófagos peritoniais e pulmonares. Macrófagos ativados por IFN- γ são fungicidas (Brummer et al 1988 e 1989). PMNs humanos e murinos apresentam atividade antifúngica, que aumenta sob ativação de GM-CSF e IFN- γ ou IL-1 β , mas não TNF- α ou IL-8 (Kurita et al, 2000; Kurita et al, 2005). A ação do TNF- α como ativador de macrófagos é controversa, pois contrariamente ao resultado anterior, foi observado que TNF- α estimula mais a eliminação de *P. brasiliensis* por macrófagos do que IFN- γ (Soares et al, 2001). Foi observado também que monócitos humanos ativados por TNF- α recombinante mostraram uma atividade fungicida significativa para o *P. brasiliensis*, com direta associação entre a morte intracelular do fungo e a produção de H₂O₂ pelas células ativadas (Carmo et al, 2006).

O óxido nítrico (NO), liberado por macrófagos ativados, também está envolvido na imunossupressão de células T durante a infecção assim como na morte do *P. brasiliensis*. Óxido nítrico derivado de NO sintase é essencial para a resistência à paracoccidiodomicose, mas a sua superprodução está associada à susceptibilidade (Nascimento et al, 2002).

A infecção com o *P. brasiliensis* também induz uma resposta imune adaptativa fungo-específica. Taborda et al (1998) demonstraram que a resposta imune protetora contra o *P. brasiliensis* é dependente de IFN- γ , e essa citocina é principalmente produzida por linfócitos T-CD4⁺, responsivos à gp43 ou ao peptídeo P10, como descrito adiante. A indução de linfócitos T protetores depende da apresentação de peptídeos específicos por células dendríticas, associada à presença de estímulos que induzam a produção de interleucinas do tipo Th1, como IL-12 e IFN- γ , por essas células. Na evolução natural da paracoccidiodomicose em camundongos B10.A, sensíveis à doença, as células dendríticas são estimuladas a produzir interleucinas do tipo Th2, como IL-10, e expressam baixos níveis de moléculas coestimulatórias, o que impede a indução de uma resposta imune protetora capaz de eliminar completamente a doença (Ferreira et al, 2007). Já foi demonstrado que a gp43 inibe a expressão de moléculas de MHC classe II na superfície de células dendríticas, e também inibe a secreção de IL-12 por essas células (Ferreira & Almeida, 2006). A produção de diversos fatores pelo fungo que impeçam a estimulação correta das células dendríticas no sítio inflamatório da doença pode explicar parcialmente a reduzida eficiência da resposta imune anti-fúngica e o estabelecimento da infecção no hospedeiro susceptível.

A gp43, uma glicoproteína de 43 kDa descrita por Puccia e colaboradores (1986), é o principal componente antigênico da paracoccidiodomicose e é reconhecida por anticorpos de pacientes com a doença ativa (Puccia & Travassos, 1991; Camargo et al, 1994). Esta glicoproteína foi clonada e sequenciada em 1996 por Cisalpino e colaboradores, e é constituída por 416 aminoácidos. A gp43 é uma molécula com similaridade às exo-1,3- β -glucanases fúngicas, no entanto em um dos sítios catalíticos conservados para atividade de glucanase houve substituição de um aminoácido, modificando a sequência Asn-Glu-Pro para Asn-Lys-Pro, o que pode explicar a perda da atividade enzimática da gp43. Ela possui uma cadeia oligossacarídica "high mannose" N-ligada (Almeida et al, 1996).

A gp43 é a molécula mais bem estudada do fungo, todavia seu papel no desenvolvimento da doença ainda é controverso. Já foi observado que gp43 ligada à laminina aumenta a invasão fúngica e destruição de tecidos no modelo de infecção testicular de hamster (Vicentini et al, 1994) e esta mesma associação causa uma diminuição da patogenicidade do fungo no modelo pulmonar (Andre et al, 2004).

Anticorpos monoclonais contra a gp43 interferiram na patogenicidade fúngica *in vivo* inibindo ou aumentando a formação de granulomas e a destruição tecidual pelas leveduras de *P. brasiliensis* ligadas à laminina, dependendo da especificidade do anticorpo (Gesztezi et al, 1996). Curiosamente, foi demonstrado que alguns, mas não todos, anticorpos monoclonais contra a gp43 reduziram a carga fúngica dos animais após administração passiva, antes e depois da inoculação intratraqueal ou intravenosa do fungo. O mAb 3E, o mais eficiente para a redução da carga

fúngica, aumentou a fagocitose das leveduras pelos macrófagos, levando a um aumento da produção de óxido nítrico (NO) por essas células e a um aumento de IFN- γ no pulmão dos animais infectados e tratados. O peptídeo NHVRIPIGWAV foi determinado como o sítio de ligação do mAb 3E à gp43, podendo ser utilizado como um candidato ao desenvolvimento de uma vacina fúngica (Buissa-Filho et al, 2008). Anti-gp43 também foi utilizado em ensaios de adesão (Hanna et al, 2000) que mostraram que esse anticorpo foi capaz de inibir a adesão de *P. brasiliensis* em até 85%. Além disso, a gp43 também se liga a fibronectina (Mendes-Giannini et al, 1996), proteína de matriz extracelular à qual a adesão do fungo é importante para que ocorra a invasão dos tecidos.

O P10, um peptídeo com 15 aminoácidos com sequência QTLIAIHTLAIRYAN, derivado da sequência da gp43 e que contém o epitopo específico de células T CD4+, apresentado pelo MHC de classe II (Taborda et al, 1998), foi utilizado na imunização de camundongos e foi capaz de diminuir a quantidade de UFCs e limitar a disseminação dos fungos para outros órgãos. A proteção pelo P10 está associada à indução de IFN- γ produzindo uma resposta Th-1. Esse mesmo peptídeo associado à quimioterapia foi utilizado na imunização de camundongos anérgicos utilizando o modelo de infecção intratraqueal (Marques et al, 2008), obtendo uma redução significativa na diminuição de UFCs (Unidades formadoras de colônia), preservação da estrutura alveolar pulmonar e limitando a disseminação do fungo para o fígado e o baço. Mais recentemente foi demonstrado que a associação do P10 com a flagelina FlicC de *Salmonella enterica* induziu resposta imune protetora que reduziu o

crescimento de *P. brasiliensis in vivo* e os danos ao pulmão no modelo intratraqueal (Braga et al, 2009).

O tratamento da paracoccidiodomicose é prolongado e muitos pacientes são tratados por um a dois anos com quimioterápicos. Na ausência de terapia medicamentosa, a doença é geralmente fatal. Atualmente, cetoconazol e itraconazol são as drogas de escolha, mais do que sulfonamidas e anfotericina B, que são responsáveis por elevadas taxas de recidiva. Embora azoles e outras drogas possam deter a progressão da paracoccidiodomicose, as lesões fibróticas persistem, provavelmente constituindo uma fonte de leveduras que poderia levar a uma recidiva da doença após término do tratamento (Mendes et al, 1994; Shikanai-Yasuda et al, 2006). Uma característica do *P. brasiliensis* é a sua capacidade de iniciar uma infecção depois de prolongado período de dormência. Por exemplo, não é raro pacientes adoecerem mais de uma década após deixarem uma região endêmica (Brummer et al, 1993).

1.4. Metallo-peptidases fúngicas

No banco de dados MEROPS (Rawlings et al, 2008), na família M3 de peptidases, à qual pertence a TOP, estão relacionadas mais de 100 peptidases fúngicas. No genoma de espécies de *Aspergillus*, *Cândida*, *Picchia* além de *Coccidioides posadasii* e *Saccharomyces cerevisiae*, já foram encontradas sequências de enzimas homólogas a essa família. No entanto, poucas foram isoladas ou tiveram sua atividade determinada, e o papel dessas enzimas no desenvolvimento do fungo ou da doença a ele relacionada ainda é elusivo.

Em *Saccharomyces cerevisiae* foi descrita uma metalo-peptidase (sacarolisina) solúvel, similar a thimet oligopeptidase de rato, inicialmente denominada oligopeptidase yscD, com massa molecular calculada de 81.8 kDa. Foi encontrada 34,8% de identidade entre os aminoácidos que compõe a oligopeptidase yscD e a TOP de mamíferos. A sacarolisina de *S. cerevisiae* é capaz de clivar a bradicinina na ligação Phe-Ser. Sua atividade é inibida por α -phenantrolina e EDTA (Büchler et al, 1994). A sua localização é primariamente citosólica, entretanto uma pequena atividade (3-5%) foi observada no espaço intermembranas da mitocôndria. O mutante de *S. cerevisiae* para o gene da sacarolisina não apresenta atividade citoplasmática e nem mitocondrial (Büchler et al, 1994).

Uma metalo-protease citosólica de 82 kDa, denominada MepB, foi descrita em *Aspergillus fumigatus* (Ibrahim-Granet, 1997). Essa enzima, capaz de degradar colágeno tipo I, apresenta aproximadamente 45% e 41% de identidade com TOP e neurolisina de mamíferos, respectivamente. A identidade com membros da família da thimet oligopeptidase presentes em bactérias é de cerca de 30%. Não há evidências da secreção dessa proteína e ela está envolvida na degradação de peptídeos bioativos (Ibrahim-Granet & d'Enfert, 1997).

Atividade proteolítica similar a MepB, verificada sobre o substrato PZ-PLGPA, foi observada em extratos citosólicos de diversos isolados fúngicos como por exemplo, *Fonsecaea pedrosoi*, *Wangiella dermatitidis*, *Sporothrix schenckii*, *Trichophyton mentagrophites*, *Trichophyton schoenleinii*, *Epidermophyton floccosum*, *Microsporum canis*, entre outros, embora os genes das enzimas não tenham sido clonados (Ibrahim-Granet et al, 1996).

Foi verificado que a metalo-protease MepB de *A. fumigatus* também é capaz de degradar o substrato PZ-PLGPA.

Em *Candida albicans* também foi descrita a existência de uma metalo-peptidase de 95 kDa, inibida fortemente por α -fenantrolina e EDTA, e localizada na parede celular. A enzima degradou totalmente fibronectina e colágeno tipo I e parcialmente laminina e colágeno tipo IV, componentes da matriz extracelular do hospedeiro, o que sugere que ela pode ser classificada como um fator de virulência fúngica, por facilitar a migração do fungo nos tecidos após cruzar a barreira endotelial, permitindo a invasão tecidual (el Moudni et al, 1995 ;Rodier et al, 1999). Outras espécies de *Candida* parecem apresentar a mesma atividade proteolítica (El Moudni et al, 1995).

Metalopeptidases em *Coccidioides posadasii*, com aproximadamente 30 kDa (Hung et al, 2005) e *Pseudallescheria boydii*, com aproximadamente 28 kDa (Silva et al, 2006) foram identificadas e relacionadas à habilidade do patógeno persistir no homem, pela sua atividade catalítica sobre antígenos de superfície para evitar sua detecção pelo sistema imune.

1.5. Peptidases já descritas em *Paracoccidioides brasiliensis*

Estudos recentes baseados na identificação de genes homólogos ao de proteases conhecidas no transcriptoma de um isolado desse fungo (isolado Pb01) demonstraram a existência de 5,6% de aspartil-peptidases, 11,3% de cisteíno-proteinases, 22,6% de metalo-peptidases, 18,8% de serino-peptidases e 41,5% de subunidades de proteasoma em 53 ORFs codificando proteases independentes e dependentes de energia (Parente et

al, 2005). O efeito do plasma humano no perfil transcricional de proteínas de *P. brasiliensis* também foi avaliado por Bailão e colaboradores (2007), verificando-se um aumento na expressão de proteínas relacionadas à degradação de ácidos graxos, síntese proteica, proteínas relacionadas à sensibilidade de mudança na osmolaridade, remodelação de parede celular e defesa celular.

Uma serino-peptidase com atividade exocelular foi caracterizada em *P. brasiliensis* (Carmona et al, 1995; Puccia et al, 1998). A enzima é capaz de clivar componentes da membrana basal da matriz extracelular como laminina, fibronectina, colégeno do tipo IV e proteoglicanas e esta hidrólise é inibida por PMSF (fluoreto de fenilmetilsulfonila) e p-HMB (para-hidroximercuriobenzoato).

As proteínas kexin-like pertencem à família das subtilisinas e estão envolvidas no processamento de pró-proteínas em sua forma ativa. Em fungos, as kexin-like estão envolvidas em processos celulares importantes, como o dimorfismo. A kexin-like de *P. brasiliensis* foi capaz de complementar a função de um mutante de *S. cerevisiae* para o gene *kex2* e esse gene no *P. brasiliensis* pode ser considerado o seu homólogo (Torres et al, 2008).

Recentemente, as metalo-peptidases de matriz MMP-9 e MMP-2 foram descritas na infecção *in vivo* por *P. brasiliensis* (Nishikaku et al, 2009). Estas metalopeptidases estão envolvidas na modulação do rearranjo da matrix extracelular, inflamação e imunidade.

Em *Paracoccidioides brasiliensis* ainda não foi isolada ou caracterizada nenhuma enzima com atividade oligopeptidásica.

2. Objetivos

Este estudo teve como objetivo a verificação da presença de uma possível atividade metalo-oligopeptidásica em frações intra- e/ou extracelulares de *P. brasiliensis*, correlacionando ou não sua presença à patogenicidade fúngica e ao desenvolvimento da doença *in vivo*.

Os objetivos específicos foram:

1. Detecção e caracterização de atividade metalo-oligopeptidásica em lisados e sobrenadantes de cultura de leveduras de *P. brasiliensis*, detecção de anticorpos contra a peptidase em pacientes com paracoccidiodomicose, para determinar a possível secreção da peptidase pelo fungo *in vitro* ou *in vivo*;
2. Obtenção da peptidase recombinante ou nativa,
3. Correlação da expressão da metalo-oligopeptidase com a virulência do fungo, analisando-se o isolado Pb18 com maior ou menor virulência.

3. Materiais e Métodos

3.1. Enzimas, anticorpos e plasmídeos recombinantes

As proteínas recombinantes utilizadas neste trabalho, rTOP (humana ou rato), rMIP (humana ou rato) e o anticorpo policlonal obtido em coelhos reativo contra MIP humana (Proteintech Group) foram gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Vitor Oliveira do Departamento de Biofísica da UNIFESP. Utilizou-se também um anticorpo policlonal obtido em coelhos reativo contra a TOP murina (Proteimax). Os clones (PBDEX-Y1-094t_G12.es e PBGEX-M1-100t_D11.es) provenientes da biblioteca de cDNA do isolado 01 de *P. brasiliensis* foram cedidos pela Profa. Dra. Maria Sueli Soares Felipe, Departamento de Biologia Celular da UnB (Felipe et al, 2005), e os clones provenientes da biblioteca de cDNA do isolado 18 (Pb3NEW1-168E06.seq-2 e Pb50001-165C09.seq-1) foram cedidos pelo Prof. Gustavo Goldman, Faculdade de Farmácia, USP - Ribeirão Preto (Goldman et al, 2003).

3.2. Animais

Camundongos Balb/c de 4 a 5 semanas foram obtidos do Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais (CEDEME), da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) ou do biotério do ICB-USP, mantidos em microisoladores, com água, ração e serragem autoclavadas. Os experimentos utilizando animais foram realizados de acordo com as regras do Comitê de Ética para Experimentação Animal da UNIFESP, projeto registrado sob número 1665/05.

3.3. Isolados fúngicos

Foi utilizado o isolado da cepa 18 do fungo *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb18), obtido originalmente de lesão de um paciente, e mantido em cultivo em laboratório. O isolado mantido em culturas *in vitro* foi considerado como **não virulento (NV)**. Para obtenção de um isolado de maior virulência, denominado de **virulento (V)**, as leveduras foram inoculadas *in vivo* em camundongos e recuperadas dos órgãos infectados desses animais. O grau de virulência dos 2 isolados foi avaliado antes da sua utilização em experimentos, como descrito no item 3.5.

3.4. Cultivo dos fungos na fase leveduriforme

Os isolados de *Paracoccidioides brasiliensis* foram mantidos em meio YPD sólido modificado (0,5% extrato de levedura, 0,5% triptona, 1,5% glicose, 1,5% ágar) a 37°C. Alternativamente, as leveduras foram cultivadas em meio YPD líquido a 37°C, sob agitação.

3.5. Infecção de camundongos Balb/c com isolados de *P. brasiliensis*

Para verificar a virulência dos isolados Pb18 utilizados neste trabalho, camundongos Balb/c machos, com 6-8 semanas, foram infectados intravenosamente com 1×10^6 leveduras viáveis em 100 μ L de PBS. A viabilidade da cultura previamente à inoculação foi verificada com o reagente de exclusão Trypan blue e contagem em câmara de Neubauer. Os animais foram sacrificados após 7 dias e Unidades Formadoras de Colônia (UFC) foram determinadas em pulmões homogeneizados e cultivados em placas contendo meio BHI (Brain Heart Infusion, Difco) suplementadas,

como descrito anteriormente (Castañeda et al, 1988; Taborda et al, 1998). Resumidamente, os órgãos pesados de cada camundongo foram homogeneizados utilizando-se um homogeneizador de tecidos elétrico (Tecnal, São Paulo) em 2 mL de PBS e 100 µL do homogenato foi espalhado em placas de Petri com 4,9 cm de diâmetro (Cral) contendo BHI suplementado (BHI adicionado de 4% de soro fetal bovino, 5% de filtrado de cultura do isolado 339, 100 µg streptomicina e 100 UI penicilina por mL). UFCs dos órgãos de cada camundongo foram contadas após 30 dias e as UFCs por grama de tecido foram calculadas individualmente. Os resultados estão apresentados como média das triplicatas de cada órgão $\times 10^3 \pm$ desvio padrão.

3.6. Obtenção do lisado total e de frações citosólica e de membrana das leveduras do *P. brasiliensis*

Células leveduriformes cultivadas em meio sólido foram coletadas, lavadas duas vezes em solução tampão salina estéril (TBS – 10mM Tris-HCl, 150mM NaCl, pH 7.4), ressuspendidas em aproximadamente 1 mL de TBS e aliqüotadas (300 µl/tubo). Para lise das leveduras, o mesmo volume de *glass beads* (425-600 µM, Sigma), foi adicionado (Carvalho et al, 2005). O tubo foi então agitado vigorosamente em vortex (30 seg. com intervalos de 30 seg no gelo, 10 - 15 vezes). Alternativamente, para obtenção de maior volume de lisado, todo o processo foi realizado em tubos de 50mL, respeitando-se as proporções dos reagentes utilizados. Membrana e parede celular foram separadas por ultracentrifugação (100.000g por 2h à 4°C) e em seguida a membrana foi ressuspendida em 500 µL de uma solução tampão Tris 50mM, pH 7,4. O sobrenadante (denominado **extrato**

citossólico) foi armazenado em alíquotas à -80°C. A concentração proteica de todas as frações foi estimada pelo micro-método adaptado de Bradford (Bradford, 1976) utilizando albumina de soro bovino (BSA) como padrão.

3.7. Obtenção do sobrenadante de cultura das leveduras para determinação da cinética de secreção da enzima com atividade oligopeptidásica.

Para a obtenção do sobrenadante de cultura, as leveduras foram cultivadas em 50 mL de meio líquido quimicamente definido McVeigh-Morton modificado (Castañeda et al, 1988). Amostras do sobrenadante (50 mL) foram coletadas após 7, 15 e 21 dias e a atividade proteolítica no sobrenadante concentrado 50 vezes foi testada como descrito no item 3.8, utilizando-se o peptídeo Abz-GFSPFRQ-EDDnp. As mesmas condições foram testadas com a adição de 5% de soro fetal bovino no meio de cultura.

3.8. Determinação da atividade oligopeptidásica no lisado e sobrenadante de leveduras de *Paracoccidioides brasiliensis*.

Com o objetivo de caracterizar a atividade de oligopeptidases no lisado de leveduras de *P. brasiliensis*, foram utilizados com supressão intramolecular de fluorescência contendo o grupo fluorescente *orto*-aminobenzoico (Abz) e grupo apagador N-(2,4-dinitrofenil)-etilenodiamino (EDDnp). Estes compostos foram sintetizados pela Profa. Maria Aparecida Juliano, no Departamento de Biofísica da UNIFESP. Foram testados os peptídeos apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Substratos com supressão intramolecular de fluorescência utilizados para caracterização de atividade oligopeptidásica no lisado de *P. brasiliensis*. Abz= ácido *orto*-amino benzóico; EDDnp= etilenodiamina 2,4-dinitrofenil.

Substrato	Característica dos Substratos
Abz-GFSPFRQ-EDDnp	Fragmento de bradiginina clivado pela TOP e neurolisina (Oliveira et al., 2001a).
Abz-GFSIFRQ-EDDnp	Fragmento modificado da bradiginina clivado preferencialmente por OpdA (Paschoalin et al., 2005).
Abz-rRL-EDDnp	Substrato seletivo para neprilisina (Medeiros et al, 1997)
Abz-NKPRRPQ-EDDnp	Fragmento de neurotensina clivado preferencialmente por neurolisina (Oliveira et al., 2001a).

A hidrólise destes compostos foi monitorada em espectrofluorímetro HITACHI F-2000 com comprimentos de onda ajustados para $\lambda_{em}=420nm$ e $\lambda_{ex}=320nm$. Foram utilizadas cubetas de caminho óptico de 10 mm com volume final de 0,5 mL. A solução tampão Tris 50 mM, pH 7,4 foi mantida no compartimento termostatizado a 37°C durante 5 minutos antes da adição do substrato.

Para verificar a presença de diferentes enzimas, a reação de hidrólise do substrato Abz-GFSPFRQ-EDDnp pela fração citosólica do *P. brasiliensis* foi inibida com os inibidores apresentados na Tabela 2.

Tabela 2: Inibidores testados na hidrólise do peptídeo Abz-GFSPFRQ-EDDnp pela fração citosólica do *P. brasiliensis* e suas especificidades.

Inibidores	Características
Orto-fenatrolina	inibidor de metalo-peptidases
JA-2	inibidor de TOP
Pro-Ile	inibidor de neurolisina
PMSF	inibidor de serino-peptidases
E64	inibidor de cisteíno-peptidases
Z-Pro-Prolinal	inibidor de prolil-oligopeptidases
Captopril	inibidor de Enzima Conversora de Angiotensina I (ECA)

3.9. Determinação dos pontos de clivagem da bradiginina e do substrato Abz-GFSPFRQ-EDDnp

Nas reações de hidrólise da bradiginina (RPPGFSPFR) e do substrato Abz-GFSPFRQ-EDDnp, foram utilizados 50 e 20 μ M do peptídeo respectivamente, o qual foi incubado a 37°C em tampão 50 mM Tris-HCL, pH 7,4 na presença de TOP recombinante murina ou de extrato citosólico do *P. brasiliensis* por 10 minutos. As amostras foram analisadas em sistema de HPLC analítico Shimadzu modelo C-R7A, constituído por duas bombas, injetor Rheodyne de 500 μ l e coluna Chromatopac C-18 (4,6x150 mm) equilibrada com 0,1% de ácido fosfórico (solvente A). A eluição da coluna a um fluxo de 1,7 mL/min foi feita com um gradiente linear de 10-80% do solvente B (90% de acetonitrila, 0,1% de ácido fosfórico, v/v). Os fragmentos produzidos foram detectados com monitor de U.V. para detecção em ultravioleta e visível e monitor de fluorescência Shimadzu RF-

535 e analisados utilizando os tempos de retenção. Os pontos de clivagem foram também deduzidos por espectrometria de massa, usando um aparelho modelo TofSpec E, da empresa Micromass, dotado de Tecnologia MALDI-TOF (Matrix Laser Desorption Ionisation - Time-of-Flight).

3.10. Purificação de IgGs a partir de soro de pacientes com paracoccidioidomicose

Soros de pacientes com paracoccidioidomicose ou negativos para a doença foram gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Arnaldo Colombo, da Disciplina de Doenças Infecciosas e Parasitárias da UNIFESP e pelo Prof. Dr. Zoilo Pires de Camargo, da Disciplina de Biologia Celular da UNIFESP. Estas amostras foram analisadas em ensaio de imunodifusão radial contra antígenos específicos de *P. brasiliensis*, e anticorpos específicos foram quantificados. Os soros analisados apresentaram títulos de anticorpos anti-*P. brasiliensis* de 1:2, 1:4, 1:16 e 1:128. Um *pool* de soros de voluntários normais, não reativos com antígenos do fungo, também foi utilizado. Os soros (aproximadamente 1 mL) foram diluídos em 9 mL de PBS e esterilizados por filtração (filtro de 0,22 µm). A purificação de IgG dos soros foi realizada em coluna de Proteína G (GE Healthcare). Uma coluna de 1 mL de resina foi equilibrada com 20 mL de PBS em circuito aberto (fluxo de 0,5 mL/minuto) e em seguida as amostras foram aplicadas individualmente na coluna. Foram realizadas duas ou três passagens de cada amostra pela coluna. A coluna foi lavada com 15 mL de PBS e as IgGs eluídas com 15 mL de solução glicina 0,1M pH 2,8, coletando-se alíquotas de aproximadamente 1 mL em tubos contendo 200 µL de Tris-HCL 1M, pH 9,0, para neutralização. A coluna foi novamente lavada com 30 mL de PBS e

armazenada em PBS-Etanol 30% à 4°C. As amostras eluídas da coluna foram dialisadas contra PBS por 24h e concentradas em sistema Amicon (Millipore). A pureza da preparação foi analisada em gel de SDS-PAGE e a concentração proteica foi determinada em espectrofotômetro a 280 nm, utilizando-se o coeficiente de extinção de 1,33 onde, absorvância = 1,33 equivale a 1 mg/mL de IgG.

3.11. Ensaio de inibição de atividade oligopeptidásica do lisado de *P. brasiliensis* por imunoglobulinas anti-*P. brasiliensis*.

As IgGs purificadas de soro de pacientes com paracoccidioidomicose, assim como imunoglobulinas purificadas de voluntários normais, foram utilizadas como inibidores da atividade oligopeptidásica de lisado de *P. brasiliensis*. Foram adicionadas 100µg de IgG purificada ao extrato citosólico das leveduras de *P. brasiliensis* e a reação foi incubada por 30 minutos a 37°C. Após a incubação, o substrato Abz-GFSPFRQ-EDDnp foi adicionado à reação e a determinação da atividade enzimática foi monitorada continuamente em espectrofluorímetro HITACHI F2000 conforme descrito no item 3.8.

3.12. Purificação da enzima nativa

3.12.1. Separação dos componentes com atividade enzimática do lisado de leveduras de *P. brasiliensis* em cromatografia de filtração em gel

Uma amostra (250 µL) de lisado de *P. brasiliensis*, isolado 18 virulento foi submetida à cromatografia de gel filtração em coluna Superdex

TM 200 HR 10/30 (Amersham Biosciences - 30 x 31 cm) em sistema FPLC. Previamente, essa coluna foi equilibrada em tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 8,0, sob fluxo de 0,5 ml/min e calibrada com os seguintes marcadores de massa molecular: β -amilase (200kDa); BSA (66kDa), ovoalbumina (43kDa), anidrase carbônica (29kDa) e citocromo C (12,4kDa). A eluição da amostra foi feita com o mesmo tampão e acompanhada pela leitura da absorbância a 280 nm. Foram recolhidas frações de 0,5 mL e a atividade enzimática testada em tampão 50 mM Tris pH 7,4 usando Abz-GFSPFRQ-EDDnp como peptídeo fluorogênico, como descrito no item 3.8.

3.12.2. Seleção de peptídeos para imunização de camundongos e obtenção de soro policlonal específico

Peptídeos de 12 a 18 aminoácidos foram desenhados a partir do alinhamento da seqüência proteica do clone PBGEX-M1-100t_D11.es selecionado da biblioteca de cDNA do Pb01 e de uma proteína hipotética de *Ajellomyces capsulatus*, que apresentou 78% de identidade com o clone, verificado no programa BLAST (NCBI). Utilizando o programa Protean (DNASar), foram escolhidas regiões de alta hidrofiliçidade, as quais apresentam maior probabilidade de expressão na superfície da célula e alta imunogenicidade. Os peptídeos selecionados estão descritos na Tabela 3 e sua localização na seqüência proteica está indicada na Figura 1.

Esses peptídeos foram sintetizados pela Profa. Maria Aparecida Juliano (INFAR, UNIFESP), e foram utilizados na imunização de camundongos Balb/c para obtenção de soros policlonais monoespecíficos.

Tabela 3. Peptídeos sintéticos utilizados na imunização de camundongos para obtenção de soro policlonal.

Peptídeos	Sequência de aminoácidos
Peptídeo 1	LYARHWETNQPLPE-NH ₂
Peptídeo 2	KETCPGETWNPDVRR-NH ₂
Peptídeo 3	FVELPSIIMENFAMAPEV-NH ₂
Peptídeo 4	HEMGHAIHSVMA-NH ₂
Peptídeo 5	TNPSPNSTKPPLLSKH-NH ₂
Peptídeo 6	LNSNNRNLVQKEIA-NH ₂
Peptídeo 7	NHENYENIQGAMD-NH ₂
Peptídeo 8	SFFTARKNPHPTH-NH ₂
Peptídeo 9	MEDYAKLGQGKPPFAP-NH ₂
Peptídeo 10	QAYHDSSPLHGG-NH ₂

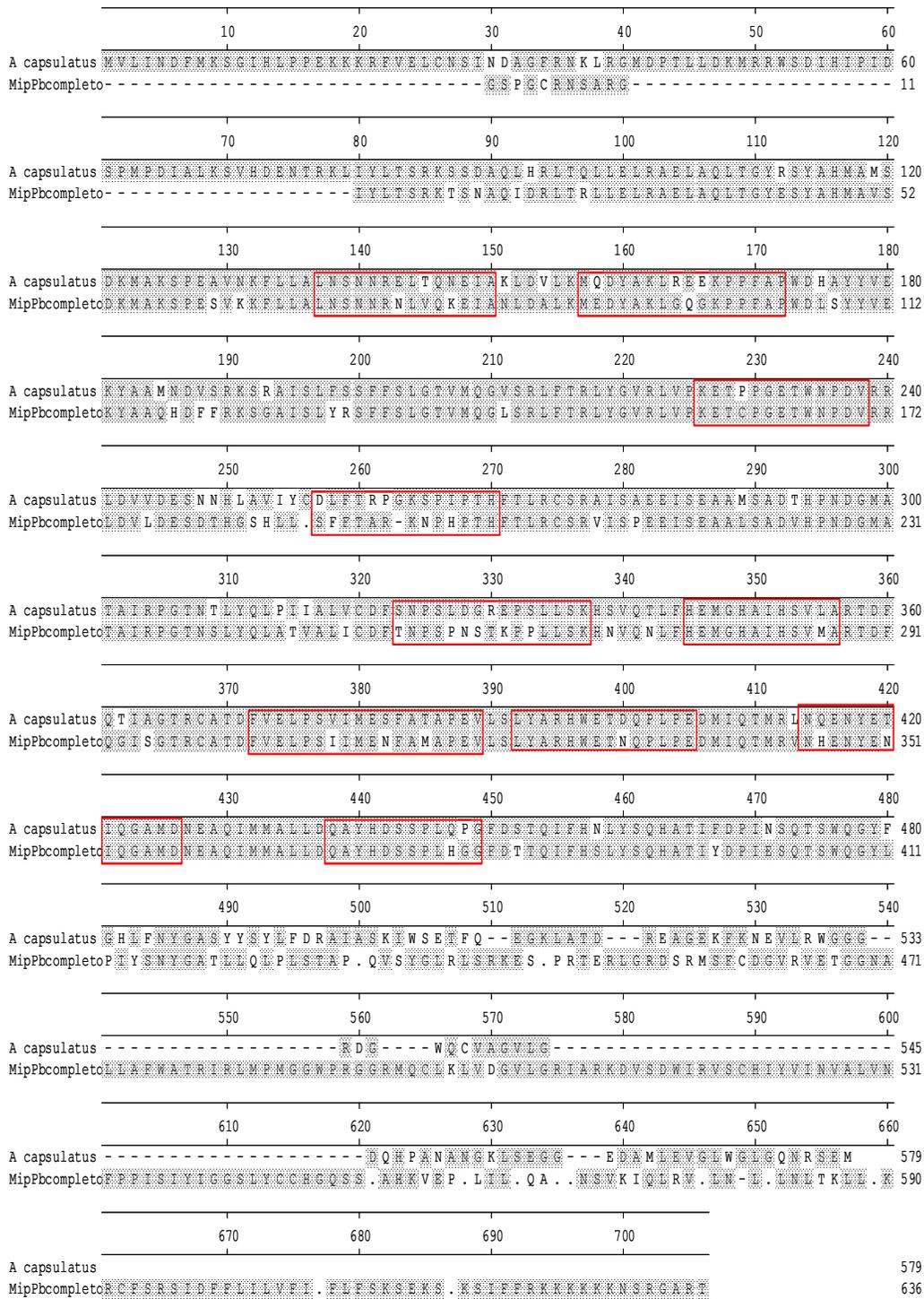


Figura 1 – Alinhamento da seqüência do clone PBGEX-M1-100t_D11.es proveniente da biblioteca de cDNA do Pb01 e da proteína hipotética de *Ajellomyces capsulatus*. Os retângulos em vermelho mostram a localização dos peptídeos selecionados que foram sintetizados e utilizados para imunização de camundongos para obtenção de soros policlonais monoespecíficos. **A. capsulatus representa a seqüência proteica da proteína hipotética de *Ajellomyces capsulatus* e **MipPbcompleto** representa a seqüência proteica deduzida do clone PBGEX-M1-100t_D11.es de *P. brasiliensis* isolado 01.**

3.12.3. Ensaio de hemólise

Para testar a toxicidade dos peptídeos sintéticos utilizados na imunização de camundongos para obtenção de soro policlonal específico para a metalo-oligopeptidase de *P. brasiliensis*, foi realizado um ensaio de hemólise. Neste ensaio, cerca de 2 mL de sangue de um voluntário sadio foram coletados de forma cuidadosa e sem anticoagulantes para minimizar a hemólise, e foram adicionados 100µL de tampão citrato para cada 900µL de sangue. Após centrifugação a 2.000g por 10 minutos, as hemáceas foram lavadas duas vezes com PBS e ressuspendidas em PBS contendo 1% de BSA. Hemáceas (3×10^7 células por poço) foram incubadas na presença dos peptídeos (25 e 10 µg) em placa de 96 poços com fundo em "U". A placa foi incubada a 37°C por 2,5h, sob agitação, centrifugada a 2.000g por 5 minutos e o sobrenadante transferido para uma placa com fundo chato. A leitura da absorbância foi feita em leitor de placa a 405nm (Multiskan, Titertek). Triton X-100 (0,2% em PBS) foi utilizado como controle positivo do experimento (100% hemólise) e hemáceas não tratadas como controle negativo.

3.12.4. Imunização de camundongos com peptídeos para produção de anticorpos específicos

Para a imunização dos animais Balb/c fêmeas, foi utilizado hidróxido de alumínio (alum) como adjuvante (Merck). Foram injetados 300µl da solução de peptídeo e adjuvante (1:1, v:v) por animal, intraperitonealmente, sendo que na primeira imunização foram injetados 25µg de peptídeo, e nas imunizações subseqüentes, 10µg do peptídeo por animal. Animais controle foram imunizados com o mesmo volume de PBS

na presença de adjuvante. Os peptídeos foram diluídos em PBS, ou em uma mistura de PBS e DMSO (dimetilsulfóxido) na concentração máxima de 20%. À solução de peptídeo foi acrescentado o hidróxido de alumínio, gota a gota, agitando-se continuamente em vortex a baixa velocidade. Após a adição total da quantidade de hidróxido de alumínio, a solução foi agitada em vortex por mais 30 minutos. Os camundongos foram imunizados a cada 15 dias e amostras de sangue (100 µL) foram coletadas antes de cada imunização. Inicialmente foram realizadas cinco imunizações e nos experimentos subseqüentes apenas duas imunizações.

3.12.5. ELISA-Q

Com o objetivo de verificar o título de anticorpos produzidos pelos camundongos imunizados, placas de 96 poços opacas foram sensibilizadas com os peptídeos utilizados nas imunizações, na concentração de 250ng/poço em PBS (50µL/poço). Este protocolo foi adaptado de um protocolo fornecido pelo Prof Carlos P. Taborda, ICB-USP. A placa foi incubada por 12h a 4°C, e em seguida lavada 5X com PBS-Tween 20 a 0,05% (PBS-T).

Foi então realizado o bloqueio da placa com solução PBS contendo 2% de BSA e 5% de leite desnatado (100µl/poço) por 2 h à temperatura ambiente (T.A.). Após cinco lavagens com PBS-T, as placas foram incubadas com os soros dos animais imunizados diluídos (1:25, 1:50 ou diluições seriadas) em PBS contendo 2% BSA e 5% leite desnatado por 2h a TA ou 12h a 4°C. Após cinco lavagens com PBS-T, as placas foram incubadas com anti-Ig total de camundongo conjugado com peroxidase (Invitrogen) diluído 1:1.000 em PBS 0,4% BSA e 1% leite desnatado por 2h

a TA. TOP recombinante de mamífero (rTOP) ou MIP recombinante de mamífero (rMIP) (100ng/poço) também foram utilizadas para sensibilizar placas de 96 poços. Anticorpos comerciais contra TOP e MIP foram individualmente testados em triplicata a uma diluição de 1:1.000 e os anticorpos reativos quantificados com anti-IgG de coelho (1:1.000) conjugado com HRP. As placas foram lavadas 5X com PBS-T e 2X com PBS e a revelação foi realizada com solução ECL (Millipore) diluída 1:100 ou 1:500. A leitura das placas foi realizada em leitor quimioluminescente (SpectraMax L – Molecular Devices) à 470nm, e os resultados expressos em valores médios de unidades relativas de luminescência (URL)

3.12.6. Montagem de coluna de afinidade CNBr-Sepharose 4B com anticorpos policlonais monoespecíficos e purificação da peptidase nativa

Inicialmente, 2g de CNBr-ativa Sepharose 4B (GE) foram ressuspendidas em 15 mL de HCl 1mM por 10 minutos. Em seguida o HCl é retirado por lavagem com auxílio de funil de placa porosa. A Sepharose foi misturada a um tampão de bicarbonato de sódio (0,1 M NaHCO₃ e 0,5 M NaCl pH 8.3) que contém IgGs purificadas de camundongos (5mg de IgG para cada 1mL de Sepharose hidratada) e incubado por 2h à temperatura ambiente ou por 16h à 4°C, com agitação. Esta Sepharose é então lavada com 5 volumes de coluna do tampão de bicarbonato de sódio. Os grupos não reagentes são bloqueados por 2h à temperatura ambiente com uma solução de 1M de etalonamina. Em seguida foi feita uma lavagem alternando pH baixo (0,1M acetato de sódio com 0,5M NaCl, pH 4) e pH alto

(0,1M Tris-HCl e 0,5M NaCl, pH 8) com 3 volumes de coluna de cada tampão por 3-6 vezes.

A purificação da peptidase nativa foi tentativamente obtida com a passagem de 2 mL (3,8 mg de proteína total) do extrato citosólico de *P. brasiliensis* (2-3 vezes) pela coluna, que foi lavada com Tris-HCl 0,1M NaCl 0,15M pH 8 (10 volumes), eluída com 10 mL de KCl/HCl 0,5M pH 2 e cada fração da eluição (aproximadamente 1mL) foi neutralizada com 50 μ L de Tris-HCl 0,1M pH 8. Foi feito um *pool* das frações que continham a maior quantidade de proteínas eluídas (quantificadas pelo micrométodo de Bradford), que foi dessalinizado em uma coluna PD-10 (GE) utilizando água como eluente. Essa amostra foi liofilizada, ressuspensa em água e analisada em gel de SDS-PAGE corado com prata, como descrito no item 3.12.7.

3.13. Eletroforese vertical em gel de poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE)

Na eletroforese vertical em gel de poliacrilamida contendo SDS (dodecilsulfato de sódio), o gel de corrida continha 10 % de acrilamida em tampão Tris-HCL 1,5 M, pH 8,8, e 0,2% de SDS. O gel de empacotamento continha 3% de acrilamida em tampão Tris-HCL 0,5 M, pH 6,8 e 0,2% de SDS. As amostras em concentrações variáveis, aproximadamente 20 μ g de lisado, extrato citosólico, preparado de membrana ou imunoglobulinas, e 1-5 μ g de proteína recombinante, foram diluídas 4 vezes em tampão de amostra (62 mM Tris-HCL, pH 6,8, 0,2% SDS, 50 mM β -mercaptoetanol, azul de bromofenol 0,005% (p/v) e glicerol 10%), fervidas por 5 minutos e aplicadas no gel. O tampão de corrida continha 25 mM de Tris, 190 mM de

glicina, pH 8.3 e SDS 0,1%. A eletroforese foi realizada a 100V e as proteínas presentes no gel foram coradas com Coomassie Brilliant Blue R-250. Alternativamente as proteínas separadas no gel foram coradas com prata, onde primeiramente o gel foi fixado por 15 minutos em uma solução de 50% de metanol, 12% de ácido acético e 0,5% de formaldeído a 37%. Logo após, foram feitas 2 lavagens, por 10 minutos cada uma, com 50% de etanol, seguido de um pré-tratamento com tiosulfato de sódio 0,2g/L, por 10 minutos. Foi feito o tratamento com prata, por 10 minutos, com a adição da solução de nitrato de prata 2g/L e 0,07% de formaldeído a 37%. O gel foi revelado com 60g/L de carbonato de sódio, 0,5% de formaldeído a 37% e 4mg/L de tiosulfato de sódio. A reação foi bloqueada com a adição de 50% de metanol e 12% de ácido acético e a última lavagem foi realizada com 50% de metanol. A cada etapa do processo de coloração, lavou-se o gel de poliacrilamida 2 vezes com água bidestilada.

3.14. Immunoblotting

TOP humana recombinante, MIP de rato recombinante e extrato citosólico de Pb18 foram separados eletroforéticamente em gel de SDS-PAGE (como descrito no item 3.13). Foram aplicados no gel de 2 a 5µg de proteína recombinante ou 20 µg de extrato citosólico. Após a separação eletroforética, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose em tampão de transferência (25mM Tris-Base, 192mM Glicina, 20% Metanol, pH 8,3) a 100V, por 1h à 4°C ou em sistema de transferência "semi-dry" (GE) a 20V, durante 25 minutos. Após a transferência, a membrana foi corada com solução Ponceau-S (0,1% de Ponceau em ácido

acético 10%), descorada com água bidestilada e os padrões de massa molecular identificados.

Foi então realizado o bloqueio da membrana com solução de PBS contendo 5% de leite em pó desnatado (PBS-Leite) por 1h à temperatura ambiente ou a 4°C por 16h, sob agitação. Após cinco lavagens de 10 minutos com PBS-Tween 0,1%, a membrana foi incubada com o anticorpo primário (Anti-TOP ou anti-MIP, descritos no item 3.1) diluídos 1:1.000 em PBS-leite 1% por 16h a 4°C, sob agitação. A membrana foi lavada novamente com PBS-Tween 0,1%, 5 vezes por 10 minutos cada lavagem e incubada com anti-Ig de coelho conjugada a HRP (*horse radish peroxidase*, Invitrogen), diluído 1:1.000 em PBS-leite 1% por 2-3h à temperatura ambiente, sob agitação. Após 5 lavagens de 10 minutos cada com PBS-Tween 0,1%, a revelação da membrana foi feita utilizando-se o reagente ECL (Millipore), segundo instruções do fabricante. Alternativamente, as membranas foram reveladas utilizando-se 3 mg de 4CN (4-chloro-1-naphthol, Sigma), diluído em 1 mL de etanol absoluto e posteriormente diluído dez vezes em 0,05M Tris-HCl pH 7,5 e 0,2M NaCl com adição de 7 µL de H₂O₂ 30 vol para cada 10 mL de solução.

3.15. Obtenção da enzima recombinante

3.15.1. Subclonagem para expressão da metalo-peptidase proveniente de biblioteca de cDNA de *P. brasiliensis*

Os clones PBDEX-Y1-094t_G12.es e PBGEX-M1-100t_D11.es da biblioteca de cDNA do *Paracoccidioides brasiliensis* 01, cedidos gentilmente pelo grupo da Profa. Maria Sueli Soares Felipe da Universidade de Brasília, estão inseridos no vetor pBluescript II SK (Stratagene). Logo, a sequência

de interesse foi amplificada por PCR utilizando-se os primers T7 (5'TAATACGACTCACTATAGGG3') e T3 (5'AATTAACCCTCACTAAAGGG3'), no seguinte protocolo: 3 minutos a 94°C para denaturação das fitas, seguido de 35 ciclos de 94°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto e 72°C por 3 minutos, finalizados por 10 minutos a 72°C. A seqüência amplificada foi clonada em pGEM T-Easy (Promega) e posteriormente seqüenciada. O gene também foi seqüenciado em seu plasmídeo original. As reações de seqüenciamento foram realizadas de acordo com o protocolo para o MegaBACE 1000 (Amersham Biosciences), utilizando o DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (com Thermo Sequenase™ II DNA Polimerase) e as seqüências foram analisadas pelo software Sequence Analyser utilizando o Base Caller Cimarron 3.12. Todos os seqüenciamentos foram realizados no Centro de Estudos do Genoma Humano da Universidade de São Paulo. O mesmo processo foi realizado para os clones da biblioteca de cDNA do Pb18, cedidos pelo Prof. Dr. Gustavo Goldman USP – Ribeirão Preto. Após a análise dos insertos, estes foram subclonados utilizando as enzimas de restrição XhoI e BamHI, e ligados em 2 diferentes vetores de expressão procariótica pGEX 4T-2 (GE) e pHIS 2 (Clontech).

3.15.2 Clonagem do gene para expressão da metalo-peptidase de *P. brasiliensis*

3.15.2.1 Extração de RNA total

O RNA total foi extraído de culturas leveduriformes de Pb18V e Pb18NV cultivadas em meio sólido após 5-7 dias de crescimento, ressuspendidas em PBS. Após centrifugação, 0,1mL de leveduras foram

lavadas duas vezes com PBS e mecanicamente lisadas por agitação com pérolas de vidro durante aproximadamente 10 minutos na presença de 0,7mL de TRIzol (Invitrogen). Após incubação por 10 minutos à temperatura ambiente, restos celulares foram removidos por centrifugação (1.800g por 10 minutos a 4°C). Para cada 0,75 mL do sobrenadante foram acrescentados 0,2mL de clorofórmio, seguido de agitação vigorosa. Após 5 minutos, a mistura foi submetida à centrifugação (1.800g por 10 minutos a 4°C) e a fase superior (aquosa) extraída com igual volume de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (50:49:1, v:v:v) até completa limpeza da interfase. À fase aquosa final foi acrescentado um volume de isopropanol e adicionado 1,2 M de citrato de sódio/ 0,8 M cloreto de sódio (0,25 mL de solução para cada 0,75 mL de TRIzol inicial), e incubado a -20°C por 12-16h para precipitação do RNA. O precipitado foi recuperado por centrifugação (1.800g por 20 minutos a 4°C), lavado com etanol 75%, seco por evaporação e ressuspenso em água estéril e livre de RNase. A quantidade de RNA e a razão RNA-proteína foram estimadas por análise das leituras espectrofotométricas a 260nm e 280nm. Todas as amostras utilizadas nos ensaios apresentaram razão $A_{260/280}$ maior do que 1,5.

Para observar a integridade do RNA extraído (visualização das bandas 18S e 28S), foi realizada eletroforese em gel de agarose a 1% com 0,5 µg/mL de brometo de etídio utilizando 3 µg de RNA em tampão de amostra contendo 0,25% bromofenol blue, 0,25% xylene cyanol, 15% Ficoll-400 e 7M de uréia, aquecido durante 10 minutos a 65 °C e acrescidos de 0,2 µl de brometo de etídio 10 mg/mL. O RNA extraído foi armazenado a -80°C.

A síntese de cDNA a partir do RNA total (2 µg) previamente tratado com 2 UI de Turbo DNase (Ambion), foi obtido utilizando o kit SuperScript III – First Strand Synthesis (Invitrogen).

Para reação de PCR, foram utilizados 10% da reação de síntese de cDNA acrescidos de 2 mM de cloreto de magnésio, 200 µM de dNTPs, 2 U de *taq* DNA polimerase (Invitrogen) e 50 pmol de cada iniciador (5'-ATGATTAGCCGTAATTGTAGG -3' e 5'-CTAATTATGCAGTCCAAGCTC -3' para TOP e 5'-ATGCTTAAGATCCTCCGACG-3' e 5'-CTAATGTCTTTCTGAGCGATC-3' para MIP) em tampão contendo 20 mM de Tris-HCl pH 8,4 e 50 mM de KCl. Esses iniciadores foram desenhados com base na sequência depositada no banco de dados genômico de *Pb18*, de genes com homologia à TOP e à MIP de mamíferos. As condições para reação de PCR incluíram 3 minutos a 94°C para desnaturação das fitas, seguido de 35 ciclos de 94°C por 1 minuto, 55°C a 58°C por 1 minuto e 72°C por 3 minutos, finalizados por 10 minutos a 72°C. A temperatura de anelamento variou conforme o par de iniciadores utilizados.

Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose. O fragmento de cDNA foi recuperado do gel com auxílio do "Concert™ Matrix Gel Extraction System" (Gibco BRL) ou BIOCLEAN DNA Purification kit (Biotools) e clonado para sequenciamento no vetor "pGEM-T easy" (Promega), de acordo com instruções do fabricante.

3.15.2.2 Sequenciamento do cDNA dos homólogos de TOP e MIP de *P. brasiliensis*

O cDNA dos homólogos de TOP e MIP clonados a partir de mRNA de células de *P. brasiliensis* foram seqüenciados utilizando o MegaBACE 1000

(Amersham Biosciences). As reações de seqüenciamento foram realizadas de acordo com o protocolo para o MegaBACE 1000, utilizando o DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (com Thermo Sequenase™ II DNA Polimerase) e as seqüências foram analisadas pelo software Sequence Analyser utilizando o Base Caller Cimarron 3.12. Todos os sequenciamentos foram realizados pelo Centro de Estudos do Genoma Humano da Universidade de São Paulo.

O resultado obtido foi comparado por alinhamento com as seqüências fúngicas de *P. brasiliensis* e das enzimas de mamíferos descritas, utilizando o banco de dados GenBank.

3.15.2.3. Construção do vetor de expressão pHis3- PbTOP e pHis3- PbMIP

O cDNA do homólogo de TOP de *P. brasiliensis* clonado por RT-PCR foi obtido por restrição com NotI a partir do plasmídeo *pGEM-T easy* (Promega). O fragmento foi separado do plasmídeo em gel de agarose 1% e eluído com BIOCLEAN DNA Purification kit (Biotools), seguindo o protocolo do fabricante.

O cDNA da enzima foi inserido no plasmídeo pHis3, digerido com a mesma enzima e defosforilado utilizando *shrimp alkaline phosphatase* (Gibco BRL ou USB), seguindo o protocolo do fabricante. O plasmídeo resultante (pHis3-PbTOP) foi utilizado para transformar *E.coli* DH5- α e os transformantes foram selecionados por resistência à ampicilina (100 μ g/ml).

Os plasmídeos foram obtidos por mini-preparação por lise alcalina a partir de bactéria *E. coli* selecionada crescida a 37°C sob agitação em meio LB (*Luria-Bertani*) composto de 1% de triptona, 0,5% de extrato de

levedura e 1% de NaCl, pH 7,3, acrescido de antibiótico. A confirmação da construção do vetor de expressão pHis3-PbTOP foi realizada por restrição e visualização do resultado em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. O tamanho dos fragmentos foi estimado por comparação com o padrão de peso molecular *1Kb DNA ladder* (Invitrogen). O mesmo foi feito para o gene de MIP de *P. brasiliensis* (pHis3-PbMIP).

3.15.2.4. Mini-preparação por lise alcalina

Uma colônia isolada de bactérias *E.coli* contendo o plasmídeo de interesse foi inoculada em 3 mL de meio LB (Luria Bertani) com antibiótico e incubada por 16h com agitação a 200 rpm e 37°C. As bactérias foram recolhidas por centrifugação a 12.000rpm por 2 minutos e ressuspendidas em 200 µL de tampão contendo 50 mM de glucose, 25 mM de Tris-HCl pH8,0 e 10 mM de EDTA pH 8,0. Adicionaram-se 400 µL de solução contendo hidróxido de sódio 0,2 M e SDS 0,1% e misturou-se por inversão. Foram adicionados 300 µL de solução contendo 3 M de acetato de potássio e 5 M de ácido acético, misturando por inversão. Ao sobrenadante recuperado por centrifugação a 12.000 rpm por 10 minutos foi adicionado 1 volume de isopropanol. O precipitado recuperado por centrifugação a 12.000rpm por 10 minutos foi lavado com etanol 70% e então ressuspendido em 50 µL de água contendo RNase (50 mg/mL).

O produto de mini-preparação foi analisado por eletroforese em gel de agarose corado com brometo de etídio.

3.15.2.5. Indução da expressão do homólogo de TOP de *P. brasiliensis* recombinante em *E. coli*

Para realizar a expressão da proteína recombinante, o plasmídeo pHis3-PbTOP foi utilizado para transformar *E.coli* BL21 (DE3) pLysS e os transformantes foram selecionados por resistência a cloranfenicol (50 µg/ml) e ampicilina (100 µg/ml) em placa de LB sólido (meio LB acrescido de 1,5% de ágar bacteriológico). Uma única colônia desta placa foi inoculada em 2 mL de meio LB contendo os dois antibióticos e incubada por 4h a 37°C sob agitação (~200 rpm), então, a expressão da proteína recombinante foi induzida por 16h a 30°C com 0,5 a 10 mM de IPTG (D-thiogalactopyranoside). As bactérias foram recuperadas por centrifugação a 4.000 rpm por 20 min, o sobrenadante e o lisado das bactérias foram analisados em gel de SDS-PAGE

3.16. RT-PCR Quantitativo (REAL TIME-PCR, ou qRT-PCR)

O sistema de detecção Syber Green (Invitrogen) foi utilizado nos experimentos de PCR quantitativo, seguindo as instruções do fabricante. A síntese de cDNA a partir de RNA total do Pb18V e Pb18NV obtidos como descrito no item 3.15.2.1 (2 µg) previamente tratados com 2 UI de Turbo DNase (Ambion), foi obtida utilizando o kit SuperScript III – First Strand Synthesis (Invitrogen). Após o término da reação, esta foi diluída cinco vezes em água milli-Q para as reações de quantificação relativa com os primers da Tabela 3, para uma concentração final de 250 nM. Os genes MIP e GAPDH de *P. brasiliensis* foram utilizados como controles endógenos. A reação foi realizada no sistema Stratagene Mx3005P System (Stratagene), com um ciclo inicial de 95°C (10 min), seguidos por 40 ou 50 ciclos de 95°C

(30 s) e 60°C (30 s). A curva de dissociação (curva de *melting*) foi determinada com um ciclo adicional de 95°C (1 min), variando de 55°C a 95°C, com cada passo de aumento de temperatura de 0,5°C. Os controles negativos não continham DNA ou RNA. As reações foram feitas em duplicatas com três amostras biológicas para cada grupo (virulento e não virulento) e em paralelo com os controles endógenos. Os valores de Ct (cycle threshold – ciclo, ponto no tempo, onde a reação cruza o limiar de detecção) foram transformados em quantidades utilizando uma planilha de Excel, baseado no método de Ct comparativo. Os dados resultantes foram convertidos em arquivos de acordo com os requerimentos do software, analisado com o VBA applet *geNorm* (Vandesompele et al, 2002). A eficiência de reação para cada gene foi realizada utilizando quantidades crescentes de amostras, obtidas através de diluições seriadas do DNA genômico de *P. brasiliensis*. Os valores de “baseline” e “threshold” foram automaticamente determinados para cada gene utilizando o software Mx3005P v3.0 (Stratagene) e os dados analisados utilizando o programa REST2008 v2.0.7 (Pfaffl et al, 2002).

Tabela 4. Sequências de *primers* utilizados nas reações de qRT-PCR. Os iniciadores *TOP* e *MIP* foram desenhados com base na sequência dos genes de *P. brasiliensis* homólogos às respectivas enzimas de mamíferos.

Oligos	Direção	Sequência 5'-3'
TOP	senso	GAGCAAATTTTCGGCAACA
	anti-senso	GGAAAAACAGCCGTAGTAGGCTTAA
MIP	senso	TCAACTACGGCGCCACCTA
	anti-senso	TCTCAGCCCATAGCTTACTTGCT
gp43	senso	CGTTGGCGTCTCAATTTG
	anti-senso	CGCCAAAAAGCCATTCCA
Tubulina	senso	TCTGCCACCGAAACCTTGAT
	anti-senso	TGGGCGATGAGGCTATTGAG
GAPDH	senso	TATACCGCCACCCAGAAGAC
	anti-senso	TGAGAGCTGGGATGACCTTT
eIF3	senso	CGAAAGCCGATACGATGAAAC
	anti-senso	GCAGATGCCGATTTTGGAT

3.16.1. Confiança dos genes endógenos

Para assegurar a correta normalização dos níveis de expressão dos genes alvos, a estabilidade dos quatro genes controle (tubulina, GAPDH, eIF3 e MIP) foi estatisticamente determinada utilizando o VBA applet *geNorm* (Vandesompele et al, 2002). *geNorm* estabelece um ranking dos genes testados baseados em sua estabilidade de expressão, determinando os dois genes endógenos ou a combinação de vários genes testados para a normalização dos resultados. Os genes endógenos selecionados são classificados de acordo com a "medida determinada da estabilidade do gene controle" (M, média *pair-wise* da variação de um gene particular em relação a todos os outros genes), do mais estável (menor valor de M) ao menos estável (maior valor de M) de acordo com Vandesompele et al (2002).

3.16.2. Análise REST2008

O REST2008 é uma ferramenta de software baseada nos dados primários obtidos da reação de qRT-PCR, que permite a quantificação

relativa entre dois grupos de amostra e subsequentemente testa a significância dos resultados com um modelo estatístico pertinente (Pfaffl et al, 2002). Este programa determina se existe uma diferença significativa entre os dois grupos amostrais utilizando técnicas randômicas. Neste estudo, REST2008 foi utilizado para comparar os níveis de expressão dos genes da enzima homóloga à TOP de mamíferos e da gp43 em *P. brasiliensis* em amostras do isolado Pb18 (normalizado utilizando os dois genes endógenos previamente analisados com *geNorm*) de dois isolados (i) virulento e (ii) não virulento. Análise estatística da expressão gênica foi baseada no teste de hipótese utilizando 2.000 realocações randômicas de amostras (virulento) e controle (não virulento). O modelo matemático utilizado foi baseado na correção para eficiências de reações exatas e o desvio médio do ponto de cruzamento entre o grupo amostral e o grupo controle. Subsequentemente, os resultados da expressão dos genes investigados foram analisados quanto à significância por um teste "pair-wise fixed reallocation randomization test" utilizando erro padrão (SE) estimado através do algoritmo complexo de Taylor (Pfaffl et al, 2002). Os genes com o valor de probabilidade $< 0,05$ foram considerados significativamente diferentes entre os grupos.

3.17. Cladograma

Com o auxílio do software MegaAlign (DNASar, Lasergene), foi feito o alinhamento das seguintes sequências: TOP de *P. brasiliensis* isolados 01 (EEH41798.1) e 03 (EEH18209.1), sacarolisina Pb18 (EEH47123.1); sacarolisina de *S. cerevisiae* (CAA54039.1); TOP humana (AAH13878.1); neurolisina humana (NP_065777.1); MIP de *P. brasiliensis* isolados 01

(EEH38189.1), 03 (EEH19367.1) e 18 (EEH47637.1), MIP humana (NP_005923.2) sendo o número em parênteses o número de acesso das sequências no Genbank. Com o resultado desse alinhamento foi possível obter o cladograma e a tabela de identidade das sequências analisadas, gerados pelo software.

3.18. Análise estatística

Os resultados foram expressos como médias \pm desvio padrão. A análise estatística foi realizada utilizando-se o teste *t* de Student, onde $p < 0,05$ indica diferença estatística significativa.

4. Resultados

4.1. Identificação e caracterização da atividade de metalo-oligopeptidases em leveduras do *Paracoccidioides brasiliensis*

4.1.1. Hidrólise de substratos fluorogênicos

Uma importante classe de enzimas ainda não descritas no fungo dimórfico *P. brasiliensis* são as metalo-oligopeptidases. Fazem parte dessa família a thimet oligopeptidase (TOP), a neurolisina, e o homólogo bacteriano Oligopeptidase A (OpdA). Como atividades sugestivas da existência dessas enzimas em outras espécies fúngicas já foram descritas, investigamos a presença desta família de enzimas em *P. brasiliensis*.

Em ensaio preliminar, verificamos a presença de atividade sugestiva dessa família de proteases em lisado de leveduras de *P. brasiliensis*, isolado 18 (Pb18). Utilizamos um substrato com supressão intramolecular de fluorescência derivado da bradicinina, clivado diferencialmente por TOP, neurolisina e pela OpdA (Camargo et al, 1997; Oliveira et al, 2001a e 2001b; Paschoalin et al 2005). Foram testados lisados de dois isolados de Pb18 recém-coletados de órgãos de camundongos infectados, que apresentam uma maior virulência, como também lisados de leveduras mantidas em culturas *in vitro* por longos períodos, que apresentam uma menor virulência e capacidade de infecção *in vivo*.

Na Figura 2, observa-se que somente lisados de leveduras de Pb18 de maior virulência clivaram o substrato Abz-GFSPFRQ-EDDnp. O lisado obtido do isolado de menor virulência não foi capaz de hidrolisar o substrato derivado de bradicinina,

sugerindo que oligopeptidases possam ser produzidas em menor concentração nas condições de cultivo *in vitro*.

Mediante o resultado positivo indicativo da presença de atividade oligopeptidásica em lisados de Pb18 de maior virulência, a hidrólise de outros substratos com supressão intramolecular de fluorescência foi analisada, para melhor identificação dos componentes do lisado de Pb18 responsáveis pela atividade oligopeptidásica. Como descrito em Materiais e Métodos, Tabela 1, foram utilizados substratos hidrolisados preferencialmente por TOP, neurolisina, e foi acrescentado um substrato seletivo da neprilisina (NEP), peptidase da mesma família também capaz de clivar a bradicinina. Nestes ensaios, a hidrólise dos substratos foi analisada em frações de membrana/parede celular e citosólica obtidas por centrifugação do lisado total, para localização da atividade oligopeptidásica no microorganismo. A maior atividade enzimática foi encontrada na fração citosólica, para todos os substratos avaliados (Figura 3). Não houve detecção de atividade peptidásica na fração de membrana/parede celular. A hidrólise do peptídeo fluorogênico análogo da neurotensina Abz-NKPRRPQ-EDDnp, clivado preferencialmente pela neurolisina, foi cerca de 8 vezes menor que a clivagem do substrato Abz-GFSPFRQ-EDDnp, clivado preferencialmente pela TOP (Tabela 5). A baixa atividade dos preparados sobre o substrato Abz-GFSIFRQ-EDDnp, que apresenta uma substituição da prolina por uma isoleucina no ponto de clivagem do substrato Abz-GFSPFRQ-EDDnp pela TOP tornando-o resistente a esta enzima (Oliveira et al, 2001b), confirma uma atividade TOP-*like* presente majoritariamente no lisado do fungo (Tabela 5 e Figura 3). Não foi observada hidrólise do peptídeo

Abz-rRL-EDDnp, que é um substrato seletivo da NEP enzimas recombinantes TOP e neurolisina (Tabela 5).

Para verificarmos se a enzima fúngica apresentaria atividade semelhante à enzimas da mesma família bacterianas ou à TOP eucariótica, a hidrólise dos diversos substratos pelo lisado fúngico foi comparada à atividade da OpdA. Na Tabela 5 observa-se que a hidrólise do substrato Abz-GFSPFRQ-EDDnp foi muito semelhante na OpdA recombinante e no lisado de Pb18, no entanto, enquanto a OpdA mostrou forte atividade hidrolítica sobre os substratos Abz-NKPRRPQ-EDDnp e Abz-GFSIFRQ-EDDnp, o lisado fúngico apresentou atividades residuais muito baixas. Esse resultado sugere que a atividade hidrolítica TOP-like fúngica é mais semelhante à TOP de mamíferos do que à OpdA bacteriana.

Em comparação com outras enzimas recombinantes (TOP, neurolisina e OpdA), o perfil de atividade peptidásica sobre diferentes substratos pelo extrato citosólico do *P. brasiliensis* se assemelha ao perfil da TOP recombinante (Tabela 5). A maior atividade enzimática do extrato citosólico em comparação aos outros preparados (membrana e parede celular, lisado total) indica uma localização citosólica dessa enzima, e o perfil de atividade peptidásica sobre os diferentes substratos fluorogênicos avaliados sugere a presença de uma metalo-peptidase com atividade TOP-like em leveduras de *P. brasiliensis*.

Para a determinação da atividade metalo-oligopeptidásica no sobrenadante de cultura do fungo, foram realizados vários ensaios utilizando diferentes métodos para obtenção do sobrenadante. No entanto, não foi possível detectar atividade oligopeptidásica nos sobrenadantes de cultura obtidos (dados não mostrados). Em um primeiro experimento, foi utilizado sobrenadante de cultura de *P. brasiliensis*

coletado em dias alternados por até 21 dias. Devido à ausência da atividade, o volume da cultura foi aumentado e o sobrenadante concentrado, a fim de verificar se a ausência de atividade observada no primeiro experimento poderia ser devida à baixa concentração da enzima secretada. Novas culturas foram feitas em um volume final de 200 mL, todo o sobrenadante foi coletado após 7 e 14 dias e concentrado 50-100X com e sem a adição de soro fetal bovino. Ainda assim não foi possível detectar atividade oligopeptidásica nesses sobrenadantes (dados não mostrados). Este resultado indica que a metalo-oligopeptidase com atividade TOP-*like* encontrada no extrato citosólico de *P. brasiliensis* não é secretada nas condições estudadas.

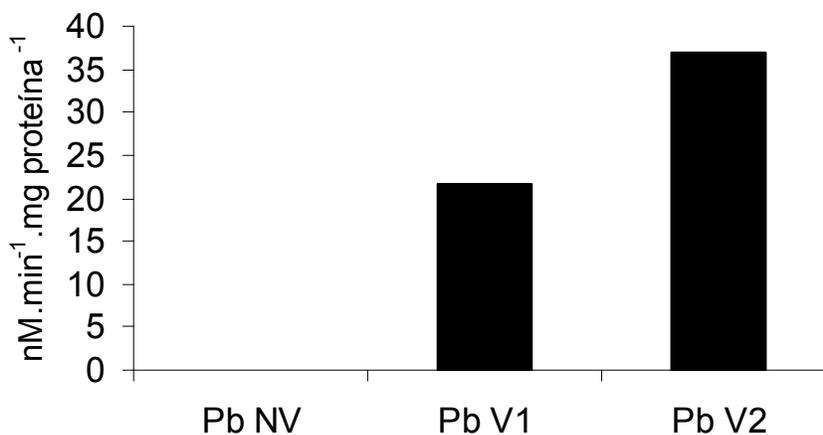


Figura 2 – Detecção de atividade oligopeptidásica em lisados de *P. brasiliensis*. A atividade proteolítica presente em preparações de Pb18 foi verificada usando Abz-GFSPFRQ-EDDnp como substrato. **PbNV**, isolado menos virulento e **PbV1** e **Pbv2** isolados mais virulentos, recém obtidos de órgãos de camundongos infectados. Os ensaios foram realizados a 37°C, utilizando-se 20 μ M de substrato em tampão 50mM Tris-HCl, pH 7,4 como descrito em Materiais e Métodos.

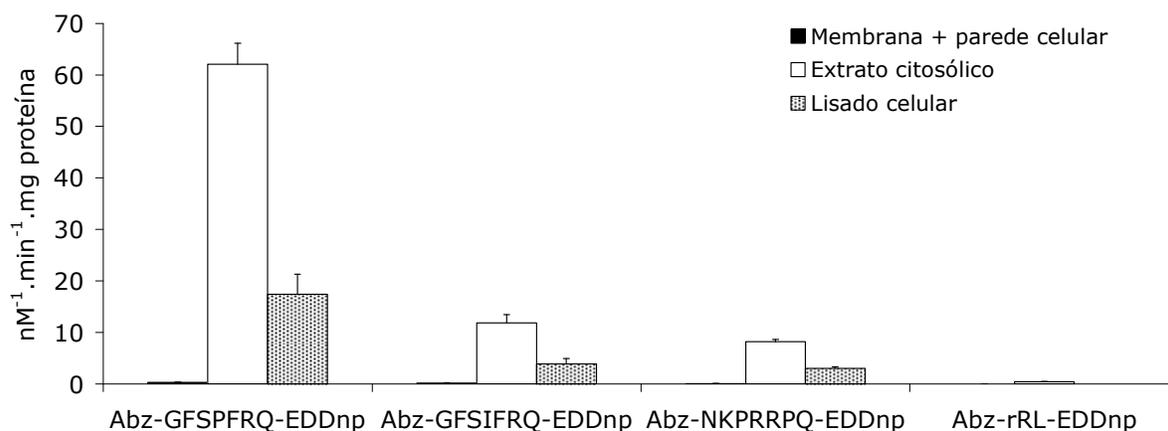


Figura 3 – Atividade peptidásica de diversas preparações de *P. brasiliensis* sobre substratos com supressão intramolecular de fluorescência. Hidrólise de diferentes substratos fluorogênicos por enzimas presentes no extrato citosólico, lisado e preparado de membrana/parede celular de Pb18. Amostras de Pb18V foram incubadas com 20 μ M dos substratos fluorogênicos a 37°C, em 50mM Tris-HCl, pH7,4 e a atividade quantificada como descrito em Materiais e Metodos. As atividades foram expressas em nM/min/mg de proteína, média \pm desvio padrão.

Tabela 5

Atividade proteolítica comparativa do extrato citosólico de *P. brasiliensis* e enzimas recombinantes sobre substratos fluorogênicos.

Abz-peptídeo-EDDnp	Atividade específica (nmoles.min ⁻¹ .mg proteína ⁻¹)			
	Pb18	TOP*	Neurolisina*	OpdA*
GFSPFRQ	62.0 \pm 4.0	100.1 \pm 9.8	5.5 \pm 1.0	66.2 \pm 7.7
GFSIFRQ	11.8 \pm 1.6	14.3 \pm 4.4	1.6 \pm 0.2	112.9 \pm 8.1
NKPRRPQ	8.2 \pm 0.4	29 \pm 3.3	58 \pm 8.3	85.8 \pm 6.1
rRL	0,4 \pm 0,04	0	0	-

* Dados de Paschoalin *et al.*, Arch Biochem Biophys. 2005 Sep 1;441(1):25-34.

Os ensaios de hidrólise foram realizados a 37°C, em 50mM Tris-HCl, pH 7,4 e 20 μ M dos substratos. A média \pm desvio padrão foram expressos em nM/min/mg de proteína.

4.1.2. Inibição da atividade peptidásica

O perfil de atividade peptidásica presente no extrato citosólico de leveduras de *P. brasiliensis* foi também analisada com a utilização de inibidores de diferentes classes de enzimas proteolíticas (Tabela 6). Os inibidores foram testados quanto aos seus efeitos sobre a hidrólise de Abz-GFSPFRQ-EDDnp pelo lisado de Pb18V e os resultados comparados com a inibição da atividade das enzimas recombinantes TOP, neurolisina e OpdA (Paschoalin et al., 2005 e 2007).

O inibidor específico de metalo-peptidases, *o*-phenantrolina, inibiu 100% a hidrólise do substrato pelo lisado do fungo. O dipeptídeo Pro-Ile (1 mM), inibidor específico de neurolisina (Dauch et al, 1991), inibiu em torno de 50% a atividade do lisado de *P. brasiliensis*, enquanto JA-2 foi capaz de inibir em torno de 90% a hidrólise do substrato. JA-2 é um inibidor seletivo de TOP (Shrimpton et al., 2000), mas é também capaz de inibir neurolisina e OpdA conforme demonstrado por Paschoalin et al (2005). PMSF (0,1 mM), Z-Pro-Prolinal (0,1 mM), E-64 (0,1 µM) e captopril (20 µM) não foram inibitórios descartando a presença de serino-peptidases, cisteíno-peptidases e enzima conversora da angiotensina I. A presença de uma atividade neurolisina-*like* foi também descartada, pois embora o inibidor específico dessa enzima (Pro-Ile) tenha inibido parcialmente a atividade do extrato citosólico, os substratos utilizados, descritos como sendo preferencialmente clivados pela neurolisina, não foram hidrolisados de forma significativa (Figura 3).

Os resultados da hidrólise do substrato Abz-GFSPFRQ-EDDnp com a adição de inibidores confirmam os resultados da atividade peptidásica do extrato citosólico sobre diferentes substratos, indicando que a atividade metalo-oligopeptidásica encontrada no extrato citosólico de *P. brasiliensis* é majoritariamente TOP-*like*. A

atividade residual na presença do inibidor JA-2 pode indicar a presença de uma outra metalo-peptidase capaz de clivar o mesmo substrato fluorogênico, como por exemplo, a peptidase intermediária de mitocôndria, ou MIP (Isaya et al, 1995). Marcondes et al (2009) demonstraram que MIP humana cliva o peptídeo Abz-GFSPFRQ-EDDnp e não é inibida por JA-2, mas é inibida por *o*-fenantrolina. As sequências homólogas da TOP e da MIP de mamíferos podem ser encontradas no banco de dados do genoma de *P. brasiliensis* dos isolados 01, 03 e 18, tornando possível sua expressão pelo fungo.

Tabela 6

Efeito de inibidores na hidrólise do substrato Abz-GFSPFRQ-EDDnp pelo extrato citosólico de *P. brasiliensis* isolado 18 (Pb18) e enzimas recombinantes TOP, neurolisina e OpdA.

Inibidores	Atividade residual (%) sobre Abz-GFSPFRQ-EDDnp			
	Pb18	TOP*	Neurolisina*	OpdA*
Controle (sem inibidor)	100	100	100	100
\square -fenantrolina (4 mM)	0	0	0	0
JA-2 (3 \square M)	8.7	0	1	8
Pro-Ile (1 mM)	44.5	87	49	67
PMSF (0.1 mM)	92	91	93	99
E64 (0.1 mM)	86	100	99	99
Z-Pro-Prolinal (1 \square M)	92	88	92	89
Captopril (20 \square M)	72	97	98	91

* Dados de Paschoalin et al., Arch Biochem Biophys. 2005 Sep 1;441(1):25-34.

Os ensaios foram realizados a 37°C, em 50mM Tris-HCL, pH7,4. A clivagem de 20 μ M do substrato com supressão intramolecular de fluorescência pelo extrato citosólico por cinco minutos representa 100% de hidrólise. Os inibidores utilizados e suas especificidades estão descritos na Tabela 2.

4.1.3. Determinação do ponto de clivagem da bradicinina (BK) e do substrato Abz-GFSPFRQ-EDDnp

Para confirmação da presença de uma peptidase com atividade TOP-*like* no extrato citosólico de leveduras de Pb18, foi analisado o ponto de clivagem do substrato Abz-GFSPFRQ-EDDnp e da bradicinina após incubação com o extrato citosólico. O resultado foi comparado a resultados obtidos anteriormente (Camargo et al, 1997; Paschoalin et al 2005).

A clivagem da bradicinina e do substrato Abz-GFSPFRQ-EDDnp pelo extrato citosólico de *P. brasiliensis*, segue o mesmo padrão observado para TOP, entre os resíduos Pro-Phe no substrato (Figuras 4) e entre os resíduos Phe-Ser gerando o análogo BK₁₋₅ na bradicinina (Figura 5), diferentemente de MIP e OpdA (Camargo et al, 1997; Paschoalin et al, 2005; Marcondes et al, 2009), corroborando que a peptidase majoritária no extrato citosólico de *P. brasiliensis* tem uma atividade TOP-*like*.

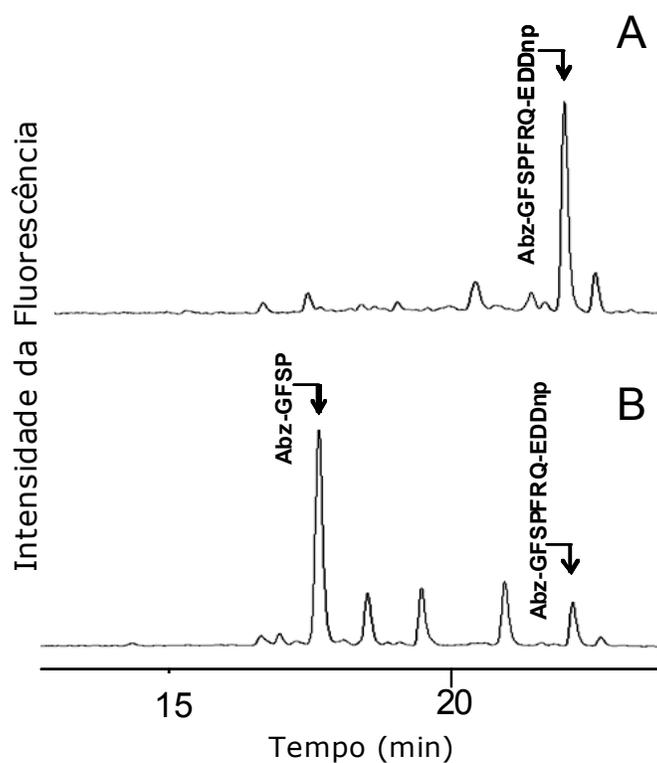


Figura 4 – Análise por HPLC e espectrometria de massa da hidrólise de Abz-GFSPFRQ-EDDnp pelo extrato citosólico de *P. brasiliensis*. Abz-GFSPFRQ-EDDnp (A) foi incubado com extrato citosólico de Pb18 (B) em 50 mM Tris-HCl, pH 7,4, a 37°C. Os produtos de reação foram separados por HPLC e identificados por espectrometria de massa. Cromatogramas desenvolvidos por detecção de fluorescência a $\lambda_{em.} = 420$ nm and $\lambda_{ex.} = 320$ nm.

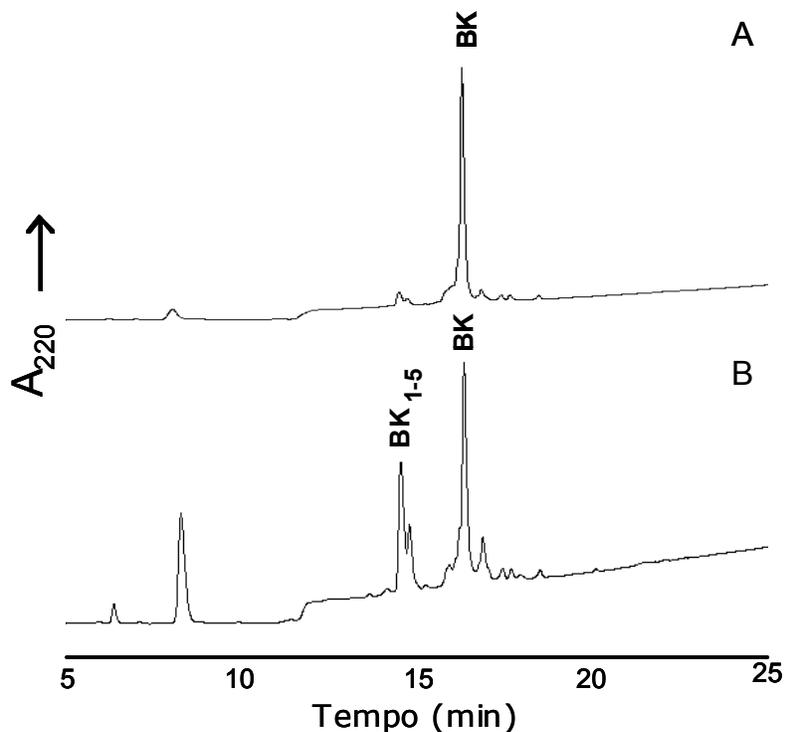


Figura 5 - Análise por HPLC pelo extrato citosólico de *P. brasiliensis*. BK (A) foi incubada com extrato citosólico de Pb18 (B) em 50 mM Tris-HCl pH 7,4 a 37°C. Os produtos de reação foram separados por HPLC e identificados por espectrometria de massa. BK1-5, fragmento formado pelos 5 primeiros aminoácidos da sequência da bradicinina, originados após hidrólise pela TOP.

4.2. Expressão de proteínas homólogas à TOP e MIP de mamíferos no extrato citosólico de *Paracoccidioides brasiliensis*

Anticorpos policlonais reativos com as metalo-peptidases TOP e MIP de mamíferos, produzidos em coelhos, estão disponíveis comercialmente. Para verificarmos se os sítios imunogênicos da TOP de mamíferos seriam semelhantes aos da metalo-peptidase com atividade TOP-like de *P. brasiliensis*, e também para verificarmos a possível presença de uma proteína homóloga à MIP de mamíferos no extrato citosólico fúngico, analisamos a reatividade dos anticorpos comerciais com TOP e MIP de mamíferos recombinantes (rTOP e rMIP, respectivamente) comparativamente ao extrato citosólico de Pb18.

Em *immunoblotting* revelado com anti-MIP, observou-se que uma proteína com aproximadamente a mesma massa molecular (75-85 kDa) é reconhecida nas 3 amostras avaliadas, rTOP, rMIP e fração citosólica de Pb18 (Figura 6A). O componente de menor massa molecular reconhecido pela rMIP é resultado de uma forma degradada da enzima (Vitor de Oliveira, comunicação pessoal). Resultados semelhantes foram encontrados revelando-se o *Immunoblotting* com anti-TOP (Fig. 6B). É importante ressaltar que a reatividade cruzada entre os dois anticorpos comerciais ainda não havia sido descrita (Vitor de Oliveira, comunicação pessoal). Corroborando este resultado, a reatividade cruzada entre as proteínas recombinantes e anticorpos foi observada também em ELISA-Q, onde a estrutura terciária das proteínas recombinantes é mantida, sugerindo que o sítio de reatividade cruzada seja conformacional (Figura 6C).

Estes resultados mostram que no extrato citosólico de *P. brasiliensis* há a presença de uma proteína reconhecida por anticorpos gerados contra a oligopeptidase de mamíferos, sugerindo que haja regiões conservadas entre as sequências da TOP de mamíferos e a enzima com atividade TOP-like presente em *P. brasiliensis*. Como os anticorpos anti-MIP e anti-TOP apresentaram reatividade cruzada entre si, ainda não foi possível verificar a presença de uma proteína homóloga à MIP de mamíferos no fungo com a técnica utilizada.

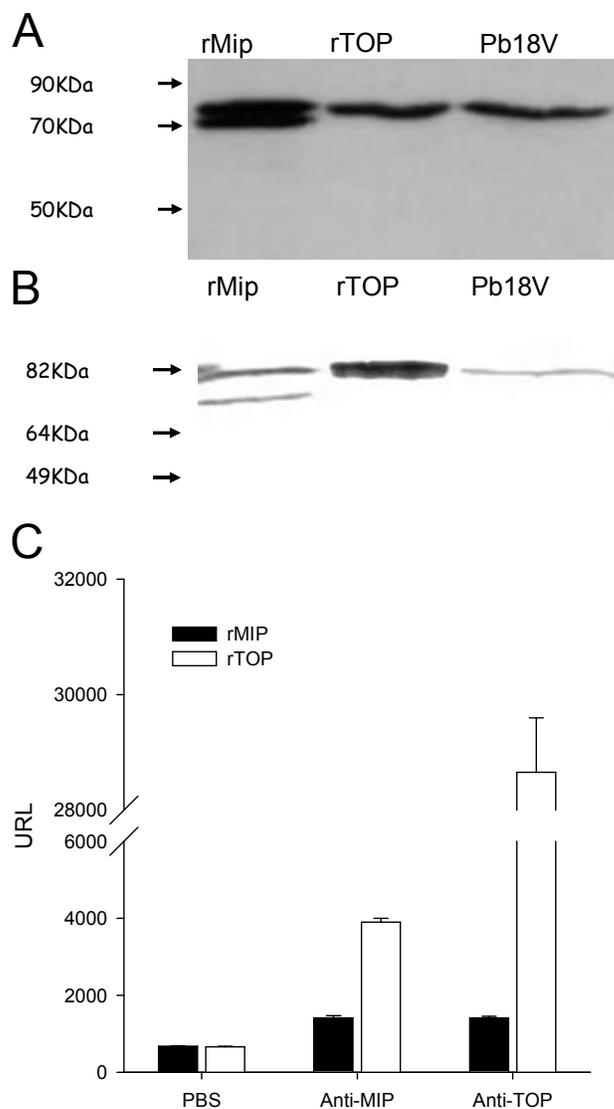


Figura 6 – Expressão de proteínas homólogas à TOP e à MIP de mamíferos no extrato citosólico de *P. brasiliensis*. **A)** MIP e TOP recombinantes (rMIP e rTOP, respectivamente) e fração citosólica de Pb18V foram separados eletroforéticamente, transferidos para membrana de nitrocelulose e revelados por quimioluminescência com anti-MIP e **B)** por 4CN com anti-TOP. As massas moleculares do padrão estão indicadas à esquerda. **C)** Elisa quimioluminescente utilizando as enzimas recombinantes (MIP e TOP) como substrato reagindo contra PBS (controle negativo, sem anticorpos), anti-MIP (1:1.000) e anti-TOP (1:1.000). Os resultados estão expressos em Unidades Relativas de Luminescência, em médias \pm desvio padrão.

4.3. Tentativas de obtenção da metalo-peptidase com atividade TOP-like de *P. brasiliensis*: peptidase recombinante ou nativa.

Foram realizadas inúmeras tentativas para purificação da proteína nativa ou obtenção da recombinante referente à(s) metalo-peptidase(s) com atividade TOP-like presente(s) no extrato citosólico das leveduras de *P. brasiliensis*. No entanto, não obtivemos sucesso apesar de nossos esforços. A seguir, descrevemos resumidamente as tentativas de isolamento dessa proteína realizadas durante o desenvolvimento deste trabalho.

4.3.1. Purificação da proteína nativa por cromatografia filtração em gel

A primeira tentativa de purificação das metalo-peptidases nativas do *P. brasiliensis* foi através da separação dos componentes do lisado do Pb18 por cromatografia em gel filtração utilizando uma coluna Superdex 200, em sistema de FPLC (*Fast Protein Liquid Chromatography*). Nas frações eluídas da coluna, foram determinadas a concentração protéica e a atividade sobre o substrato Abz-GFSPFRQ-EDDnp (Figura 7). Três picos protéicos foram detectados, frações 1-3, 19-22 e 27-37. No entanto, a atividade peptidásica sobre o substrato fluorogênico foi observada apenas nas frações 31 a 35. Estas frações foram submetidas à separação eletroforética e o conteúdo protéico corado por Coomassie Brilliant Blue G250 (CBB) pode ser visualizado na Figura 8. Observa-se que a cromatografia em gel filtração não conseguiu separar eficientemente as proteínas presentes no lisado de leveduras de *P. brasiliensis*. A fração de número 33, que apresentou a maior atividade peptidásica sobre o substrato fluorogênico ainda é constituída por inúmeros componentes protéicos de alta e baixa massa molecular corados pelo

CBB. Esperávamos conseguir purificar nessa fração de alta atividade poucos componentes com massas moleculares próximas, que seriam então tentativamente separados pela utilização de outro tipo de cromatografia, como por exemplo, de troca iônica. No entanto, a presença de proteínas com variadas massas moleculares na fração mais ativa dificultou a utilização de diferentes métodos cromatográficos para a obtenção da enzima nativa. Esse resultado pode ser explicado pela grande quantidade de proteínas presentes no lisado de *P. brasiliensis*, e nessas condições a separação dos componentes por cromatografia em gel filtração muitas vezes é prejudicada.

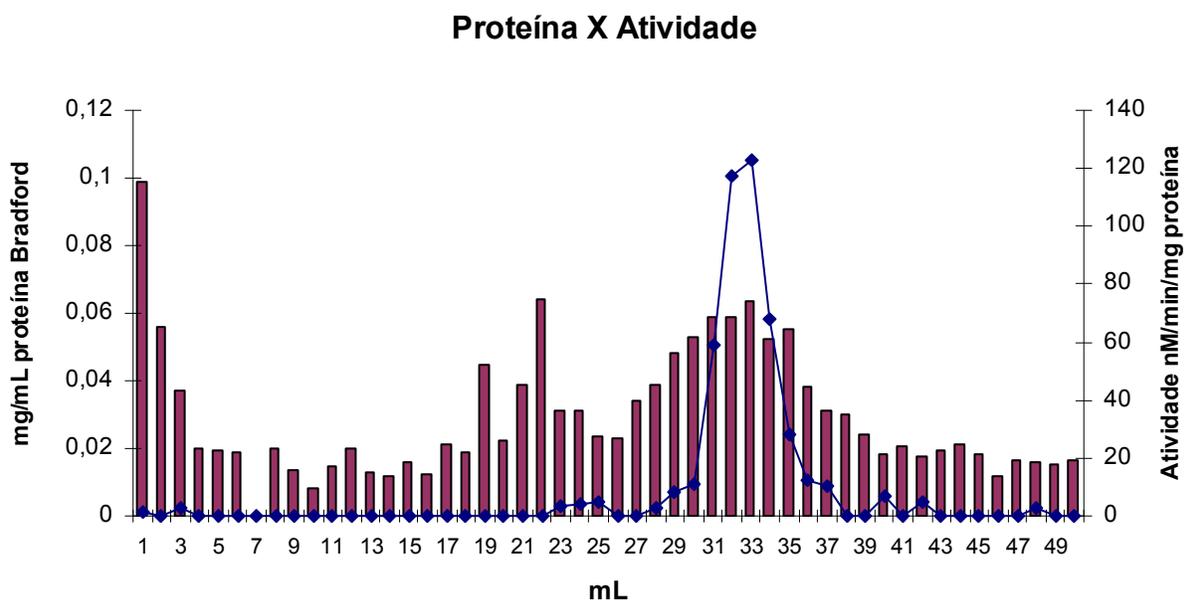


Figura 7 - Cromatografia em gel filtração do lisado de *P. brasiliensis* em coluna Superdex S-200. No gráfico estão representadas a concentração proteica determinada pelo método de Bradford (barras) e a atividade sobre o substrato Abz-GFSPFRQ-EDDnp (pontos) das frações coletadas na eluição da coluna, como descrito em Materiais e Métodos.

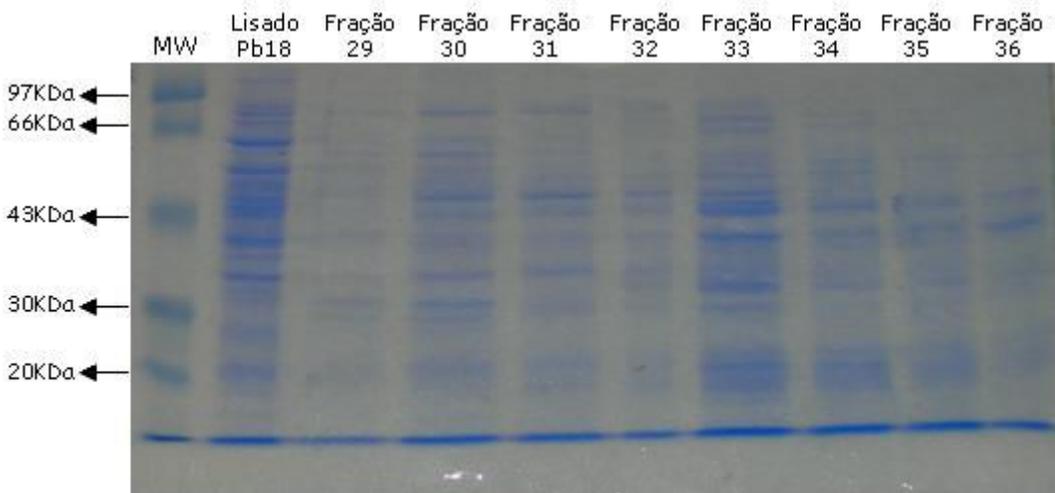


Figura 8 – Separação eletroforética dos componentes das frações eluídas da coluna de gel filtração (Superdex 200) com atividade oligopeptidásica.

Estão representadas as frações 29 a 36, que apresentaram atividade sobre o substrato Abz-GFSPFRQ-EDDnp, e o lisado de Pb18 antes da separação na coluna (**lisado Pb18**). MW = padrão de massa molecular utilizado e os respectivos valores indicados pelas setas.

4.3.2. Obtenção da metalo-peptidase recombinante

Alternativamente, tentou-se a obtenção da proteína recombinante referente à metalo-peptidase com atividade *TOP-like* presente no lisado de leveduras de *P. brasiliensis*. A sequência proteica da TOP murina (GenBank Q8C1A5) foi utilizada para alinhamento com sequências da biblioteca de cDNA de *P. brasiliensis* isolado 01, na época a única disponível. Esta biblioteca foi gentilmente colocada à nossa disposição pela Profa Dra Maria Sueli Soares Felipe, da UnB. Deste alinhamento foram selecionados dois clones, PBDEX-Y1-094t_G12.es e PBGEX-M1-100t_D11.es,

os quais foram cedidos pela Profa. Maria S.S. Felipe, responsável pela produção e manutenção da biblioteca.

Ao compararmos a sequência proteica da TOP murina (Gene accession number Q8C1A5) com sequências de outras moléculas depositadas no GenBank (NCBI), várias proteases fúngicas apresentaram alta similaridade com essa molécula, como por exemplo, metalo-peptidases fúngicas (Mip1 e MepB de *Aspergillus fumigatus*), proteínas hipotéticas (proteínas que ainda não apresentam uma anotação funcional) de *Candida glabrata* e *Candida albicans*, Pdr1p (Metalopeptidase Zinco-dependente de *Saccharomyces cerevisiae*) e OpdA (Oligopeptidase A de *Escherichia coli*). Essas sequências foram também alinhadas com as sequências parciais deduzidas das ORFs dos 2 clones de Pb 01, da biblioteca de cDNA.

Como pode ser observado na Figura 9, há um alto grau de similaridade entre as sequências, sendo que os clones apresentaram maior identidade com metalo-proteases de *A. fumigatus*. Quando a sequência disponível (parcial) de cada clone foi alinhada individualmente com cada uma das enzimas, observou-se que a sequência deduzida do clone PBDEX-Y1-094t_G12.es apresentou homologia com MepB de *A. fumigatus*, principalmente na porção inicial do gene. Já a sequência deduzida do clone PBGEX-M1-100t_D11.es apresentou homologia com Mip1 de *A. fumigatus*, principalmente na porção média do gene (dados não apresentados). Esses resultados, baseados nas sequências da biblioteca de cDNA do Pb01, nos indicaram que os dois clones selecionados poderiam representar metalo-peptidases presentes no citosol de leveduras de *P. brasiliensis*.

Procedemos então, ao sequenciamento completo dos dois clones, que foram expandidos, purificados, quantificados e enviados para sequenciamento no Centro de Estudos do Genoma Humano da Universidade de São Paulo. Os clones provenientes da biblioteca de *P. brasiliensis* isolado 01 foram construídos no vetor pBluescript II SK (Stratagene), que foi utilizado para o sequenciamento.

As sequências nucleotídicas completas dos clones foram comparadas com sequências depositadas no *GenBank* utilizando o programa BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*). Observou-se identidade de 81% do clone PBDEX-Y1-094t_G12.es com uma proteína de *P. brasiliensis* já conhecida, a formamidase (Gene accession number AY163575.1). Esse fato pode ser explicado pelo processo de construção da biblioteca de cDNA, onde apenas uma pequena sequência do início da ORF do gene inserido no vetor é lida para depósito da mesma na biblioteca. Quando foi realizado um sequenciamento completo do gene contido no clone, observamos uma maior identidade com o gene de formamidase de *P. brasiliensis* e não com MepB de *Aspergillus fumigatus*, como esperado e previsto anteriormente.

A comparação da sequência protéica deduzida do inserto completo contido no clone PBGEX-M1-100t_D11.es com sequências depositadas no *GenBank* utilizando o programa BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) apresentou identidade de 54% com a Mip1, uma metalo-peptidase de *Aspergillus fumigatus*, além de identidade com outras proteínas da mesma família: 54% com a metalo-peptidase Mip1 de *Neosartorya fischeri* NRRL 181, 53% com a metalo-peptidase Mip1 de *Aspergillus fumigatus* Af293, e 52% com a metalo-peptidase Mip1 de *Aspergillus*

clavatus NRRL 1, sendo essas as metalo-peptidases com maior identidade selecionadas pelo programa no GenBank (dados não mostrados).

A sequência completa deduzida de aminoácidos do fragmento do clone PBDEX-Y1-094t_G12.es, contendo 1946 pb, foi alinhada e comparada com as sequências das metalo-peptidases fúngicas Mip1 e Mepb de *A. fumigatus* e com as oligopeptidases OpdA bacteriana e TOP murina (Figura 10). Observou-se que a proteína clonada de *P. brasiliensis* apresenta identidade de 11,3% com a OpdA bacteriana, 11,4% com a TOP murina, 33,8% com a Mip1 de *A. fumigatus* e 14,5% com a MepB de *A. fumigatus*. Todas as sequências analisadas apresentaram o motivo de ligação com zinco, HEXXH, e o ácido glutâmico importante para essa ligação.

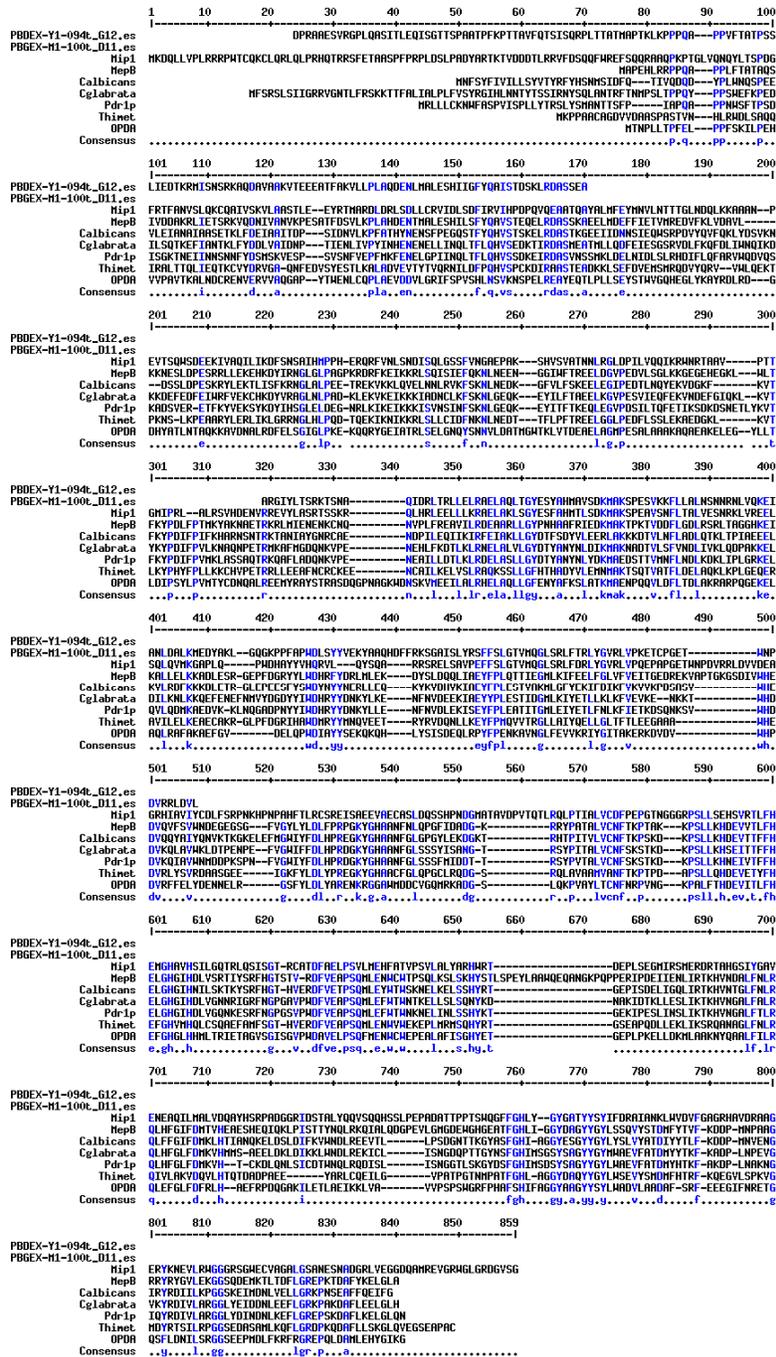


Figura 9 - Alinhamento das seqüências protéicas deduzidas dos clones da biblioteca de cDNA de Pb01 com seqüências depositadas de diferentes metalo-peptidases. As seqüências proteicas deduzidas da seqüência parcial dos dois clones obtidos da biblioteca de *P. brasiliensis* isolado 01 - PBDEX-Y1-094t_G12.es e PBGEX-M1-100t_D11.es foram alinhadas com Mip1 e MepB de *A. fumigatus*, proteínas hipotéticas de *C. glabrata* e *C. albicans*, Pdr1p (metalo-peptidase zinco-dependente de *S. cerevisiae*), OPdA (oligopeptidase A bacteriana) e TOP (thimet olopeptidase murina), depositadas no GenBank (NCBI). Em azul é mostrado o consenso.

```

TOP mouse      D I Y P R R G K M G H A A C F G I Q P G - - - - - C L R 436
OpdA          D I Y A R R E N K R G G A W M D D C V G Q - - - - - M R K 432
Mip1 A. fumigatus D E F S R P N K H P N P A H F T L R G S R E I S A E E V A E C A S L D Q S S H E P 513
MepB A. fumigatus D E F F R P G K Y G H A A N F N I Q P G - - - - - F I D 443
Pb metallo    S F E T - A R K N P H P T H T L R G S R V I S P E E I S H A A - L S A D V H E P 238

TOP mouse      Q D G S R - - - - - O H A V A A M Y A M F I K E T P D A - - - F S L 462
OpdA          A D G S L - - - - - O K P V A Y L I C M Y I N R E V N G K - - - P A L 458
Mip1 A. fumigatus N D G M A T A V D P V F Q T L R Q H P T I A L V C D I P E P G T G G G R P S L 553
MepB A. fumigatus A D G K R - - - - - R Y E A T A L V C M F I K E T A K K - - - P S L 469
Pb metallo    N D G M A T A I R P G T N S L Y Q H A T V A L I C D I T N R S P P S - T K P P L 277

TOP mouse      L Q H D E V E T Y F H E F G H V M H Q L C S Q A E F A M F S G T H - V E R D P Y 501
OpdA          F T H D E V I T L F H E F G H E L H H M L T R I E T A G V S G I S G V P W D A V 498
Mip1 A. fumigatus L S E H S Y R T L F H E M G H A V H S I L G O T R L Q S I S G T R - C A T D F A 592
MepB A. fumigatus L K H V E V Y T L F H E L G H E I H D L V S R T I Y S R F H G T S - T V R D P Y 508
Pb metallo    L S K H N V Q N L F H E M G H A I H S V M A R T E D E Q S I S G T R - C A T D P Y 316

TOP mouse      E A R S Q N L E M M V M E K E P I M R M S Q H Y R T G S - - - - - 529
OpdA          E E S S Q P M E N M C M E P E A D A F I G H V E T G E F - - - - - 527
Mip1 A. fumigatus E E S S V L M E H F A T V E S Y I A L L Y A R H W R T D E E - - - - - 621
MepB A. fumigatus E A R S Q N L E M M G T E S Q I K S L K H Y S I L S P H Y L A A W Q E Q A N 548
Pb metallo    E E S S I I M E N F A M A E E Y I S L Y A R H W E T N Q P - - - - - 345

TOP mouse      - - - - - E A P Q D L L E K L I K S - - - - R Q A N A G L P N L R Q I V L A 558
OpdA          - - - - - L E K E L L D K M L A A - - - - E M Y Q A A L T I L E Q L E P G 555
Mip1 A. fumigatus - - - - - L S E G M I R S M E R D R T A H G S I Y G A V E N N A Q I L M A 653
MepB A. fumigatus G K P Q P P E R I E D E I I E N L I R T - - - - E H V N D A L T L E Q L E P G 584
Pb metallo    - - - - - L P E D M I Q T M R V N H E N Y E M I Q A M D N E A Q I M M A 377

```

Figura 10 – Alinhamento da sequência proteica deduzida do clone PBGEX-M1-100t_D11.es de Pb01 com a sequência de metalo-peptidases fúngicas, TOP murina e OpdA bacteriana. A sequência proteica deduzida do clone PBGEX-M1-100t_D11.es (**PB metallo**), obtida a partir do sequenciamento completo do inserto contido no mesmo, foi alinhada com as sequências das OpdA bacteriana (*E. coli*), TOP murina (Thimet oligopeptidase), e metalo-peptidases Mip1 e MepB de *Aspergillus fumigatus* pelo método Clustal W do software DNASTar. Os pontos sombreados mostram o consenso e a caixa em vermelho mostra o motivo de ligação ao Zinco (HEXXH). A caixa em azul mostra o ácido glutâmico que é o terceiro ligante da molécula de zinco.

O inserto do clone PBGEX-M1-100t_D11.es foi excisado do vetor original e subclonado em vetores de expressão pHIS e pGEX. Foram realizados inúmeros protocolos com o objetivo de expressar a proteína recombinante (variação na quantidade de IPTG, temperatura e tempo de indução de expressão, verificação da presença da proteína em corpos de inclusão). Foram também tentativamente utilizadas diferentes cepas de bactérias para expressão do vetor, inclusive a cepa Rosetta (Novagen), derivada da linhagem de *E. coli* BL21, utilizada para otimização da expressão de proteínas eucarióticas que contém códons raramente usados em *E.coli*. No entanto, em nenhuma dessas tentativas obtivemos sucesso. Um dos motivos desse insucesso pode estar relacionado ao fato que o clone utilizado não possuía a sequência nucleotídica da proteína completa, faltando uma parte da região N terminal. A proteína completa tem alta massa molecular (aproximadamente 80 kDa), o que pode dificultar em alguns casos a expressão da proteína recombinante.

Além dos clones obtidos a partir da biblioteca de cDNA Pb01, outros dois clones foram selecionados a partir da biblioteca de cDNA do *P. brasiliensis* isolado 18, construída pelo Prof. Gustavo Goldman – USP Ribeirão Preto, também selecionados por sua alta identidade com a sequência de nucleotídeos da TOP murina. Estes clones (Pb3NEW1-168E06 e Pb 50001-165C09) foram expandidos e enviados para sequenciamento.

O sequenciamento de um trecho de 105 nucleotídeos do clone Pb3NEW1-168E06 apresentou identidade de 46% com a proteína MepB de *Aspergillus fumigatus*. Entretanto no decorrer do sequenciamento, foi detectada uma região poli-T, regiões instáveis que causam erro na polimerização durante a reação de

seqüenciamento, ou que podem ser lidas simultaneamente gerando uma grande quantidade de luz em uma única reação (Shibata et al, 2001). Desta forma, não foi possível o sequenciamento do clone. O outro clone (Pb 50001-165C09) apresentou identidade com uma proteína Rack1-like de *Paracoccidioides brasiliensis*, e isto pode ter acontecido pelos mesmos motivos já descritos para o clone PBDEX-Y1-094t_G12.es da biblioteca de Pb01.

Em novembro de 2008, houve uma atualização importante no banco de dados do genoma de *P. brasiliensis* (http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/paracoccidioides_brasiliensis/MultiHome.html). Com essa atualização, tivemos acesso às sequências do genoma completo de dois novos isolados do *P. brasiliensis*, Pb18 e Pb03, depositadas nesse banco, que foram então comparadas com as sequências da TOP murina e do clone da biblioteca de Pb01 (clone PBGEX-M1-100t_D11.es) utilizado anteriormente. Foram selecionadas no banco de dados do Pb18, sequências com alta homologia aos genes de nosso interesse, nomeadas como "TOP/Sacarolisina" e "MIP". Para ambas as sequências foram desenhados *primers* para a clonagem dos genes a partir do cDNA extraído do nosso isolado Pb18V. Os genes foram clonados a partir do cDNA fúngico, sequenciados, clonados em vetor de expressão, e novamente não conseguimos obter as proteínas recombinantes.

4.4. Purificação da proteína nativa em coluna de afinidade com anticorpos específicos

A purificação de proteínas nativas pode também ser conseguida por cromatografia de afinidade utilizando anticorpos policlonais ou monoclonais desenvolvidos contra a proteína. Desta forma, nosso objetivo foi a obtenção de anticorpos policlonais reativos com a metalo-peptidase de *P. brasiliensis*.

A obtenção de anticorpos policlonais depende da imunização de animais (camundongos ou coelhos) com a proteína nativa ou com a proteína recombinante, e estas não estavam à disposição. Uma alternativa à utilização da proteína completa, é a imunização com peptídeos derivados dessa proteína na presença de adjuvantes. Na época que se iniciou esta fase do trabalho, a biblioteca de cDNA do Pb18 não estava ainda disponível, e somente tínhamos a sequência incompleta do clone PBGEX-M1-100t_D11.es, com homologia à TOP murina e metalo-peptidases fúngicas. Utilizando-se a sequência de aminoácidos deduzida do clone PBGEX-M1-100t_D11.es e comparando-a com as sequências depositadas no banco de dados de proteínas do National Center for Biotechnology Information (NCBI, Entrez Protein), foi observado 78% de identidade com uma proteína hipotética de *Ajellomyces capsulatus*. *A. capsulatus* é o teleomorfo do *Histoplasma capsulatum*, fungo dimórfico patogênico de importância médica, e a sequência completa da proteína hipotética se encontrava depositada.

As sequências de aminoácidos da proteína de *A. capsulatus* e do clone foram analisadas utilizando o software Protean (DNASStar). Foram selecionadas regiões homólogas com alta hidrofiliabilidade e probabilidade de expressão na superfície celular, ou seja, peptídeos provavelmente imunogênicos indutores de

respostas humorais. Peptídeos de 12 a 18 aminoácidos foram sintetizados pela Profa. Maria Aparecida Juliano (INFAR, UNIFESP), e estes foram utilizados para imunização de camundongos. Os peptídeos desenhados estão listados na Tabela 3 e sua localização na sequência protéica está demonstrada na Figura 1.

Inicialmente foram injetados 25 μ g de peptídeo na presença de adjuvante (hidróxido de alumínio), intraperitonealmente, em camundongos Balb/c. Após 48h da primeira imunização, foi observada uma alta mortalidade dos animais, sugerindo uma alta toxicidade dos peptídeos. Para verificar esta hipótese, a capacidade hemolítica dos peptídeos foi analisada (Mandal & Nagaraj, 2002). Na Figura 11, é possível observar que nenhum dos peptídeos testados (1, 4, 6, 7 e 8) foi capaz de lisar eritrócitos humanos nas duas concentrações utilizadas no ensaio, 10 e 25 μ g. É possível que na primeira imunização, com 25 μ g dos peptídeos, tenha ocorrido uma reação inflamatória acentuada, levando os animais a óbito. Optou-se então por utilizar a dose de 10 μ g de peptídeo por animal por dose.

Os animais foram imunizados a cada 2 semanas, em um total de 5 imunizações. Antes de cada imunização foi coletado sangue pela veia caudal para obtenção do soro para quantificação dos anticorpos em ELISA-quimioluminescente, ou ELISA-Q.

A produção de anticorpos contra os peptídeos neste primeiro experimento está demonstrada na Figura 12. Para a realização do ELISA-Q, as placas foram sensibilizadas com os próprios peptídeos utilizados para a imunização de cada grupo, os soros foram diluídos 25 e 50 vezes e utilizados em *pools* representativos de cada grupo. Todos os grupos apresentaram o mais alto nível de anticorpos após a 2^a ou 3^a dose do peptídeo, níveis que caíram após as demais imunizações. Alguns

pools de soros de animais imunizados somente com o adjuvante reconheceram fortemente alguns peptídeos em ELISA-Q, principalmente os peptídeos 1, 6, 7 e 8. Observamos que, embora todos os peptídeos utilizados tenham induzido a produção de anticorpos pelos animais imunizados, os peptídeos 1, 2, 3, 6 e 8 foram capazes de induzir o maior título de anticorpos. Como esperado, o peptídeo 4 foi o que apresentou menor reatividade, pois parte deste peptídeo corresponde ao sítio HEXXH das metalo-peptidases, que é bastante conservado. A reatividade de um soro hiperimune contra gp43 de *P. brasiliensis* foi utilizada como controle positivo em cada ensaio (dados não mostrados).

Os peptídeos capazes de induzir altos títulos de anticorpos foram selecionados para novos ensaios, além de dois novos peptídeos, que foram sintetizados posteriormente.

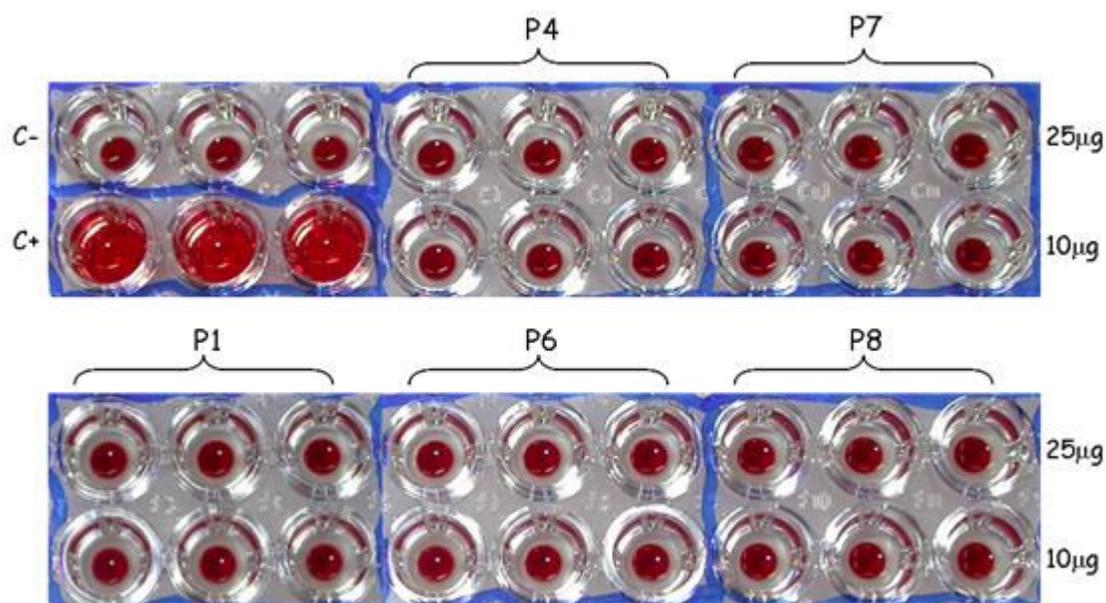
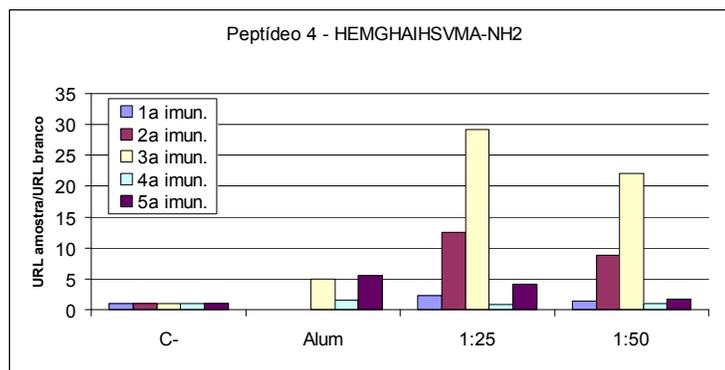
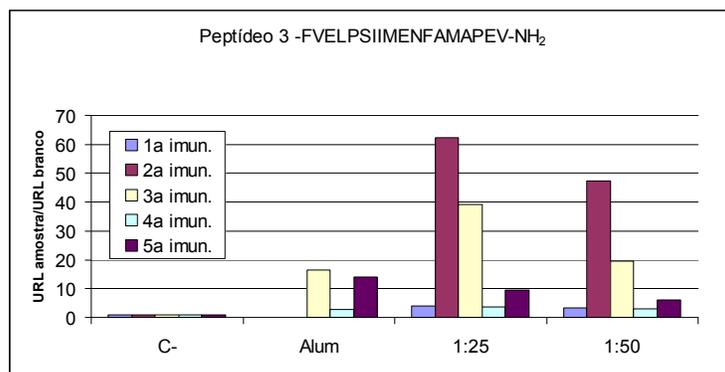
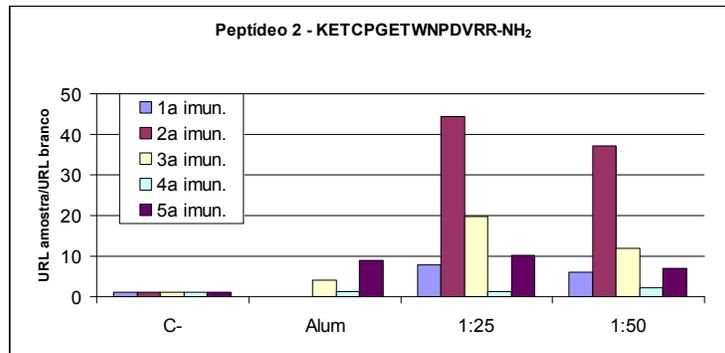
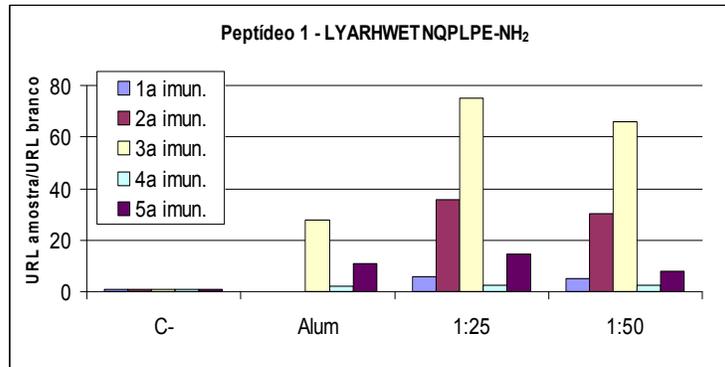


Figura 11 - Ensaio de hemólise para verificar a toxicidade dos peptídeos.

Na fileira superior à esquerda está representado o controle negativo (**C-**, 3×10^7 eritrócitos/poço em solução de PBS-BSA 1%); na fileira inferior, o controle positivo (**C+**, adição de Triton X-100 0,2%), que provocou a lise de 100% das células. P1, P4, P6, P7 e P8 representam os peptídeos, nas duas concentrações utilizadas no ensaio, 10 e 25 µg. A placa foi incubada à 37°C por 2,5h antes da leitura.



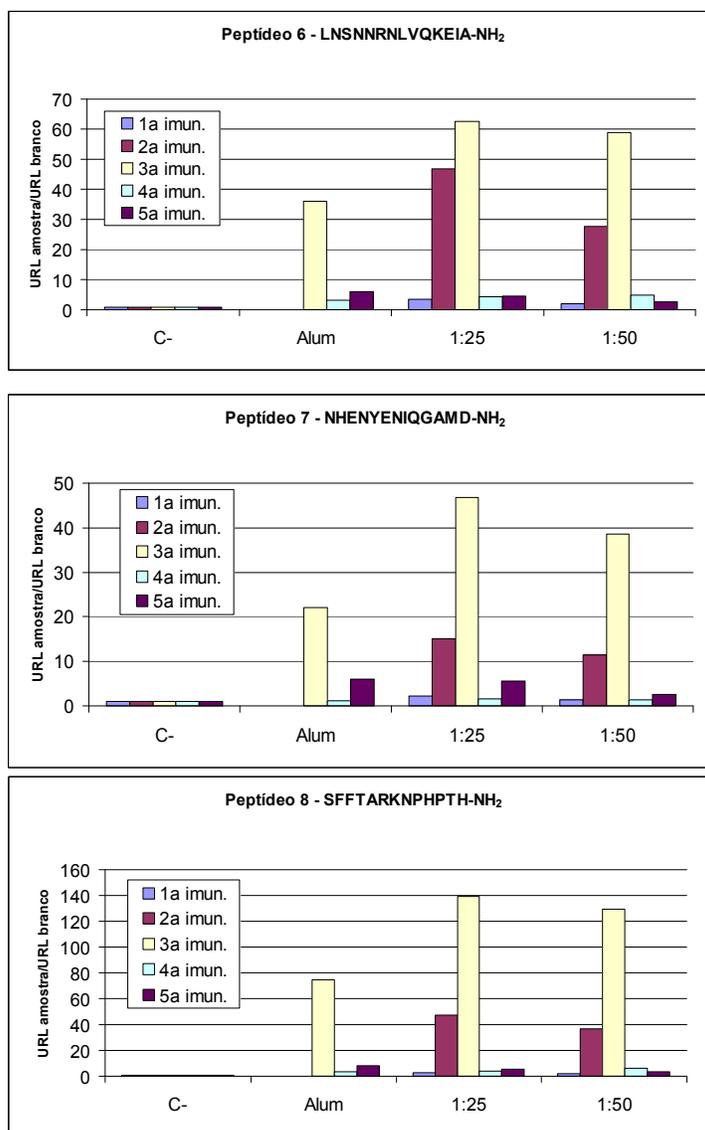


Figura 12 - ELISA-Q dos pools de soros obtidos dos animais imunizados com peptídeos. Os animais receberam 25 μ g de peptídeo na primeira imunização e 10 μ g nas imunizações subsequentes. **Branco**, reação de ELISA-Q na ausência de *pool* de soros. **Alum**, *pool* de soros de animais imunizados com hidróxido de alumínio diluído a 1:50. **1:25** e **1:50**, diluições dos *pools* de soros utilizadas no ensaio. As barras coloridas são referentes a *pools* de soros coletados após cada imunização, realizadas com um intervalo de 15 dias. Número de animais por grupo, 3. Dados expressos na razão da média de URL da amostra pela média da URL do branco. URL, Unidades Relativas de Luminescência. Cada gráfico utilizou uma escala diferente no eixo Y para melhor observação dos resultados individuais de cada grupo.

Um segundo experimento foi realizado com apenas três imunizações e o sangue foi coletado 7 dias após cada imunização. Como controles, foram coletados os soros pré-ímmes dos animais de cada grupo, além de um grupo de animais imunizados somente com o adjuvante (hidróxido de alumínio). Corroborando os resultados anteriores, observamos que os peptídeos 1, 2, 3, 6 e 8 induziram altos títulos de anticorpos após 2 ou 3 imunizações, apresentando uma diferença significativa em relação aos animais imunizados com o adjuvante (dados não mostrados). A imunização de animais com os dois novos peptídeos introduzidos neste ensaio, o peptídeo 5 e o peptídeo 9, mostrou elevada produção de anticorpos pelo primeiro mas não pelo último. Pudemos observar também que após a segunda imunização a resposta de anticorpos não se alterou significativamente, sugerindo que apenas duas doses são suficientes para a indução de uma resposta satisfatória (dados não mostrados).

Os soros coletados após a segunda imunização neste experimento foram então ensaiados individualmente para determinação da variação individual intra-grupo no protocolo utilizado. Observou-se uma grande variabilidade individual intra-grupo na produção de anticorpos específicos para todos os peptídeos analisados. Todos os animais imunizados com o peptídeo 6 apresentaram leituras de 3 a 6 vezes maiores que a leitura do *pool* de soros de animais imunizados com o adjuvante, enquanto os grupos imunizados com os peptídeos 2, 3 e 5 apresentaram, cada um, somente 1 animal com alto nível de anticorpos produzidos, comparativamente ao *pool* de soros de animais imunizados com o hidróxido de alumínio (Figura 13). Animais imunizados com os peptídeos 1 e 8 apresentaram pouca diferença em relação aos animais imunizados com o adjuvante (dados não

mostrados). Em seguida, as IgGs dos soros dos animais que apresentaram maior reatividade em ELISA-Q foram isoladas em proteína G (animal 1 imunizado com o peptídeo 2, animal 4 imunizado com o peptídeo 3, animal 4 imunizado com o peptídeo 5 e animais 1 e 4 imunizados com o peptídeo 6, representados na Figura 13). A reatividade dessas imunoglobulinas com o extrato citosólico de *P. brasiliensis*, que contém a peptidase com atividade TOP-like, foi analisada por *immunoblotting*.

Na Figura 14, pode ser visto que soros dos camundongos de todos os grupos reconheceram uma proteína majoritária, com massa molecular ao redor de 75-90 kDa, que corresponde ao tamanho previsto para a proteína anotada como TOP no banco genômico do *P. brasiliensis*. Embora todos os soros tenham sido diluídos na mesma proporção (1:500), alguns deles reconheceram a proteína mais intensamente. Esses resultados mostram que a imunização com alguns peptídeos selecionados induziu a formação de anticorpos capazes de reconhecer uma proteína específica no extrato citosólico do Pb18. O reconhecimento de uma proteína no extrato citosólico do *P. brasiliensis* pelos anticorpos testados, possibilita a purificação da proteína nativa utilizando-se uma coluna de afinidade montada com os anticorpos específicos produzidos.

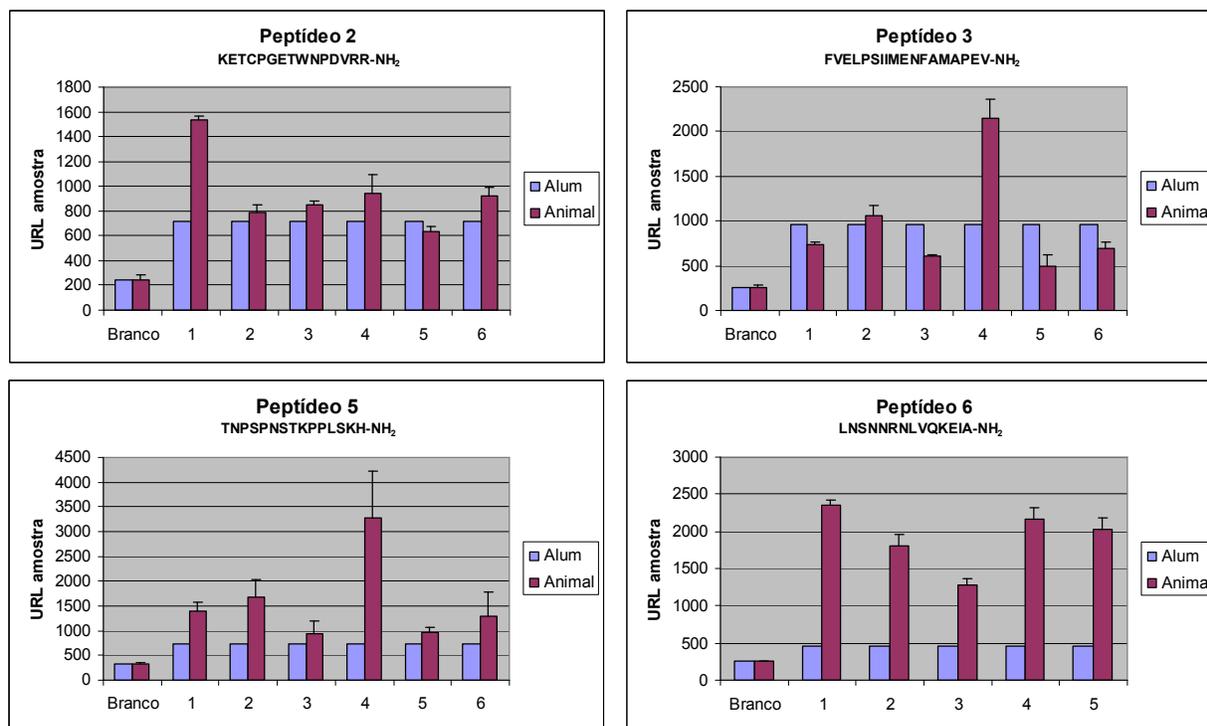


Figura 13: ELISA-Q dos soros dos grupos com maior resposta de anticorpos ensaiados individualmente. A imunização foi realizada com 10 μ g de peptídeo por animal, e o soro foi coletado após duas doses. **Branco**, reação de ELISA-Q na ausência de pool de soros. **Alum**, pool de soros de animais imunizados com hidróxido de alumínio na diluição 1:50. A diluição do anticorpo primário (soro de cada animal) foi 1:25. Os números no eixo X representam cada animal individualmente. Resultado expresso em médias \pm desvio padrão.

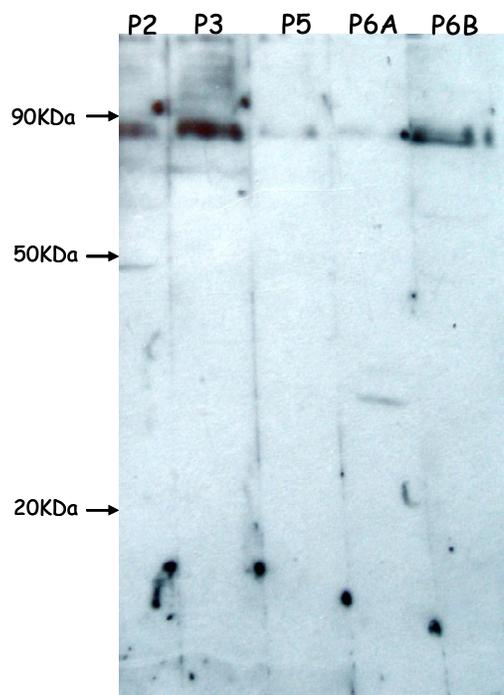


Figura 14 - Reatividade das IgGs purificadas dos soros com alta reatividade em ELISA-Q com o extrato citosólico do *P. brasiliensis* em *immunoblotting*. P2 (KETCPGETWNPDVRR-NH₂), soro do animal 1 imunizado com peptídeo 2. P3 (FVELPSIIMENFAMAPEV-NH₂), soro do camundongo 4 imunizado com peptídeo 3. P5 (TNPSPNSTKPPLLSKH-NH₂), soro do animal 4 imunizado com peptídeo 5. P6A e P6B (LNSNNRNLVQKEIA-NH₂), soros dos animais 1 e 4, respectivamente, imunizados com o peptídeo 6 (reatividade dos anticorpos por ELISA-Q na Figura 13). O extrato citosólico do fungo foi separado eletroforéticamente; a reação com as IgGs purificadas (primário 1:500 e secundário anti-mouse-HRP 1:1.000) e a revelação realizada com ECL (Millipore), foram realizadas como descrito em Materiais e Métodos.

Para a montagem de uma coluna de afinidade, 10 camundongos foram imunizados para aumentar a quantidade de anticorpos peptídeo-específicos. Devido à disponibilidade de peptídeo e resultados anteriores, foram escolhidos os peptídeos 5 e 6, com a obtenção de soro pré-imune e 2 imunizações com intervalo de quinze dias. O resultado do ELISA-Q com os soros individuais pode ser visto na Figura 15 e o *immunoblotting* com o pool dos soros com maior reatividade, na Figura 16.

Corroborando resultados anteriormente obtidos, observa-se uma grande variabilidade na resposta individual nos grupos, mas todos os animais produziram anticorpos após imunização com os peptídeos (Figura 15). Observa-se no *immunoblotting* que ambos os peptídeos induziram a produção de imunoglobulinas capazes de reconhecer uma banda de aproximadamente 75-85 kDa no extrato citosólico do Pb18, como observado anteriormente (Figura 16).

Com essas imunoglobulinas purificadas, mostradas na Figura 17, foi montada uma coluna de afinidade, como descrito em Materiais e Métodos. Entretanto, em uma primeira tentativa de purificação não foi possível observar o isolamento de uma proteína específica do extrato citosólico do Pb18 utilizando-se a coluna de afinidade preparada para esse fim (Figura 17). A obtenção de vários componentes fúngicos se deve provavelmente ao tempo prolongado de incubação da amostra na coluna (1h à temperatura ambiente com agitação), facilitando as ligações inespecíficas.

Na tentativa de se obter interações mais específicas, as condições do ensaio foram modificadas (menor tempo de incubação entre extrato citosólico e coluna, utilização de água como tampão na coluna de dessalinização, utilização de uma maior quantidade de amostra a ser cromatografada). Na Figura 18 pode-se

observar o extrato citosólico de *P. brasiliensis* antes da passagem pela coluna de afinidade (A) e o eluato recolhido da coluna de afinidade (B e C, sobrenadante e *pellet* do liofilizado após ressuspensão em tampão de amostra, respectivamente). É possível observar uma redução do número de bandas eluídas da coluna, e pode-se ver no sobrenadante do liofilizado uma tênue banda na altura aproximada de 80 kDa, que é o tamanho previsto para TOP.

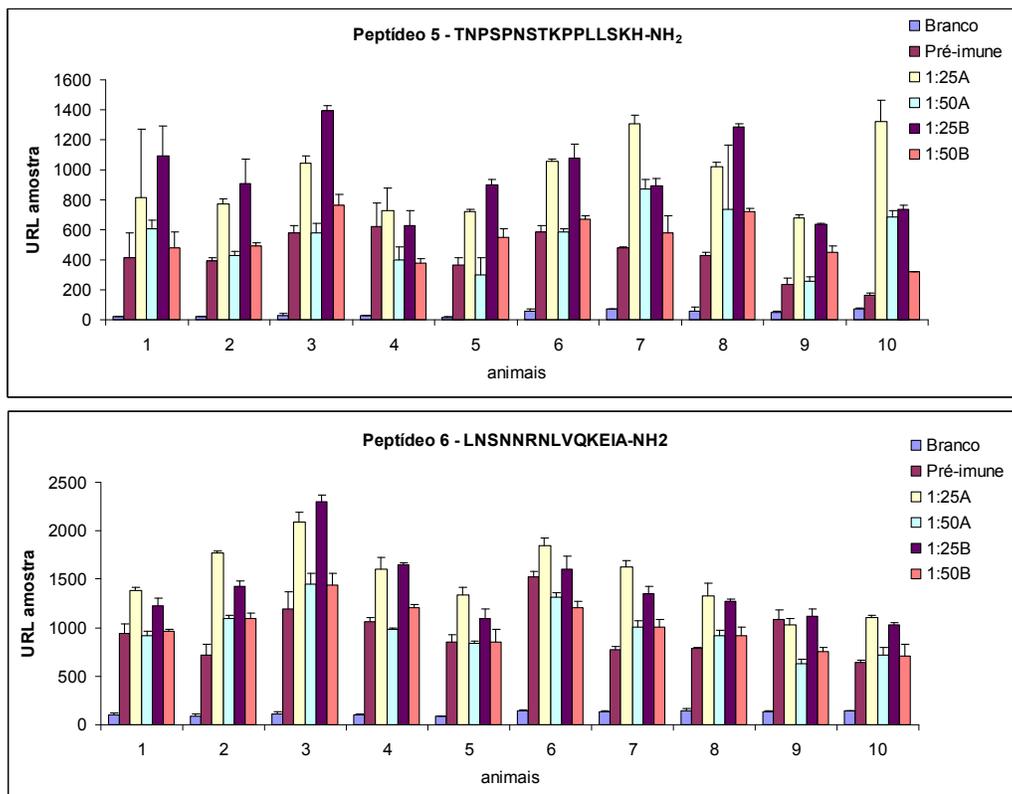


Figura 15 - ELISA-Q dos soros de animais imunizados com os peptídeos 5 ou 6. A imunização foi realizada com 10µg de peptídeo por animal, duas doses, 15 dias de intervalo. O soro foi coletado 15 dias após a última imunização. Branco, reação de ELISA-Q na ausência de *pool* de soros. Pré-Imune (diluição 1:50), soros obtidos previamente às imunizações. 1:25A e 1:50A, diluições dos soros coletados após a primeira imunização, e 1:25B e 1:50B, diluições dos soros coletados após a segunda imunização. Os números representados no eixo X referem-se aos animais individuais. Resultados expressos em médias \pm desvio padrão. URL, unidades relativas de luminescência.

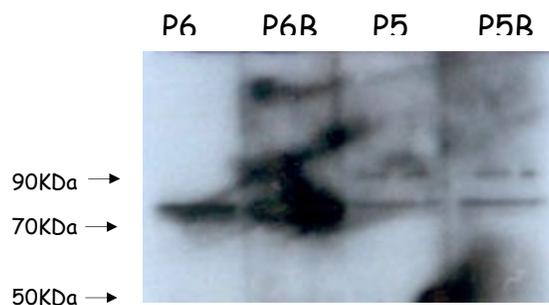


Figura 16 - Reatividade dos soros com alta reatividade em ELISA-Q com o extrato citosólico do *P. brasiliensis* em immunoblotting. P6 e P6B (LNSNNRNLVQKEIA-NH₂), pool de soros de animais imunizados com o peptídeo 6, utilizado nas diluições de 1:100 e 1:50 respectivamente. P5 e P5B (TNPSNSTKPPLLSKH-NH₂), pool de soros de animais imunizados com o peptídeo 5, utilizado nas diluições de 1:100 e 1:50 respectivamente. O extrato citosólico do fungo foi separado eletroforéticamente; a reação com os anticorpos e a revelação realizada com ECL (Millipore), como descrito em Materiais e Métodos.

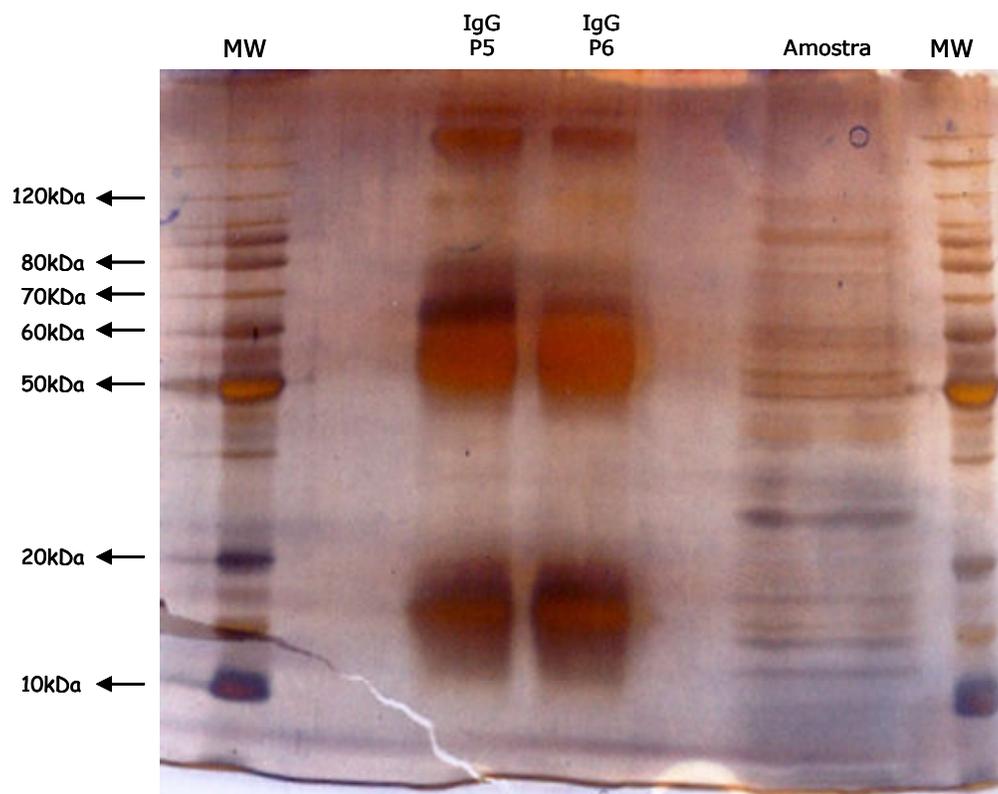


Figura 17 -SDS-PAGE contendo as IgGs purificadas obtidas do soro de camundongos imunizados com os peptídeos 5 (LNSNNRNLVQKEIA-NH₂) e 6 (TNPSNSTKPPLLSKH-NH₂), e eluato da coluna de afinidade após passagem do extrato citosólico de *P. brasiliensis*. IgG P5 e IgG P6, *pools* de IgGs purificadas do soro de camundongos imunizados com o peptídeo 5 e 6, respectivamente. Amostra, fração eluída da coluna de afinidade após passagem do extrato citosólico de *P. brasiliensis*, que foi dessalinizada, liofilizada e ressuspensa em tampão de amostra. MW representa o padrão de massa molecular, com os respectivos valores indicados por setas.

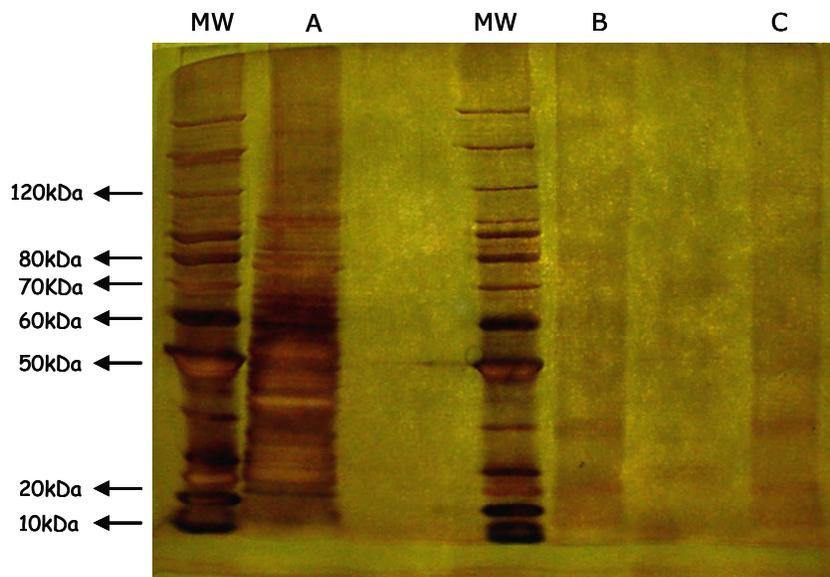


Figura 18 -SDS-PAGE contendo o extrato citosólico de *P. brasiliensis* e amostras resultantes da passagem do extrato citosólico de *P. brasiliensis* em coluna de afinidade. **A**, extrato citosólico de *P. brasiliensis* antes da passagem pela coluna de afinidade. **B** e **C**, amostras eluídas da coluna de afinidade, dessalinizadas, liofilizadas e ressuspensas em tampão de amostra. **B** é o sobrenadante e **C** o pellet. MW representa o padrão de massa molecular, com os respectivos valores indicados por setas.

4.5. Determinação do possível papel biológico da oligopeptidase com atividade TOP-like de *P. brasiliensis*

Embora não tenhamos detectado uma forma secretada da metalo-peptidase com atividade TOP-like no *P. brasiliensis* nas nossas condições de estudo, esta protease pode ser secretada *in vivo* pela existência de estímulos específicos teciduais e/ou humorais. O aumento na secreção de proteases em meios contendo proteínas séricas já foi demonstrada em *Aspergillus fumigatus* (Gifford et al, 2002), *Saccharomyces cerevisiae* (Kurucoová et al, 2009) e *Candida albicans* (dos Santos et al, 2006). Foi demonstrado que em leveduras de *P. brasiliensis* isoladas de camundongos infectados cerca de 35% do transcriptoma são proteínas que não são expressas em cultivos *in vitro*, e cerca de 23% do transcriptoma são proteínas superexpressas nas condições *in vivo*, comparado ao fungo cultivado *in vitro* (Costa et al, 2007).

Alternativamente, o *P. brasiliensis* pode também ser lisado *in vivo* e liberar o seu conteúdo citoplasmático no sítio de infecção, pela ação dos componentes efetores da resposta imune inata e adaptativa.

Para verificarmos se a metalo-peptidase com atividade TOP-like de *P. brasiliensis* é secretada ou liberada *in vivo* e se possui propriedades imunogênicas no hospedeiro, verificamos a presença de imunoglobulinas específicas contra a peptidase em soros de pacientes diagnosticados com a paracoccidiodomicose (PCM).

IgGs foram purificadas a partir de soros de 4 indivíduos infectados com *P. brasiliensis*, e foram testadas quanto a sua capacidade de neutralizar a atividade enzimática do lisado de *P. brasiliensis* sobre o substrato com supressão

intramolecular de fluorescência Abz-GFSPFRQ-EDDnp. Como controle negativo, IgGs foram purificadas a partir de um *pool* de soros de voluntários saudáveis.

O título de anticorpos específicos presentes nos soros foi determinado por imunodifusão em gel de ágar, utilizando antígenos de *P. brasiliensis*. Esses soros foram gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Arnaldo Colombo, da Disciplina de Doenças Infecciosas e Parasitárias da UNIFESP e pelo Prof. Dr. Zoilo Pires de Camargo, da Disciplina de Biologia Celular da UNIFESP, e apresentaram títulos em imunodifusão de 1:2, 1:4, 1:16 e 1:128.

A redução na atividade catalítica do extrato citosólico de Pb18 sobre o substrato Abz-GFSPFRQ-EDDnp pelas IgGs purificadas dos pacientes com PCM foi diretamente proporcional ao título de anticorpos de cada soro (Figura 19). A mesma concentração de IgGs (100 µg) de soros com maiores títulos em imunodifusão, o que significa uma melhor produção de anticorpos específicos pelo hospedeiro, levou a uma maior inibição da atividade peptidásica do extrato citosólico, chegando a 60% de inibição pelo soro com título de 1:128. Ao contrário, 100 µg de IgGs isoladas de soros com baixos títulos em imunodifusão induziram uma menor inibição da atividade peptidásica. Essa inibição foi específica, pois a mesma quantidade de IgGs purificadas de soros de indivíduos saudáveis não inibiu a atividade TOP-*like* do extrato citosólico de Pb18.

Um ensaio semelhante foi realizado utilizando-se anticorpos comerciais anti-TOP (Proteimax) e anti-MIP (ProteinTech Group, Inc). Esses anticorpos inibem a atividade catalítica das suas respectivas peptidases em ensaio de hidrólise do substrato fluorogênico Abz-GFSPFRQ-EDDnp (Vitor de Oliveira, comunicação pessoal). Na Figura 20, observa-se que anti-TOP e anti-MIP inibiram parcialmente a

atividade peptidásica do extrato citosólico de Pb18. Anticorpos anti-MIP inibiram em 50% a hidrólise do substrato fluorogênico na concentração de 1 μ l (a concentração proteica desse anticorpo comercial não está disponível), e os anticorpos anti-TOP inibiram a hidrólise do peptídeo de forma dose-dependente, como observado nas duas doses utilizadas, 5 e 10 μ g. A concentração proteica dos anticorpos comerciais anti-TOP não corresponde à concentração de imunoglobulinas purificadas devido à grande quantidade de albumina contida no reagente para sua conservação (dados não mostrados).

Os anticorpos utilizados neste ensaio apresentaram reação cruzada entre si, como demonstrado anteriormente na Figura 6, não sendo possível, portanto, determinar a existência de uma atividade peptidásica MIP-like minoritária em adição à atividade TOP-like majoritária no extrato citosólico de *P. brasiliensis*.

Esses resultados sugerem que a oligopeptidase do extrato citosólico de *P. brasiliensis* é secretada ou liberada após lise das leveduras *in vivo* e apresenta propriedades imunogênicas, induzindo a produção de anticorpos específicos no hospedeiro, capazes de inibir a atividade catalítica da peptidase. A inibição da atividade catalítica do extrato citosólico com os anticorpos anti-MIP e anti-TOP, que reagem cruzadamente entre si, reforçam a existência de uma peptidase com atividade TOP-like no *P. brasiliensis*, não descartando porém a existência de uma peptidase MIP-like.

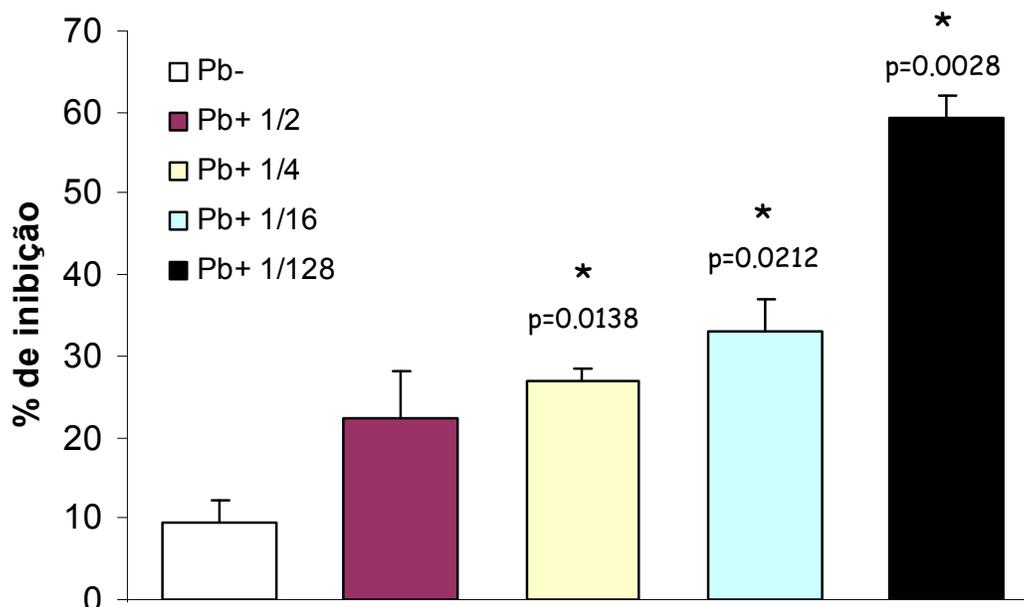


Figura 19 – Inibição da hidrólise de Abz-GFSPFRQ-EDDnp pelo extrato citosólico de *P. brasiliensis* por IgGs purificadas de pacientes com PCM. Porcentagem de inibição da hidrólise do substrato Abz-GFSPFRQ-EDDnp pelo extrato citosólico de Pb18 por IgGs Pb-específicas. Pb-, IgGs isoladas de indivíduos não-infectados; 1/2, 1/4, 1/16 e 1/128, IgGs isoladas de indivíduos infectados com *P. brasiliensis*, soros com títulos de anticorpos anti-Pb (em imunodifusão) de 1:2, 1:4, 1:16 e 1:128 respectivamente. Os ensaios foram realizados a 37°C, em 50mM Tris-HCL, pH7,4. As barras representam a porcentagem de inibição da hidrólise do substrato Abz-GFSPFRQ-EDDnp (20 μ M) pelo extrato citosólico do Pb18 por cinco minutos, comparado com o controle sem adição de anticorpos, que representa 100% de atividade. Para a inibição da hidrólise, foram adicionadas 100 μ g de IgGs purificadas. Resultado expresso em médias \pm desvio padrão.

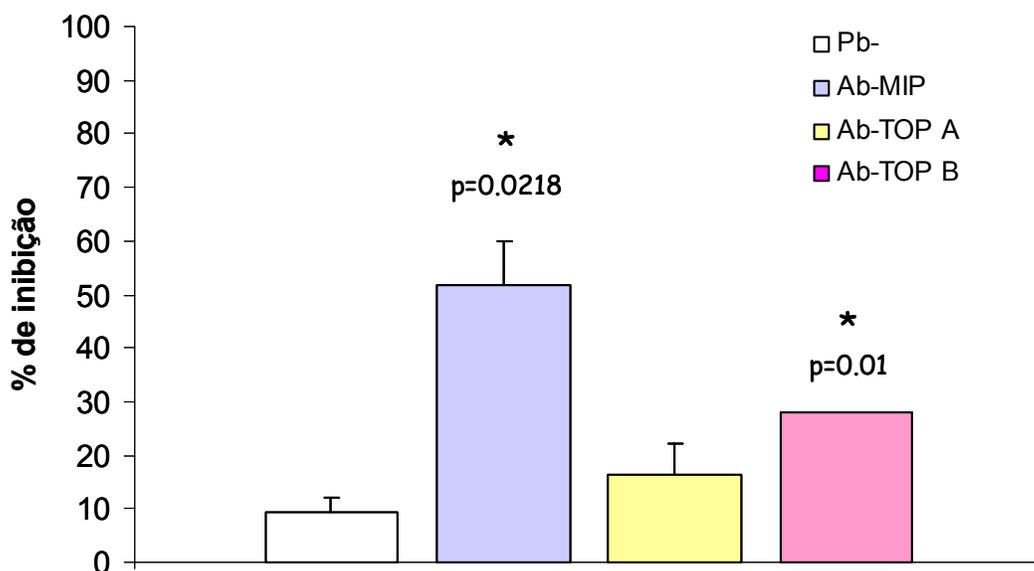


Figura 20 - Inibição da hidrólise de Abz-GFSPFRQ-EDDnp por extrato citosólico de Pb18 com anticorpos policlonais anti-TOP e anti-MIP.

Porcentagem de inibição da hidrólise do substrato Abz-GFSPFRQ-EDDnp pelo extrato citosólico de Pb18 por anticorpos comerciais anti-TOP e anti-MIP. Pb-, 100 μ g de IgGs isoladas de indivíduos não-infectados. Os ensaios foram realizados a 37°C, em 50mM Tris-HCL, pH7,4. As barras representam a porcentagem de inibição da hidrólise do substrato Abz-GFSPFRQ-EDDnp (20 μ M) pelo extrato citosólico do Pb18 por cinco minutos, comparado com o controle sem adição de anticorpos, que representa 100% de atividade. Resultado expresso em médias \pm desvio padrão.

4.6. Expressão da oligopeptidase com atividade TOP-like e gp43 em isolados de *P. brasiliensis* com diferentes virulências

A análise preliminar da atividade oligopeptidásica TOP-like em lisados de leveduras de *P. brasiliensis* com maior ou menor virulência, mostrou que isolados Pb18 de maior virulência (recentemente coletados de órgãos de animais infectados) apresentaram uma maior atividade peptidásica sobre o substrato fluorogênico. Este resultado sugere que a expressão dessa enzima poderia estar relacionada a uma maior virulência fúngica, o que possibilitaria sua indicação como um fator de virulência para o *P. brasiliensis* (Figura 2).

Para confirmar um possível papel da oligopeptidase com atividade TOP-like de *P. brasiliensis* na virulência e patogenicidade fúngica, foram realizados ensaios onde a virulência do fungo foi controlada e métodos mais precisos de quantificação da peptidase foram utilizados. O isolado 18 de *P. brasiliensis* foi utilizado nas suas duas variações, o Pb18V (virulento) e o Pb18NV (não virulento). O isolado virulento representa o fungo mantido em passagens frequentes por camundongos e recuperado a partir de órgãos infectados. O isolado, após passagem *in vivo*, foi utilizado em experimentos até no máximo o décimo repique *in vitro* para extração de RNA, obtenção de lisado, extrato citosólico, preparado de membrana/parede celular. O isolado não virulento vem sendo mantido há muito tempo em cultivos *in vitro* no laboratório.

Para comprovar a diferença na virulência dos dois isolados a serem utilizados no ensaio, representada pela diferença na capacidade infectante *in vivo* dos mesmos, os isolados foram inoculados intravenosamente em camundongos e o número de unidades formadoras de colônia (UFC) obtidas dos pulmões dos animais

infectados foi determinado. O isolado com maior virulência, Pb18V, apresentou número de UFCs/grama de tecido pulmonar cerca de 30 vezes maior que o isolado não virulento (Pb18NV), como observado na Figura 21.

O extrato citosólico foi obtido dos dois isolados e testado quanto a sua capacidade de hidrolisar o substrato fluorogênico Abz-GFSPFRQ-EDDnp. Corroborando os resultados preliminares obtidos, o extrato citosólico obtido do isolado Pb18V mostrou uma atividade peptidásica significativamente maior que isolado Pb18NV (Figura 22), sugerindo que uma maior expressão da oligopeptidase com atividade TOP-*like* ocorra nos isolados mais virulentos.

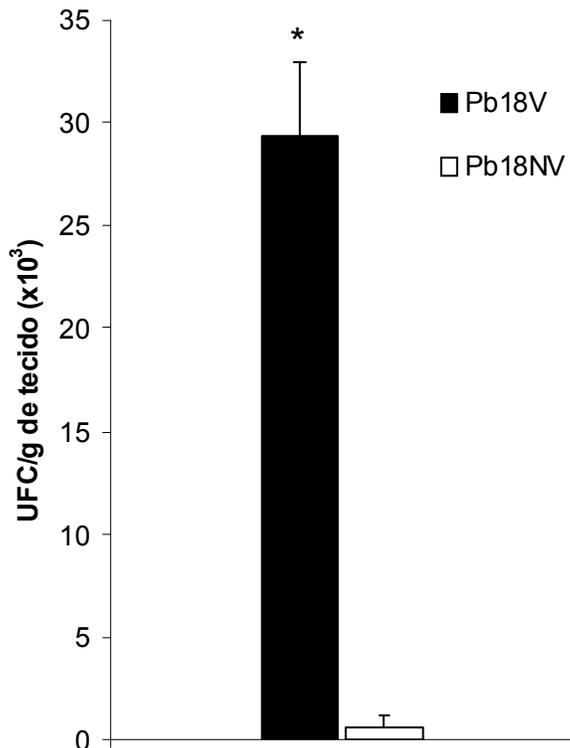


Figura 21 – Comparação da infectividade *in vivo* dos isolados Pb18V e Pb18NV. Unidades formadoras de colônia (UFC) de *P. brasiliensis* isolado 18V (virulento) e 18NV (não virulento) recuperadas dos pulmões de camundongos Balb/c, 15 dias após a infecção com 10^6 células viáveis injetadas endovenosamente. * $p < 0.001$, comparado com o isolado não virulento. Resultados expressos em médias \pm desvio padrão.

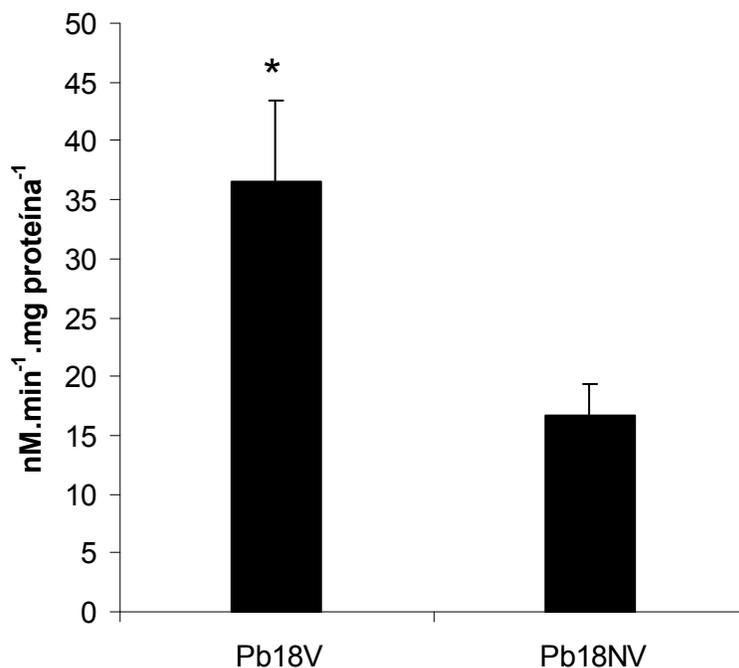


Figura 22 – Comparação da atividade oligopeptidásica TOP-like presente nos extratos citosólicos dos isolados Pb18 virulento e não virulento.

Extratos citosólicos de Pb18V and Pb18NV foram incubados com o peptídeo fluorogênico Abz-GFSPFRQ-EDDnp (20 μ M) em 50mM Tris-HCl, pH 7,4, a 37°C. Os resultados estão expressos em médias \pm desvio padrão. * $p < 0.05$ comparado com Pb18NV.

Para verificar se os níveis de expressão de peptidases com atividade TOP-*like* pelo *P. brasiliensis* podem ser influenciados pelo grau de virulência/infectividade do fungo, foi utilizada a técnica de qPCR (reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real), que permite robusta detecção e quantificação da expressão gênica. As quantificações foram realizadas a partir do cDNA obtido do mRNA extraído dos isolados Pb18V e Pb18NV.

Nucleotídeos iniciadores foram desenhados a partir das sequências gênicas homólogas à TOP e MIP de mamíferos depositadas no banco de dados contendo as bibliotecas genômicas do *P. brasiliensis* isolados 01, 03 e 18. Para a realização desse método quantitativo, genes endógenos de expressão constante são necessários para efeitos comparativos, e foram então utilizados nucleotídeos iniciadores de genes do *P. brasiliensis* já empregados como genes endógenos para qPCR, como os genes de GAPDH, EIF3 e tubulina (Nunes et al, 2005; Bandeira & Nóbrega, 2008; Rocha et al, 2009). Como a glicoproteína de 43 kDa do *P. brasiliensis* (gp43) é também um gene expresso por todos os isolados desse fungo, nucleotídeos iniciadores foram também desenhados para a detecção do gene dessa glicoproteína, com base nas sequências das bibliotecas de cDNA e genômica descritas.

Primeiramente foi realizada a escolha dos genes endógenos a serem utilizados no ensaio. Utilizou-se para isso um aplicativo para Excel (Microsoft) chamado geNorm (Vandesompele et al, 2002), que analisa a estabilidade de expressão dos genes endógenos. Esses genes endógenos são classificados de acordo com um valor de "M" (média *pair-wise* da variação de um gene particular em relação a todos os outros genes). Essa é uma medida determinada da

estabilidade do gene controle, que classifica um gene como sendo mais estável (menor valor de M) ou menos estável (maior valor de M), sendo considerados aceitáveis valores menores que 1,5 (Vandesompele et al, 2002). De acordo com este software, 4 dos 6 genes testados, GAPDH, EIF3, tubulina e o gene homólogo da MIP de *P. brasiliensis* ("MIP"), mostraram uma confiabilidade global ideal, confirmada pelo baixo valor de "M". Em particular, o aplicativo geNorm classificou os genes MIP e GAPDH como os dois melhores genes endógenos do grupo, pelos menores valores de M obtidos (Figura 23). O aplicativo também sugere que um fator de normalização exata dos dados da qPCR pode ser calculado usando apenas os dois genes endógenos mais estáveis (MIP e GAPDH), sem necessidade de incluir controles adicionais na análise. Portanto, esses dois controles endógenos foram utilizados no cálculo do fator de normalização utilizando o software REST2008 (Pfaffl et al, 2002).

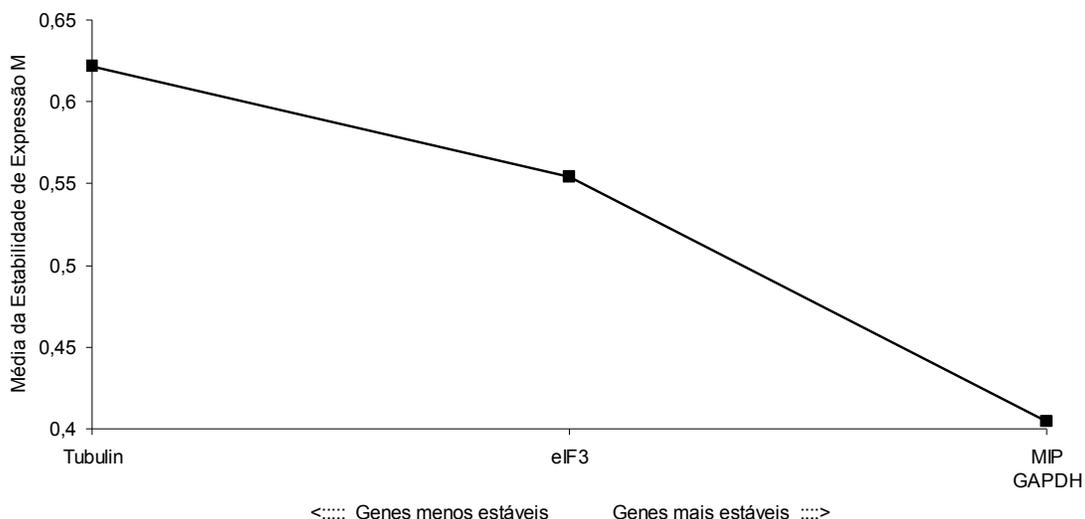


Figura 23 – Determinação da estabilidade da expressão gênica para genes a serem utilizados como referência no ensaio de qPCR. Média dos valores de “M” da estabilidade da expressão dos genes a serem utilizados como referência no ensaio de qPCR, tubulina, eIF3, MIP e GAPDH, calculado pelo aplicativo geNorm.

Utilizando agora os genes endógenos selecionados como controles, MIP e GAPDH, foi quantificada a expressão dos genes da gp43 e do gene do *P. brasiliensis* homólogo à TOP. O ensaio de qPCR mostrou que a expressão do gene do *P. brasiliensis* homólogo à TOP foi quase 2 vezes maior no isolado Pb18V do que no isolado Pb18NV (Figura 24), tanto utilizando MIP como GAPDH como genes de referência. Essa diferença é estatisticamente significativa, como analisado pelo aplicativo REST (Pfaffal et al, 2002)

Este resultado sugere que a peptidase homóloga à TOP de mamíferos presente no genoma do *P. brasiliensis*, que possivelmente é responsável pela atividade catalítica TOP-like no extrato citosólico de *P. brasiliensis*, pode ser considerada uma candidata a um fator de virulência fungica. Entretanto, este resultado necessita de experimentos adicionais para sua confirmação.

Em paralelo à análise da expressão da peptidase homóloga à TOP em *P. brasiliensis*, foi também analisada a expressão da gp43 nos dois isolados, Pb18V e Pb18NV. Na Figura 24, podemos observar que a gp43 foi onze e treze vezes mais expressa no Pb18V do que no Pb18NV, utilizando-se MIP ou GAPDH como genes de referência, respectivamente. Ambos mostraram resultados estatisticamente significativos utilizando o software REST (Pfaffl, 2002) para análise dos dados.

Um resultado preliminar nos sugeriu que a expressão da gp43 pode variar de acordo com o tempo de cultivo do isolado *in vitro*. O isolado Pb18V foi mantido *in vitro* por 3 e 6 passagens após seu isolamento de animais infectados, e a expressão da gp43 foi quantificada nesses dois isolados, Pb18V3 e Pb18V6. A expressão do gene no isolado Pb18V3 foi maior do que no isolado Pb18V6 (dados não apresentados). Ensaio complementares são necessários para confirmar os resultados obtidos para a expressão da gp43 nos isolados com diferentes virulências de *P. brasiliensis*.

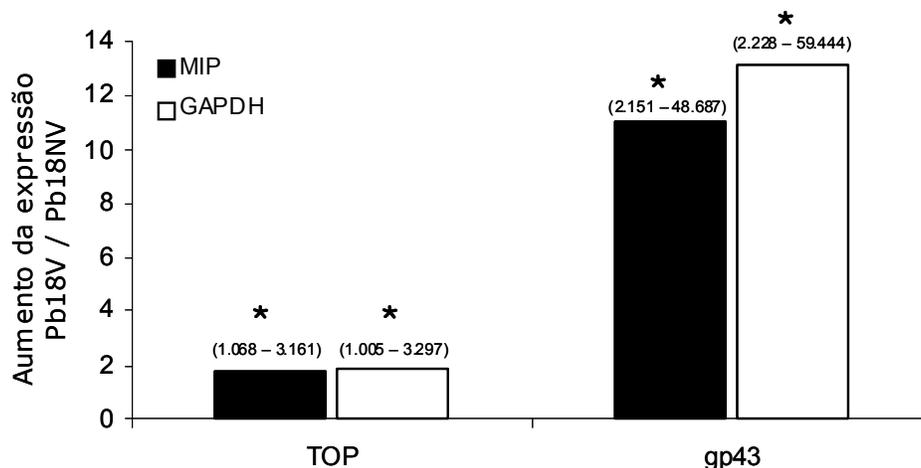


Figura 24 – Expressão do gene homólogo à TOP de mamíferos e do gene da gp43 em isolados virulentos e não virulentos do *P. brasiliensis*. Expressão relativa do gene homólogo à TOP de mamíferos e da gp43 pelo Pb18V e Pb18NV utilizando qPCR e calculado pelo aplicativo de expressão relativa REST2008. O eixo Y representa o número de vezes que a expressão do gene do Pb18V aumentou em comparação ao gene do Pb18NV, normalizado pelos genes de referência MIP (barras cheias) ou GAPDH (barras vazias). Os ensaios foram realizados em duplicatas, com três amostras biológicas para cada grupo. O erro padrão da expressão está entre parênteses no topo de cada barra. * $p > 0.05$ comparado com os níveis de expressão do isolado não virulento.

4.7. Análise filogenética de metalo-oligopeptidases de mamíferos, fúngicas e bacterianas

As sequências protéicas de metalo-oligopeptidases de mamíferos, fúngicas e bacterianas foram analisadas utilizando o software MegaAlign (DNASStar, Lasergene) com o alinhamento (método Clustal W). As peptidases analisadas foram: a OpdA da bactéria *E. coli*, a sacarolisina da levedura *S. cerevisiae*, as peptidases homólogas à MIP humana dos isolados 01, 03 e 18 do fungo *P. brasiliensis* (presente nas bibliotecas de cDNA e genômica como MIP), as peptidases homólogas à TOP humana dos isolados 01 e 03 do *P. brasiliensis* (definidas como TOP) e do isolado 18 (definida como sacarolisina), e as peptidases humanas TOP e neurolisina. As análises foram traduzidas em um painel de identidade/divergência (Figura 25) e em um cladograma (Figura 26).

Observou-se que embora todas as peptidases estudadas pertençam à mesma família (M3), a análise das sequências proteicas permite a divisão em dois grupos distintos, um contendo as MIPs dos três isolados de *P. brasiliensis*, e um segundo grupo contendo as outras metalo-oligopeptidases, que mesmo de diferentes origens (bacteriana, fúngica ou humana) apresentam uma maior identidade entre si, quando comparadas com as sequências das MIPs fúngicas.

Dentro do segundo grupo podemos observar claramente dois subgrupos, um deles formado pela única peptidase bacteriana estudada, a OpdA de *E. coli*. No outro subgrupo formado, as enzimas humanas TOP e neurolisina se separam das peptidases fúngicas, TOP de *P. brasiliensis* e sacarolisina de *S. cerevisiae*.

Um resultado interessante foi observado quando as peptidases fúngicas são analisadas. A peptidase homóloga à TOP humana presente no isolado 18 de *P.*

brasiliensis foi denominada "sacarolisina" no banco de dados das bibliotecas de cDNA e genômica do fungo. No entanto, o cladograma da Figura 26 mostra claramente que essa peptidase apresenta forte identidade com as TOPs dos isolados 01 e 03 de *P. brasiliensis*, sendo mais distante da sacarolisina de *S. cerevisiae*. Esse resultado sugere que o gene denominado "sacarolisina" na biblioteca de cDNA do isolado 18 do *P. brasiliensis* pode ser na verdade, o gene homólogo à TOP desse isolado.

		Identidade (%)										
		1	2	3	4	5	6	7	8	9		
Divergência	1		97.4	97.1	18.7	17.6	17.6	21.9	19.9	21.5	1	MIP Pb01
	2	2.7		99.8	18.1	17.2	17.2	21.6	19.9	22.2	2	MIP Pb03
	3	2.9	0.2		18.2	17.3	17.3	21.6	19.7	22.2	3	MIP Pb18
	4	221.0	221.0	223.0		90.9	89.1	43.7	37.4	39.6	4	Thimet Pb01
	5	223.0	224.0	224.0	8.8		99.6	44.2	37.6	39.8	5	Thimet Pb03
	6	223.0	224.0	224.0	10.8	0.2		44.5	37.8	39.8	6	Saccharolisina Pb18
	7	224.0	224.0	224.0	89.0	89.5	89.5		33.5	35.8	7	Saccharolisina Saccharomyces
	8	240.0	240.0	243.0	114.6	116.2	116.2	133.2		61.7	8	Neurolisina
	9	227.0	227.0	227.0	106.0	106.0	106.0	124.6	50.5		9	TOP
		1	2	3	4	5	6	7	8	9		

Figura 25 –Identidade (%) e a divergência de metalo-oligopeptidases de diferentes origens. Foram analisadas peptidases homólogas à TOP humana de *P. brasiliensis* isolados 01 (Thimet Pb01, EEH41798.1), 03 (Thimet Pb03, EEH18209.1), e 18 (anotada como sacarolisina Pb18,EEH47123.1); sacarolisina de *S. cerevisiae* (CAA54039.1); TOP humana (AAH13878.1); neurolisina humana (NP_065777.1); Peptidases homólogas à MIP humana de *P. brasiliensis* isolados 01 (EEH38189.1), 03 (EEH19367.1) e 18 (EEH47637.1) e OpdA de *E. coli* (NP_417955).

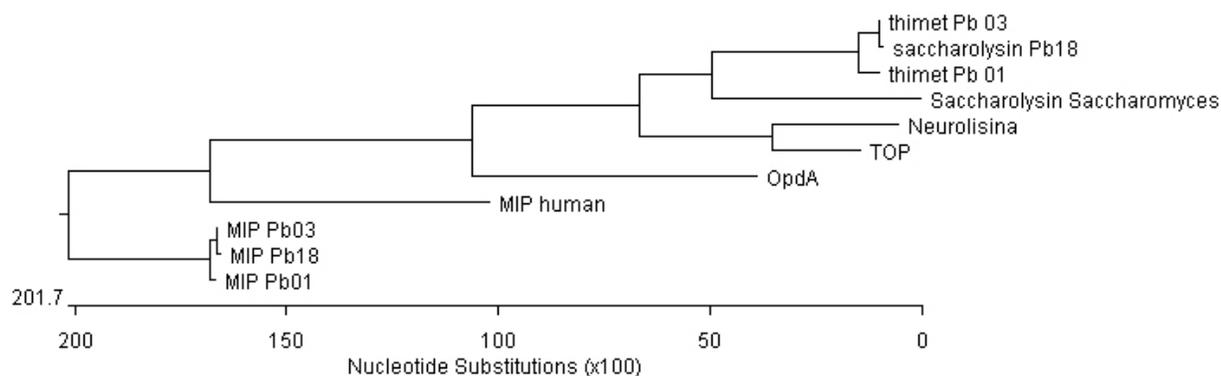


Figura 26- Cladograma de diferentes peptidases: Foram analisadas peptidases homólogas à TOP humana de *P. brasiliensis* isolados 01 (Thimet Pb01, EEH41798.1), 03 (Thimet Pb03, EEH18209.1), e 18 (denominada sacarolisina Pb18, EEH47123.1); sacarolisina de *S. cerevisiae* (CAA54039.1); TOP humana (AAH13878.1); neurolisina humana (NP_065777.1); Peptidases homólogas à MIP humana de *P. brasiliensis* isolados 01 (EEH38189.1), 03 (EEH19367.1) e 18 (EEH47637.1), MIP humana (NP_005923.2) e OpdA de *E. coli* (NP_417955).

5. Discussão

Oligopeptidases pertencentes à subfamília M3 das metaloproteases são importantes em vários processos biológicos e patológicos, e todas elas apresentam sítios ativos estruturalmente similares, capazes de clivar peptídeos com menos de 17 aminoácidos. Embora mais de 100 sequências de peptidases fúngicas pertencentes a essa família estejam relacionadas no banco de dados MEROPS, poucas já foram efetivamente isoladas e tiveram suas atividades determinadas, com muitas delas sendo identificadas no genoma do fungo por homologia a outras peptidases da família.

Em um ensaio preliminar, observamos a hidrólise de um peptídeo análogo à bradicinina, com supressão intramolecular de fluorescência hidrolisado pela thimet oligopeptidase (TOP) murina, uma das proteases da subfamília M3 e pelo lisado de leveduras de *P. brasiliensis*. Esse resultado nos sugeriu a existência de metalo-oligopeptidases em leveduras de *P. brasiliensis*, e nos levou a estudar melhor essa atividade oligopeptidásica. Nossos resultados demonstram a atividade majoritária de uma atividade oligopeptidásica no extrato citosólico de leveduras de *P. brasiliensis*, isolado 18 (Pb18).

Avaliando-se a atividade catalítica do lisado de Pb18 sobre vários peptídeos com supressão intramolecular de fluorescência (Tabela 2) concluiu-se que a atividade peptidásica majoritária presente era muito similar à TOP, com ausência de atividade neprilisina- ou neurolisina-*like*. A atividade catalítica do lisado foi significativamente inibida pelos inibidores seletivos *o*-fenantrolina e por JA-2 (Tabela 4), o que corrobora uma atividade TOP-*like* (Camargo et al, 1997; Medeiros et al 1997; Oliveira et al,

2001a e 2001b; Paschoalin et al 2005 e 2007). Avaliando-se o efeito de inibidores seletivos, a presença de serino-peptidases, cisteíno-peptidases, neurolisina-*like* e enzima conversora da angiotensina I foi descartada.

Nos genomas dos isolados 01, 03 e 18 do *P. brasiliensis*, foram encontradas sequencias de nucleotídeos homólogas às sequencias da TOP e da MIP de mamíferos, sugerindo que ambas possam ser expressas pelo fungo. Foi demonstrado por Marcondes et al (2009) que MIP humana hidrolisa o peptídeo Abz-GFSPFRQ-EDDnp, igualmente à TOP, e não é inibida por JA-2, mas é inibida por *o*-fenantrolina, e não se conhece um inibidor seletivo para essa enzima.

Nossos resultados, embora demonstrem uma atividade majoritária TOP-*like*, não descartam a possibilidade de existir uma atividade minoritária MIP-*like* no extrato citosólico de *P. brasiliensis*. A inibição pelo JA-2, seletiva para a TOP, foi de 90%, enquanto que a inibição por orto-fenantrolina foi de 100%. Essa atividade residual observada após inibição com JA-2, pode ser devida a uma atividade MIP-*like*, e embora os fragmentos gerados após clivagem da bradicinina e do peptídeo Abz-GFSPFRQ-EDDnp sugiram a existência de somente uma peptidase com atividade TOP-*like*, fragmentos gerados pela hidrólise de uma peptidase MIP-*like* poderiam ser mascarados por fragmentos gerados majoritariamente pela peptidase TOP-*like*.

Na tentativa de determinarmos a existência de uma peptidase com atividade MIP-*like* foi avaliada no extrato citosólico de *P. brasiliensis*, a reatividade de anticorpos policlonais adquiridos comercialmente contra TOP e MIP de mamíferos. No extrato citosólico de *P. brasiliensis* há a presença de uma proteína reconhecida tanto por anticorpos anti-MIP como anti-TOP, não sendo possível determinar se essa proteína é TOP-*like* ou MIP-*like*

devido à reatividade cruzada entre esses anticorpos, também impossibilitando a determinação de sua localização intracelular.

A maior atividade enzimática do extrato citosólico comparativamente aos outros preparados estudados (membrana/parede celular e lisado total) pode indicar uma localização citosólica dessa enzima e foi observado que ela não é secretada nas condições estudadas *in vitro*.

A oligopeptidase com atividade *TOP-like* de *P. brasiliensis* induz a produção de anticorpos capazes de inibir a atividade enzimática, que são encontrados em soros de pacientes com paracoccidioidomicose, e soros com maior título em imunodifusão contém maiores concentrações de anticorpos enzima-específicos. Esse resultado sugere que, embora a peptidase com atividade *TOP-like* não seja secretada nas condições de cultivo *in vitro*, ela pode ser secretada *in vivo*, ou que a lise de leveduras causada pela resposta imune do hospedeiro libere a peptidase, possibilitando sua localização no microambiente da infecção fúngica.

A bradicinina (BK) é um peptídeo biologicamente ativo amplamente descrito na literatura e alvo de oligopeptidases da família da thimet oligopeptidase. BK é gerada pela ação de calicreínas a partir de um substrato precursor, o cininogênio e está envolvida em uma série de processos fisiopatológicos

O substrato Abz-GFSPFRQ-EDDnp é clivado pela TOP na ligação Pro-Phe (Camargo et al., 1997) e pela MIP (Marcondes et al., 2009) e OpdA, na ligação Phe-Ser (Paschoalin et al, 2005). O extrato citosólico de *P. brasiliensis*, clivou este substrato entre a ligação Pro-Phe, semelhante à TOP (Figura 4). Já a hidrólise da bradicinina pela TOP e pela MIP ocorre entre Phe-Ser, gerando o análogo BK₁₋₅ (Camargo et al, 1997;Marcondes et al,

2009). No nosso estudo verificamos que o extrato citosólico de *P. brasiliensis* clivou a bradicinina nesse mesmo sítio, como demonstrado pela formação do fragmento BK₁₋₅ identificado após separação em HPLC e análise em espectrometria de massa (Figura 5).

Como dito acima, a MIP humana cliva a bradicinina no mesmo sítio que TOP e neurolisina, dando origem ao fragmento BK₁₋₅. No entanto, o substrato Abz-GFSPFRQ-EDDnp é clivado por MIP entre os aminoácidos Phe-Ser, diferentemente da TOP e neurolisina que clivam o mesmo substrato entre os aminoácidos Pro-Phe (Marcondes et al, 2009). Mesmo não observando a fragmentação sugestiva da presença de uma atividade MIP-*like* no extrato citosólico de *P. brasiliensis*, não podemos descartar completamente essa possibilidade devido à presença majoritária da atividade TOP-*like* que poderia mascarar uma atividade minoritária MIP-*like*. Esses resultados sugerem que a principal atividade observada no extrato citosólico de leveduras de *P. brasiliensis* capaz de hidrolisar bradicinina é proveniente de uma peptidase TOP-*like*, confirmando os resultados anteriormente obtidos utilizando substratos e inibidores seletivos.

O papel de bradicinina no controle da infecção por *Trypanosoma cruzi* já foi demonstrado. Este parasita secreta a cruzipaína, uma cisteíno-peptidase capaz de gerar cininas a partir de cininogênio acumulado no sítio de infecção após recrutamento de células inflamatórias (Monteiro et al, 2006). Bradicinina funciona então como um "sinal de perigo", induzindo a maturação de células dendríticas levando a uma polarização da resposta imune para um perfil Th1, via B₂R e de forma dependente de IL-12 (Scharfstein et al, 2007). Uma enzima capaz de clivar bradicinina, a

gingipaína, também foi isolada de *Porphyromonas gingivalis* (Imamura et al, 1994).

A expressão de metalo-oligopeptidases capazes de clivar bradicinina por leveduras de *P. brasiliensis* poderia explicar a longa persistência do fungo nos tecidos infectados. Aliberti et al. (2003) relataram que bradicinina induz a produção de IL-12 por células dendríticas e esta citocina estimula a polarização da resposta imune para um perfil Th1. No caso do *P. brasiliensis*, a produção, eventual secreção ou liberação após lise de enzimas TOP-like, poderia bloquear este efeito da bradicinina, constituindo-se um mecanismo anti-fúngico importante. Portanto, o estudo da atividade oligopeptidásica presente no lisado de *P. brasiliensis* pode levar à identificação de moléculas proteicas que possam servir de alvo em terapias específicas. Deste modo, a inibição da peptidase *in vivo*, poderia estimular a produção de IL-12 bradicinina-dependente por células dendríticas, o que possibilitaria a indução de uma resposta imune mais eficaz contra o fungo. Pouco se tem discutido sobre metalo-peptidases fúngicas, sua caracterização, atividade e inibição de atividade, o que é de fundamental importância na biologia do fungo além de ser um possível alvo de terapias antifúngicas.

Por mais de 100 anos, os postulados de Henle-Koch serviram como ponto de referência para o estabelecimento de evidência que um determinado organismo causava a doença clínica associada a ele (Evans, 1976). Por causa de sua habilidade de co-existir com o hospedeiro como comensal (*Candida albicans*) ou colonizar sem produzir uma doença identificável (*Aspergillus* spp, *C. neoformans*) ou na incapacidade de crescimento do organismo sem componentes do hospedeiro (*P. carinii*), os

fungos patogênicos não poderiam ser classificados de acordo com esses critérios (Casadevall & Pirofski, 1999).

Falkow, em 1988 adaptou os postulados de Koch para definir fatores de virulência com base na biologia molecular, onde a inativação do gene alvo atenua a virulência e a restauração da virulência do tipo selvagem com a reintrodução do gene alvo. No entanto, estes critérios são baseados somente nas propriedades dos microorganismos, não considerando a contribuição do ambiente do hospedeiro (Casadevall & Pirofski, 1999, 2001 e 2009).

Com exceção de algumas espécies de *Candida*, a maioria dos fungos patogênicos sobrevive no meio ambiente sem precisar de um hospedeiro humano ou animal como parte de seu ciclo de vida. Características que permitem a sobrevivência no meio ambiente, podem se sobrepor àquelas que permitem que esses fungos sobrevivam no hospedeiro (humano ou animal). Possivelmente em resposta ao desafio de sobreviver em condições atípicas e a uma variedade de predadores, esses fungos desenvolveram moléculas redundantes associadas à virulência (Feldmesser, 2004).

Casadevall e Pirofski (1999; 2003 e 2009) propuseram o “Damage Framework” que incorporou esses conceitos na definição de virulência e fatores de virulência, onde virulência é definida como a capacidade de um microorganismo causar danos a um hospedeiro. O dano pode ocorrer em nível celular, tecido ou órgão.

Por causa da prova molecular de acordo com o critério de Falkow, poucos fatores de virulência clássicos foram definidos para fungos patogênicos. O desenvolvimento de ferramentas genéticas necessárias para

a demonstração de virulência em fungos como o *P. brasiliensis* ainda se encontra nas fases iniciais.

Alguns candidatos a fator de virulência em *P. brasiliensis* são: melanina (Taborda et al, 2008), CBP – proteína ligante de cálcio e alfa-(1,3)-glucana, urease e catalases, as três primeiras presentes em EST de *P. brasiliensis* e a última já caracterizada e considerada fator de virulência em *Histoplasma capsulatum* (Rappleye et al, 2006; Campos et al, 2005; Moreira et al, 2004). Além desses fatores, são ainda citadas as adesinas (Barbosa et al, 2006), a gp43, com resultados ainda contraditórios (Popi et al, 2002 e Hanna et al, 2002), gp70 (de Mattos Grosso et al, 2003), serino-protease (Carmona et al, 1995; Puccia et al, 1998) e redutase férrica dependente de glutathiona (Zarnowski et al, 2005).

Neste estudo, observamos que o gene da peptidase homóloga à TOP de mamíferos contido no genoma de *P. brasiliensis* é quase duas vezes mais expresso no isolado 18 virulento (Pb18) em comparação ao não virulento. O aumento da hidrólise do substrato Abz-GFSPFRQ-EDDnp também foi observado no isolado de maior virulência quando comparado ao de menor virulência. Estes resultados preliminares são sugestivos para uma classificação da metalo-oligopeptidase com atividade TOP-like presente em leveduras de *P. brasiliensis* como um fator de virulência, no entanto, como discutido acima, este resultado necessita de experimentos adicionais para sua confirmação.

Durante os ensaios de expressão gênica, pudemos observar também que o gene da gp43 apresenta variação de expressão quando se compara o isolado virulento (até treze vezes mais expresso) e não virulento. Para melhor caracterização dessas metalo-oligopeptidases é necessária a

obtenção da proteína purificada recombinante, ou nativa, isolada do lisado fúngico. Não obtivemos sucesso na expressão das proteínas recombinantes, talvez por causa do tamanho (78-85 kDa) ou o sistema de expressão utilizado. Uma alternativa seria o sistema de expressão eucariótica. A obtenção da proteína purificada por cromatografia de afinidade oriunda do lisado fúngico ainda não foi possível, sendo necessária ainda a padronização da purificação assim como experimentos posteriores (como *immunoblotting*) para confirmar a obtenção da proteína e se necessário, a utilização de outras colunas cromatográficas para complementar a purificação da metalopeptidase alvo.

Quando analisamos filogeneticamente metalo-peptidases fúngicas, de mamíferos e bacterianas, foi possível observar dois grupos distintos: um grupo com as metalo-peptidases homólogas à MIP de mamíferos presentes nos isolados de *P. brasiliensis* e outro grupo com metalo-peptidases TOP-like fúngicas, bacteriana e humanas. Neste segundo grupo, foi possível observar que embora com denominações diferentes, o alinhamento das metalo-peptidases do isolado 01 e 03 de *P. brasiliensis* (denominadas como TOP no genoma dos fungos) e do isolado 18 (denominada sacarolisina nesse isolado), apresentam uma identidade superior a 90%. Entre o isolado 03 e 18, essa identidade ultrapassa 99%, o que sugere uma divergência na anotação e a metalo-peptidase do isolado 18 denominada sacarolisina pode ser o gene homólogo da TOP nesse isolado, como anotado para os outros dois isolados.

6. Conclusões

Neste trabalho foi identificada e caracterizada a atividade majoritária de uma enzima com atividade metalo-oligopeptidásica TOP-*like* no extrato citosólico, mas não nos preparados de membrana/parede celular, de *P. brasiliensis* isolado 18.

Os ensaios de clivagem de peptídeos com supressão intramolecular de fluorescência e a utilização de inibidores seletivos sugeriram a presença de atividade metalo-oligopeptidase TOP-*like*. Essa enzima cliva bradicinina, importante mediador inflamatório *in vivo*, no mesmo sítio de clivagem que a TOP de mamíferos, corroborando a presença majoritária de uma peptidase com atividade TOP-*like* em *P. brasiliensis*.

A atividade peptidásica TOP-*like* não foi detectada no sobrenadante de cultura, mesmo com os diferentes protocolos utilizados, sugerindo que nas condições de cultivo *in vitro* essa peptidase não seja secretada pelo fungo. No entanto, nossos resultados sugerem que essa peptidase possa ser liberada *in vivo* por secreção ou por lise das leveduras infectantes, uma vez que anticorpos capazes de inibir a atividade enzimática são encontrados em soros de pacientes com paracoccidiodomicose, e soros com maior título em imunodifusão contém maiores concentrações de anticorpos enzima-específicos.

Embora nossos resultados indiquem a presença majoritária de uma metalo-oligopeptidase com atividade TOP-*like* no extrato citosólico de *P. brasiliensis*, não podemos descartar a presença minoritária de uma peptidase com atividade MIP-*like*, já que essas enzimas hidrolisam os mesmos peptídeos, e genes homólogos para ambas foram descritos no genoma do fungo. Anticorpos comerciais (anti-TOP e anti-MIP de

mamíferos) reconheceram e foram capazes de inibir a atividade observada no extrato citosólico de *P. brasiliensis*, mas esses anticorpos apresentaram reação cruzada entre si, o que não permitiu a identificação de uma atividade MIP-like.

O isolado Pb18 mais virulento apresentou uma maior atividade dessa enzima metalo-oligopeptidásica TOP-like que o isolado menos virulento, como observado em ensaio de hidrólise do peptídeo Abz-GFSPFRQ-EDDnp. Um aumento da expressão do gene do *P. brasiliensis* homólogo à TOP de mamíferos também pode ser observado ao compararmos o isolado virulento e o não virulento, sugerindo uma possível relação entre expressão da peptidase com a virulência do fungo.

Foi também observado que gp43 é mais expressa nos isolados mais virulentos do que nos de menor virulência e o gene de MIP é um excelente controle endógeno para ser utilizado em reações de qPCR como calibrador.

Não foi possível obter as metalo-oligopeptidases recombinantes (homólogos de TOP e MIP) do *P. brasiliensis*, mesmo utilizando diferentes protocolos, ou a oligopeptidase nativa com atividade TOP-like por cromatografia de afinidade e/ou gel filtração. A obtenção das metalopeptidases é importante para melhor estudar o papel das mesmas *in vitro* ou *in vivo*.

Estudos filogenéticos mostraram que a enzima depositada como *saccharolisina* no genoma do isolado Pb18, na verdade apresenta mais de 90% de identidade com as enzimas depositadas como homólogas da thimet oligopeptidase nos genomas dos isolados 01 e 03. O alinhamento dessas sequências com a sequência da *saccharolisina* de *S. cerevisiae* mostrou que elas estão distantes.

Esse resultado sugere que o gene denominado como "sacrolisina" na biblioteca de cDNA do isolado 18 do *P. brasiliensis* pode ser na verdade, o gene homólogo da TOP de mamíferos desse isolado.

7. Referências

- Aliberti J, Viola JP, Vieira-de-Abreu A, Bozza PT, Sher A, Scharfstein J (2003) Cutting edge: bradykinin induces IL-12 production by dendritic cells: a danger signal that drives Th1 polarization. *J Immunol.* 170:5349-53.
- Almeida IC, Neville DC, Mehlert A, Treumann A, Ferguson MA, Previato JO, Travassos LR (1996) Structure of the N-linked oligosaccharide of the main diagnostic antigen of the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Glycobiology.* 6:507-15. Erratum in: *Glycobiology* (1996) 6:vii.
- Alvarez-Sanchez MEA, Avila-Gonzalez L, Becerril-Garcia C, Fattel-Facenda LF, Ortega-Lopes J, Arroyo R (2000) A novel cysteine proteinase (CP65) of *Trichomonas vaginalis* involved in cytotoxicity. *Microbial Pathogenesis,* 28:193-202.
- André DC, Lopes JD, Franco MF, Vaz CA, Calich VL (2004) Binding of laminin to *Paracoccidioides brasiliensis* induces a less severe pulmonary paracoccidioidomycosis caused by virulent and low-virulence isolates. *Microbes Infect.* 6:549-58.
- Bailão AM, Shrank A, Borges CL, Parente JA, Dutra V, Felipe MS, Fiúza RB, Pereira M, de Almeida Soares CM (2007) The transcriptional profile of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast cells is influenced by human plasma. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 51:43-57.
- Bandeira SC & Nóbrega MP (2008) Characterization of *Paracoccidioides brasiliensis* COX9, COX12, and COX16 respiratory genes. *Mycol Res.* 112:1414-1420.
- Barelli H, Vincent JP, Checler F (1993) Rat kidney endopeptidase 24.16. Purification, physico-chemical characteristics and differential specificity towards opiates, tachykinins and neurotensin-related peptides. *Eur J*

- Biochem. 211: 79-90
- Barrett AJ (1994) Classification of peptidases. *Methods in Enzymology*. 244:1-15.
- Barrett AJ, Brown MA, Dando PM, Knight CG, McKie N, Rawlings ND, Serizawa A (1995) Thimet oligopeptidase and oligopeptidase M or neurolysin. *Methods Enzymol*. 248: 529-556.
- Barrett AJ, Rawlings ND (1995) Families of aspartic peptidases, those of unknown catalytic mechanism. *Methods Enzymol*. 248: 105-120.
- Barrett AJ, Rawlings ND, Woessner JF (2004) *The Handbook of Proteolytic Enzymes*, 2nd ed. Academic Press.
- Benard G, Orii NM, Marques HH, Mendonça M, Aquino MZ, Campeas AE, del Negro GB, Durandy A, Duarte AJ (1994) Severe acute paracoccidioidomycosis in children. *Pediatr Infect Dis J*. 13:510-515.
- Borges-Walmsley MI, Chen D, Shu X, Walmsley AR (2002) The pathobiology of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Trends in Microbiology*. 10:80-87.
- Bradford MM (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 CJ, Rittner GM, Muñoz Henao JE, Teixeira AF, Massis LM, Sbrogio-Almeida ME, Taborda CP, Travassos LR, Ferreira LC (2009) *Paracoccidioides brasiliensis* vaccine formulations based on the gp43-derived P10 sequence and the *Salmonella enterica* FliC flagellin. *Infect Immun*. 77:1700-1707.
- Branda SS, Isaya G (1995) Prediction and identification of new natural substrates of the yeast mitochondrial intermediate peptidase. *J Biol Chem*. 270:27366-27373.

- Branquinha MH, Vermelho AB, Goldenberg S, Bonaldo MC (1996) Ubiquity of cysteine - and metalloproteinases activities in a wide range of trypanosomatids. *J. Euk. Microbiolol* 43: 130-135.
- Brown CK, Madauss K, Wei Lian MR, Beck, W, Tolbert D, Rodgers DW (2001) Structure of neurolysin reveals a deep channel that limits substrate access. *Proc. Nat. Acad Sci. USA.* 98: 3127-3132.
- Brummer E, Hanson LH, Restrepo A, Stevens DA (1988) In vivo and in vitro activation of pulmonary macrophages by IFN-gamma for enhanced killing of *Paracoccidioides brasiliensis* or *Blastomyces dermatitidis*. *J Immunol.* 140:2786-2789.
- Brummer E, Hanson LH, Restrepo A, Stevens DA (1989) Intracellular multiplication of *Paracoccidioides brasiliensis* in macrophages: killing and restriction of multiplication by activated macrophages. *Infect Immun.* 57:2289-2294.
- Brummer E, Restrepo A, Hanson LH, Stevens DA (1990) Virulence of *Paracoccidioides brasiliensis*: the influence of in vitro passage and storage. *Mycopathologia.* 109:13-7.
- Brummer E, Castaneda E, Restrepo A (1993) Paracoccidioidomycosis: an update. *Clin. Microbiol. Rev.* 6: 89-117
- Büchler M, Tisljar U, Wolf DH (1994) Proteinase yscD (oligopeptidase yscD). Structure, function and relationship of the yeast enzyme with mammalian thimet oligopeptidase (metalloendopeptidase, EP 24.15). *Eur J Biochem.* 219:627-639.
- Buissa-Filho R, Puccia R, Marques AF, Pinto FA, Muñoz JE, Nosanchuk JD, Travassos LR, Taborda CP (2008) The monoclonal antibody against the major diagnostic antigen of *Paracoccidioides brasiliensis* mediates immune protection in infected BALB/c mice challenged intratracheally

- with the fungus. *Infect Immun.* 76:3321-3328.
- Burns-Hamuro LL, Ma Y, Kammerer S, Reineke U, Self C, Cook C, Olson GL, Cantor CR, Braun A, Taylor SS (2003) Designing isoform-specific peptide disruptor of protein kinase A localization. *Proc. Nat. Acad Sci. USA.* 100: 4072-4077.
- Calich VL, da Costa TA, Felonato M, Arruda C, Bernardino S, Loures FV, Ribeiro LR, de Cássia Valente-Ferreira R, Pina A (2008) Innate immunity to *Paracoccidioides brasiliensis* infection. *Mycopathologia.* 165:223-236.
- Camargo ACM, Shapanka R., Greene LJ (1973). Preparation, assay, and partial characterization of a neutral endopeptidase from rabbit brain. *Biochemistry* 12: 1838-1844.
- Camargo ACM, Gomes MD, Reichl AP, Ferro ES, Jacchieri S, Hirata IY, Juliano L (1997) Structural features that make oligopeptidases susceptible substrates for hydrolysis by recombinant thimet oligopeptidase. *Biochem. J.* 324: 517-522.
- Camargo ZP, Gesztesi JL, Saraiva EC, Taborda CP, Vicentini AP, Lopes JD (1994) Monoclonal antibody capture enzyme immunoassay for detection of *Paracoccidioides brasiliensis* antibodies in paracoccidioidomycosis. *J Clin Microbiol.* 32:2377-2381.
- Carmo JP, Dias-Melicio LA, Calvi SA, Peraçoli MT, Soares AM (2006) TNF-alpha activates human monocytes for *Paracoccidioides brasiliensis* killing by an H₂O₂-dependent mechanism. *Med Mycol.* 44:363-368.
- Carmona AK, Puccia R, Oliveira MC, Rodrigues EG, Juliano L, Travassos LR (1995) Characterization of an exocellular serine-thiol proteinase activity in *Paracoccidioides brasiliensis*. *Biochem J.* 309:209-214.
- Carvalho KC, Ganiko L, Batista WL, Morais FV, Marques ER, Goldman GH, Franco MF, Puccia R (2005) Virulence of *Paracoccidioides brasiliensis* and

- gp43 expression in isolates bearing known PbGP43 genotype. *Microbes Infect.* 7: 55-65.
- Casadevall A, Pirofski LA (1999) Host-pathogen interactions: redefining the basic concepts of virulence and pathogenicity. *Infect Immun.* 67:3703-3713.
- Casadevall A, Pirofski L (2001) Host-pathogen interactions: the attributes of virulence. *J Infect Dis.* 184:337-344.
- Casadevall A, Pirofski LA (2003) The damage-response framework of microbial pathogenesis. *Nat Rev Microbiol.* 1:17-24.
- Casadevall A, Pirofski LA (2009) Virulence factors and their mechanisms of action: the view from a damage-response framework. *J Water Health.* 7 Suppl 1:S2-S18.
- Castañeda E, Brummer E, Perlman AM, McEwen JG, Stevens DA (1988) A culture-medium for *Paracoccidioides brasiliensis* with high plating efficiency, and the effect of siderophores, *J. Med.Vet. Mycol.* 26: 351-358.
- Chagas JR, Juliano L, Prado ES (1991) Intramolecularly quenched fluorogenic tetrapeptide substrates for tissue and plasma kallikreins. *Anal. Biochem.* 192: 419-425.
- Checler F, Vincent JP, Kitabgi P (1983) Degradation of neurotensin by rat brain synaptic membranes: involvement of a thermolysin-like metalloendopeptidase (enkephalinase), angiotensin-converting enzyme, and other unidentified peptidases. *J Neurochem.* 41:375-384
- Chew A, Buck EA, Peretz S, Sirugo G, Rinaldo P, Isaya G (1997) Cloning, expression, and chromosomal assignment of the human mitochondrial intermediate peptidase gene (MIPEP). *Genomics* 40: 493-496.

- Chew A, Sirugo G, Alsobrook JP, Isaya G (2000) Functional and genomic analysis of the human mitochondrial intermediate peptidase, a putative protein partner of frataxin. *Genomics* 65: 104-112.
- Chu TG, Orlowski M (1985) Soluble metalloendopeptidase from rat brain: action on enkephalin-containing peptides and other bioactive peptides. *Endocrinology* 116: 1418-1425.
- Cisalpino PS, Puccia R, Yamauchi LM, Cano MI, da Silveira JF, Travassos LR (1996) Cloning, characterization, and epitope expression of the major diagnostic antigen of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Biol Chem.* 271:4553-4560.
- Costa M, Borges CL, Bailão AM, Meirelles GV, Mendonça YA, Dantas SF, de Faria FP, Felipe MS, Molinari-Madlum EE, Mendes-Giannini MJ, Fiuza RB, Martins WS, Pereira M, Soares CM. (2007) Transcriptome profiling of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast-phase cells recovered from infected mice brings new insights into fungal response upon host interaction. *Microbiology.* 153:4194-4207.
- Crack PJ, Wu TJ, Cummins PM, Ferro ES, Tullai JW, Glucksman MJ, Roberts JL (1999) The association of metalloendopeptidase EC 3.4.24.15 at the extracellular surface of the AtT-20 cell plasma membrane. *Brain Res.* 24: 113-124.
- Cunha CE, Magliarelli Hde F, Paschoalin T, Nchinda AT, Lima JC, Juliano MA, Paiva PB, Sturrock ED, Travassos LR, Carmona AK (2009) Catalytic properties of recombinant dipeptidyl carboxypeptidase from *Escherichia coli*: a comparative study with angiotensin I-converting enzyme. *Biol Chem.* 390:931-940.
- Cunha FM, Berti DA, Ferreira ZS, Klitzke CF, Markus RP, Ferro ES (2008) Intracellular peptides as natural regulators of cell signaling. *J Biol Chem.* 283:24448-59

- Dando PM, Brown MA, Barrett AJ (1993) Human thimet oligopeptidase. *Biochem. J.* 294: 451-457.
- Dauch P, Vincent JP, Checler, FP (1991) Specific inhibition of endopeptidase 24.16 by dipeptides. *Eur. J. Biochem.* (202): 269-276.
- Dauch P, Masuo, Y, Vincent, JP, Checler, F (1992) Endopeptidase 24-16 in murines: tissue distribution, cerebral regionalization, and ontogeny. *J Neurochem.* 59:1862-1867.
- Dauch P, Vincent JP, Checler FP (1995) Molecular cloning and expression of rat brain endopeptidase 3.4.24.16. *J. Biol. Chem.* 270:27266.
- Del Rosso M, Fibbi G, Pucci M, Margheri F, Serrati S (2008) The plasminogen activation system in inflammation. *Front Biosci.* 13:4667-4686.
- dos Santos AL, de Carvalho IM, da Silva BA, Portela MB, Alviano CS, de Araújo Soares RM. (2006) Secretion of serine peptidase by a clinical strain of *Candida albicans*: influence of growth conditions and cleavage of human serum proteins and extracellular matrix components. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 46:209-220.
- el Moudni B, Rodier MH, Barrault C, Ghazali M, Jacquemin JL (1995) Purification and characterization of a metallopeptidase of *Candida albicans*. *J Med Microbiol.* 43:282-288.
- Evans AS (1976) Causation and disease: the Henle-Koch postulates revisited. *Yale J Biol Med.* 49:175-195.
- Falkow S (1988) Molecular Koch's postulates applied to microbial pathogenicity. *Rev Infect Dis.* 10 (Suppl 2):S274-6.
- Feldmesser M (2004) Pathogenic Fungi: Host Interactions and Emerging Strategies for Control. Chapter 2. Virulence Factors That Protect the Fungus From Elimination. Editores: Gioconda San-Blas and Richard A.

- Calderone. Caister Academic Press.
- Felipe MSS, Andrade RV, Arraes FB, Nicola AM, Maranhão AQ, Torres FA, Silva-Pereira I, Poças-Fonseca MJ, Campos EG, Moraes LM, Andrade PA, Tavares AH, Silva SS, Kyaw CM, Souza DP, Pereira M, Jesuíno RS, Andrade EV, Parente JA, Oliveira GS, Barbosa MS, Martins NF, Fachin AL, Cardoso RS, Passos GA, Almeida NF, Walter ME, Soares CMA, Carvalho MJ, Brígido MM, Pbggenome Network (2005) Transcriptional profiles of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* in mycelium and yeast cells. J Biol Chem 280: 24706-24714.
- Ferreira KS, Almeida SR. (2006) Immunization of susceptible mice with gp43-pulsed dendritic cells induce an increase of pulmonary Paracoccidioidomycosis. Immunol Lett. 103:121-126.
- Ferreira KS, Bastos KR, Russo M, Almeida SR. (2007) Interaction between *Paracoccidioides brasiliensis* and pulmonary dendritic cells induces interleukin-10 production and toll-like receptor-2 expression: possible mechanisms of susceptibility. J Infect Dis. 196:1108-1115.
- Ferro ES, Tullai JW, Glucksman MJ, Roberts JL (1999) Secretion of metalloendopeptidase 24.15 (EC 3.4.24.15). DNA Cell Biol. 18: 781-789.
- Ferro ES, Hyslop S, Camargo ACM (2004) Intracellular peptides as putative natural regulators of protein interactions. J Neurochem. 91: 769-77.
- Fontenele-Neto JD, Massarelli EE, Garrido PA, Beaudet A, Ferro ES (2001) Comparative fine structural distribution of endopeptidase 24.15 (EC3.4.24.15) and 24.16 (EC3.4.24.16) in rat brain. J Comp Neurol. 438: 399-410.
- Franco M (1987) Host-parasite relationships in paracoccidioidomycosis. J Med Vet Mycol. 25:5-18.

- Franco M (1994) Pathology. In *Paracoccidioidomycosis* (Franco, M. *et al.*, eds), pp. 142–146, CRC Press
- Fruitier-Arnaudin I, Cohen M, Bordenave S, Sannier F, Piot JM (2002) Comparative effects of angiotensin IV and two hemorphins on angiotensin-converting enzyme activity. *Peptides* 23: 1465-1470.
- Garrido PA, Vandebulcke F, Ramjaun AR, Vincent B, Checler F, Ferro ES, Beaudet A (1999) Confocal microscopy reveals thimet oligopeptidase (EC 3.4.24.15) and neurolysin (EC 3.4.24.16) in the classical secretory pathway. *DNA Cell Biol.* 18: 323-331.
- Gavel Y & von Heijne G (1990) Cleavage-site motifs in mitochondrial targeting peptides. *Protein Eng.* 4:33-37.
- Gesztési JL, Puccia R, Travassos LR, Vicentini AP, de Moraes JZ, Franco MF, Lopes JD (1996) Monoclonal antibodies against the 43,000 Da glycoprotein from *Paracoccidioides brasiliensis* modulate laminin-mediated fungal adhesion to epithelial cells and pathogenesis. *Hybridoma.* 15:415-422.
- Gifford AHT, Klippenstein JR, Moore MM (2002) Serum Stimulates Growth of and Proteinase Secretion by *Aspergillus fumigatus*. *Infect Immun.* 70: 19–26.
- Goldman GH, dos Reis Marques E, Duarte Ribeiro DC, de Souza Bernardes LA, Quiapin AC, Vitorelli PM, Savoldi M, Semighini CP, de Oliveira RC, Nunes LR, Travassos LR, Puccia R, Batista WL, Ferreira LE, Moreira JC, Bogossian AP, Tekaia F, Nobrega MP, Nobrega FG, Goldman MH (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.
- Hanna SA, Monteiro da Silva JL, Giannini MJ (2000) Adherence and

- intracellular parasitism of *Paracoccidioides brasiliensis* in Vero cells. *Microbes Infect.* 2:877-884.
- Hawksworth DL (1991) The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation. *Mycological Research* 95:641-655.
- Healy DP, Orlowski M (1992) Immunocytochemical localization of endopeptidase 24.15 in rat brain. *Brain Res.* 571: 121-128.
- Hersh LB, Rodgers DW (2008) Neprilysin and Amyloid Beta peptide Degradation. *Current Alzheimer Research* 5: 225-231.
- Hrycyna CA & Clarke S (1993) Purification and Characterization of a novel metalloendopeptidase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry* 32: 11293-11301.
- Hung CY, Seshan KR, Yu JJ, Schaller R, Xue J, Basrur V, Gardner MJ, Cole GT (2005) A metalloproteinase of *Coccidioides posadasii* contributes to evasion of host detection. *Infect Immun.* 73:6689-6703.
- Ibrahim-Granet O, Hernandez FH, Chevrier G, Dupont B (1996) Expression of PZ-peptidases by cultures of several pathogenic fungi. Purification and characterization of a collagenase from *Trichophyton schoenleinii*. *J Med Vet Mycol.* 34: 83-90.
- Ibrahim-Granet O & D'Enfert C (1997) The *Aspergillus fumigatus* mepB gene encodes an 82kDa intracellular metalloproteinase structurally related to mammalian thimet oligopeptidase. *Microbiology* 143: 2247-2253.
- Imamura T, Pike RN, Potempa J, Travis J (1994) Pathogenesis of periodontitis: a major arginine-specific cysteine proteinase from *Porphyromonas gingivalis* induces vascular permeability enhancement through activation of the kallikrein/kinin pathway. *J Clin Invest.* 94: 361-367.

- Imamura T, Potempa J, Travis J (2004) Activation of the kallikrein-kinin system and release of new kinins through alternative cleavage of kininogens by microbial and human cell proteinases. *Biol Chem.* 385:989-996.
- Isaya G, Kalousek F, Fenton WA, Rosenberg LE (1991) Cleavage of precursors by the mitochondrial processing peptidase requires a compatible mature protein or an intermediate octapeptide. *J Cell Biol.* 113: 65-76.
- Isaya G, Miklos D, Rollins RA (1994) MIP1, a new yeast gene homologous to the rat mitochondrial intermediate peptidase gene, is required for oxidative metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* 14: 5603- 5616.
- Isaya G, Sakati WR, Rollins RA, Shen GP, Hanson LC, Ullrich RC, Novotny CP (1995) Mammalian mitochondrial intermediate peptidase: structure/function analysis of a new homologue from *Schizophyllum commune* and relationship to thimet oligopeptidases. *Genomics* 28: 450- 461.
- Iwata N, Tsubuki S, Takaki Y, Shirotani K, Lu B, Gerard NP, Gerard C, Hama E, Lee HJ, Saido TC (2001) Metabolic regulation of brain A β by neprilysin. *Science.* 292:1550-1552.
- Jeske NA, Glucksman MJ, Roberts JL (2003) EP24.15 is associated with lipid rafts. *J Neurosci Res* 74: 468-473.
- Jeske NA, Glucksman MJ, Roberts JL (2004) Metalloendopeptidase EC3.4.24.15 is constitutively released from the exofacial leaflet of lipid rafts in GT1-7 cells. *J Neurochem.* 90: 819-828.
- Jiracek J, Yiotakis A, Vincent B, Checler F, Dive V (1996) Development of the first potent and specific of the zinc endopeptidase neurolysin using a

- systematic approach based on combinatorial chemistry of phosphinic peptides. *J Biol Chem* 271: 19606-19611.
- Jiracek J, Yiotakis A, Vincent B, Lecoq A, Nicolaou A, Checler F, Dive V (1995) Development of highly potent and selective phosphinic peptide inhibitors of zinc endopeptidase 24.15 using combinatorial chemistry. *J Biol Chem*. 270: 21701-21706.
- Kalousek F, Hendrick JP, Rosenberg LE (1988) Two mitochondrial matrix proteases act sequentially in the processing of mammalian matrix enzymes. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 85: 7536– 7540.
- Kashino SS, Calich VL, Burger E, Singer-Vermes LM (1985) In vivo and in vitro characteristics of six *Paracoccidioides brasiliensis* strains. *Mycopathologia*. 92:173-178
- Katoh I, Yashinaka Y, Rein A, Shibuya M, Okada T, Oroszlan S (1985) Murine leukemia virus maturation: protease region required for conversion from 'immature' to 'mature' core form and for virus infectivity. *Virology* 145:280–292.
- Klimpel KR, Arora N, Leppla SH (1994). Anthrax toxin lethal factor contains a zinc metalloprotease consensus sequence which is required for lethal toxin activity. *Mol. Microbiol*. 13: 1093-1100.
- Koehne P, Schäper C, Graf K, Kunkel G (1998) Neutral endopeptidase 24.11: its physiologic and possibly pathophysiologic role in inflammation with special effect on respiratory inflammation. *Allergy*. 53:1023-1042.
- 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*. 38:177-182.
- Kurita N, Oarada M, Brummer E (2005) Fungicidal activity of human peripheral blood leukocytes against *Paracoccidioides brasiliensis* yeast cells. *Med Mycol*. 43:417-422.

- Kuručov A, Farkasov E, Varecka L, Simkovic M. (2009) Spontaneous and protein-induced secretion of proteinases from *Saccharomyces cerevisiae*. J Basic Microbiol. 49:545-552.
- Lacaz CS, Porto E, Martins JEC, Heins-Vaccari EM, Melo NT (2002) Tratado de Micologia Mdica Lacaz. 9 edico. So Paulo: Ed. Sarvier.
- Lasdun A & Orłowski M (1989) Inhibition of endopeptidase 24.15 slows the in vivo degradation of luteinizing hormone-releasing hormone. J Pharmacol Exp Ther. 251: 439-447.
- Lew RA, Cowley M, Clarke IJ, Smith AI (1997) Peptidases that degrade gonadotropin-releasing hormone: influence on LH secretion in the ewe. J. Neuroendocrinol. 9: 707-712.
- Lew RA, Boulos E, Stewart KM, Perlmutter PM, Harte MF, Bond S, Gerreyn SB, Aguilar M-I, Smith AI (2000) Bradykinin analogs with b-amino acid substitutions reveal subtle differences in substrate specificity between the endopeptidases EC 3.4.24.15 and EC 3.4.24.16. J Peptide Sci. 6: 440-445.
- Londero A T & Ramos CD (1972) Paracoccidioidomycosis. A clinical and mycologic study of forty-one cases observed in Santa Maria, RS, Brazil. Am J Med. 1972 52:771-775.
- Madigan TM, Martinko JM, Parker J (1997) Biology of Microorganisms. 8th edition. New Jersey: Prendice Hall, Inc.
- Mandal M & Nagaraj R (2002) Antibacterial activities and conformations of synthetic alpha-defensin HNP-1 and analogs with one, two and three disulfide bridges. J Pept Res. 59:95-104.
- Marcondes MF, Torquato RJ, Assis DM, Juliano MA, Hayashi MA, Oliveira V (2009) Mitochondrial intermediate peptidase: Expression in *Escherichia coli* and improvement of its enzymatic activity detection with FRET

- substrates. *Biochem Biophys Res Commun.* 391:123-128
- Marques AF, da Silva MB, Juliano MA, Munhöz JE, Travassos LR, Taborda CP (2008) Additive effect of P10 immunization and chemotherapy in anergic mice challenged intratracheally with virulent yeasts of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Microbes Infect.* 10:1251-1258.
- Massarelli EE, Casatti CA, Kato A, Camargo AC, Bauer JA, Glucksman MJ, Roberts JL, Hirose S, Ferro ES (1999) Differential subcellular distribution of neurolysin (EC 3.4.24.16) and thimet oligopeptidase (EC 3.4.24.15) in the rat brain. *Brain Res.* 851: 261-265.
- Medeiros MA S (1997) Specific fluorogenic substrates for neprilysin (neutral endopeptidase, EC 3.4.24.11) which are highly resistant to serine- and metalloproteases. *Braz J Med Biol Res.* 30: 1157-1162.
- Mendes-Giannini MJ, Taylor ML, Bouchara JB, Burger E, Calich VL, Escalante ED, Hanna SA, Lenzi HL, Machado MP, Miyaji M, Monteiro Da Silva JL, Mota EM, Restrepo A, Restrepo S, Tronchin G, Vincenzi LR, Xidieh CF, Zenteno E (2000) Pathogenesis II: Fungal responses to host response: interaction of host cells with fungi. *Med Mycol* 38:113-123.
- Mendes-Giannini MJ, Andreotti PF, Vincenzi LR, da Silva JL, Lenzi HL, Benard G, Zancopé-Oliveira R, de Matos Guedes HL, Soares CP (2006) Binding of extracellular matrix proteins to *Paracoccidioides brasiliensis*. *Microbes Infect.* 8:1550-1559.
- Mendes RP, Negroni R, Arechavala A (1994) Treatment and control of cure. In *Paracoccidioidomycosis* (Franco, M. et al., eds), pp. 373-392, CRC Press
- Miyoshi SC & Shinoda S (2000) Microbial metalloproteases and pathogenesis. *Microbes Infect.* 2: 91-98.
- Molineaux CJ & Ayala JM (1990) An inhibitor of endopeptidase 24.15 blocks

- the degradation of intraventricularly administered dynorphins. *J. Neurochem.* 55: 611-618
- Monod M. (2008) Secreted Proteases from *Dermatophytes*. *Mycopathologia* 166:285–294
- Monteiro AC, Schmitz V, Svensjo E, Gazzinelli RT, Almeida IC, Todorov A, de Arruda LB, Torrecilhas AC, Pesquero JB, Morrot A, Bouskela E, Bonomo A, Lima AP, Müller-Esterl W, Scharfstein J. (2006) Cooperative activation of TLR2 and bradykinin B2 receptor is required for induction of type 1 immunity in a mouse model of subcutaneous infection by *Trypanosoma cruzi*. *J Immunol.* 177:6325-35.
- Morais FV, Barros TF, Fukada MK, Cisalpino PS, 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.
- Naglik JR, Challacombe SJ, Hube B (2003) *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. *Microbiol Mol Biol Rev.* 67:400-428
- Nascimento FR, Calich VL, Rodríguez D, Russo M (2002) Dual role for nitric oxide in paracoccidioidomycosis: essential for resistance, but overproduction associated with susceptibility. *J Immunol.* 168:4593-4600.
- Nishikaku AS, Ribeiro LC, Molina RF, Albe BP, Cunha Cda S, Burger E (2009) Matrix metalloproteinases with gelatinolytic activity induced by *Paracoccidioides brasiliensis* infection. *Int J Exp Pathol.* 90:527-537.
- Nosanchuk J. D., Steenbergen JN, Shi L, Deepe GS Jr, Casadevall A. (2003). Antibodies to a cell surface histone-like protein protect against *Histoplasma capsulatum*. *J Clin Invest.* 112:1164-1175

- Nunes LR, Costa de Oliveira R, Leite DB, da Silva VS, dos Reis Marques E, da Silva Ferreira ME, Ribeiro DC, de Souza Bernardes LA, Goldman MH, Puccia R, Travassos LR, Batista WL, Nobrega MP, Nobrega FG, Yang DY, de Bragança Pereira CA, Goldman GH (2005) Transcriptome analysis of *Paracoccidioides brasiliensis* cells undergoing mycelium-to-yeast transition. *Eukaryotic Cell* 4: 2115–2128.
- Oefner C, Darcy A, Hennig M, Winkler FK, Dale GE (2000) Structure of human neutral endopeptidase (Neprilysin) complexed with phosphoramidon. *J Mol Biol.* 296:341-349
- Oefner C, Roques BP, Fournie-Zaluski MC, Dale GE (2004) Structural analysis of neprilysin with various specific and potent inhibitors. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 60: 392–396.
- Oliveira V, Campos M, Hemerly JP, Ferro ES, Camargo AC, Juliano MA, Juliano L (2001a) Selective neurotensin-derived internally quenched fluorogenic substrates for neurolysin (EC 3.4.24.16): comparison with thimet oligopeptidase (EC 3.4.24.15) and neprilysin (EC 3.4.24.11). *Anal. Biochem.* 292: 257-265.
- Oliveira V, Campos M, Melo RL, Ferro ES, Camargo AC, Juliano MA, Juliano L (2001b) Substrate specificity characterization of recombinant metallo oligo-peptidases thimet oligopeptidase and neurolysin. *Biochemistry* 40: 4417-4425.
- Parente JA, Costa M, Pereira M, Soares CMA (2005) Transcriptome overview of *Paracoccidioides brasiliensis* proteases *Genet Mol Res.* 4: 358-371.
- Paschoalin T, Carmona AK, Oliveira V, Juliano L, Travassos LR (2005) Characterization of thimet- and neurolysin-like activities in *Escherichia coli* M 3 A peptidases and description of a specific substrate. *Arch Biochem Biophys.* 441:25-34
- Paschoalin T, Carmona AK, Rodrigues EG, Oliveira V, Monteiro HP, Juliano

- MA, Juliano L, Travassos LR (2007) Characterization of thimet oligopeptidase and neurolysin activities in B16F10-Nex2 tumor cells and their involvement in angiogenesis and tumor growth. *Mol Cancer*. 6:44.
- Prado M, Silva MB, Laurenti R, Travassos LR, Taborda CP (2009) Mortality due to systemic mycoses as primary cause of death or in association with AIDS in Brazil: a review from 1996 to 2006. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 104: 513-521.
- Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L (2002) Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res*. 30:e36.
- Pinto AR, Puccia R, Diniz SN, Franco MF, Travassos LR (2000) DNA-based vaccination against murine paracoccidioidomycosis using the gp43 gene from *Paracoccidioides brasiliensis*. *Vaccine*. 18:3050-3058.
- Puccia R, Carmona AK, Gesztesi JL, Juliano L, Travassos LR (1998) Exocellular proteolytic activity of *Paracoccidioides brasiliensis*: cleavage of components associated with the basement membrane. *Med Mycol*. 36:345-348.
- Pozsgay M, Michaud C, Liebman M, Orlowski M (1986) Substrate and inhibitor studies of thermolysin-like neutral metalloendopeptidase from kidney membrane fractions. Comparison with bacterial thermolysin. *Biochemistry*. 25:1292-1299.
- Puccia R, Schenkman S, Gorin PA, Travassos LR (1986) Exocellular components of *Paracoccidioides brasiliensis*: identification of a specific antigen. *Infect Immun*. 53:199-206.
- Puccia R, Travassos LR (1991) 43-kilodalton glycoprotein from *Paracoccidioides brasiliensis*: immunochemical reactions with sera from patients with paracoccidioidomycosis, histoplasmosis, or Jorge Lobo's disease. *J Clin Microbiol*. 29:1610-1615.

- Rao MB, Tanksale AP, Ghatge MS, Deshpande VV (1998) Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and molecular biology reviews*. 62:597-635.
- Rawlings ND & Barrett AJ (1993) Evolutionary families of peptidases. *Biochem J*. 290: 205-118.
- Rawlings ND, Morton FR, Kok CY, Kong J, Barrett AJ (2008) *MEROPS*: the peptidase database. *Nucleic Acids Res* 36: D320-D325
- Ray K, Hines CS, Coll-Rodriguez J, Rodgers DW (2004) Crystal structure of human Thimet oligopeptidase provides insight into substrate recognition, regulation and localization. *J Biol Chem*. 279: 20480-20489
- Rioli V, Kato A, Portaro FC, Cury GK, te Kaat K, Vincent B, Checler F, Camargo AC, Glucksman MJ, Roberts JL, Hirose S, Ferro ES (1998) Neuropeptide specificity and inhibition of recombinant isoforms of the endopeptidase 3.4.24.16 family: Comparison with the related recombinant endopeptidase 3.4.24.15. *Biochem Biophys Res Commun*. 250: 5-11.
- Rocha AA, Malavazi I, Goldman GH, Puccia R (2009) Transcription regulation of the Pbgp43 gene by nitrogen in the human pathogen *Paracoccidioides brasiliensis*. *Fungal Genet Biol*. 46:85-93.
- Rodier MH, el Moudni B, Kauffmann-Lacroix C, Daniault G, Jacquemin JL (1999) A *Candida albicans* metallopeptidase degrades constitutive proteins of extracellular matrix. *FEMS Microbiol Lett*. 177:205-210
- Roques BP, Noble F, Dauge V, Fournié-Zaluski MC, Beaumont A. (1993) Neutral endopeptidase 24.11: structure, inhibition, and experimental and clinical pharmacology. *Pharmacol Rev*. 45: 87-146
- Sahli S, Stump B, Welti T, W. Schweizer B, Diederich F, Blum-Kaelin D, Aebi

- JD, Böhm HJ (2005) A New Class of Inhibitors for the Metalloprotease Nephilysin Based on a Central Imidazole Scaffold. *Helvetica Chimica Acta* 88: 707–730.
- Sambrook J, Fritsh E, Maniatis T (1989) *A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Saric T, Graef C, Goldberg AL (2004) Pathway for degradation of peptides generated by proteasomes. *J Biol Chem.* 279: 46723-46732.
- Scharfstein J, Schmitz V, Svensjö E, Granato A, Monteiro AC (2007) Kininogens Coordinate Adaptive Immunity through the Proteolytic Release of Bradykinin, an Endogenous Danger Signal Driving Dendritic Cell Maturation. *Scand J Immunol.* 66: 128-136.
- Schriefer J A & Molineaux C J (1993) Modulatory effect of endopeptidase inhibitors on bradykinin-induced contraction of rat uterus. *J Pharmacol Exp Ther.* 266: 700-706.
- Shibata Y, Carninci P, Sato K, Hayatsu N, Shiraki T, Ishii Y, Arakawa T, Hara A, Ohsato N, Izawa M, Aizawa K, Itoh M, Shibata K, Shinagawa A, Kawai J, Ota Y, Kikuchi S, Kishimoto N, Muramatsu M, Hayashizaki Y (2001) Removal of polyA tails from full-length cDNA libraries for high-efficiency sequencing. *Biotechniques.* 31:1042, 1044, 1048-9.
- Shikanai-Yasuda MA, Telles-Filho FQ, Mendes RP, Colombo AL, Moretti ML (2006) Consenso em paracoccidiodomicose. *Rev Soc Bras Med Trop* 39:297-310
- Shrimpto CN, Abbenante G, Lew RA, Smith I (2000) Development and characterization of novel potent and stable inhibitors of endopeptidase EC 3.4.24.15. *Biochem J.* 345: 351-356.
- Silva BA, Pinto MR, Soares RM, Barreto-Bergter E, Santos AL (2006) *Pseudallescheria boydii* releases metallopeptidases capable of cleaving several proteinaceous compounds. *Res Microbiol.* 157:425-432.

- Soares AM, Calvi SA, Peraçoli MT, Fernandez AC, Dias LA, Dos Anjos AR (2001) Modulatory effect of prostaglandins on human monocyte activation for killing of high- and low-virulence strains of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Immunology*. 102:480-485.
- Taborda CP, Juliano MA, Puccia R, Franco M, Travassos LR (1998) Mapping of the T-cell epitope in the major 43-kDa glycoprotein of *Paracoccidioides brasiliensis* which induces a Th-1 response protective against fungal infection in BALB/c mice. *Infect Immun*. 66: 786–793.
- Torres FA, Vilaça R, Pepe De Moraes LM, Reis VC, Felipe MS (2008) Expression of a kexin-like gene from the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* in *Saccharomyces cerevisiae*. *Med Mycol*. 46:385-388.
- Tisljar U (1993) Thimet oligopeptidase-a review of a thiol dependent metallo-endopeptidase also known as Pz-peptidase endopeptidase 24.15 and endo-oligopeptidase. *Biol Chem Hoppe-Seyler*. 374: 91-100.
- Turner AJ (2003) Exploring the structure and function of zinc metallopeptidases: old enzymes and new discoveries. *Biochem Soc Trans*. 31:723-727.
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology* 3:34.1-34.11.
- Vincent B, Dive V, Yiotakis A, Smadja C, Maldonado R, Vincent JP, Checler F (1995) Phosphorus-containing peptides as mixed inhibitors of endopeptidase 3.4.24.15 and 3.4.24.16: effect on neurotensin degradation in vitro and in vivo. *Br J Pharmacol*. 115: 1053-1063.
- Vicentini AP, Gesztesi JL, Franco MF, de Souza W, de Moraes JZ, Travassos

- LR, Lopes JD (1994) Binding of *Paracoccidioides brasiliensis* to laminin through surface glycoprotein gp43 leads to enhancement of fungal pathogenesis. *Infect Immun.* 62:1465-1469.
- Withers-Martinez C, Jean L, Blackman MJ (2004) Subtilisin-like proteases of the malaria parasite. *Mol Microbiol.* 53: 55–63.
- Wu TJ, Pierotti AR, Jakubowski M, Sheward WJ, Glucksman MJ, Smith AI, King JC, Fink G, Roberts JL (1997) Endopeptidase EC 3.4.24.15 presence in the rat median eminence and hypophysial portal blood and its modulation of the luteinizing hormone surge. *J Neuroendocrinol.* 9: 813-822.
- Yang XP, Saitoh S, Scicli AG, Mascha E, Orlowski M, Carretero AO (1994) Effects of a metalloendopeptidase-24.15. Inhibitor on renal hemodynamics and function in rats. *Hypertension* 23: I235-I239.
- York IA, Mo AX, Lemerise K, Zeng W, Shen Y, Abraham CR, Saric T, Goldberg AL, Rock KL (2003) The cytosolic endopeptidase, thimet oligopeptidase, destroys antigenic peptides and limits the extent of MHC class I antigen presentation. *Immunity* 18: 429-440.
- 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.* 24:445-454.

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](#)