



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**COORDENAÇÃO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM**  
**PATOLOGIA MOLECULAR**

Identificação de um novo Antígeno de *Paracoccidioides*  
*brasiliensis* (Lumazina Sintase) através da Técnica de IVIAT

CANDIDATA: TEREZA CRISTINA VIEIRA DE REZENDE  
ORIENTADORA: DRA. CÉLIA MARIA DE ALMEIDA SOARES

DISSERTAÇÃO APRESENTADA AO CURSO  
DE MESTRADO EM PATOLOGIA  
MOLECULAR, DA FACULDADE DE  
MEDICINA, DA UNIVERSIDADE DE  
BRASÍLIA COMO REQUISITO PARCIAL À  
OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM  
PATOLOGIA MOLECULAR.

**BRASÍLIA – DF**  
**JUNHO - 2006**

DISSERTAÇÃO DESENVOLVIDA NO LABORATÓRIO DE BIOLOGIA MOLECULAR, DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR, INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS, UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS, COMO REQUISITO PARCIAL PARA A OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM PATOLOGIA MOLECULAR

APOIO FINANCEIRO: CNPQ

## **BANCA EXAMINADORA**

PROFA. DRA. CÉLIA MARIA DE ALMEIDA SOARES, INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS, DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR, INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS, UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS.

PROF. DR. JAIME MARTINS DE SANTANA, INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS, DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR, UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA.

PROF. DR. BERGMANN MORAIS RIBEIRO, INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS, DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR, UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA.

## **SUPLENTE**

PROF. DR. ANTÔNIO R. LIMA CRUZ TEIXEIRA, FACULDADE DE MEDICINA, UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA.

PROFA. DRA. MARISTELA PEREIRA, INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS, DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR, UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS.

Ó Senhor, Deus do nosso antepassado Jacó, bendito sejas para sempre! Tu és grande e poderoso, glorioso, esplêndido e majestoso. Tudo o que existe no céu e na terra pertence a ti; tu és o Rei, o supremo governador de tudo. Toda riqueza e prosperidade vêm de ti; tu governas todas as coisas com teu poder e a tua força e podes tornar grande e forte qualquer pessoa. Agora, Senhor Deus, **te agradeço** e louvo teu nome glorioso. No entanto, **eu não** posso, de fato, te dar nada, pois tudo vem de ti, e **eu** somente devolvo o que já era teu. Tu sabes, ó Senhor, que tanto os nossos antepassados como nós passamos pela vida como estrangeiros, como pessoas que estão de passagem. Os nossos dias são como uma sombra que passa, e não podemos escapar da morte. Ó Senhor, nosso Deus, eu **te dou** toda esta obra para honrar teu nome, mas tudo isto vem de ti, e tudo é teu. Eu sei que tu pões à prova os corações e amas as pessoas corretas. Com honestidade e sinceridade, **eu te dei** de livre vontade tudo isso. Ó Senhor, Deus dos nossos antepassados Abraão, Isaque e Jacó, conserva para sempre no **meu** coração esta disposição e este pensamento e guarda-me fiel a ti. Dá-me desejo de obedecer com todo o coração a todos os teus mandamentos e ordens.

(Oração do Rei Davi em 1<sup>o</sup>Cr.29:11-19)

À minha família que me ajudou em todos os momentos desse trabalho, especialmente ao meu pai, Sebastião V.Rezende, pelo apoio constante e exemplo de luta, perseverança e bondade.

À minha avó Adelina, com quem recebi grande exemplo de determinação, coragem, amor e perseverança, e que está vivendo na eternidade celestial, ao lado de Deus.

Ao meu irmão Neto, que sempre me incentivou e acreditou na minha capacidade. Perdemos você tão cedo, mas, para Deus. Minha eterna saudade.

À minha sobrinha Daniela, pela ajuda constante na realização das figuras e na confecção da capa.

À minha irmã Lúcia, que muito me ajudou e recebeu em sua casa quando foi preciso.

À Sirlene e Paulinho, que são mais amigos que um irmão. Eu não tenho palavras para expressar tudo o que vocês tem feito por mim. Peço a Deus que lhes dêem porção dobrada de tudo.

À todos os pacientes vítimas da PCM, os quais  
contribuíram generosamente fornecendo material  
biológico para realização desse projeto. Um  
agradecimento especial ao paciente J.M.A., vítima fatal  
da paracoccidioidomiose.

## AGRADECIMENTOS

À Deus, que é poderoso para fazer INFINITAMENTE mais além de tudo que pedimos ou pensamos, segundo o Seu poder que opera em nós.

À Profa. Dra Célia Maria de Almeida Soares por ser um exemplo de profissional dedicada e por exigir o melhor de seus alunos. Obrigado pela orientação e pela oportunidade de trabalhar nessa área de pesquisa tão promissora como é a Biologia Molecular.

À Profa. Dra. Maristela Pereira, pelas sugestões e disposição na colaboração deste trabalho.

À Profa. Dra. Rosália, pela amizade e apoio constante.

À diretoria do Hospital de Doenças Tropicais de Goiânia, que contribuíram permitindo a coleta de soros de pacientes com paracoccidioidomicose. Um agradecimento especial à minha irmã Márcia pela ajuda no processo de aprovação para coleta de soros dos pacientes, e também à Dra. Ana Joaquina, pela presteza em ajudar na realização desse trabalho.

À amiga Renata, pela oportunidade de acompanhá-la durante o estágio no Biomol. Obrigada por acreditar em mim e não me deixar desistir no momento mais difícil, quando tudo parecia que era impossível de conseguir (você sabe). Tenho um grande carinho e admiração por você.

Um agradecimento especial ao Alexandre, pela constante e preciosa ajuda durante a toda a realização deste trabalho.

À amiga Sabrina, pela amizade e ajuda principalmente durante a coleta de soros dos pacientes, quando eu estava em BSB. Obrigada pelos conselhos, ajuda nos momentos difíceis e por compartilhar comigo as admirações que temos pelas nossas avós.

À Mônica Oliveira, pela grande bondade, mansidão e valiosa amizade. Sua ajuda incondicional contribuiu para a realização desse trabalho. Obrigado pela segurança que você sempre transmite. Você é muito preciosa.

À Nádyá, pela amizade e precioso auxílio nos momentos difíceis deste trabalho. Sua experiência contribuiu muito para a realização deste trabalho.

À amiga Ernna Hérica, pela amizade e convivência. Minha enorme admiração.

À Bernadete, pelo sorriso fácil, pela bondade e amor que tem no coração.

Ao Clayton pelo incentivo no ingresso desse curso. Obrigado pela amizade, ajuda e momentos de distração.

Ao Luiz Augusto, por compartilhar suas experiências.

Ao Bruno, Yuri e Gabriela pela agradável convivência, confiança e valiosíssima amizade.

Aos amigos doutorandos: Juliana Parente, Mônica Santiago, Wesley e Daniela pela ajuda e pelos momentos de convivência e distração. Um agradecimento em especial ao Tércio, por compartilhar sua experiência. À Milce, pela amizade e compreensão quando foi preciso.

Ao amigo e ex-colega de trabalho Waunner, pela valiosa amizade, conselhos e pelo incentivo na área de biologia molecular. À amiga Edlaine (UCG), pela companhia e conselhos nos momentos de dificuldades. Com certeza vocês dois foram os responsáveis por eu ter escolhido este curso. Minha eterna gratidão.

Às amigas do curso de mestrado: Zilma, Fernanda Castro, Glaciane, Patrícia Zambuzzi e Karinne pela agradável convivência e amizade.

Aos colegas Rodrigo, Ronney, Sara, Patrícia Kott, Lidiane, Aline, Kesser, Cristielly e Elisa, pela convivência.

Às amigas de curso em Brasília: Rosane, Aline, Dulciane e Gina, pela ajuda nos momentos difíceis, conselhos e agradável convivência.

## ÍNDICE

	<u>Página</u>
<b><u>RESUMO</u></b>	<b><u>xviii</u></b>
<b><u>ABSTRACT</u></b>	<b><u>xix</u></b>
<b><u>I. INTRODUÇÃO</u></b>	<b><u>20</u></b>
I.1 – O FUNGO <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	<b><u>20</u></b>
I.1.1 – ASPECTOS GERAIS	<b><u>20</u></b>
I.1.2 – CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA DE <i>P. brasiliensis</i>	<b><u>20</u></b>
I.1.3 – MORFOLOGIA	<b><u>21</u></b>
I.1.4 – HABITAT E CICLO BIOLÓGICO DO FUNGO <i>P. brasiliensis</i>	<b><u>22</u></b>
I.1.5 – A DOENÇA PARACOCCIDIOIDOMICOSE	<b><u>24</u></b>
I.1.5.1 – PATOGENIA	<b><u>24</u></b>
I.1.5.2.– RESPOSTA IMUNE DA PCM	<b><u>25</u></b>
I.1.5.3.– ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA PCM	<b><u>27</u></b>
I.1.6.– ANTÍGENOS DE <i>P.brasiliensis</i>	<b><u>27</u></b>
I.1.7 – DIAGNÓSTICO DA PCM	<b><u>31</u></b>
I.2 – LUMAZINA SINTASE	<b><u>34</u></b>
I.2.1 – CONCEITOS E FUNÇÕES	<b><u>34</u></b>
I.2.2 – CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS	<b><u>35</u></b>
I.2.2.1 – COMPARAÇÃO ENTRE ESTRUTURAS TRIDIMENSIONAIS DE DIFERENTES LUMAZINA SINTASE	<b><u>36</u></b>
I.2.2.2 – ESTABILIZAÇÃO DO PENTÂMERO	<b><u>37</u></b>
I.2.3 – MECANISMO CATALÍTICO	<b><u>38</u></b>
I.2.4 – PROPRIEDADES DA LUMAZINA SINTASE	<b><u>39</u></b>
<b><u>II – TECNOLOGIA DO ANTÍGENO INDUZIDO IN-VIVO (IVIAT)/ JUSTIFICATIVAS</u></b>	<b><u>41</u></b>
<b><u>III – OBJETIVOS</u></b>	<b><u>42</u></b>
<b><u>IV – MATERIAL E MÉTODOS</u></b>	<b><u>43</u></b>
IV.1 – MATERIAL	<b><u>43</u></b>
IV.1.1 – LINHAGENS BACTERIANAS	<b><u>43</u></b>
IV.1.2- VETORES DE CLONAGEM	<b><u>43</u></b>
IV.1.2.1-PLASMÍDEOS	<b><u>43</u></b>
IV.1.3 – MEIOS UTILIZADOS PARA CRESCIMENTO DO FUNGO <i>P. brasiliensis</i>	<b><u>44</u></b>
IV.1.4 – MEIOS UTILIZADOS PARA CRESCIMENTO E TRANSFORMAÇÃO DE BACTÉRIAS	<b><u>44</u></b>
IV.1.5 – MARCADORES DE MASSA MOLECULAR PARA PROTEÍNAS	<b><u>46</u></b>
IV.1.6 – REAGENTES E SOLUÇÕES UTILIZADAS PARA EXTRAÇÃO E ANÁLISE DE PROTEÍNAS ATRAVÉS DE ELETROFORESE BIDIMENSIONAL	<b><u>46</u></b>
IV.1.6.1 – REAGENTES E SOLUÇÕES UTILIZADAS EM ELETROFORESE UNIDIMENSIONAL DE PROTEÍNAS	<b><u>50</u></b>
IV.1.7 – REAGENTES E SOLUÇÕES UTILIZADAS EM REAÇÃO DE WESTERN BLOTTING	<b><u>53</u></b>
IV.1.8 – SOLUÇÕES E TAMPÃO UTILIZADOS NO RASTREAMENTO IMUNOLÓGICO DA BIBLIOTECA DE EXPRESSÃO	<b><u>55</u></b>

<u>IV.1.8.1 – SOLUÇÕES UTILIZADAS NO PREPARO DE CÉLULAS BACTERIANAS COMPETENTES E NO PROTOCOLO DE TRANSFORMAÇÃO</u>	<u>55</u>
<u>IV.1.8.2 – SOLUÇÕES UTILIZADAS NAS ETAPAS DE EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE</u>	<u>57</u>
<u>IV.1.8.3 – SOLUÇÕES, SOLUÇÕES-TAMPÃO E ENZIMAS UTILIZADAS PARA REAÇÕES DE AMPLIFICAÇÃO DE DNA POR PCR</u>	<u>57</u>
<u>IV.1.8.4 – SOLUÇÕES UTILIZADAS PARA ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE</u>	<u>58</u>
<u>IV.1.8.5 – SOLUÇÕES UTILIZADAS NOS PROTOCOLOS DE MATERIAIS LIVRES DE RNASES</u>	<u>59</u>
<u>IV.1.9 – REAGENTES E SOLUÇÕES PARA AS ETAPAS DE LIGAÇÃO DOS INSERTOS AOS VETORES</u>	<u>59</u>
<u>IV.1.10 – ENZIMAS DE RESTRIÇÃO</u>	<u>59</u>
<u>IV.1.11 – MARCADOR DE MASSA MOLECULAR PARA DNA</u>	<u>60</u>
<u>IV.1.12 – MEMBRANAS DE NITROCELULOSE</u>	<u>60</u>
<u>IV.1.13 – KITS DE USO ESPECÍFICO EM BIOLOGIA MOLECULARS</u>	<u>60</u>
<u>IV.2- MÉTODOS</u>	<u>61</u>
<u>IV.2.1 – MICRORGANISMO UTILIZADO E CONDIÇÕES DE CULTIVO</u>	<u>61</u>
<u>IV.2.2 – PREPARO DE EXTRATOS PROTÉICOS</u>	<u>61</u>
<u>IV.2.3 – DOSAGEM DE PROTEÍNAS</u>	<u>61</u>
<u>IV.2.4 – ELETROFORESE DE PROTEÍNAS EM GEL DE POLIACRILAMIDA</u>	<u>62</u>
<u>IV.2.4.1 – ELETROFORESE BIDIMENSIONAL DE PROTEÍNAS</u>	<u>62</u>
<u>IV.2.4.1.1 – PREPARAÇÃO DO GEL PARA ISOTACOFRESE</u>	<u>62</u>
<u>IV.2.4.1.2 – PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS</u>	<u>63</u>
<u>IV.2.4.1.3 – ISOTACOFRESE</u>	<u>63</u>
<u>IV.2.4.2 – ELETROFORESE UNIDIMENSIONAL DE PROTEÍNAS</u>	<u>63</u>
<u>IV.2.4.2.1 – EQUIPAMENTOS</u>	<u>64</u>
<u>IV.2.4.2.2 – CONFECÇÃO DOS GÉIS DE GRADIENTE</u>	<u>64</u>
<u>IV.2.4.2.3 – CORRIDA ELETROFORÉTICA</u>	<u>64</u>
<u>IV.2.4.2.4 – COLORAÇÃO POR AZUL DE COOMASSIE</u>	<u>64</u>
<u>IV.2.5 – ANTICORPO PRIMÁRIO-SOROS DE PACIENTES COM PCM E AMOSTRAS</u>	<u>65</u>
<u>CONTROLE</u>	
<u>IV.2.6 – <i>Western Blotting</i></u>	<u>66</u>
<u>IV.2.6.1 – TRANSFERÊNCIA DE PROTEÍNAS PARA MEMBRANA DE NITROCELULOSE</u>	<u>66</u>
<u>IV.2.6.2 – REAÇÃO COM ANTICORPO PRIMÁRIO</u>	<u>67</u>
<u>IV.2.6.3 – REAÇÃO COM ANTICORPO SECUNDÁRIO E REVELAÇÃO DO COMPLEXO ANTÍGENO-ANTICORPO</u>	<u>67</u>
<u>IV.2.7 – RASTREAMENTO DA BIBLIOTECA DE CDNA DE <i>P.brasiliensis</i> UTILIZANDO-SE A METODOLOGIA DE IVIAT</u>	<u>68</u>
<u>IV.2.7.1 – BIBLIOTECA DE CDNA DE <i>P.brasiliensis</i></u>	<u>68</u>
<u>IV.2.7.2 – RASTREAMENTO IMUNOLÓGICO PRIMÁRIO</u>	<u>68</u>
<u>IV.2.7.2.1 – PREPARO DE CÉLULAS HOSPEDEIRAS</u>	<u>68</u>
<u>IV.2.7.2.2 – PRÉ-ADSORÇÃO DOS BACTERIÓFAGOS E SEMEADURA</u>	<u>69</u>
<u>IV.2.7.2.3 – INDUÇÃO DA SÍNTESE DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES E TRANSFERÊNCIA PARA MEMBRANA</u>	<u>69</u>
<u>IV.2.7.2.4 – BLOQUEIO DOS SÍTIOS ESPECÍFICOS</u>	<u>69</u>
<u>IV.2.7.2.5 – REAÇÃO DAS PROTEÍNAS COM ANTICORPO PRIMÁRIO</u>	<u>70</u>
<u>IV.2.7.2.6 – REAÇÃO DAS PROTEÍNAS COM ANTICORPO SECUNDÁRIO E REVELAÇÃO DO COMPLEXO ANTÍGENO-ANTICORPO</u>	<u>70</u>

<u>IV.2.7.3 – RASTREAMENTO IMUNOLÓGICO SECUNDÁRIO E TERCIÁRIO</u>	<u>70</u>
<u>IV.2.8 – EXCISÃO <i>in-vivo</i> DO FAGOMÍDEO PBLUESCRIPT DO VETOR <math>\lambda</math> ZAP II, USANDO O SISTEMA EXSSIST HELPER PHAGE COM CÉLULAS SOLR</u>	<u>71</u>
<u>IV.2.8.1 – PREPARO DAS CÉLULAS HOSPEDEIRAS</u>	<u>71</u>
<u>IV.2.8.2 – ADSORÇÃO DO FAGO E EXCISÃO DO PLASMÍDEO</u>	<u>71</u>
<u>IV.2.8.3 – PLAQUEAMENTO DOS FAGOS EXCISADOS</u>	<u>71</u>
<u>IV.2.9 – CARACTERIZAÇÃO DO CLONE DE CDNA</u>	<u>72</u>
<u>IV.2.9.1 – SEQUENCIAMENTO</u>	<u>72</u>
<u>IV.2.9.2 – ANÁLISES COMPUTACIONAIS</u>	<u>72</u>
<u>IV.2.9.3 – DESENHO DE OLIGONUCLEOTÍDEOS A PARTIR DA SEQÜÊNCIA DO CLONE DE CDNA <i>Pbls</i></u>	<u>73</u>
<u>IV.2.10 – OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA SEQÜÊNCIA GENÔMICA CODIFICANTE PARA LUMAZINA SINTASE</u>	<u>73</u>
<u>IV.2.10.1 – QUANTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS DE DNA</u>	<u>74</u>
<u>IV.2.10.2 – ANÁLISE DO DNA EM GEL DE AGAROSE</u>	<u>75</u>
<u>IV.2.10.3 – ELUIÇÃO DE FRAGMENTOS DE DNA</u>	<u>75</u>
<u>IV.2.10.4 – LIGAÇÃO DO FRAGMENTO GENÔMICO AMPLIFICADO AO VETOR PGEM-T-EASY</u>	<u>76</u>
<u>IV.2.11 – ANÁLISE DA EXPRESSÃO DOS TRANSCRITOS</u>	<u>76</u>
<u>IV.2.11.1 – EXTRAÇÃO DO RNA TOTAL DE <i>P.brasiliensis</i> NAS FORMAS MICÉLIO E LEVEDURA</u>	<u>76</u>
<u>IV.2.11.1.1 – TRATAMENTO DAS SOLUÇÕES E VIDRARIAS</u>	<u>76</u>
<u>IV.2.11.1.2 – EXTRAÇÃO DE RNA (TRIZOL<sup>®</sup>)</u>	<u>77</u>
<u>IV.2.11.1.3 – SÍNTESE DE CDNA</u>	<u>77</u>
<u>IV.2.11.2 – INFECÇÃO DE PNEUMÓCITOS POR CÉLULAS LEVEDURIFORMES DE <i>P.brasiliensis</i></u>	<u>78</u>
<u>IV.2.11.3 – CONSTRUÇÃO DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS</u>	<u>78</u>
<u>IV.2.11.4 – REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) PARA DETERMINAÇÃO DO CICLO IDEAL PARA ANÁLISE SEMIQUANTITATIVA</u>	<u>79</u>
<u>IV.2.12 – CLONAGEM DO CDNA EM VETOR DE EXPRESSÃO</u>	<u>80</u>
<u>IV.2.12.1 – AMPLIFICAÇÃO DO CDNA ATRAVÉS DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE</u>	<u>80</u>
<u>IV.2.12.2 – PREPARO E ANÁLISE DO INSERTO DE CDNA</u>	<u>80</u>
<u>IV.2.12.3 – LIGAÇÃO DO CDNA AO VETOR DE EXPRESSÃO pGEX-4T-3</u>	<u>80</u>
<u>IV.2.12.4 – PREPARO DE CÉLULAS COMPETENTES PARA TRANSFORMAÇÃO POR CHOQUE TÉRMICO EM <i>E.coli</i> BL21</u>	<u>81</u>
<u>IV.2.12.5 – TRANSFORMAÇÃO DE CÉLULAS <i>E.coli</i> BL21 POR CHOQUE TÉRMICO</u>	<u>81</u>
<u>IV.2.13 – EXPRESSÃO HETERÓLOGA DA PROTEÍNA RECOMBINANTE</u>	<u>82</u>
<u>IV.2.13.1 – INDUÇÃO DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE <i>rPbLS-GST</i></u>	<u>82</u>
<u>IV.2.13.2 – SOLUBILIZAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE</u>	<u>82</u>
<u>IV.2.13.3 – PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE</u>	<u>83</u>
<u>IV.2.13.3.1 – PREPARAÇÃO DA RESINA</u>	<u>83</u>
<u>IV.2.13.3.2 – PURIFICAÇÃO E CLIVAGEM DA PROTEÍNA <i>rPbLS</i></u>	<u>83</u>
<u>IV.2.13.4 – REATIVIDADE IMUNOLÓGICA DA LUMAZINA SINTASE RECOMBINANTE</u>	<u>84</u>
<b><u>V – RESULTADOS</u></b>	<b><u>85</u></b>
<u>V.1 – ESQUEMA EXPERIMENTAL DA TÉCNICA DE IVIAT</u>	<u>85</u>
<u>V.2 – ADSORÇÃO DOS SOROS DE PACIENTES PORTADORES DE PCM COM</u>	<u>86</u>

<u>EXTRATO DE <i>E. COLI</i></u>	
<u>V.3 – ADSORÇÃO DOS SOROS DE PACIENTES PORTADORES DE PCM COM</u>	<u>87</u>
<u>EXTRATO TOTAL DE <i>P. BRASILIENSIS</i></u>	
<u>V.4 – RASTREAMENTO IMUNOLÓGICO DA BIBLIOTECA DE CDNA</u>	<u>88</u>
<u>V.5 – IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE CDNAS DE <i>P. BRASILIENSIS</i> DE</u>	<u>90</u>
<u>PROTEÍNAS IMUNOGÊNICAS</u>	
<u>IV.5.1 – SEQUENCIAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE CLONES DE CDNA</u>	<u>90</u>
<u>V.6 – OBTENÇÃO DE FRAGMENTO GENÔMICO DA LUMAZINA SINTASE VIA PCR</u>	<u>91</u>
<u>V.6.1 – ANÁLISES COMPARATIVAS DOS AMINOÁCIDOS DA PROTEÍNA DE 18,8</u>	<u>93</u>
<u>KDA E PI DE 6.61 COM SEQÜÊNCIAS DEPOSITADAS EM BANCOS DE DADOS</u>	
<u>V.7 – ANÁLISE DE EXPRESSÃO DA LUMAZINA SINTASE POR RT-PCR</u>	<u>96</u>
<u>V.8 – EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE <i>PBLS</i></u>	<u>98</u>
<u>V.8.1 – CLONAGEM NO VETOR DE EXPRESSÃO pGEX-4T-3</u>	<u>98</u>
<u>V.8.2 – ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA <i>RPBLS</i></u>	<u>99</u>
<u>V.8.3 – PURIFICAÇÃO E CLIVAGEM DA PROTEÍNA <i>RPBLS</i></u>	<u>100</u>
<u>V.9 – ANÁLISE DA REATIVIDADE IMUNOLÓGICA DA PROTEÍNA <i>PBLS</i></u>	<u>101</u>
<u>RECOMBINANTE COM SOROS DE PACIENTES PORTADORES DE PCM</u>	
<u>VI – DISCUSSÃO</u>	<u>102</u>
<u>VII – PERSPECTIVAS</u>	<u>109</u>
<u>VIII – BIBLIOGRAFIA</u>	<u>110</u>
<u>IX – ANEXOS</u>	<u>137</u>

## ÍNDICE DE FIGURAS

	<u>Página</u>
<u>FIGURA A – Reação da biossíntese da riboflavina</u>	<u>35</u>
<u>FIGURA B- Mecanismo hipotético da reação catalisada pela lumazina sintase</u>	<u>39</u>
<u>FIGURA 1 – <i>In-vivo</i> Induced Antigen Technology (IVIAT)</u>	<u>85</u>
<u>FIGURA 2 – Análise de Proteínas de Extrato de <i>E.coli</i> através de eletroforese Unidimensional e de <i>Western Blotting</i></u>	<u>86</u>
<u>FIGURA 3 – Análise de Proteínas de Extrato de <i>P.Brasiliensis</i> através de Eletroforese Unidimensional e de <i>Western Blotting</i></u>	<u>87</u>
<u>FIGURA 4 – Etapas do Rastreamento Imunológico da Biblioteca de cDNA Utilizando-se a Tecnologia do IVIAT.</u>	<u>89</u>
<u>FIGURA 5 - Seqüência de Nucleotídeos do cDNA de <i>P.Brasiliensis</i> de 627 Pb, Codificante para LS</u>	<u>90</u>
<u>FIGURA 6 - Produto de PCR obtido por amplificação do DNA genômico</u>	<u>91</u>
<u>FIGURA 7 - Seqüência de nucleotídeos do fragmento genômico, de cDNA e da seqüência de aminoácidos da <i>PbLS</i></u>	<u>92</u>
<u>FIGURA 8 - Alinhamento entre a seqüência de aminoácidos do cDNA codificante para LS de <i>P.brasiliensis</i> (<i>PbIs</i>) com LS de outros organismos eucariotos</u>	<u>95</u>
<u>FIGURA 9 - Validação dos resultados IVIAT por RT-PCR semiquantitativa</u>	<u>97</u>
<u>FIGURA 10 - Análise eletroforética da transformação do plasmídeo pGEX-4T-3-Is em <i>E.coli</i> BL21</u>	<u>98</u>
<u>FIGURA 11 - Análise em SDS-PAGE da Expressão da <i>rPbLS</i></u>	<u>99</u>
<u>FIGURA 12 - Análise em SDS-PAGE da proteína recombinante <i>rPbLS</i></u>	<u>100</u>
<u>FIGURA 13 - <i>Western blotting</i> da proteína <i>rPbLS</i> com soros de pacientes com <u>PCM</u></u>	<u>101</u>

## ÍNDICE DE QUADROS

	<b><u>Página</u></b>
<u>TABELA 1 - Oligonucleotídeos utilizados para amplificação do cDNA</u>	<b><u>73</u></b>
<u>TABELA 2 - Oligonucleotídeos utilizados para reação de RT-PCR semiquantitativo</u>	<b><u>78</u></b>
<u>TABELA 3 - Componentes e volumes usados para purificação da proteína</u>	<b><u>84</u></b>
<u>TABELA 4 – Comparação entre a seqüência deduzida de aminoácidos de PbLS com outras depositadas em banco de dados</u>	<b><u>93</u></b>

## ÍNDICE DE ANEXOS

	<b><u>Página</u></b>
<u>ANEXO 1 - Excisão do vetor <math>\lambda</math> ZAP II e construção do plasmídeo pBluescript SK</u>	<b><u>137</u></b>
<u>ANEXO 2 - Seqüência de nucleotídeos do vetor plasmidial pBluescript SK</u>	<b><u>137</u></b>
<u>ANEXO 3 - Vetor pGEM – T Easy</u>	<b><u>138</u></b>
<u>ANEXO 4 - Seqüência nucleotídica do vetor pGEM – T Easy</u>	<b><u>138</u></b>

## ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

%	Porcentagem
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µm	Micrômetro
ATP	Adenosina 5'-trifosfato
ARAPD	5-amino-6-(D-ribitilamino)-2,4(1H, 3H)-pirimidinediona
BCIP	Bromocloroindol fosfato
BSA	Albumina sérica bovina
cAMP	Adenosina monofosfato cíclico
cDNA	Ácido dextrorribonucléico complementar
CaCl <sub>2</sub>	Cloreto de Cálcio
D.O	Densidade óptica
DEPC	Dietilpirocarbonato
DMRL	6,7-dimetil-8-ribitilumazina
DNA	Ácido dextrorribonucléico
DNAse	Dextrorribonuclease
dNTP	Dextrorribonucleotídeo
dTTP	Desoxitimina trifosfato
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EST	“Expression sequence tags” – etiquetas de seqüências expressas
FMN	Flavina mononucleotídeo
FAD	Flavina adenina dinucleotídeo
FPLC	Cromatografia líquida de realização rápida (Fast protein liquid chromatography)
FBA	Frutose bifosfato aldolase
FMD	Formamidase
g	Grama
g	Gravidade
Gp	Glicoproteína
GST	Glutathione S-transferase
GTP	Guanosina 5'-trifosfato
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

HCl	Ácido Clorídrico
HSP	“Heat shock protein”- Proteína de choque térmico
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	Ácido fosfórico
IPTG	Isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo
IFN-γ	Interferon γ
IL	Interleucina
IVIAT	<i>In-vivo</i> Induced Antigen Technology – Tecnologia da Antígeno inducido <i>in-vivo</i>
Kb	Kilobases
KCl	Cloreto de Potássio
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Fosfato Monopotássico
kDa	Kilodalton
L	Litros
LCR	Líquido céfalo-raquidiano
LS	Lumazina sintase
M	Molar
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MgSO <sub>4</sub>	Sulfato de magnésio
mA	Miliampére
mg	Miligrama
mL	Mililitros
mm	Milímetros
mM	Milimolar
Mpb	Mega pares de bases
NaCl	Cloreto de Sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Fosfato dissódico
NBT	Nitroblue tetrazoluim
NP-40	Nonidet P-40
ng	Nanograma
nm	Nanômetros
°C	Graus centígrados
ODC	Ornitina descarboxilase

ORF	“Open Reading Frame” – Quadro de leitura aberta
pb	pares de bases
p.f.u.	Unidade formadora de placa
pH	Potencial hidrogeniônico
PBS	Solução de Tampão Fosfato
PCR	“Polimerase Chain Reaction” – Reação em cadeia da polimerase
PCM	Paracoccidioidomicose
PCMB	4- Chloromercuribenzoic acid
PMSF	Phenylmethylsulfonyl fluoride
PFGE	Eletroforese em gel de campo alternado
Pro	Prolina
p/v	Peso por Volume
q.s.p	Quantidade suficiente para
RAPD	“Random amplified polymorphic DNA” - Polimorfismo de DNA amplificado randomicamente
RNAse	Ribonuclease
RS	Riboflavina sintase
rRNA	Ácido ribonucléico ribossômico
RT	“Reverse transcription” – Transcrição reversa
rpm	Rotações por minuto
RT-PCR	“Polimerase Chain Reaction” - Reação da transcriptase reversa e PCR
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SFB	Soro Fetal de Bovino
TCA	Ácido Tricloroacético
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano.
Ta-1	Células T auxiliares tipo 1
Ta-2	Células T auxiliares tipo 2
TB	“Transformation Buffer” – Tampão de transformação
TEMED	N, N, N', N'-Tetra metiletlenodiamina
TGF-β1	Fator de crescimento transformador β1
TLCK	Tosyl Lysyl Chloromethyl Ketone - Tosil Lisil Clorometil Cetona

TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral $\alpha$
TPI	Triose fosfato isomerase
UI	Unidade Internacional
UV	Ultravioleta
V	Volts
v	Volume
XGAL	5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosídeo
v/v	Volume por Volume

## RESUMO

*Paracoccidioides brasiliensis* é um fungo termodimórfico agente causador da paracoccidioidomicose (PCM), uma micose que afeta 10 milhões de indivíduos na América Latina. A infecção é adquirida pela inalação de propágulos aéreos produzidos pela forma miceliana do fungo, os quais se convertem à morfologia leveduriforme na temperatura do hospedeiro. *P. brasiliensis* expressa *in-vivo* importantes genes que podem contribuir para a patogênese do fungo. Nós utilizamos a tecnologia do antígeno induzido *in-vivo* (IVIAT) para identificar novos genes de *P. brasiliensis* que podem ser expressos durante o processo de infecção. A técnica IVIAT é uma modificação do rastreamento imunológico que evita o uso de modelo animal e permite a identificação de antígenos expressos em vários estágios da infecção. Nós utilizamos a estratégia de IVIAT para identificar genes possivelmente induzidos *in-vivo*. Usando esta técnica nós selecionamos proteínas imunogênicas que poderiam ser expressas especificamente durante a infecção e não durante o crescimento sob condições padrões do laboratório. O soro de onze pacientes com PCM obtidos em Goiânia, foram combinados e, em seguida, adsorvidos com extratos de células totais e lisados de células leveduriformes cultivadas *in-vitro*. Esses soros foram utilizados para rastrear proteínas de uma biblioteca de cDNA da fase leveduriforme de *P. brasiliensis* construída no vetor  $\lambda$ ZAPII. Clones foram obtidos e caracterizados. O cDNA que codifica para uma proteína de 174 resíduos de aminoácidos foi caracterizado como lumazina sintase (*PbLS*) de *P. brasiliensis* (GenBank: DQ081183). Análises comparativas entre a *PbLS* e outros organismos foram feitas. Essa proteína catalisa o penúltimo passo na síntese de riboflavina em plantas, fungos e bactérias. Para produzir anticorpos contra a *PbLS* recombinante, uma construção no pGEX-4T-3-LS foi realizada e introduzida dentro das células de *Escherichia coli* e a expressão e purificação da proteína recombinante foi obtida. A análise da reatividade imunológica da proteína recombinante mostrou que esta é reconhecida por soros de pacientes com PCM e não é reativa com soros de indivíduos controle. Para analisarmos a expressão do gene *PbLS* nas duas formas de *P. brasiliensis* utilizamos a técnica RT-PCR semiquantitativo. Os transcritos para LS foram preferencialmente expressos na forma leveduriforme do fungo. Pneumócitos humanos infectados com *P. brasiliensis* foram utilizados para investigar a expressão dos transcritos num modelo de infecção. O gene *PbLS* foi detectado em células de pneumócitos humanos infectados com células leveduriformes. A LS representa um alvo atrativo para o desenvolvimento de drogas contra patógenos, visto que, bactérias, fungos e plantas são dependentes da síntese endógena da vitamina B2. Estudos mostram que a LS recombinante são fortemente imunogênicos e elucidam resposta immune celular e humoral, conferindo proteção em camundongos. Esses dados são muito interessantes e despertam o interesse em se estudar essa proteína do fungo *P. brasiliensis*.

**Palavras chave:** *Paracoccidioides brasiliensis*, virulência, IVIAT, expressão *in-vivo*, lumazina sintase, patogênese.

## ABSTRACT

*Paracoccidioides brasiliensis* is a thermally dimorphic fungus causing paracoccidioidomycosis (PCM), a mycosis that affects 10 million individuals in Latin America. The infection is acquired by inhaling airborne propagules produced by the fungal mycelium which transforms into the pathogenic yeast form, when at the body temperature. *P. brasiliensis* expresses *in vivo* many important virulence genes that may contribute to the overall fungus pathogenesis. We utilized *in vivo*-induced antigen technology (IVIAT) to identify new *P. brasiliensis* antigens that could be expressed during the infection process. IVIAT is a modified immunoscreening that circumvents the need for animal models and permits identification of antigens expressed at various stages of infection. We used the IVIAT strategy to identify *P. brasiliensis* genes putatively induced *in vivo*. Using this technique we selected immunogenic proteins which should be expressed specifically during human infection and not during growth under standard laboratory conditions. Sera from eleven patients with PCM infection obtained in Goiânia were pooled and after that were adsorbed with whole cells and lysates of the *in vitro* cultured yeast phase. These sera were probed to induced proteins from a cDNA expression library of the yeast phase of *P. brasiliensis* constructed in  $\lambda$ ZAPII. Clones were obtained and characterized. Of special note is a cDNA (*Pbls*) encoding a 174 amino acid residues protein characterized as lumazine synthase (*PbLS*) homologue of *P. brasiliensis* (GenBank: DQ081183). This protein catalyzes the penultimate step in the synthesis of riboflavin in plants, fungi, and microorganisms. In order to produce antibodies against the recombinant *PbLS* the expression construct pGEX-4T-3-LS was introduced into *Escherichia coli* cells and the expression and purification of the recombinant protein was obtained. The analysis of the immunological reactivity of the recombinant protein showed that this is recognized by sera of patients with PCM and is not reactive with sera of control individuals. To analyze the expression of the *Pbls* gene in the two forms of *P. brasiliensis* we use semiquantitative RT-PCR. The transcripts for LS had been preferentially expressed in the yeast form of fungus. Human pneumocytes infected with *P. brasiliensis* had been used to investigate the expression of transcripts in an infection model. The *Pbls* gene was detected in yeast cells infecting human pneumocytes. The lumazine synthase represents an attractive targets for the development of drugs against pathogens, since bacteria, fungus and plants are dependent of the endogenous synthesis of the B2 vitamin. Studies shown that recombinant lumazine synthase is strongly immunogenic and elicits both humoral and cellular immune responses conferring protection in mice. Those data make very interesting the study of this protein in *P. brasiliensis*.

**Words key:** *Paracoccidioides brasiliensis*, virulence, IVIAT, expression *in-vivo*, lumazine synthase, pathogenesis

# I - INTRODUÇÃO

## I.1-*Paracoccidioides brasiliensis*

### I.1.1-ASPECTOS GERAIS

O fungo *Paracoccidioides brasiliensis*, primeiramente descrito por **ADOLPHO LUTZ** em **1908**, é o agente etiológico da Paracoccidioidomicose (PCM), uma micose sistêmica (**FRANCO, 1987, RESTREPO et al., 1990**), com áreas endêmicas no Brasil, Colômbia e Venezuela, sendo as regiões Sudeste e Centro-Oeste as áreas de maior frequência da micose no Brasil (**LACAZ et al., 1982, CAMARGO e FRANCO, 2000**). *P. brasiliensis* é um fungo termodimórfico que cresce como levedura nos tecidos infectados ou quando cultivado *in vitro* nas temperaturas de 35°C a 37°C. A forma miceliana é encontrada em condições saprofíticas no meio ambiente, ou quando cultivada em temperaturas de 18°C a 23°C (**BAGAGLI et al., 2006**). Micélio e conídios provavelmente crescem saprofitamente no solo, na água e em plantas, à temperatura ambiente, e são considerados como as formas infectivas do fungo (**RESTREPO, 1985; RESTREPO et al., 2001**).

### I.1.2-CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA

Inicialmente, o fungo *P. brasiliensis* foi denominado *Zymonema brasiliensis* por **SPLENDRE (1912)**. A comparação deste microrganismo e de *Coccidioides immitis*, levou **ALMEIDA (1930)** a classificar o fungo no gênero *Paracoccidioides* e na espécie *brasiliensis*. **LACAZ et al. (1991)** classificaram o fungo como pertencente ao reino: fungi; divisão: eumycota; subdivisão: deuteromycotina; classe: hyphomycetes; ordem: moniliales; família: moniliaceae; gênero: *Paracoccidioides*; espécie: *brasiliensis*. Posteriormente, **MARGULIS e SCHARWARTZ (1998)** incluíram *P. brasiliensis* no grupo ascomycota.

Avanços nas técnicas moleculares têm permitido a caracterização genômica, mapeamento genético e biotipagem epidemiológica de espécies de microrganismos, para os quais as ferramentas genéticas não são ainda disponíveis (**SAN-BLAS et al., 2002**), com base, principalmente, no RNA ribossomal (rRNA) e seu correspondente DNA ribossomal (rDNA). O locus menor do rDNA 5,8S é muito conservado e pode fornecer informações evolucionárias

entre organismos distantemente relacionados, enquanto que o locus maior do rDNA é mais heterogêneo e apresenta duas subunidades, a subunidade grande (LSU), e a subunidade pequena (SSU) que podem fornecer diferenças dentro de uma mesma espécie (JAMES *et al.*, 1996).

LECLER *et al.* (1994) e BIALEK *et al.* (2000) propuseram a classificação do *P. brasiliensis* como pertencente ao filo Ascomycota, a ordem Onygenales e a família Onygenaceae, junto com os as formas teleomórficas de *Blastomyces dermatitidis*, *Histoplasma capsulatum* e *Histoplasma capsulatum var. duboissi*, na qual foram comparadas seqüências de rDNA da subunidade ribossomal maior entre fungos dermatófitos e dimórficos. Posteriormente, esses estudos foram confirmados ao se verificar que o gene codificante para a ornitina descarboxilase (ODC) do *P. brasiliensis* o posiciona próximo ao de *Coccidioides immitis*, um membro da ordem Onygenales (BOWMAN *et al.*, 1996).

A atual classificação taxonômica do *P. brasiliensis* é: reino Fungi, filo Ascomycota, subdivisão Euascomycotina, classe Plectomyceto, subclasse Euascomycetidae, ordem Onygenales, família Onygenaceae, subfamília Onygenaceae Anamórficos, gênero *Paracoccidioides*, espécie única *brasiliensis* (SAN BLAS *et al.*, 2002).

### I.1.3-MORFOLOGIA

O fungo cresce lentamente como micélio em temperaturas que variam de 22 a 27°C (LACAZ, 1994). Macroscopicamente, as colônias de micélio são pequenas, duras, irregulares, de coloração creme, freqüentemente aderida ao agar e com micélio aéreo curto (BRUMMER *et al.*, 1993). Quando examinadas ao microscópio óptico, são observadas hifas finas e septadas, com clamidósporos terminais ou intercalares (FRANCO *et al.*, 1989). Ao microscópio eletrônico, as hifas apresentam um envoltório celular constituído de três camadas: uma interna, a membrana plasmática; uma camada mais espessa, a parede celular e uma externa de aspecto finamente granular, a membrana basal (MINGUETTI *et al.*, 1985). As hifas são multinucleadas, com fina cromatina dispersa no nucleoplasma. No citoplasma podem ser vistos ribossomos, mitocôndrias esféricas ou alongadas, retículo endoplasmático e vacúolos (SAMSONFF *et al.*, 1991).

As colônias leveduriformes apresentam, macroscopicamente, coloração creme, de aspecto cerebriforme, não aderidas ao meio e com crescimento evidente após sete dias de incubação a 37°C (CARBONELL e RODRIGUES, 1965). As células leveduriformes

apresentam morfologia oval ou alongada, em diferentes tamanhos (4 a 30  $\mu\text{m}$ ), contendo múltiplos núcleos (2 a 5 por células), nucléolo e cromatina evidentes (LACAZ, 1994). O citoplasma contém escasso retículo endoplasmático, gotas de lipídios proeminentes, ribossomos e mitocôndrias, que são reduzidas com a idade e pela vacuolização citoplasmática (BRUMMER *et al.*, 1993). Sua parede celular é birrefringente com blastoconídios simples ou múltiplos gerados por germinação, conferindo ao fungo a característica primordial em sua identificação, o aspecto de “roda de leme” (FURTADO *et al.*, 1967; ANGULO-ORTEGA e POLLAK, 1971; LACAZ *et al.*, 1991).

O aspecto morfológico do fungo também foi descrito nos tecidos do hospedeiro, onde foi possível observar-se que durante a infecção ativa, as lesões contêm um elevado número de leveduras, sendo que destas, 24 – 33% apresentam múltiplos brotamentos. A maioria das células leveduriformes que são coletadas de tecidos calcificados, observados em pacientes que desenvolveram infecção crônica, apresentam parede celular lesada, contornos irregulares, brotamentos escassos e células menores que as usuais (RESTREPO, 2000).

Importantes diferenças nos aspectos ultraestruturais das duas formas foram reveladas por MINGUETTI *et al.* (1985) através de análises por microscopia eletrônica. A membrana plasmática é de fácil identificação na fase leveduriforme, enquanto que a membrana basal estrutura facilmente identificável na fase filamentosa, aparentemente não ocorre. A parede celular é pouco eletrodensa e não apresenta aspecto laminado tal como observado na fase filamentosa. Alguns isolados quando cultivados sob condições nutricionais adversas dão origem a vários tipos de propágulos, como conídios e clamidósporos (BUSTAMANTE–SIMON *et al.*, 1985; RESTREPO, 1988).

#### I.1.4 - HABITAT E CICLO BIOLÓGICO DO FUNGO *P. brasiliensis*

O local exato e as condições onde o fungo ocorre na natureza ainda são indeterminados (MONTENEGRO *et alii.*, 1996; RESTREPO *et al.*, 2001; BAGAGLI *et al.*, 2006). A determinação do habitat para alguns agentes infecciosos facilita a compreensão de sua patofisiologia. Vários esforços têm sido feito para tentar se elucidar o habitat do *P. brasiliensis*, porém o que se sabe é o fungo é capaz de sobreviver no solo (MEDINA e BODZIAK, 1949) e em vegetais (LACAZ, 1949). A frequência de infecção por *P. brasiliensis* em tatus *Dasypus novemcinctus* é alta e o fungo já foi isolado em 75-100% dos

animais capturados nas áreas endêmicas de PCM (**BAGAGLI et al., 1998, 2003; RESTREPO et al., 2000**). Estudos ecológicos e epidemiológicos têm mostrado que a PCM tem uma distribuição ampla. Diversos autores têm relatado as características do microambiente onde a PCM é endêmica o que inclui temperaturas entre 17 e 24°C, ventos, precipitação média anual de 500 a 2500 mm; proximidades de cursos d'água, lodo fértil e solos ácidos (**RESTREPO et al., 1985; MONTENEGRO et al., 1994; CHIRIF et al., 1965; NEGRONI et al., 1966; BOPP et al., 1967; BORELLI et al., 1972; MARQUES et al., 1983**). O fungo já foi isolado do solo no Brasil (**SHOME e BATISTA, 1963**), na Argentina (**NEGRONI, 1966**) e na Venezuela (**ALBORNOZ, 1971**); também foi isolado de ração de cães, provavelmente contaminada com solo (**FERREIRA et al., 1990**); do trato intestinal de morcego, *Artibeus lituratus* (**GROSE e TRAMSITT, 1965**); de fezes de Pinguim, *Pygoscelis adeliae* (**GEZUELE, 1989**); de macaco, *Saimir sciureus* (**JOHNSON e LANG, 1977**).

O índice de exposição ao fungo é maior em locais que já sofreram modificações ambientais (**MANGIATERRA et al., 1999**), que possuem altitude elevada, clima frio, chuvas abundantes, vegetação rica e economia baseada principalmente na agricultura e pecuária (**PEDROSA, 1976; BLOTTA et al., 1999**). Os locais que reúnem todas estas características são chamados de 'reservaria', ou seja, são áreas que apresentam todos os fatores que contribuem para o desenvolvimento do fungo em seu habitat natural (**BORELLI, 1964; RESTREPO-MORENO, 1994**).

Segundo **FORJAZ (1989)**, as regiões tropicais do Brasil, no verão, possuem um clima quente, com chuvas abundantes e solos ricos em materiais orgânicos que fornecem nutrientes para o fungo se desenvolver na forma leveduriforme. Com a chegada do outono, a temperatura cai e os nutrientes do solo ficam escassos, fatores que favorecem a transformação das leveduras em hifas. Durante os meses de inverno, a umidade é restrita e faltam nutrientes apropriados para o desenvolvimento do fungo, forçando a produção de conídios e blastoconídios. Na primavera, as chuvas recomeçam e o solo é preparado para agricultura. Os conídios são liberados e formam aerossóis que são facilmente inalados pelo homem. A inalação de propágulos pelo homem encerra o ciclo de vida saprófita do fungo que após instalar-se nos pulmões do hospedeiro, converte-se para a forma leveduriforme, iniciando a infecção (**FRANCO, 1987**). As formas micelianas que permanecem no solo continuam o ciclo de vida, transformam-se novamente em leveduras devido ao clima quente do verão, época com chuvas abundantes e solo ricos em nutrientes (**FORJAZ et al., 1992**).

**CONTI DIAZ e RILLA (1989)** sugerem que a sobrevivência do fungo na natureza dependa da presença de espécies heterotérmicas servindo como reservatório do fungo até que o ciclo biológico se complete. Possivelmente, pássaros se alimentariam de reservatórios infectados com conídios e/ou propágulos do fungo, sendo que, a temperatura corporal manteria a forma leveduriforme de *P. brasiliensis*. O fungo retornaria a natureza por regurgitação e fezes desses pássaros que seriam depositadas em árvores, ninhos e água, onde as leveduras se diferenciariam na forma miceliana, esporulativa. A presença do homem e de outros animais manteria o ciclo biológico do fungo. **BAGAGLI *et al.* (1998; 2003; 2006)** demonstraram que tatus podem apresentar infecção natural, sendo, portanto, hospedeiros silvestres do fungo e não transmissores da doença para o homem (**RIVITTI e AOKI, 1999**).

## **I.1.5 – A DOENÇA PARACOCCIDIOIDOMICOSE**

### **I. 1.5.1.- PATOGENIA**

A patogenia do fungo *P. brasiliensis* ainda não foi precisamente definida. O fungo infecta hospedeiros humanos usualmente através das vias respiratórias, por inalação de propágulos do micélio, como artroconídeos (**BAGAGLI *et al.*, 2006**). A primeira interação parasita-hospedeiro ocorre nos alvéolos pulmonares. A capacidade invasiva do fungo depende da sua capacidade de adaptar às mudanças de temperatura e se defender do ataque das células de defesa do hospedeiro (**CAMARGO *et al.*, 2000**). Quando o parasita atinge o organismo do hospedeiro ele pode ser imediatamente destruído ou converter-se em leveduras nos pulmões e disseminar-se através das vias hematogênica e linfática (**SAN-BLAS, 1993; CAMARGO *et al.*, 2000**). A possibilidade de infecção inter-humana parece não ocorrer (**BARBOSA e DAHER 1991**). Fatores relacionados à resistência ou susceptibilidade em humanos ainda são desconhecidos (**DINIZ *et al.*, 2004**).

A PCM está dividida em três grupos principais: a infecção assintomática observada em indivíduos saudáveis que vivem em áreas endêmicas e apresentam teste de hipersensibilidade tardio, e duas formas clínicas da doença, denominadas forma aguda ou subaguda (tipo juvenil), e crônica (tipo adulto), que pode ser uni ou multifocal dependendo da evolução e da localização das lesões (**MAMONI *et al.*, 2005**).

A forma juvenil (aguda ou subaguda) representa 3 a 5% dos casos descritos da doença, sendo a maioria dos pacientes constituídos por crianças ou adultos jovens (**BRUMMER *et al.*, 1993**). A doença caracteriza-se por um desenvolvimento rápido e por marcante envolvimento de órgãos como baço, fígado, gânglios linfáticos e medula óssea. A função imune mediada por células é gravemente deprimida nesses pacientes, provavelmente devido ao comprometimento medular (**LONDERO e MELO 1983; BRUMMER *et al.*, 1993**).

A forma crônica ou adulta ocorre em mais de 90% dos casos, acometendo, na maioria dos casos, homens adultos. Ao contrário da forma aguda, o quadro clínico apresenta um desenvolvimento lento com comprometimento pulmonar evidente (**BRUMMER *et al.*, 1993**). Em aproximadamente 25% dos casos, o pulmão é o único órgão afetado (forma unifocal). Muitas vezes, com o desenvolvimento silencioso da doença, o paciente busca auxílio médico somente quando apresenta sintomas de comprometimento extrapulmonar. Nestes casos se constatam o envolvimento de órgãos como pele, mucosas das vias aéreas superiores, tubo digestivo e linfonodos (forma multifocal) (**FRANCO *et al.*, 1989; LONDERO, 1986; RESTREPO *et al.*, 1976**). As lesões pulmonares são nodulares, infiltrativas ou fibróticas; verifica-se comprometimento bilateral e localização das lesões nas porções central e baixa do pulmão, com o ápice livre da doença (**CAMPOS *et al.*, 1991; LONDERO, 1996; LONDERO e RAMOS, 1990; PATIÑO *et al.*, 1987; RESTREPO *et al.*, 1976**). Os sintomas são heterogêneos e frequentemente, ocorrem lesões nas mucosas orais e nasais, pele, gânglios linfáticos e adrenais. Menos frequentemente, pode ocorrer envolvimento ocular, comprometimento dos sistemas nervoso e vascular, destruição óssea. O envolvimento da glândula tireóide também é raro (**ÂNGULO-ORTEGA & POLLAK, 1971; FRANCO *et al.*, 1989; LONDERO *et al.*, 1990; RESTREPO *et al.*, 1978; TENDRICH *et al.*, 1991**).

### I. 1.5.2 - RESPOSTA IMUNE NA PCM

Diversos estudos têm mostrado que formas benignas da PCM estão associadas com a produção de baixos títulos de anticorpos e reação positiva para teste de hipersensibilidade tardia. Nas formas severas disseminadas observam-se altos títulos de anticorpos e anergia (ausência de reação) para o teste de hipersensibilidade tardio

(**BERNARD *et al.*, 2001**). Embora os anticorpos possam aumentar a opzonização do fungo e a atividade fagocitária das células, os imunocomplexos formados e os anticorpos provocam uma diminuição da resposta imune celular específica, a qual constitui a principal linha de defesa contra PCM (**BRUMMER *et al.*, 1993**; **CAMARGO *et al.*, 2000**).

Tem-se mostrado que a susceptibilidade à doença está relacionada com a ativação das células T auxiliares tipo 2 (Ta-2), enquanto que a resistência está relacionada com a predominância de resposta T auxiliares tipo 1 (Ta-1) (**MURPHY *et al.*, 1998**) com formação de granulomas e produção de óxido nítrico (**CALICH *et al.*, 1998**). Em análises comparativas do perfil de citocinas entre pacientes com forma branda da PCM, verifica-se que, nos pacientes com disseminação da doença há produção de altos títulos de citocinas Ta-2 (interleucina 4 [IL-4], IL-5 e IL-10, fator de crescimento transformador  $\beta$  1 [TGF- $\beta$ 1], anticorpos (Imunoglobulinas E [IgE], IgG4 e IgA), além de eosinofilia e deficiência de interferon  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ). Ao contrário, indivíduos com infecção assintomática, que vivem nas áreas endêmicas, apresentam um padrão de citocinas Ta-1 com produção de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  e níveis basais de IL-4, IL-5 e IL-10 (**OLIVEIRA *et al.*, 2002**). O desenvolvimento da resposta se Ta-1 ou Ta-2, irá depender das citocinas presentes no microambiente, e os fatores interferentes são dose do antígeno, células apresentadoras de antígeno, moléculas co-estimulatórias, virulência do patógeno, alcoolismo, desnutrição e fumantes de tabaco (**FERREIRA *et al.*, 2004**; **MARTINEZ *et al.*, 1992**; **DOS SANTOS *et al.*, 2003**).

Os macrófagos também exercem papel fundamental na resistência à PCM. Quando ativados pela citocina IFN- $\gamma$  os macrófagos produzem óxido nítrico impedindo que os conídios fagocitados transformem-se em levedura (**BOCCA *et al.*, 1998**; **GONZÁLES *et al.*, 2000**). Além disso, o IFN- $\gamma$  também é capaz de estimular os macrófagos a secretarem TNF- $\alpha$  que é necessário para a persistência de granulomas formados e controle da infecção (**SOUTO *et al.*, 2000**). Recentes estudos indicam que o IFN- $\gamma$  e o TNF- $\alpha$  são negativamente regulados pela prostaglandina que é secretada pelas células em resposta ao patógeno, podendo estar envolvida na supressão das células T (**SOARES *et al.*, 2001**).

Alguns modelos animais têm sido utilizados na tentativa de se entender a resposta imune na PCM. **CANO *et al.* (1995)** desenvolveram um modelo de PCM em murinos e mostraram uma associação entre a resposta Ta-1 com ativação de macrófagos e ausência de disseminação da doença.

**MAMONI *et al.* (2005)** estudaram e compararam o perfil de citocinas entre indivíduos com a infecção assintomática e indivíduos com PCM nas formas adulta e juvenil.

Nesse estudo, verificaram que indivíduos com infecção assintomática tinham alta expressão de citocinas Ta-1, enquanto que os pacientes com a forma juvenil mostraram altos níveis de expressão de citocinas Ta-2. Na forma adulta um perfil de citocinas Ta-1 e Ta-2 foi encontrado, o que confirma o padrão heterogêneo da doença.

### I. 1.5.3 - ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA PCM

A PCM apresenta distribuição geográfica restrita a países da América Latina, onde um grande número de habitantes é acometido (LACAZ *et al.*, 1991; BRUMMER *et al.*, 1993). A PCM é endêmica do México à Argentina, com um grande número de ocorrências no Brasil, Venezuela e Colômbia (RESTREPO *et al.*, 1985). A dificuldade em se calcular a prevalência da doença deu-se ao fato de a PCM não ser uma doença notificável (RESTREPO *et al.*, 1985). No Brasil, a doença representa a oitava causa de morte entre as doenças infecciosas e parasitárias (COUTINHO *et al.*, 2002), sendo o país considerado o maior centro endêmico desta micose. Nas cidades de maior prevalência, os casos não são distribuídos homogeneamente pelo território, tendendo a se concentrar ao redor das florestas úmidas (RESTREPO, 1985). Alguns casos autóctones já foram diagnosticados na Europa, nos Estados Unidos e na Ásia (JOSEPH *et al.*, 1966; CHIKAMORI *et al.*, 1984; AJELLO e POLONELLI, 1985), o que tem possibilitado se verificar a duração do período assintomático da PCM, que variou entre 5 meses a 60 anos, com uma estimativa média de 14 anos (MANNIS *et al.*, 1996). O longo período de latência, característico da PCM, impede a determinação precisa do sítio onde a infecção foi adquirida (BORELLI, 1972).

A PCM atinge principalmente trabalhadores rurais, do sexo masculino, adultos, com idade entre 30 e 60 anos (SVIDZINKI *et al.*, 1999; VILLAR *et al.*, 2000). Durante a infância a doença acomete ambos os sexos com igual intensidade fortalecendo a hipótese de que os fatores hormonais possam desempenhar papel na patogênese da doença (MARTINEZ, 1997; RESTREPO *et al.*, 1984; CLEMONS e STEVENS, 1990; SANO *et al.*, 1999).

### I.1.6 - ANTÍGENOS DE *P. brasiliensis*

O fungo *P. brasiliensis*, assim como outros fungos dimórficos, produzem *in-vivo* moléculas que induzem a resposta imune do hospedeiro, podendo ser expressas durante a infecção. Muitas dessas moléculas podem ser reconhecidas por anticorpos produzidos por pacientes humanos ou em animais imunizados em laboratório. Assim, varios antígenos desse fungo já foram identificados (**PUCCIA *et alii.*, 1986; CASOTTO, 1990; FIGUEROA *et alii.*, 1994; FONSECA *ET alii.*, 2001**), porém poucos foram purificados e caracterizados.

De acordo com sua origem, os antígenos de *P. brasiliensis* têm sido caracterizados em derivados de parede celular, antígenos citoplasmáticos (intracelulares) e antígenos de filtrado de cultura (exocelulares) (**YARZÁBAL 1982; RESTREPO *et al.*, 1983; RESTREPO *et al.*, 1984; SAN-BLAS e SAN-BLAS 1989; FAVA-NETTO 1990**). **PUCCIA *et al.* (1986)** estudaram um grupo de antígenos exocelulares de um isolado de *P. brasiliensis*. Os principais antígenos descritos neste estudo foram as glicoproteínas de 72-kDa, 55-kDa e 43-kDa, denominadas gp70, gp55 e gp43, respectivamente. A molécula antigênica mais estudada é uma glicoproteína que contém uma simples cadeia de oligossacarídeo (**ALMEIDA *et al.*, 1996**), apresenta massa molecular de 43 kDa (gp43) e tem sido considerada o principal componente antigênico *P. brasiliensis* (**DE MATTOS *et al.*, 2003** ). Após a purificação da gp43 (**PUCCIA *et al.*, 1991**) a glicoproteína tem sido utilizada no imunodiagnóstico da PCM (**TABORDA *et al.*, 1993**). A clonagem e a caracterização do gene codificante para gp43 mostrou que sua seqüência de aminoácidos apresenta 56-58% de similaridade à exo-1,3- $\beta$ -D-glucanase de *Saccharomyces cerevisiae* e de *Candida albicans*, respectivamente (**CISALPINO *et al.*, 1996**). A gp43 de *P. brasiliensis* está relacionada com o processo de ligação do fungo à laminina na superfície das células do hospedeiro, sugerindo o envolvimento desta molécula no processo de adesão e na patogênese do fungo (**VICENTINI *et al.*, 1994**). Foi identificado ao longo da molécula de gp43 um epítipo para células T, designado P10, o qual protegeu ratos contra infecção experimental por *P. brasiliensis* (**TABORDA *et al.*, 1998**). **PINTO *et al.* (2000)** descreveram o emprego do gene da gp43 para produção de vacinas de DNA contra PCM murina experimental. Os animais imunizados tiveram uma indução específica e de longa duração nas respostas imunes humoral e celular.

O segundo antígeno de *P. brasiliensis* a ser clonado e caracterizado codifica uma proteína de 27 kDa (p27) e não apresenta homologia significativa com outras seqüências já descritas (**MCEWEN *et al.*, 1996 e ORTIZ *et al.*, 1998**). Uma outra glicoproteína expressa pelo fungo *P. brasiliensis* e de localização intracelular é a gp70; que é reconhecida por 96% dos soros de pacientes com PCM, estando também presente na urina de pacientes exibindo a forma aguda da PCM (**SALINA *et al.*, 1998**). **DE MATTOS GROSSO *et al.***

(2003) extraíram, purificaram e produziram anticorpo contra a gp70 de células leveduriformes do *P. brasiliensis*. A gp70 tem localização predominantemente intracelular e apresenta apenas uma isoforma com pI de 3.4. Como a gp43, a gp70 liga-se a receptores de manose na membrana de macrófagos, induzindo decréscimo na liberação de óxido nítrico e de peróxido de hidrogênio, contribuindo para a propagação do fungo nos tecidos do hospedeiro e estabelecendo a infecção. Ao contrário da gp43, a gp70 inibe a atividade fagocítica dos macrófagos também através de receptores Fc (POPI *et al.*, 2002). A imunização passiva de camundongos com anticorpos monoclonais contra a gp70, acompanhada pela infecção com *P. brasiliensis*, aboliu completamente a formação de granulomas nos pulmões e o progresso da doença (DE MATTOS GROSSO *et al.*, 2003).

Um antígeno de 87 kDa de *P. brasiliensis* pode ser detectado em soros de pacientes com as formas aguda unifocal e multifocal da PCM (GÓMEZ *et al.*, 1998). O antígeno é caracterizado como pertencente à família das proteínas de choque térmico (HSP) (DÍEZ *et al.*, 2002). DÍEZ *et al.* (2003) utilizaram uma combinação desse antígeno de 87 kDa e da p27 para o diagnóstico e acompanhamento de pacientes com PCM. Foram observados que o uso combinado desses dois antígenos aumenta a sensibilidade e especificidade de reconhecimento de soros de pacientes com PCM, em relação ao seu uso separadamente.

DINIZ *et al.* (2004) avaliaram o efeito protetor de antígenos do *P. brasiliensis* fracionados por FPLC (Fast protein liquid chromatography). Os antígenos fracionados (F0, FII e FIII) foram inoculados em camundongos BALB/C que, posteriormente, foram infectados com células leveduriformes de *P. brasiliensis*. A imunização dos camundongos com as frações F0 e FII, antígenos predominantemente localizados na superfície celular do fungo provocaram uma resposta imune celular e humoral capaz de proteger os animais contra a PCM.

Utilizando combinações de soros de pacientes com diferentes formas clínicas da PCM e preparações de antígenos extracelulares (Mexo) de células leveduriformes de *P. brasiliensis*, REIS *et al.*, 2005 identificaram uma proteína do *P. brasiliensis* com massa molecular de 28 kDa. Essa proteína foi purificada e a seqüência N-terminal obtida. A comparação da seqüência de aminoácidos com seqüências presentes em banco de dados não evidenciou qualquer homólogo, sugerindo uma proteína específica de *P. brasiliensis*. Cento e quarenta amostras de soros de pacientes com PCM foram analisadas com a proteína recombinante através *Western blotting*, tendo 100% de sensibilidade e especificidade nas reações de soros de pacientes com PCM não tratados. Ao contrário, foi observada uma ausência de reatividade após dois dias de tratamento, sugerindo ser a proteína de 28 kDa um

antígeno específico da infecção ativa, podendo ser usado como uma alternativa para o diagnóstico e monitoramento do tratamento de pacientes com PCM.

O laboratório de Biologia Molecular, UFG, tem investigado e caracterizado novos antígenos de *P. brasiliensis*. Dessa forma, **SALEM-IZACC et al. (2001)**, clonaram, caracterizaram e expressaram, em nosso laboratório, o gene codificante para a proteína mitocondrial HSP60 do fungo *P. brasiliensis*. Posteriormente, a proteína recombinante HSP60 foi purificada, em nosso laboratório, por **CUNHA et al. (2002)**, e testada com um total de 75 amostras de soros humanos através de *Immunoblotting*. Os resultados obtidos indicaram que a mesma apresenta alta sensibilidade e especificidade, 97,3 e 92,5% respectivamente, sugerindo que a HSP60 purificada possa ser usada tanto isolada como em associação com outros antígenos no diagnóstico da PCM. **COSTA et al., (2002)** caracterizaram a sequência de um gene que codifica uma proteína imunoreativa de *P. brasiliensis*, que apresenta identidade com sequências de manosiltransferases de outros fungos. A proteína recombinante foi testada reagindo com soros de pacientes com PCM.

Através das técnicas de eletroforese bidimensional e immunoblotting **FONSECA et al. (2001)** identificaram, em nosso laboratório, determinantes antigênicos de *P. brasiliensis*, utilizando combinações de soros de pacientes com diferentes manifestações clínicas da PCM. Os antígenos de *P. brasiliensis* caracterizados apresentaram homologia com as proteínas catalase (61 kDa), gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (36 kDa), triose fosfato isomerase (29 kDa), malato desidrogenase (34 kDa) e frutose bifosfato aldolase (39 kDa). A proteína de 61 kDa identificada como catalase, com possível localização peroxissomal, foi clonada e caracterizada por **MOREIRA et al. (2004)**. Os níveis de transcritos e da proteína mostraram que a catalase é diferencialmente expressa nas formas micélio e levedura.

Com relação à proteína com massa molecular de 29 kDa, codificante para triose fosfato isomerase (TPI), o cDNA foi clonado e caracterizado por **PEREIRA et al. (2004)**, bem como a molécula recombinante foi obtida. A TPI recombinante purificada mostrou forte reatividade com soros de pacientes com PCM e não reagiu com soros de indivíduos controle. **CARNEIRO et al. (2004)** clonaram e caracterizaram dois cDNAs codificantes para distintas isoformas frutose bifosfato aldolase (FBA1 e FBA2). Experimentos de análise de expressão gênica demonstraram variações nos perfis entre *Pbfbal* e *Pbfba2*, sendo que a *Pbfbal* é mais expressa nas células leveduriformes, enquanto que a *Pbfba2* foi detectada apenas na forma miceliana. Os autores sugerem que a *Pbfba2* possa estar envolvida na adesão do fungo à matriz extracelular do hospedeiro durante o estágio inicial da infecção.

A seqüência codificante para o antígeno de 36 kDa foi clonada e caracterizada em nosso laboratório por **BARBOSA et al. (2004)**. A seqüência deduzida de aminoácidos apresentou identidade de 88% e similaridade de 93% com gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) de *Histoplasma capsulatum*. Análises dos transcritos demonstraram que a GAPDH é mais abundante na fase leveduriforme do fungo do que na fase miceliana. **BARBOSA et al. (2006)** descreveram que a GAPDH do *P. brasiliensis* está relacionada com a capacidade do fungo de ligar-se a componentes da matriz extracelular do hospedeiro, bem como a adesão e internalização do fungo por pneumócitos. Os dados informam que a GAPDH possa mediar a ligação do fungo à fibronectina, colágeno tipo I e laminina, contribuindo para a adesão e internalização do *P. brasiliensis* a tecidos do hospedeiro, disseminando a infecção.

A formamidade (FMD) é uma molécula potencialmente relacionada com a interação patógeno-hospedeiro e que foi caracterizada em nosso laboratório por **BORGES et al. (2005)**. A FMD de *P. brasiliensis* foi isolada através de sistema de focalização isoelétrica. A proteína purificada mostrou forte reação com soros de pacientes com PCM e não reagiu com soros de indivíduos controle, tornando-se um antígeno potencial no sorodiagnóstico da PCM.

### I.1.7 - DIAGNÓSTICO DA PCM

O diagnóstico conclusivo da PCM tem sido tradicionalmente realizado através da identificação microscópica das formas leveduriformes de *P. brasiliensis* presentes em lesões de pacientes. Entretanto, quando as leveduras apresentam um tamanho pequeno, estas podem ser facilmente confundidas com outros fungos (**LACAZ, 1994**). Outra forma de se diagnosticar a PCM é através de métodos sorológicos, como por exemplo, fixação do complemento, imunodifusão e ensaios imunoenzimáticos (**CAMARGO et al., 1984; CANO e RESTREPO, 1987; TABORDA e CAMARGO, 1994; ORTIZ et al., 1997**). O antígeno de *P. brasiliensis* mais utilizado no imunodiagnóstico da PCM é a gp43; entretanto esta glicoproteína comumente apresenta reação cruzada com histoplasmose (**PUCCIA e TRAVASSOS, 1991**) e Doença de Jorge Lobo (**CAMARGO et al., 1998**). Os pacientes que se encontram imunocomprometidos não são capazes de produzir níveis de anticorpos suficientes para serem detectados por testes imunológicos, e além do mais, a gp43 pode desaparecer da circulação durante tratamento (**MENDES-GIANINNI et al., 1989**), podendo gerar alguns resultados falso - negativos (**DEL NEGRO et al., 1995**). O gene que codifica a

gp43 apresenta polimorfismos (**MORAIS et al., 2000**), o que pode levar à variabilidade desta glicoproteína em diferentes isolados de *P. brasiliensis* (**SAN-BLAS e NIÑO-VEGA, 2001**), dificultando assim o diagnóstico da micose.

Alguns métodos para diagnóstico a partir da detecção de antígenos de *P. brasiliensis* em fluidos corporais vêm sendo testados (**MENDES-GIANNINI et al., 1989; FREITAS e ROQUE-BARRERA, 1992; SALINS et al., 1998**). **GÓMEZ et al. (1997)** descreveram um ensaio imunoenzimático utilizando um anticorpo monoclonal específico (MAb) que é capaz de reconhecer o antígeno de 87-kDa em soros de pacientes com PCM (**GÓMEZ et al., 1997; GÓMEZ et al., 1998**). Esta metodologia foi utilizada no diagnóstico precoce desta micose e especialmente em soro de pacientes imunodeprimidos, apresentando 80,4% de sensibilidade e 81,4% de especificidade.

Para melhorar a especificidade os testes de ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) para diagnóstico da PCM, **ALBUQUERQUE et al., (2005)** trataram os soros de pacientes com PCM de várias maneiras, tais como metaperiodato de sódio e adsorção do soro de pacientes com antígenos de *H. capsulatum* e de *C. albicans*. O objetivo foi eliminar epítomos de carboidratos da gp43 que causa reações cruzadas com outras micoses. Os autores descreveram que esse método utilizado resultou numa especificidade de 84% para os soros de indivíduos com PCM, pelo método de ELISA.

Métodos moleculares estão sendo usados para identificar e distinguir diferentes espécies de fungos, sem a necessidade de cultivo. A técnica é rápida, altamente específica e sensível (**ATKINS et al., 2004**). Diversas seqüências de DNA que apresentam um potencial papel no diagnóstico da PCM estão sendo pesquisadas (**GOLDANI et al., 1995; HAYNES et al., 1995; GOMES et al., 2000**) para serem utilizadas em diagnósticos moleculares como PCR e *Southern blot*. Este tipo de diagnóstico é importante, pois é capaz de detectar o DNA do fungo em indivíduos que apresentam reações sorológicas negativas e baixa presença de antígenos ou anticorpos, facilitando assim, a determinação do melhor tipo de terapia para o paciente. **MOTOYA et al., (2000)** utilizaram para identificação molecular de *P. brasiliensis*, por PCR, oligonucleotídeos baseados nos genes do rDNA 5,8 S e 28 S de *P. brasiliensis*, isolado *Pb 01*. Este sistema é capaz de detectar o DNA do fungo proveniente de diferentes isolados. **GOMES et al., (2000)** desenvolveram oligonucleotídeos capazes de detectar DNA de *P. brasiliensis*, via PCR, em espécimes clínicas. Para isso, os oligonucleotídeos utilizados foram construídos baseados na seqüência do gene que codifica para o antígeno gp43. Os mesmos, não são capazes de amplificar DNA de outros agentes causadores de micoses sistêmicas e oportunistas, como histoplasmose, criptococose e candidíase. **SAN-BLAS et al.,**

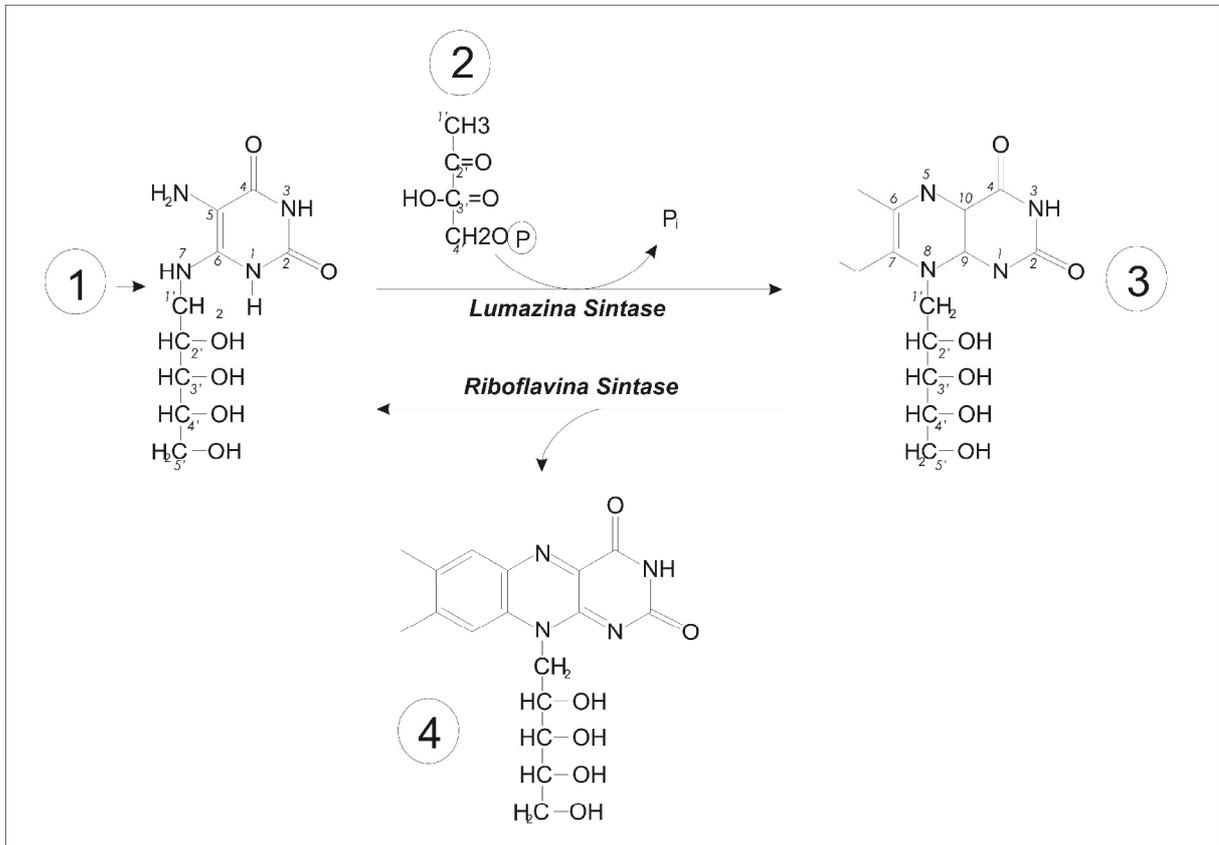
(2005) utilizando oligonucleotídeos específicos dos genes a todos os isolados de *P. brasiliensis*, relataram que foi possível amplificar dois fragmentos de 0,72 kb e de 0,83 kb. Os oligonucleotídeos foram utilizados com outros fungos e não mostraram nenhum sinal de amplificação, indicando que são específicos do *P. brasiliensis*. Nesse estudo, os autores foram capazes de identificar o DNA do *P. brasiliensis* em isolados de escarro e no líquido cerebrospinal (CSF) de pacientes com PCM.

## I.2-LUMAZINA SINTASE

### I.2.1-CONCEITOS E FUNÇÕES

A riboflavina (vitamina B2) é o precursor da flavina mononucleotídeo (FMN) e da flavina adenina dinucleotídeo (FAD). Ambas as coenzimas são essenciais nos processos de transferência de elétrons para transmissão de energia em todos os organismos celulares vivos (ZHANG *et al.*, 2003). A formação do FAD depende da utilização sequencial de duas moléculas de ATP nas reações que envolvem a fosforilação da riboflavina para formar o FMN pela riboflavina quinase e, então, a adenilação do FMN para formar a FAD (BAUER *et al.*, 2003).

A via biossintética da síntese de riboflavina (**Figura A**) tem sido muito estudada. O penúltimo passo na biossíntese da riboflavina é mediado pela Lumazina sintase (LS) que facilita a condensação de uma molécula de 5-amino-6-(D-ribitilamino)-2,4(1H,3H)-pirimidinediona (ARAPD) com duas moléculas de 3,4-dihidroxi-2-butanona-4-fosfato (DHBP), produzindo uma molécula de lumazina e ortofosfato (KIS *et al.*, 1995). Duas moléculas de lumazina sofrem uma dismutação (oxidação e redução concomitantes) para produzir a riboflavina e ARAPD, reação terminal catalisada pela riboflavina sintase (RS). Num reciclamento natural, a ARAPD produzida servirá como substrato para a LS iniciar um novo ciclo de reação (PLAUT *et al.*, 1970). A LS (E.C. 2.5.1.9) é uma enzima pertencente à família dimetil ribitil lumazina sintase (DMRL SYNTHASE) ([www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/](http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/)). Esta família inclui uma subfamília de distantes proteínas de arqueobactérias que podem ter a mesma função.



**Figura A - Reação na biossíntese da riboflavina.** A lumazina sintase catalisa a condensação do 5-amino-6-(D-ribitilamino)-2,4(1H,3H)-pirimidinediona (substrato 1) com o 3,4-dihidroxi-2-butanona 4-fosfato sintase(substrato 2) eliminando uma molécula de ortofosfato e produzindo o composto lumazina (3). A riboflavina sintase provoca uma oxidação e redução da lumazina produzindo a riboflavina (composto 4) e o substrato 1(MORTL *et al.*, 1996).

### I.2.2-CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS

Todas as enzimas LS estruturalmente estudadas pertencem à família de proteínas  $\alpha/\beta$ , apresentando uma topologia  $\alpha/\beta/\alpha$ . A estrutura secundária do monômero da LS consiste de uma repetição central de quatro motivos  $\beta/\alpha$  num arranjo de quatro cadeias de folha- $\beta$  paralelas ( $\beta 2\alpha 1\beta 3\alpha 2\beta 4\alpha 3\beta 5\alpha 4\alpha 5$ ), flanqueadas pelas hélices  $\alpha 1$ ,  $\alpha 4$  e  $\alpha 5$  de um lado e as hélices  $\alpha 2$  e  $\alpha 3$  no outro lado (MORGUNOVA *et al.*, 2005).

A enzima LS de nove espécies diferentes foram estudadas por cristalografia de raios-x. Enzimas dos fungos *Magnaporthe grisea*, *Schizosaccharomyces pombe* e *S.cerevisiae* e da bactéria *Mycobacterium tuberculosis* apresentam uma estrutura quaternária como pentâmero, enquanto que, em *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Aquifex aeolicus* e na planta

*Spinach oleracea* formam um capsídeo icosaédrico, descrito como dodecâmero de pentâmero (KLINKE *et al.*, 2005). A LS de *Brucella abortus* é montada como um dímero estável de pentâmeros, representando uma terceira categoria de estrutura quaternária (ZYLBERMAN *et al.*, 2004). KIS *et al.* (1995) descreveram que o capsídeo icosaédrico do *B.subtilis* é formado pelo complexo de 60 subunidades de LS com 3 subunidades de riboflavina sintase (RS).

Cada unidade do pentâmero é formada pela interação entre as hélices  $\alpha_3$ , cadeia  $\beta$  e hélice  $\alpha_5$  de uma subunidade de monômero com as hélices  $\alpha_3$ ,  $\alpha_2$  e cadeia  $\beta$  da subunidade do monômero adjacente. Nas LS icosaédricas as hélices  $\alpha_1$  e  $\alpha_4$  de um pentâmero conectam com as hélices  $\alpha_1$  e  $\alpha_4$  do pentâmero adjacente, formando o capsídeo (ZHANG *et al.*, 2001). O laço que conecta as hélices  $\alpha_4$  e  $\alpha_5$  estabelece múltiplos contatos com as hélices  $\alpha_1$  e  $\alpha_4$  da subunidade adjacente.

Apesar de apresentar diferentes estruturas quaternárias, a LS é formada pela mesma unidade estrutural monomérica. Nas LS icosaédricas e em *B.subtilis*, os onze primeiros resíduos N-terminal de cada monômero formam a quinta cadeia, que é a fita  $\beta_1$  da folha- $\beta$  da subunidade adjacente. As duas últimas hélices  $\alpha_4$  e  $\alpha_5$  estão separadas por um curto grampo num ângulo de  $50^\circ$ , sendo este grampo estabilizado por pontes de hidrogênio (PERSSON *et al.*, 1999).

Independente da estrutura quaternária, os sítios ativos de todas as LS estruturalmente caracterizadas estão invariavelmente, localizados na interface entre duas subunidades adjacentes de monômero e esta topologia é bem conservada. Portanto, a formação do pentâmero é essencial para a atividade catalítica da enzima (KOCH *et al.*, 2004).

### **I.2.2.1-COMPARAÇÃO ENTRE ESTRUTURAS TRIDIMENSIONAIS DE DIFERENTES LS**

A comparação da estrutura tridimensional de diferentes LS revelam determinantes que previnem a formação do capsídeo em fungos, leveduras e em *M.tuberculosis*. O primeiro sinal é a inserção de resíduo prolina na região N-terminal, a qual impede a interação entre a cadeia N-terminal e a folha- $\beta$  da subunidade adjacente, resultando numa orientação diferente da fita  $\beta_1$  (ZYLBERMAN *et al.*, 2004). Na LS de *M.grisea* a inserção dos resíduos prolina 8(Pro) e glutamina 9 (Gln) são responsáveis pela incapacidade de se formar capsídeo (PERSSON *et al.*, 1999). Uma segunda causa que justifica a falha na

montagem do capsídeo é a inserção de resíduos de aminoácidos no grampo que conecta as hélices  $\alpha 4$  e  $\alpha 5$  entre dois pentâmeros. A enzima LS icosaédrica apresenta motivos altamente conservados (G[T/G]K[A/H]GN), responsáveis pela ligação entre  $\alpha 4$  e  $\alpha 5$  e que estão envolvidos no contato entre pentâmeros (MORGUNOVA *et al.*, 2005). Ao contrário, a LS de *S.cerevisiae* tem um inserção de quatro resíduos de aminoácidos (IDEA) no laço entre  $\alpha 4$  e  $\alpha 5$ , ao passo que, em *S.pombe* apenas um único resíduo de aminoácido leucina nessa região é capaz de prevenir a formação do capsídeo (GERHARDT *et al.*, 2002). MORGUNOVA *et al.* (2005) descreveram que a inserção de quatro resíduos na região do laço entre  $\alpha 4$  e  $\alpha 5$  impede a formação de capsídeo na LS de *M.tuberculosis*, enquanto que a inserção de dois resíduos de aminoácidos na LS de *M.grisea* impede a montagem em capsídeo (PERSSON *et al.*, 1999). A LS de *B. abortus* não tem inserções na região N-terminal (PERSON *et al.*, 1999), mas, ao contrário de outras enzimas homólogas, a inserção de três resíduos de aminoácidos no grampo entre  $\alpha 4$  e  $\alpha 5$  leva a uma extensão da hélice  $\alpha 4$ , que a torna incapaz de formar a dobra de estabilização do capsídeo (KLINKE *et al.*, 2005).

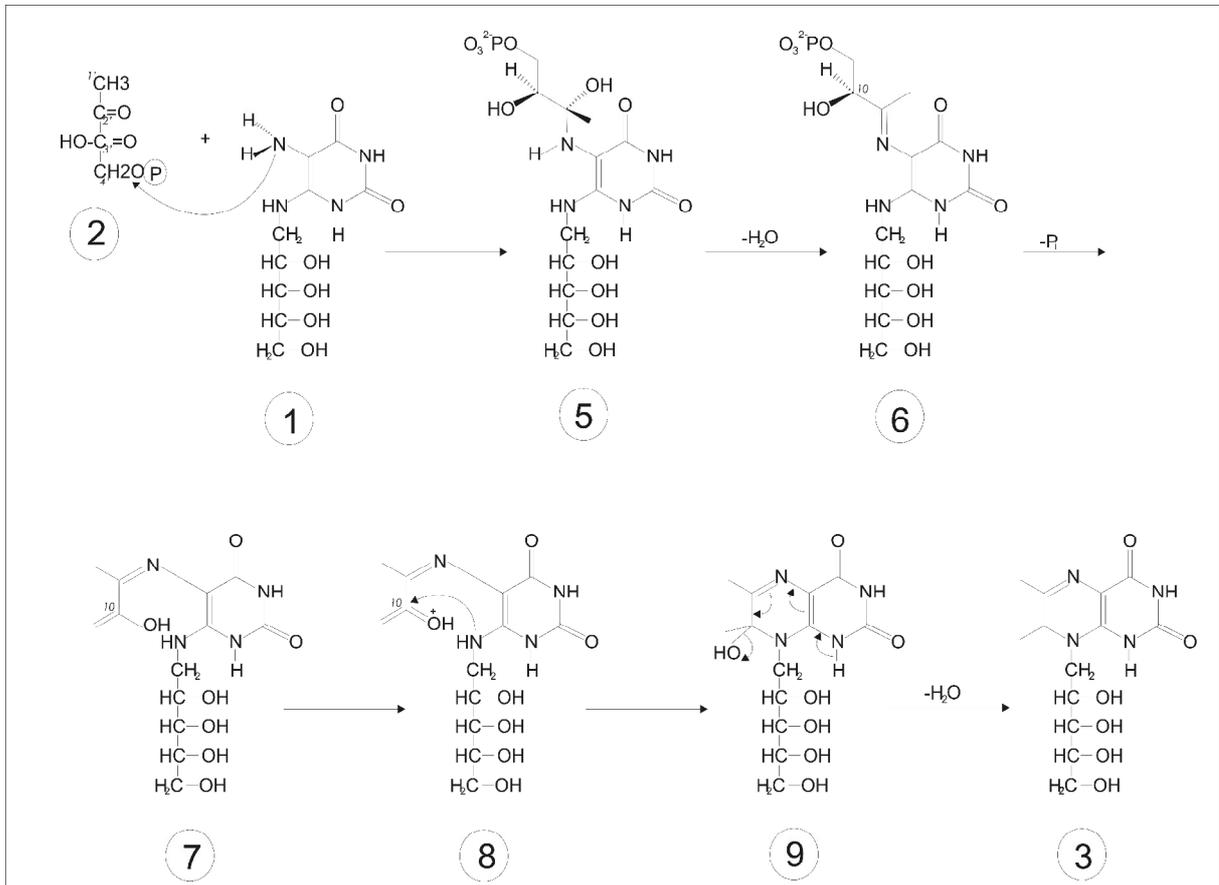
### I.2.2.2-ESTABILIZAÇÃO DO PENTÂMERO

A estabilização do pentâmero ocorre devido a uma predominante natureza hidrofóbica existente entre duas subunidades de monômero e entre as subunidades de pentâmero. Nessas interfaces é encontrado número variável de pontes de hidrogênio. ZYLBERMAN *et al.* (2004) demonstraram que a estrutura decamérica encontrada em *B. abortus* também é estabilizada por pontes de hidrogênio que ocorrem nos contatos hidrofóbicos, cuja superfície entre os pentâmeros é composta por marcada presença de resíduos de His (histidina) e de Phe (fenilalanina), estabilizando o dímero de pentâmero a um pH de 6,3. Essa característica estrutural da LS de *B. abortus* proporciona alta resistência à desnaturação por uréia e maior estabilidade à desnaturação termal. Os autores mostraram também que, devido à grande quantidade de resíduos de histidina, num pH abaixo de 6,0, a proteína pode desassociar o decâmero em pentâmero sem perder a estabilidade.

### I.2.3-MECANISMO CATALÍTICO

O mecanismo da reação catalisada pela LS foi inicialmente investigado em *B.subtillis* por **KIS et al. (1995)** e, posteriormente, por **ZHANG et al. (2003)** com base na estrutura da enzima de *A. aeolicus*. Segundo os autores o mecanismo consiste dos seguintes passos: A enzima LS liga-se ao grupo fosfato do carboidrato L-3,4-dihidroxi-2-butanona-4-fosfato (substrato 2). A presença do substrato 1 é essencial para a LS catalizar esse passo da reação. Estudos de **VOLK e BACHER (1990)** sugerem que o grupo 5-amino-6-(D-ribitilamino)-2,4(1H, 3H)-pirimidinediona (substrato 1) ataca o grupo carbonil do substrato 2 com eliminação de uma molécula de água e formação da base de Schiff (composto 6). Esse passo é seguido pela eliminação do fosfato inorgânico resultando numa dupla ligação e favorecendo a conjugação com o sistema pirimidina. O intermediário composto 7 é tautomerizado e o grupo carbonil do composto 8 é atacado pelo grupo 6-amino resultando no sistema pirimidina do composto 9, bicíclico. Finalmente, o grupo hidroxila 10 do composto 9 recebe um próton eliminando uma molécula de água, com subsequente fechamento do segundo anel pirimidina do composto 9 (lumazina). A reação termina resultando numa conjugação energeticamente favorável no sistema de duplo anel heterocíclico do produto 3. Um esquema do mecanismo de ação da LS é mostrado na **Figura B**.

**ZHANG et al.(2003)** descreveram o envolvimento de resíduos críticos no mecanismo catalítico que foram considerados e discutidos com base na atividade enzimática medida em mutantes de LS de *B. subtilis*. Esses estudos indicam que os resíduos de Arg<sup>127</sup>(arginina), Lys<sup>135</sup>(lisina) e Glu<sup>138</sup>(ácido glutâmico) estão envolvidos no posicionamento do grupo fosfato 2 através de formação do contato iônico. O resíduo de His<sup>88</sup> estaria envolvido na doação de prótons com subsequente eliminação de água e formação da base de Schiff (composto 6). Na LS de *M.tuberculosis* a Lys<sup>135</sup> e o Glu<sup>138</sup> são substituídos pela Lys<sup>138</sup> e Gln<sup>141</sup>, respectivamente (**MORGUNOVA et al., 2000**). A Arg<sup>127</sup> é um resíduo bem conservado e está presente na hélice  $\alpha_4$ , antes da dobra existente entre  $\alpha_4$  e  $\alpha_5$ , a qual estabelece a estrutura quaternária da proteína (**KLINK et al., 2005**). Diversas pontes de hidrogênio são observadas quando o sistema pirimidina do substrato 1 interage com o anel fenil do aminoácido Phe<sup>22</sup>(fenilalanina), auxiliando na estabilização energética desse substrato e durante a conjugação dos dois anéis de pirimidina. **PERSSON et al.(1999)** descreveram que na LS de fungos e leveduras a posição 22 é ocupada por triptofano. Na LS de *S. cerevisiae*, *S. pombe* e *M. grisea* o triptofano ocupa a posição 27.



**Figura B** - Mecanismo hipotético da reação catalisada pela LS sugerida por **KIS *et al.*, (1995)**. (1) 5-amino-6-(D-ribitilamino)-2,4(1H, 3H)-pirimidinediona, L-3,4-dihidroxi-2-butanona-4-fosfato, (3) lumazina (**ZHANG *et al.*, 2003**).

#### I.2.4-PROPRIEDADES DA LS

**BALDI *et al.* (1997)** demonstraram o potencial da LS de *B. abortus* (BLS) em ser utilizada com um antígeno para diagnóstico sorológico. Um teste de ELISA foi desenvolvido para detecção dos níveis de anticorpos anti-LS em soros de cães, confirmados ou com suspeita de brucelose. Os estudos mostraram que a detecção de anticorpos contra a BLS pode ser utilizada para o diagnóstico de brucelose canina. O uso do teste de ELISA mostrou que a detecção de anticorpos contra LS em gados foi muito útil para diferenciar animais vacinados de fêmeas gestantes infectadas com uma espécie virulenta de *B. abortus*. O teste sorológico tem se tornado uma importante ferramenta para o diagnóstico, prognóstico e na manutenção da doença.

**BALDI *et al.* (2000)** realizaram o teste de ELISA com a LS de *Brucella abortus* (BLS). A proteína recombinante purificada, livre de lipopolissacarídeos foi obtida e

testada para diagnóstico por ELISA utilizando-se soros de indivíduos infectados com a bactéria. Em muito dos pacientes, anticorpos anti-IgM contra LS foram detectados no início dos sintomas da brucelose, e depois, seguido pelo aparecimento de anticorpos IgG, servindo como um teste útil para se acompanhar a evolução clínica dos pacientes.

**VELIKOVSKY *et al.* (2002)** demonstraram que a injeção de plasmídeo de DNA contendo o gene codificante para LS de *B.abortus* (rBLS) em camundongos BALB/c provocou uma alta resposta imune celular mediada por T<sub>H</sub>1 conferindo proteção contra infecção experimental pela bactéria.

**VELIKOVSKY *et al.* (2003)** investigaram os efeitos de diferentes adjuvantes na imunogenicidade e eficácia protetiva da LS de *B.abortus* (BLS). Independentemente do adjuvante usado, a BLS foi capaz de induzir uma resposta humoral e celular específica ao antígeno, destacando-se a alta produção de interferon- $\gamma$ , importante para proteção contra um antígeno citoplasmático como é a LS. Os autores sugerem que a LS pode ser um candidato ao desenvolvimento de vacinas contra brucelose e desenvolvimento de imunógenos.

**BERGUER *et al.* (2006)** estudaram a capacidade de a BLS ativar células apresentadoras de antígeno, especificamente células dendríticas (DCs), através de receptores da família Toll. Em seus resultados, os autores mostraram que a LS de *B.abortus* é um potente ativador de células dendríticas, via TLR4 (receptores Toll-like 4). Esses resultados demonstram a possibilidade da BLS em atuar como um carreador de antígenos e induzir uma potente resposta imune contra proteínas anexadas covalentemente em sua estrutura. A alta imunogenicidade desta proteína, potencialmente útil para o desenvolvimento de vacinas acelulares, pode ser explicada pelo arranjo polimérico dessa proteína,

**MORGUNOVA *et al.* (2005)** demonstraram que compostos derivados de ribitilpurinetrione ligam-se ao sítio ativo da LS e atuam como um substrato para a ação catalítica da LS de *M.tuberculosis*, tornando-se um inibidor de potencial valor como antibiótico.

## II – TECNOLOGIA DO ANTÍGENO INDUZIDO *IN-VIVO* (IVIAT)/ JUSTIFICATIVAS

Durante a interação patógeno-hospedeiro a expressão de muitos genes de virulência é influenciada por vários fatores do ambiente e do hospedeiro. Tem sido observado que muitos genes que são expressos durante o crescimento *in-vitro* do patógeno são regulados por fatores do hospedeiro durante a infecção (**HEITHOFF et al., 1997**). Para se identificar genes que podem se expressos durante a infecção, utilizamos a Tecnologia do Antígeno Induzido *In-vivo* (IVIAT), que é uma técnica que identifica os antígenos do patógeno que são expressos durante a infecção. A técnica foi inicialmente descrita por **HANFIELD et al. (2000)** e tem sido utilizada para se estudar antígenos expressos *in-vivo* por vários patógenos, como a bactéria *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (**HANFIELD et al., 2000**), *M. tuberculosis* (**DEB et al., 2002**), *Vibrio cholerae* (**HANG et al., 2003**), *Vibrio vulnificus* (**KIM et al., 2003**), o fungo *Candida albicans* (**CHENG et al., 2003**) e a bactéria *Streptococcus grupo A* (**SALIM et al., 2005**). A tecnologia IVIAT é uma modificação do rastreamento imunológico e evita o uso de modelo animal por utilizar soros de pacientes permitindo a identificação de antígenos expressos em vários estágios da infecção. Um esquema experimental do IVIAT é mostrado na **Figura 1**, em Resultados.

A definição de genes expressos diferencialmente por patógenos humanos durante a fase infectiva pode auxiliar na elucidação daqueles responsáveis pela patogênese, virulência e interação com o hospedeiro, como já descrito (**MAHAN et al., 2000**). Por esta razão, a utilização de metodologias úteis para a identificação de antígenos de *P. brasiliensis* expressos durante a infecção no hospedeiro humano é importante. Entre esses estudos nós focalizamos inicialmente na caracterização de genes/proteínas, preferencialmente expressos na fase leveduriforme de *P. brasiliensis*. Para a caracterização de genes codificantes de antígenos de *P. brasiliensis* utilizamos uma nova técnica, o IVIAT (*In vivo* Induced Antigen Technology) (**WANG et al., 1996; KIM et al., 2003**), como acima descrito.

### III - OBJETIVOS

O objetivo central desse trabalho foi a identificação de genes do *P. brasiliensis* potencialmente expressos *in-vivo*, utilizando-se soros de pacientes com diferentes manifestações clínicas da PCM.

Para realização deste trabalho foram desenvolvidas as seguintes estratégias:

- Obtenção de soros de pacientes com PCM apresentando diferentes manifestações clínicas da doença, e que não estivessem em tratamento.
- Adsorção desses soros com o fungo crescido *in-vitro* na temperatura de 37 °C.
- Rastreamento de uma biblioteca de expressão do fungo *P. brasiliensis* com uma combinação de soros de pacientes com PCM adsorvidos, como citado.
- Identificação e caracterização de seqüências de cDNAs.
- Obtenção e caracterização de seqüência genômica
- Expressão heteróloga de proteína recombinante.

## IV–MATERIAL E MÉTODOS

### IV.1 - MATERIAL

#### V.1.1 – LINHAGENS BACTERIANAS

- *Escherichia coli* XL1-Blue MRF':  $\Delta$  (*mcrA*) 183,  $\Delta$  (*mcrCB-hsdSMR-mrr*) 173, *endA1*, *supE44*, *thi-1*, *gyrA96*, *relA1*, *lac* (F' *proAB lacI<sup>q</sup>* Z $\Delta$ M15 Tn 10 (Tet<sup>r</sup>) (Stratagene Cloning Systems<sup>®</sup>).
- *Escherichia coli* SOLR: *e14-* (*McrA-*),  $\Delta$  (*mcrCB-hsdSMR-mrr*) 171, *sbcC recB recJ uvrC umuC*: Tn5 (*Kan<sup>r</sup>*) *lac gyrA96 relA1 thi- endA1  $\lambda^R$*  (F' *proAB lacI<sup>q</sup>* Z $\Delta$  M15 ) *Su-* (Stratagene Cloning Systems<sup>®</sup>).
- *Escherichia coli* BL21(DE3): *F-*, *ompT*, *hsdS* (*rB-*, *mB-*), *gal* (53, 54)*dcm* (DE3).

#### IV.1.2 – VETORES UTILIZADOS

##### IV.1.2.1 – PLASMÍDEOS

- pBluescript II SK(+) fagomídeo (Stratagene Cloning Systems<sup>®</sup>, California, USA, no catálogo: 212207).
- pGEM-T Easy (Promega Biotech<sup>®</sup> Co., Madison, USA, no catálogo: A1360)
- pGEX-4T-3 (Amersham Biociences<sup>®</sup> catálogo: 27-4583-01)

#### IV.1.3 – MEIOS UTILIZADOS PARA CRESCIMENTO DO FUNGO *P.brasiliensis*

##### **MEIO SEMI - SÓLIDO FAVA-NETO**

Proteose peptona	3 g
Peptona	10 g
Infuso de Cérebro e Coração (BHI)	10 g
Glicose	40 g
Extrato de levedura	5 g
Extrato de carne	5 g
Cloreto de Sódio	5 g
Ágar	15 g
Água bidestilada (q.s.p.)	1000 mL

Após todos os reagentes terem sido dissolvidos em água bidestilada o pH do meio foi ajustado para 7,2 e, posteriormente, o meio foi autoclavado à 120°C durante 20 min. Posteriormente, foram adicionados os antibióticos Penicilina (0,05 UI/mL) e cloranfenicol (7,0 µg/mL) e o meio foi distribuído nos tubos de cultura e colocados em posição inclinada até sua completa solidificação.

#### IV.1.4 – MEIOS UTILIZADOS PARA CRESCIMENTO E TRANSFORMAÇÃO DE BACTÉRIAS

##### **MEIO LÚRIA - BERTANI (LB) - LÍQUIDO**

Triptona	10 g
NaCl	10 g
Extrato de levedura	5 g
Água destilada (q.s.p.)	1.000 mL

Os reagentes foram dissolvidos em água bidestilada e o pH foi ajustado para 7,0 com NaOH 5N. O meio foi autoclavado a 120°C por 20 min.

### **MEIO LÚRIA-BERTANI (LB) COM ÁGAR**

Este meio foi preparado conforme o LB descrito anteriormente, adicionando-se apenas 2% de ágar.

#### **MEIO NZY-AGAROSE**

NZ amina	10 g
NaCl	5 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	2 g
Extrato de Levedura	5 g
Agarose	7 g
Água bidestilada (q.s.p.)	1.000 mL

O pH do meio foi ajustado para 7,0 para posterior esterilização em autoclave a 120°C por 20 min.

### **MEIO NZY-ÁGAR**

Este meio foi preparado conforme o meio NZY descrito anteriormente, adicionando-se apenas 1,5% de ágar em substituição à agarose.

#### **MEIO SOB**

Triptona	20 g
Extrato de levedura	5,0 g
NaCl	0,58 g
KCl	0,18 g
Água bidestilada (q.s.p.)	1.000 mL

A solução foi autoclavada a 120°C durante o período de 20 min e, posteriormente, adicionou-se 10 mM de MgCl<sub>2</sub>.

## MEIO SOC

Este meio foi confeccionado conforme o SOB, descrito anteriormente, adicionando-se 10 mM de MgCl<sub>2</sub> e 20 mM de glicose.

### IV.1.5.– MARCADORES DE MASSA MOLECULAR PARA PROTEÍNAS

Foi utilizado o Kit “LMW Electrophoresis Calibration” (17-0446-01-Amersham-Biosciences®). O marcador foi dissolvido em tampão de amostra para proteínas. Antes do uso, o padrão foi fervido por 10 min.

<b>“LMW Electrophoresis Calibration Kit”</b>	
94,0 kDa	Fosforilase-B, músculo de coelho
67,0 kDa	Soroalbumina bovina
43,0 kDa	Ovoalbumina, ovo branco
30,0 kDa	Anidrase Carbônica, eritrócitos bovinos
20,1 kDa	Inibidor de Tripsina, soja
14,2 kDa	α-Lactalbumina, leite bovino

### IV.1.6 – REAGENTES E SOLUÇÕES PARA EXTRAÇÃO E ANÁLISE DE PROTEÍNAS ATRAVÉS DE ELETROFORESE BIDIMENSIONAL

#### **TAMPÃO TRIS - CÁLCIO COM INIBIDORES DE PROTEASES**

Tris-HCl 2M (pH 8,8)	1 mL
CaCl <sub>2</sub> 1M	0,5 mL
Água bidestilada (q.s.p.)	100 mL

### INIBIDORES DE PROTEASES

Inibidor	Concentração final
EDTA (Colagenase e Metaloprotease [Zn-protease])	1 mM
Iodoacetamida (Cisteína protease)	5 mM
PCMB (Cisteína protease)	1 mM
PMSF (Serina protease e Metaloprotease [Zn-protease])	4 mM
TLCK (Serina protease e Cisteína protease)	50 µg/mL

### REAGENTE DE BRADFORD

---

Azul de <i>Coomassie</i> Brilhante G-250	100 mg
Etanol absoluto	47 mL
Ácido O-fosfórico	85 mL
Água bidestilada (q.s.p.)	1.000 mL

---

### SOLUÇÃO DE SOROALBUMINA BOVINA A 100 µg/mL

---

Soroalbumina Bovina (Sigma Aldrich Co.)	1,0 mg
NaOH 0,1 M (q.s.p.)	10 mL

---

### SOLUÇÃO ACRILAMIDA: BIS-ACRILAMIDA (29:1)

---

Acrilamida	29 g
Bis-acrilamida	1 g
Água bidestilada (q.s.p.)	100 mL

---

Após os reagentes serem dissolvidos em água bidestilada a solução foi filtrada em sistema Millipore 0,45 µm e estocada em abrigo contra a luz a 4°C.

### SOLUÇÃO DE URÉIA 8 M

---

Uréia	4,8 g
Água bidestilada (q.s.p.)	5,2 mL

---

**SOLUÇÃO PARA GEL DE URÉIA (12 FILETES)**

Acrilamida:bis-acrilamida 29:1	1,33 mL
Uréia	5,00 g
Anfólitos pH 3,5-10,0	0,5 mL
NP40 10%	2,00 mL
Persulfato de amônio 10%	0,015 mL
TEMED	0,010 mL
Água bidestilada (q.s.p.)	2,00 mL

**NP40 10% (v/v)**

NP40	1 mL
Água bidestilada (q.s.p.)	10 mL

**SOLUÇÃO DE PERSULFATO DE AMÔNIO 10% (p/v)**

Persulfato de Amônio	1 g
Água bidestilada (q.s.p.)	10 mL

**TAMPÃO DE AMOSTRA PARA ANÁLISE BIDIMENSIONAL DE PROTEÍNAS**

Uréia	6,7 g
Anfólitos 5-8	0,4 mL
Anfólitos 3,5-10	0,1 mL
NP40 10%	2 mL
$\beta$ -mercaptoetanol 100%	0,5 mL
Água bidestilada (q.s.p.)	10 mL

**TAMPÃO DE SUPERFÍCIE**

---

Uréia	2,702 g
Anfólitos (pH 5,0 - 8,0)	100 µL
Anfólitos (pH 3,5 -10,0)	25 µL
NP40 10%	500 µL
Verde de metila	20 µg
Água bidestilada (q.s.p.)	5 mL

---

**SOLUÇÃO DE HIDRÓXIDO DE SÓDIO (NaOH) 0,02 M**

---

NaOH	0,8 g
Água bidestilada (q.s.p.)	1.000 mL

---

**SOLUÇÃO DE ÁCIDO FOSFÓRICO (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) 0,01 M**

---

H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	576 mL
Água bidestilada (q.s.p.)	1.000 mL

---

**TAMPÃO DE DESNATURAÇÃO DOS FILETES**

---

Tris-HCl (pH6,8)	625 µL
β-mercaptoetanol	500 µL
SDS 10%	23 µL
Glicerol	1 mL
Azul de Bromofenol	1 mL
Água bidestilada (q.s.p.)	10 mL

---

#### IV.1.6.1 – REAGENTES E SOLUÇÕES UTILIZADOS EM ELETROFORESE UNIDIMENSIONAL DE PROTEÍNAS

##### **TAMPÃO DE AMOSTRA (2X)**

Tris-HCl 1 M pH 6,8	2 mL
SDS 10%	4 mL
β-Mercaptoetanol	2 mL
Glicerol	2 mL
Azul de bromofenol	0,01 g

##### **ÁGAR 2 % (p/v)**

Ágar	20 g
Água bidestilada (q.s.p.)	1.000 mL

##### **SOLUÇÃO ACRILAMIDA: BIS-ACRILAMIDA 39:1**

Acrilamida	390 g
Bis-acrilamida	10 g
Água bidestilada (q.s.p.)	1.000 mL

Após os reagentes serem dissolvidos em água bidestilada a solução foi filtrada em sistema Millipore 0,45 µm e estocada em abrigo contra a luz, a 4°C.

##### **SOLUÇÃO TRIS - HCL 2,0 M pH 8,8**

Tris-base	241 g
Água bidestilada (q.s.p.)	1.000 mL

##### **SOLUÇÃO TRIS - HCL 1,0 M pH 6,8**

Tris-base	121 g
Água bidestilada (q.s.p.)	1.000 mL

**SDS 20% (p/v)**

---

SDS	20 g
Água bidestilada (q.s.p.)	100 mL

---

**SOLUÇÃO DE PERSULFATO DE AMÔNIO 10% (p/v)**

---

Persulfato de Amônio	1 g
Água bidestilada (q.s.p.)	10 mL

---

**GEL DE SEPARAÇÃO 15% (v/v)**

---

Acri-bis 39:1	2,9 mL
Tri-HCl 2,0 M pH 8,8	1,5 mL
Água bidestilada	2,8 mL
SDS 20%	195 mL
Persulfato de amônio 10%	30 µL
TEMED	6 µL

---

**GEL DE SEPARAÇÃO 5% (v/v)**

---

Acri-bis 39:1	0,97 mL
Tri-HCl 2,0 M pH 8,8	1,5 mL
Água bidestilada	4,8 mL
SDS 20%	195 µL
Persulfato de amônio 10%	30 µL
TEMED	6 µL

---

**SOLUÇÃO DE N-BUTANOL SATURADO EM ÁGUA**

---

N-butanol	1v
Água bidestilada (q.s.p.)	1v

---

**GEL DE SEPARAÇÃO 4% (v/v)**

Acri-bis 39:1	600 µL
Tri-HCl 1,0 M pH 6,8	510 µL
Água bidestilada	4,2 mL
SDS 20%	120 µL
Persulfato de amônio 10%	60 µL
TEMED	9 µL

**TAMPÃO DE CORRIDA PARA ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA-TRIS-GLICINA 5X (ESTOQUE)**

Tris-base	22,7 g
Glicina	112,5 g
Água bidestilada (q.s.p.)	1.000 mL

**SOLUÇÃO CORANTE DE AZUL DE COOMASSIE 0,2% (p/v):**

**SOLUÇÃO A**

Azul de <i>Coomassie</i> brilhante G-250	0,5 g
Metanol	225 mL
Água bidestilada (q.s.p.)	250 mL

**SOLUÇÃO B**

Ácido acético glacial	50 mL
Água bidestilada (q.s.p.)	250 mL

As soluções A e B foram misturadas no momento do uso (v/v).

**SOLUÇÃO DESCORANTE**

Metanol	50 mL
Ácido acético glacial	100 mL
Água bidestilada (q.s.p.)	1.000 mL

**SOLUÇÃO DE ENCOLHIMENTO**

Metanol	650 mL
Glicerol (P.A.)	20 mL
Água bidestilada (q.s.p.)	1.000 mL

**IV.1.7 – REAGENTES E SOLUÇÕES UTILIZADOS EM REAÇÃO DE WESTERN BLOTTING**

**TAMPÃO DE TRANSFERÊNCIA**

Tris base	3,0 g
Glicínia	14,4 g
Metanol	200 mL
Água bidestilada (q.s.p.)	1.000 mL

**SOLUÇÃO CORANTE VERMELHO PONCEAU**

Vermelho <i>Ponceau</i>	2,0 g
TCA	30 mL
Água bidestilada (q.s.p.)	1.000 mL

**PBS 10 X**

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	9,94 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,04 g
NaCl	80,00 g
KCl	2,00 g
Água bidestilada (q.s.p.)	1.000 mL

**PBS 1X**

PBS 10 X	100 mL
Água bidestilada (q.s.p.)	1.000 mL

**TAMPÃO DE BLOQUEIO**

---

Leite desnatado	50 g
Tween 20	1 mL
PBS 1X (q.s.p.)	1.000 mL

---

**TAMPÃO DE LAVAGEM**

---

Tween 20	1 mL
PBS 1X (q.s.p.)	1.000 mL

---

**TAMPÃO PARA FOSFATASE ALCALINA**

---

NaCl	5,844 g
MgCl <sub>2</sub>	1,016 g
Tris-HCl 2 M pH 9,5	100 mL
Água bidestilada (q.s.p.)	1.000 mL

---

**SUBSTRATO CROMOGÊNICO PARA FOSFATASE ALCALINA**

---

BCIP	33 µL
NBT	66 µL
Tampão de Fosfatase Alcalina (q.s.p.)	10 mL

---

**SOLUÇÃO DE INTERRUPÇÃO DA REAÇÃO DE PARADA**

---

EDTA 0,5M	200 µL
PBS 1X	50 mL

---

#### **IV.1.8 – SOLUÇÕES E TAMPÕES UTILIZADOS NO RASTREAMENTO IMUNOLÓGICO DA BIBLIOTECA DE EXPRESSÃO**

##### **TAMPÃO SM**

NaCl	5,8 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	3,7 g
Tris-HCl 1M pH 7,5	50 mL
Gelatina a 2%	5 mL
Água bidestilada (q.s.p.)	1.000 mL

A solução foi autoclavada a 120°C durante o período de 20 min.

##### **SOLUÇÃO DE TETRACICLINA**

O antibiótico foi diluído em etanol 70% na concentração final 100 mg/mL.

##### **SOLUÇÃO DE KANAMICINA**

O antibiótico foi diluído em água bidestilada autoclavada na concentração de 100 mg/mL, e esterilizado por filtração em sistema Millipore 0, 22 µm.

##### **SOLUÇÃO DE AMPICILINA**

O antibiótico foi diluído em água bidestilada autoclavada na concentração de 100 mg/mL, e esterilizado por filtração em Millipore 0,22 µm.

##### **SOLUÇÃO DE MALTOSE 20% (P/V)**

Maltose	200 g
Água bidestilada (q.s.p.)	1.000 mL

A solução foi esterilizada por filtração em sistema Millipore 0,22 µm .

**MgSO<sub>4</sub> 1 M**

MgSO <sub>4</sub> 7 H <sub>2</sub> O	246,5 g
Água bidestilada (q.s.p.)	1.000 mL

A solução foi autoclavada a 120°C durante o período de 20 min.

**SOLUÇÃO DE IPTG**

IPTG	10 mM
------	-------

**IV.1.8.1–SOLUÇÕES UTILIZADAS NO PREPARO DE CÉLULAS BACTERIANAS COMPETENTES E NO PROTOCOLO DE TRANSFORMAÇÃO**

**CaCl<sub>2</sub>**

CaCl <sub>2</sub>	100 mM
CaCl <sub>2</sub> /glicerol	100 mM /15%(v/v)

**GLICOSE 2M**

Glicose anidra	26,04 g
Água bidestilada (q.s.p.)	100 mL

**SOLUÇÃO DE IPTG**

IPTG	100 mM
------	--------

**SOLUÇÃO DE X- GAL**

X-Gal	20 mg
N,N-Dimetilformamida	1 mL

**SOLUÇÃO DE GLICEROL 10 % (v/v)**

Glicerol	100 mL
Água bidestilada (q.s.p.)	1.000 mL

**IV.1.8.2 – SOLUÇÕES UTILIZADAS NA EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE**

**SOLUÇÃO DE LIsoZIMA**

Lisozima	10 mg/mL
----------	----------

**SOLUÇÃO DE IPTG**

IPTG	100 mM
------	--------

**PBS 1X**

PBS 10 X	100 mL
Água bidestilada (q.s.p.)	1.000 mL

**SOLUÇÃO DE TROMBINA**

Trombina 1U/ $\mu$ l	Amersham Pharmacia Biotech®
----------------------	-----------------------------

**IV.1.8.3 – SOLUÇÕES, SOLUÇÕES-TAMPÃO E ENZIMAS UTILIZADAS PARA REAÇÕES DE AMPLIFICAÇÃO DE DNA POR PCR**

**MISTURA DE dNTPs**

dATP	2,5 mM
dCTP	2,5 mM
dGTP	2,5 mM
dTTP	2,5 mM

<b>ENZIMA</b>	
TaqDNA polimerase I	5U/ $\mu$ L

<b>TAMPÃO DA TAQ DNA POLIMERASE 10X</b>	
Tris-HCl pH 8,3	0,1 M
KCl	0,5M
BSA	0,1%

Na reação de PCR adicionou-se cloreto de magnésio para uma concentração final de 1,5 mM.

#### **IV.1.8.4 – SOLUÇÕES UTILIZADAS PARA ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE**

<b>GEL DE AGAROSE 0,8% (P/V)</b>	
Agarose	0,8 g
TEB 5X	10 mL
Água bidestilada (q.s.p.)	100 mL

A agarose foi fundida por aquecimento.

#### **TAMPÃO DE CORRIDA PARA GEL DE AGAROSE (TEB 5 X)**

Trizma base	54 g
EDTA 0,5 M pH 8,8	20 mL
Ácido Bórico	27,5 g
Água bidestilada (q.s.p.)	1.000 mL

#### **TAMPÃO DE AMOSTRA PARA DNA**

Tampão de corrida TEB 10X	50 mL
Glicerol	50 mL
Azul de bromofenol	100 mg
Xilenocianol	100 mg

#### IV.1.8.5 – SOLUÇÕES UTILIZADAS NOS PREPARO DE MATERIAIS LIVRES DE RNASES

<b>DEPC 0,1% (v/v)</b>	
DEPC	1 mL
Água milli-Q	1.000 mL

A mistura foi agitada durante 8 h, a 37°C. Posteriormente, foi autoclavada a 120°C, por 20 min e armazenada a 8°C.

<b>PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO 3% (v/v)</b>	
Peróxido de Hidrogênio	3 mL
Água milli-Q	100 mL

#### IV.1.9 – REAGENTES E SOLUÇÕES PARA AS ETAPAS DE LIGAÇÃO DOS INSERTOS AOS VETORES

<b>ENZIMA (PROMEGA®)</b>	
T4 DNA ligase	5 U/μL

<b>TAMPÃO (T4) DE LIGAÇÃO 2X (PROMEGA®)</b>	
Tris-HCl pH 7,4	0,50 M
MgCl <sub>2</sub>	0,10 M
DTT	0,10 M
Espermidina	0,01 M
ATP	0,01 M

#### IV.1.10 – ENZIMAS DE RESTRIÇÃO

<i>EcoRI</i>	12 U/μL
<i>XhoI</i>	8 U/μ

#### **IV.1.11– MARCADOR DE TAMANHO MOLECULAR PARA DNA**

---

1 Kb ladder	(Amersham-Pharmacia-Biotech®)
1 Kb	(Promega®)

---

#### **IV.1.12–MEMBRANAS DE NITROCELULOSE**

---

Hybond	(Amersham-Pharmacia-Biotech®)
C- Extra	(Amersham-Pharmacia-Biotech®)

---

#### **IV.1.13 – “KITS”DE USO ESPECÍFICO EM BIOLOGIA MOLECULAR**

- Flex Prep Kit (Amersham Biosciences®)
- DYEnamic ET, Dye Terminator Cycle Sequencing (Amersham Biosciences®)
- QUIAEX II (Quiagen)
- GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham-Pharmacia-Biotech®)
- Kit Bulk GST Purification Module (Amersham Pharmacia Biotech®)
- Super SMART PCR cDNA Synthesis SMART™ (Clontech)

## IV.2 – MÉTODOS

### IV.2.1 - MICROORGANISMO UTILIZADO E CONDIÇÕES DE CULTIVO

Foi utilizado neste estudo o isolado *Pb01* (coleção ATCC-MYA-826), já caracterizado e padronizado em nosso laboratório (**PEREIRA *et al.*, 2004 ; BARBOSA *et al.*, 2006**). O fungo tem sido mantido em nosso laboratório há mais de 10 anos e foi adotado como padrão por apresentar-se dimórfico nas temperaturas de cultivo das formas miceliana (23°C) e leveduriforme (36°C) (**SALEM-IZAAC *et al.*, 1997**).

O fungo *P. brasiliensis* foi cultivado em meio semi-sólido Fava-Neto (**FAVA-NETO, 1955**). As células leveduriformes foram mantidas a 36°C e as micelianas a 23°C, durante 7 e 14 dias, respectivamente.

### IV. 2.2 - PREPARO DE EXTRATOS PROTÉICOS

As células leveduriformes foram removidas do meio após sete dias de cultivo, e em seguida, lavadas com água bidestilada estéril e centrifugadas a 4.000 g por 5 min a 4°C. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado e as células foram congeladas e maceradas na presença de nitrogênio líquido, utilizando-se gral e pistilo, até a completa pulverização celular. O material foi transferido para um tubo cônico acrescido de tampão Tris-cálcio contendo inibidores de proteases. Após agitação em vortex por 30 min a 4°C, o material foi centrifugado a 12.000 g por 15 min. O sobrenadante foi coletado, para que se pudesse repetir novamente todo o processo de centrifugação e o material resultante deste passo foi aliquotado e armazenado a – 20°C para realização de estudos posteriores.

### IV.2.3 - DOSAGEM DE PROTEÍNAS

O teor de proteínas do extrato bruto total foi determinado segundo o método descrito por **BRADFORD (1976)**. Uma curva padrão foi construída para o reagente de Bradford utilizando-se uma solução de albumina bovina sérica em NaOH 0,1 M, em uma

faixa de concentração crescente de 0 a 10 µg/mL. A proteína padrão, em diferentes concentrações, foi alíquotada em triplicata, em tubos de ensaio (0,1 mL), e acrescida de 0,9 mL do reagente de Bradford. Após os tubos terem sido homogeneizados e incubados por 5 min à temperatura ambiente, foi realizado a leitura de absorbância em espectrofotômetro no comprimento de onda de 595 nm. A equação da curva padrão foi obtida por regressão linear, utilizando-se os valores da leitura espectrofotométrica que foram expressos em µg de proteína/mL. A dosagem de proteínas dos extratos celulares foi realizada nas condições descritas acima. A concentração de proteína extraída nos extratos celulares foi determinada utilizando-se a curva padrão previamente determinada.

#### **IV.2.4 - ELETROFORESE DE PROTEÍNAS EM GEL DE POLIACRILAMIDA**

##### **IV.2.4.1 - ELETROFORESE BIDIMENSIONAL DE PROTEÍNAS**

A análise bidimensional das proteínas quanto ao ponto isoelétrico e à massa molecular, foi realizada em gel de poliacrilamida, segundo o procedimento descrito por O'FARREL *et al.* (1975).

##### **IV.2.4.1.1 – PREPARAÇÃO DO GEL PARA ISOTACOFORESE**

Inicialmente vedou-se a base dos tubos com *parafilm* e, em seguida, a solução de gel de uréia foi colocada nos 12 tubos de vidro para isotacoforese e coberta com 20 µL de uréia 8 M para favorecer a polimerização. Os tubos foram deixados em repouso até a completa polimerização do gel e, em seguida, o *parafilm* e a uréia foram retirados e os tubos foram montados em cuba verticais tipo *Buchler*.

#### **IV.2.4.1.2 – PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS**

Adicionou-se ácido tricloroacético (TCA) ao extrato protéico total do fungo para a concentração final de 15% (v/v). Manteve-se o material por 30 min. no gelo. Em seguida, foram centrifugadas a 10.000 g por 15 min a 4°C. Lavou-se o precipitado por duas vezes com acetona 100% (gelada e resfriada a -20 °C) e ressuspendido em volume máximo de 70 µL de tampão de amostra.

#### **IV.2.4.1.3– ISOTACOFORESE**

Um filete foi reservado para o padrão de pH e em seu topo, foi aplicado 50 µL de tampão de amostra. As amostras protéicas foram aplicadas no topo do gel adicionadas de 20 µL de tampão de superfície, com a finalidade de se evitar a flutuação das mesmas. O compartimento inferior foi preenchido com NaOH 0,02 M e o compartimento superior da cuba e o restante do volume do topo dos tubos foram preenchidos com ácido fosfórico (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) 0,01 M, até que os filetes ficassem totalmente submersos. Os cabos foram conectados na cuba com os pólos invertidos e a corrida foi realizada a 400 V durante 5 h. Ao término da corrida eletroforética os géis foram retirados de dentro dos tubos com auxílio de injeção de água destilada e foram incubados imediatamente em solução de desnaturação por 1 h, sob agitação e estocados a -20°C. O filete controle de pH foi cortado em pedaços de 1 cm, os quais foram colocados individualmente em tubos de ensaio contendo 1 mL de água destilada. O material foi incubado por 24 h a 4°C para equilíbrio do pH, o qual foi em seguida determinado.

#### **IV.2.4.2 - ELETROFORESE UNIDIMENSIONAL DE PROTEÍNAS**

A análise eletroforética das proteínas foi realizada em gel de poliacrilamida com gradiente de concentração de 5% a 15%, segundo a descrição de **LAEMMLI (1970)**.

#### **IV.2.4.2.1 – EQUIPAMENTOS**

- Cubas acrílicas
- Placas de vidro para géis verticais de 100 mm x 140 mm
- Pentes e espaçadores (0,75 mm)

#### **IV.2.4.2.2 - CONFECCÃO DOS GÉIS DE GRADIENTE**

Os géis de gradiente foram confeccionados em placas de vidro vedadas com ágar 2%. As soluções para confecção dos géis de poliacrilamida (15% a 5 %) foram colocadas em beakers separados e misturados no momento da adição à placa de vidro. Para alinhamento e retirada de bolhas da superfície do gel foi adicionado sobre o mesmo uma solução de butanol saturado em água, a qual foi descartada após a polimerização. A seguir adicionou-se o gel de concentração (4 %).

#### **IV. 2.4.2.3 - CORRIDA ELETROFORÉTICA**

Após a polimerização do gel, o filete foi colocado em seu topo, os espaçadores foram retirados e a placa foi fixada em uma cuba de acrílico, preenchida com o tampão de corrida para eletroforese em gel de poliacrilamida 1X. As corridas foram realizadas a 40 mA e após seu término o gel ou foi corado com azul de *Coomassie* ou foi transferido para membranas de Nitrocelulose.

#### **V.2.4.2.4 - COLORAÇÃO POR AZUL DE COOMASSIE**

O gel de poliacrilamida foi corado com azul de *Coomassie* segundo a metodologia descrita por NEUHOFF *et al.* (1988). Ao término da corrida o gel foi incubado em solução corante de azul de *Coomassie*, sob suave agitação, por um período de 30 min. Em

seguida, o gel foi transferido para solução descorante até a visualização das proteínas e logo após, foi transferido para a solução de encolhimento para secagem posterior.

#### IV.2.5 - ANTICORPO PRIMÁRIO - SOROS DE PACIENTES COM PCM E

##### AMOSTRAS CONTROLE

Os soros utilizados neste trabalho foram provenientes de pacientes com diagnóstico clínico e imunológico (imunoprecipitação e imunofluorescência indireta) de PCM. Os soros foram coletados em pacientes do HDT (Hospital de Doenças Tropicais) Goiânia-Goiás, após a aprovação deste projeto por uma comissão de ética. Foram coletados soros de onze pacientes com diferentes formas clínicas de PCM. Amostras de onze indivíduos saudáveis também foram coletadas e utilizadas como soros controle.

Onze soros de pacientes com PCM foram utilizados para serem adsorvidos com extrato de *Escherichia coli* e extratos de células leveduriformes de *P.brasiliensis* Pb01, crescido sob condições de cultivo em laboratório. Duas etapas de adsorção foram realizadas. A primeira etapa consistiu na eliminação de anticorpos que reagem com proteínas de *E.coli* e, a segunda etapa, consistiu na eliminação de anticorpos que reagem com proteínas totais do fungo *P.brasiliensis* expressas *in-vitro*.

O preparo do extrato celular total de *E. coli* XL1-Blue MRF<sup>+</sup> foi realizado segundo a descrição de **SAMBROOK et al. (1989)**. Uma alíquota de células de *E.coli* foi retirada do estoque de glicerol, que se encontrava congelada a -80°C, e foi estriada em meio semi-sólido LB com tetraciclina a 12,5 µg/ml. As placas foram colocadas a 37°C por 16 h. Uma colônia foi retirada da placa, inoculada em 100 mL de meio líquido LB com tetraciclina a 12,5 µg/ml e colocada sob agitação a 37°C por 18 h. As células foram então, centrifugadas a 3.000 g e ressuspensas em 20 mL de tampão PBS 1X. Após este procedimento, as células foram sonicadas por 15 min. e centrifugadas a 3.000 g por 10 min. O sobrenadante foi coletado, filtrado em sistema Millipore e estocado a - 80°C até o momento do uso.

Com o objetivo de se eliminar as reações dos anticorpos com as proteínas bacterianas, procedeu-se a pré-adsorção dos soros de pacientes portadores de PCM com extrato de *E. coli* XL1-Blue MRF<sup>+</sup>. Uma mistura de volumes iguais de onze soros de pacientes portadores de PCM foi diluída com extrato de *E. coli* XL1-Blue e o mesmo volume de tampão PBS 1X. A mistura foi incubada a 37°C por 1 h, sob suave agitação. Em seguida,

procedeu-se a centrifugação a 10.000 g, a 4°C durante 20 min. O sobrenadante foi recolhido e estocado a -80°C até o momento do uso. A eficiência da adsorção foi monitorada por eletroforese unidimensional e por *Western blotting*.

Extrato protéico de células leveduriformes do *P. brasiliensis* Pb01 foi obtido como descrito no ítem IV.2.2. A pré-adsorção do soros de pacientes PCM com este extrato foi realizada com o objetivo de remover anticorpos que reagem com as proteínas das células na fase leveduriforme expressas em condições de cultivo, permanecendo preferencialmente os anticorpos que reagiriam com proteínas expressas durante a infecção. Assim, os soros, anteriormente reagidos com extrato de células *E. coli* XL1-Blue MRF<sup>7</sup>, foram incubados durante 1 h a 37°C, sob lenta agitação, com o mesmo volume de extrato protéico de células leveduriformes de *P. brasiliensis* (100 µg/mL de soro). Esta mistura foi centrifugada por 10.000 g, a 4°C por 20 min e, em seguida, o sobrenadante foi recolhido e estocado - 80°C até o momento do uso. A eficiência da adsorção foi monitorada por eletroforese bidimensional e por *Western blotting*.

#### **IV.2.6 - WESTERN BLOTTING**

##### **IV.2.6.1-TRANSFERÊNCIA DE PROTEÍNAS PARA MEMBRANA DE NITROCELULOSE**

Após eletroforese unidimensional das proteínas totais de células leveduriformes do *P. brasiliensis* realizou-se a transferência das proteínas para membrana de Nitrocelulose, segundo o método descrito por **SAMBROOK et al. (1989)**. A membrana foi cortada no tamanho do gel a ser transferido, sendo incubada em tampão de transferência por um período de 15 min. O sistema foi colocado em uma cuba para transferência a uma corrente constante de 25 V por 18 h a 4°C. Após esse período, o sistema foi desmontado, a membrana foi corada em solução de vermelho *Ponceau*, para se avaliar a eficiência da transferência, e em seguida descorada por lavagem com água destilada e PBS 1X. A membrana foi então, incubada com tampão de bloqueio por 16 h a 4°C, sendo imediatamente utilizada em ensaios de *Western blotting* ou estocada a -20°C.

#### **IV.2.6.2 - REAÇÃO COM ANTICORPO PRIMÁRIO**

Após bloqueio dos sítios inespecíficos, as membranas foram incubadas com soros de pacientes com PCM adsorvidos e não adsorvidos com extrato de células leveduriformes do *P.brasiliensis* e extrato total de *E.coli*, ambos diluídos à concentração de 1:100, em tampão de bloqueio. A incubação foi realizada à temperatura ambiente por 2 h, sob agitação vigorosa. Soros de indivíduos controle também foram utilizados na mesma diluição.

#### **IV.2.6.3-REAÇÃO COM ANTICORPO SECUNDÁRIO E REVELAÇÃO DO COMPLEXO ANTÍGENO-ANTICORPO.**

Após incubação com anticorpo primário, procedeu-se à lavagem da membrana, por 3 vezes, durante 15 min, em tampão de lavagem. A seguir, a membrana foi incubada com anticorpo secundário: Anti-IgG humano (**Sigma Aldrich Co.**) acoplado a fosfatase alcalina, diluído em tampão de bloqueio à concentração 1:2000. A incubação foi realizada a temperatura ambiente por 1 h, sob agitação vigorosa. Logo após, as membranas foram lavadas três vezes com tampão de lavagem durante 15 min e uma vez com PBS 1X. Em seguida, as membranas foram incubadas em tampão para fosfatase alcalina por 15 min, sob agitação suave. Para revelação, as membranas foram incubadas com o substrato cromogênico para fosfatase alcalina (BCIP/NBT) e a reação foi interrompida pela adição de solução de interrupção da reação enzimática.

## **IV.2.7 – RASTREAMENTO DA BIBLIOTECA DE CDNA DE *P.brasiliensis* UTILIZANDO-SE A METODOLOGIA DE IVIAT**

### **IV.2.7.1 - BIBLIOTECA DE CDNA DE *P.brasiliensis***

Para encontrarmos proteínas preferencialmente expressas durante a infecção, uma biblioteca de cDNA na forma leveduriforme de *P.brasiliensis*, isolado Pb01, construída no nos sítios *EcoRI* e *XhoI* do vetor  $\lambda$  ZAP II (Stratagene Cloning Systems® pela Dra. Maristela de Oliveira Azevedo, Laboratório de Biologia Molecular–Universidade de Brasília em colaboração com o Laboratório de Biologia Molecular–Universidade Federal de Goiás (FELIPE *et al.*, 2003), foi rastreada com uma combinação (n=11) de soros de pacientes com diagnóstico clínico e imunológico de PCM. Os soros foram pré-adsorvidos com lisado de *E. coli* XL1-Blue MRF' e com extrato total de levedura de *P. brasiliensis*. Os soros de pacientes com PCM adsorvidos foram diluídos 1:100.

### **IV.2.7.2- RASTREAMENTO IMUNOLÓGICO PRIMÁRIO**

#### **IV.2.7.2.1 – PREPARO DE CÉLULAS HOSPEDEIRAS**

As células XL1-Blue MRF', armazenadas em glicerol e mantidas a - 80°C, foram semeadas em placas de Petri contendo 20 mL de meio LB ágar com tetraciclina a 12,5 µg/mL e incubadas em estufa a 37°C por 16 a 18 h. Para o inóculo, uma colônia isolada foi colocada em 25 mL de meio LB líquido contendo maltose a 0,2 % (p/v) e MgSO<sub>4</sub> 0,01 M. Agitou-se a 37°C, a 120 rpm até que a cultura atingisse a fase estacionária, D.O. entre 0,8 - 1,0 em um comprimento de onda de 600 nm. As células foram então coletadas por centrifugação a 3.000 g por 10 min e ressuspensas em MgSO<sub>4</sub> 0,01 M para obtenção de D.O<sub>600</sub> de 0,5, sendo então estocadas a 4°C por 48 h.

#### **IV.2.7.2.2 – PRÉ-ADSORÇÃO DOS BACTERÍOFAGOS E SEMEADURA**

Para adsorção dos bacteriófagos  $\lambda$  Zap II da biblioteca de cDNA às bactérias hospedeiras *E.coli* XL1-Blue MRF', foram colocados, em microtubos estéreis, 15  $\mu$ L de bacteriófagos  $\lambda$  Zap II empacotados da biblioteca de cDNA (concentração de  $10^5$  p.f.u./ml.) e 400  $\mu$ L de células XL1-Blue MRF'. A mistura foi incubada em Banho-Maria a 37°C por 15 min. Posteriormente, esse material foi transferido para tubos contendo 10 mL de meio NZY-agarose a uma temperatura de 48°C. Homogeneizou-se bem o sistema para que fosse então vertido e espalhado cuidadosamente sobre placas de Petri contendo 35 mL de meio NZY-ágar, previamente preparadas. As placas semeadas foram incubadas em estufa a 37°C por um período de 7 h, quando começam a se formar as placas de lise.

#### **IV. 2.7.2.3 – INDUÇÃO DA SÍNTESE DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES E TRANSFERÊNCIA PARA MEMBRANA**

Assim que as placas de lise tornaram-se visíveis, as placas de Petri foram retiradas da estufa. As membranas foram umedecidas em água destilada estéril e depois saturadas com 10 mM de isopropyl- $\beta$ -tiogalactopiranosídeo (IPTG). Em seguida, as membranas foram colocadas diretamente sobre as placas de Petri cobrindo-as em toda sua extensão. As membranas foram marcadas com agulha para possibilitar a orientação e as placas incubadas a 37°C por um período adicional de 12 h.

#### **IV.2.7.2.4 – BLOQUEIO DOS SÍTIOS ESPECÍFICOS**

As placas, com membranas Nitrocelulose sobrepostas, foram retiradas da estufa e deixadas à temperatura ambiente para evitar adesão do meio NZY agarose às membranas. Depois de retirada das membranas, procedeu-se ao bloqueio de sítios inespecíficos por 16 h a 4°C.

#### **IV.2.7.2.5 – REAÇÃO DAS PROTEÍNAS COM ANTICORPO PRIMÁRIO**

Após serem retiradas do tampão de bloqueio, as membranas foram incubadas por 2 h, sob agitação vigorosa, a temperatura ambiente, com a combinação de soros de pacientes com PCM adsorvidos e diluídos em tampão de bloqueio 1:100, como descrito no item IV.2.6.2.

#### **IV.2.7.2.6 – REAÇÃO DAS PROTEÍNAS COM ANTICORPO SECUNDÁRIO E REVELAÇÃO DO COMPLEXO ANTÍGENO-ANTICORPO**

A incubação com anticorpo secundário e a revelação com o substrato cromogênico para fosfatase alcalina procedeu-se conforme descrito no item IV.2.6.3.

#### **IV.2.7.3- RASTREAMENTO IMUNOLÓGICO SECUNDÁRIO E TERCIÁRIO**

Os clones que reagiram com a combinação de soros de pacientes com PCM no rastreamento primário, foram devidamente identificados, retirados da placa e colocados em tubos de microcentrífuga contendo 1 mL de tampão SM e 20 µL de clorofórmio, e deixados por 1 h a temperatura ambiente para permitir a difusão das partículas de bacteriófagos. Em seguida, uma breve e suave agitação foi realizada para assegurar a eluição dos bacteriófagos. A suspensão de bacteriófagos foi estocada a 4°C e para posterior rastreamento secundário e terciário, utilizando-se os mesmos procedimentos citados anteriormente.

## **IV.2.8 – EXCISÃO IN VIVO DO FAGOMÍDEO pBLUESCRIPT® DO VETOR $\lambda$ ZAP II, USANDO O SISTEMA EXASSIST HELPER PHAGE COM CÉLULAS SOLR (STRATAGENE CLONING SYSTEMS®)**

### **IV.2.8.1 - PREPARO DAS CÉLULAS HOSPEDEIRAS**

As linhagens bacterianas SOLR e XL1 Blue MRF', armazenadas em glicerol e mantidas a - 80°C, foram separadamente semeadas em placas de Petri contendo 20 mL meio LB ágar, com kanamicina a 50 µg/mL e tetraciclina a 12,5 µg/mL, e incubadas em estufa a 37°C por 16 h. Para o inóculo, uma colônia isolada de cada linhagem foi crescida, separadamente, em 25 mL de meio LB contendo maltose a 0,2 % (p/v) e MgSO<sub>4</sub> 10 mM. Agitou-se a 37°C, a 120 rpm até que a cultura atingisse a fase estacionária, D.O. entre 0,8 - 1,0 em um comprimento de onda de 600 nm. As células foram então coletadas por centrifugação a 3.000 g por 10 min 4°C e ressuspensas separadamente, em MgSO<sub>4</sub> 10 mM para obtenção de D.O<sub>600</sub> de 0,5, sendo então estocadas a 4°C por 48 h.

### **IV.2.8.2-ADSORÇÃO DO FAGO E EXCISÃO DO PLASMÍDEO**

Em um tubo de microcentrífuga foram adicionados 200 µL de células *E.coli* XL1 Blue MRF', 250 µL do estoque de fago (contendo 10<sup>5</sup> partículas de fago) provenientes do rastreamento terciário e 1 µL de fago "helper ExAssist" (1 x 10<sup>6</sup> p.f.u./µL). O sistema foi incubado por um período de 15 min a 37°C. Posteriormente, adicionou-se 3,0 mL de meio LB líquido e o sistema foi submetido a uma nova incubação de 3 h a 37°C, sob agitação lenta. Após a segunda incubação, o sistema foi aquecido por 20 min a 65°C, e então centrifugado a 4.000 g por 15 min. O sobrenadante foi recolhido em tubo estéril e estocado a 4°C.

### **IV. 2.8.3 - PLAQUEAMENTO DOS FAGOS EXCISADOS**

Foram feitas duas alíquotas em tubos de microcentrífuga contendo em cada uma 200 µL de células hospedeiras SOLR, previamente preparadas, sendo que na primeira foram acrescentados 10 µL do estoque do fagemídeo pBluescript excisado e na segunda 100

$\mu\text{L}$  do mesmo. O sistema foi incubado a  $37^{\circ}\text{C}$  por 15 min. Em seguida, 5  $\mu\text{L}$  da mistura foram plaqueados em meio LB ágar com ampicilina a 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . As placas foram incubadas a  $37^{\circ}\text{C}$  por 16 h. As colônias resultantes foram coletadas individualmente e crescidas meio LB líquido com 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de ampicilina para a extração do DNA plasmidial e para seqüenciamento dos clones. Uma alíquota foi armazenada em glicerol e estocada a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

## IV.2.9 – CARACTERIZAÇÃO DO CLONE DE CDNA

### IV.2.9.1 – SEQÜENCIAMENTO

Para o seqüenciamento selecionamos um clone positivo de cada placa do rastreamento terciário. Os clones foram seqüenciados no aparelho MEGABACE® (GE, Healthcare®), utilizando-se o sistema “DYEnamic ET, Dye Terminator Cycle Sequencing. As reações de seqüenciamento foram preparadas utilizando-se 4  $\mu\text{l}$  de DYEnamic ET terminator Reagent Premix, 1  $\mu\text{l}$  de oligonucleotídeos (5 $\mu\text{m}$ ), **T3** (5'-AAT TAA CCC TCA CTA AAG GG-3') ou **T7** (5'-GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C-3'), 1 $\mu\text{L}$  de DNA (clone positivo, 200 ng – 500 ng) água Milli-Q para volume final de 10  $\mu\text{l}$ . Estas reações foram amplificadas, via PCR, em 35 ciclos nas condições:  $95^{\circ}\text{C}$  por 2 seg;  $95^{\circ}\text{C}$  por 10 seg ;  $50^{\circ}\text{C}$  por 15 seg e  $60^{\circ}\text{C}$  por 1 min. Por último, as amostras contendo o DNA amplificado foram precipitadas com 7.5M de acetato de amônia, etanol 100%, lavadas com etanol 70% e ressuspendidas em 10  $\mu\text{l}$  de tampão contendo formamida.

### IV.2.9.2 - ANÁLISES COMPUTACIONAIS

Após o seqüenciamento dos cDNAs, as seqüências obtidas foram analisadas (**Figura 5**). Primeiramente, foram comparadas entre si utilizando-se o programa PHRED (EWING e GRANDEN, 1998; EWING *et al.*, 1998) com finalidade de se retirar o vetor e formar contigs, formando-se assim a seqüência completa. Em seguida, as pesquisas de similaridade das seqüências de proteínas e de nucleotídeos foram feitas no banco de dados NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) usando-se o programa BLAST (ALTSCHUL *et al.*, 1990). O alinhamento entre as seqüências homólogas foi feito através do programa

CLUSTAL X (THOMPSON *et al.*, 1997), e os motivos na seqüência deduzida de proteínas foram analisados pelo programa PROSITE (www.expasy.org/prosite) (HOFMANN *et al.*, 1999).

#### IV. 2.9.3 – DESENHO DE OLIGONUCLEOTÍDEOS A PARTIR DA SEQÜÊNCIA DO CLONE DE CDNA *Pbls*

A partir da seqüência de nucleotídeos do cDNA obtido no rastreamento da biblioteca de expressão de *P. brasiliensis*, foram desenhados oligonucleotídeos (Tabela 1) com um sítio para a enzima *EcoRI* no sentido senso (S-4T3) e com um sítio para a enzima *XhoI* no sentido anti-senso (AT-4T3), que foram sintetizados pela **GIBCO™ Invitrogen Corporation**. Estes oligonucleotídeos foram utilizados na reação de polimerase em cadeia para amplificação do cDNA de 525 pb e para obtenção de fragmentos genômicos referentes ao clone *pbls*. A Tabela 1 apresenta as seqüências dos nucleotídeos. Os sítios para as enzimas de restrição *EcoRI* e *XhoI* estão sublinhados.

**Tabela 1** - Oligonucleotídeos utilizados para amplificação do cDNA

<i>Oligonucleotídeos</i>	<i>Seqüência</i>
S-4T3(senso)	5'- GGTGGT <u>GAATTC</u> ATGGCTACTCTCAAAGGTTTG – 3'
AT-4T3 (anti-senso)	5'- GGTGGT <u>TCTCGAG</u> CTACGAAACTTCCCCATTG – 3'

#### IV.2.10 - OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA SEQÜÊNCIA GENÔMICA CODIFICANTE PARA LS

Com base na seqüência de nucleotídeos do clone de cDNA que codifica para lumazina sintase (*pbls*), foram sintetizados oligonucleotídeos (Tabela 1), com a finalidade de se amplificar um fragmento genômico codificante da *pbls* via reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando o DNA total de *P.brasiliensis* na forma leveduriforme. O sistema de amplificação continha: 1 µL dos oligonucleotídeos (Tabela 1) na concentração de 50 µM; 2,5

$\mu\text{L}$  de DNA total de *P. brasiliensis* na concentração 10  $\eta\text{g}/\mu\text{L}$ ; 2,5  $\mu\text{L}$  de dNTPs na concentração de 2,5 mM cada; 0,5  $\mu\text{L}$  de Taq DNA Polimerase na concentração de 5 U; 2,5  $\mu\text{L}$  de tampão 10 X para Taq DNA Polimerase; 1,5  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  a 25 mM e quantidade de água Milli-Q suficiente para um volume final de 25  $\mu\text{L}$ . O DNA molde foi desnaturado a 94°C por 2 min, seguido por 25 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 min e 30 seg., anelamento a 60°C por 1 min e 15 seg. e extensão por 2 min a 72°C. Uma extensão final a 72°C foi realizada. Obteve-se desta forma um fragmento genômico de 800 pb. As amplificações foram realizadas no termociclador (Perkin Elmer/Gene Amp PCR System 2400) e a análise dos produtos da reação foi feita através de eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de brometo de etídeo. A visualização do gel foi feita em transiluminador de luz ultravioleta. Após a corrida, os géis foram fotografados e os fragmentos obtidos foram eluidos do gel utilizando o sistema comercial GFX PCR DNA e Gel Band Purification .

#### **IV.2.10.1 - QUANTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS DE DNA**

A concentração das amostras de DNA genômico amplificadas via PCR foi determinada através de leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 260 nm, observando-se que 1 unidade de absorbância corresponde a 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de DNA de fita dupla e 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de DNA de fita simples. Foram realizadas também leituras de absorbância em comprimento de onda de 280 nm, para determinação do grau de pureza dos DNAs. Assim, a razão entre as leituras a 260 nm e a 280 nm indica bom resultado se apresentar igual ou superior a 1,8.

Uma alternativa para determinação da concentração de DNA genômico foi a análise em gel de agarose 0,8% com brometo de etídeo. As amostras, cujas concentrações deveriam ser estimadas, foram aplicadas em gel de agarose juntamente com amostras de concentração conhecidas. Através de comparação visual entre as amostras estimou-se a concentração do DNA.

#### **IV.2.10.2 - ANÁLISE DO DNA EM GEL DE AGAROSE**

Os géis foram preparados com agarose em TEB 1X com brometo de etídio a 5 µg/mL, em concentrações que variam de 0,8% (para fragmentos superiores a 500 pb) a 2% (para fragmentos menores). Após a montagem da forma e pente apropriados, verteu-se a agarose derretida em forno de microondas e esperou-se pela total solidificação. As amostras de DNA genômico amplificadas por PCR foram preparadas com tampão de amostra à concentração final de 1X e água bidestilada. A corrida eletroforética foi feita em TEB 1X. Até a completa entrada das amostras no gel foram aplicados 30 mA, depois aumentou-se a corrente para 60-80 mA. A migração dos fragmentos de DNA foi acompanhada através de transiluminador de luz ultravioleta. Após a corrida, os géis foram fotografados.

#### **IV.2.10.3 - ELUIÇÃO DE FRAGMENTOS DE DNA**

Os fragmentos de DNA a serem eluídos foram separados por eletroforese em gel de agarose. Após a corrida, os fragmentos de DNA foram cortados do gel e transferidos para microtubos e cerca de 10µL de “capture buffer” foram adicionados para cada 10 mg de gel. Após agitação em vortex o tubo tipo “Eppendorf” foi mantido a 60°C por 15 min, misturando sempre e, depois, centrifugado a 12.000 g por 30 seg. A solução foi transferida para uma coluna de GFX adaptada a um tubo coletor e incubada por 1 min. a temperatura ambiente para, em seguida, ser centrifugado a 12.000 g por 30 seg. A solução do tubo coletor foi desprezada e a coluna GFX foi colocada novamente no tubo coletor. 500 µL de tampão etanólico foi adicionado para remover sais e outro contaminantes. Após uma centrifugação de 12.000 g por 30 seg., o tubo coletor foi descartado e a coluna foi colocada em tubo tipo “Eppendorf”, adicionando-se água milli-Q para eluição do DNA da coluna à temperatura ambiente por 1 min. Procedeu-se a centrifugação a 12.000 g por 30 seg. para recuperação do DNA purificado. A amostra eluída foi quantificada em gel de agarose 0,8%.

#### **IV.2.10.4 - LIGAÇÃO DO FRAGMENTO GENÔMICO AMPLIFICADO AO VETOR pGEM-T-EASY**

O produto de 800 pb amplificado foi purificado e subclonado no vetor pGEM-T-Easy seguindo-se os métodos descritos no protocolo do fabricante. A razão molar da concentração de DNA do vetor e do inserto foi de 1:4. O sistema de ligação com volume final de 10 µL foi composto de: 2,3 µL do inserto (22,5 ng/ µL); 0,5 µL de vetor pGEM-T Easy (25 ng/ µL); 1 µL de tampão de enzima (10 X); 1 µL de ATP (10 mM) e 0,5 µL de T4 DNA ligase (4 U). O sistema foi incubado a 16°C por 1 h e mantido a 4°C até o momento da transformação, como já descrito anteriormente.

#### **IV.2.11 – ANÁLISE DA EXPRESSÃO DOS TRANSCRITOS**

Para analisarmos a expressão da *PbLS*, utilizamos a técnica de RT-PCR semiquantitativo. Esse método requer produtos amplificados na fase exponencial da reação de PCR, e antes de atingir a fase final, quando todos os produtos são limitantes (**FREEMAN *et al.*, 1999**).

O nível de expressão da *PbLS* foi avaliado como medida relativa entre os RNAs extraídos dos dois tipos de células de *P.brasiliensis* (micélio e levedura) crescidas *in-vitro*. Numa segunda análise avaliamos o nível de transcrito de pneumócitos humanos infectados com *P.brasiliensis*. A quantificação relativa requer o uso de genes constitutivos que mostrem níveis de expressão constante.

#### **IV.2.11.1 – EXTRAÇÃO DO RNA TOTAL DE *P.brasiliensis* NAS FORMAS MICÉLIO E LEVEDURA**

##### **IV.2.11.1.1 – TRATAMENTO DAS SOLUÇÕES E VIDRARIAS**

Todos os procedimentos para extração e manipulação de RNA foram realizados em condições livres de RNAses. Para isso, as vidrarias e louças foram embaladas em papel

alumínio, autoclavadas e tratadas em estufa a 180°C por um período de 4 h. Os materiais plásticos usados foram novos e também tratados com água DEPC 0,1%, durante 2 h.

#### **IV.2.11.1.2 – EXTRAÇÃO DE RNA (TRIZOL<sup>®</sup>)**

As células de *P. brasiliensis*, nas formas levedura e micélio foram cultivadas, em meio Fava-Neto (**FAVA-NETO, 1955**), por um período de 7 e 14 dias, respectivamente e, foram extraídos os RNAs utilizando-se o método Trizol, seguindo o protocolo do fabricante.

#### **IV.2.11.1.3– SÍNTESE DO CDNA**

As amostras de RNA total extraído das células de micélio e levedura foram submetidos à síntese de cDNA utilizando-se o Kit Super SMART PCR cDNA Synthesis SMART<sup>™</sup> (*Switching Mechanism At 5' end of RNA Transcript*) (**Clontech –BD Biocience**), segundo as especificações do fabricante.

Para a síntese da primeira fita de cDNA, foram adicionados em tubos de 500 µL, 1 µg de RNA e 2,0 µL de oligonucleotídeos CDS(10 pmol/ µL). A mistura foi aquecida a 42°C por 1,5 min e, em seguida, adicionamos 2,0 µL de oligonucleotídeos CDS (10 pmol/ µL); 4,0 µL de tampão 5X da primeira fita; 2,0 µL de dNTP(10 mM); 2,0 µL inibidor de RNase(10 U/µL); 2,0 µL de enzima PowerScript Reverse Transcriptase (200 U/ µL); 0,4 µg de DTT(10 Mm) e 1,2 µL de MgCl<sub>2</sub>(10 mM). As amostras foram incubadas a 42°C por 1,5 h em termociclador. Adicionamos 80 µL de TE (10 mM Tris/1 mM EDTA) e incubou-se a 72°C por 7 min. Para síntese da segunda fita, colocamos 3,0 µL da primeira fita, 10 µL de tampão para PCR(10X), 2,0 µL de dNTP(10 mM), 2,0 µL de oligonucleotídeos (10 pmol/ µL), 5,0 µL de MgCl<sub>2</sub>(10 mM), 1,5 µL da enzima Taq Hifi (200 U/ µL) e água milli-Q para volume da reação de 100 µL. Os parâmetros de amplificação foram: desnaturação a 94°C por 2 min, seguido por 25 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 min e 30 seg., anelamento a 60°C por 1 min e 15 seg. e extensão por 2 min a 72°C. Uma extensão final a 72°C por 7 min foi realizada.

#### IV.2.11.2–INFEÇÃO DE PNEUMÓCITOS POR CÉLULAS LEVEDURIFORMES

##### DE *P.brasiliensis*

Células de pneumócitos humanos (A549) foram cultivadas por 16 h em meio de cultura completo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Médium) suplementado com 10% (v/v) de soro bovino fetal (SBF), inativado a 56°C. Após este período as células foram lavadas por três vezes em meio DMEM e incubadas com  $10^8$  células leveduriformes de *P.brasiliensis*, conforme descrito (BARBOSA *et al.*, 2006). As células foram incubadas por 48 h a 37°C. Após este período, as células foram lavadas 3 vezes com PBS e incubadas com PBS contendo tripsina (0,2%) e EDTA (0,02%) durante 30 min para completa remoção da monocamada. As células foram coletadas por centrifugação 380 g por 5 min e submetidos à extração de RNA. Controles de pneumócitos não infectados foram obtidos.

#### IV.2.11.3 – CONSTRUÇÃO DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS

Para detecção e diferenciação dos níveis de expressão de mRNA de *Pbls*, oligonucleotídeos S-4T3 e AT-4T3 (Tabela 1) foram construídos. Para o controle interno, um par de oligonucleotídeos foi construído para amplificar um fragmento de 398 pb do gene 134 ribossomal (*r134*) de *P.brasiliensis*. Para a detecção da *PbLS* em pneumócitos infectados com células leveduriformes de *P.brasiliensis* um controle (CP) foi utilizado. Os oligonucleotídeos utilizados são mostrados na Tabela 2.

Tabela 2 - Oligonucleotídeos utilizados para reação de RT-PCR semiquantitativo.

Oligonucleotídeos	Seqüência
L 34 (senso)	5'-CAAGACTCCAGGCGGCAAC-3'
L 34 (anti-senso)	5'-GCACCGCCATGACTGACG-3'
CP-L34(anti-senso)	5'-GGTGTGTGCCAGGCAGAC-3'
CP-L34(senso)	5'-CTGACTCTGTGCTTGTGCC-3'

#### IV.2.11.4 – REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE PARA DETERMINAÇÃO DO CICLO IDEAL PARA ANÁLISE SEMIQUANTITATIVA

O cDNA obtido (item IV.2.13.1.3) foi submetido à reação de PCR para determinação do ciclo de amplificação ideal para quantificação do transcrito *Pbls*. Foram testados de 20 a 40 ciclos de amplificação, com intervalo de 5 ciclos, na condição de que o produto a ser quantificado fosse claramente visível no gel de agarose e que atingisse a fase exponencial da reação, e não a fase final da reação (MARRONE *et al.*, 2001). Cada mistura de reação continha um total de 25  $\mu\text{L}$ : 0,5  $\mu\text{L}$  dos oligonucleotídeos (50  $\mu\text{M}$ ); 2  $\mu\text{L}$  de cDNA (15  $\eta\text{g}/\mu\text{L}$ ); 2  $\mu\text{L}$  de dNTP (2,5 mM); 0,3  $\mu\text{L}$  de Taq DNA Polimerase (5 U); 2,5  $\mu\text{L}$  tampão para Taq DNA Polimerase (10X); 1  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  (50 mM) e quantidade de água milli-Q suficiente para completar o volume da reação. As amplificações foram realizadas em termociclador e os parâmetros foram: 94°C por 2 min, seguido de desnaturação a 94°C por 45 segundos, anelamento a 60°C por 1 min e extensão por 45 seg. a 72°C e uma extensão final a 72°C por 7 minutos. Os produtos de PCR foram separados em gel de agarose 0,8%, corado e fotografado sob luz ultravioleta.

## IV.2.12 - CLONAGEM DO CDNA EM VETOR DE EXPRESSÃO

### IV.2.12.1 - AMPLIFICAÇÃO DO CDNA ATRAVÉS DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE

O cDNA de 525 pb contendo a região codificante para *Pbls* foi amplificado, via PCR, usando-se os oligonucleotídeos senso e anti-senso (**Tabela 1**), que contem sítios para as enzimas de restrição *EcoRI* e *XhoI*, respectivamente. O sistema continha: 1µL dos oligonucleotídeos na concentração de 50 µM; 1 µL de cDNA na concentração de 10 ng/µL ; 2,5 µL de dNTPs na concentração de 2,5 mM; 0,5 µL de Taq DNA Polimerase na concentração de 5U; 2,5 µL de Tampão 10 X (Taq Polimerase); 1,5 µL de MgCl<sub>2</sub> a 25 mM e quantidade de água Milli-Q suficiente para um volume final de 25 µL. Os parâmetros de amplificação foram: desnaturação a 94°C por 2 min, seguido por 25 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 min e 30 seg., anelamento a 60°C por 1 min e 15 seg. e extensão por 2 min a 72°C. Uma extensão final a 72°C foi realizada.

### IV.2.12.2 - PREPARO E ANÁLISE DO INSERTO DE CDNA

O produto de 525 pb amplificado via PCR foi digerido com as enzimas de restrição *EcoRI* e *XhoI*. O sistema da reação foi constituído de 55 ng de cDNA, 12U de enzima *EcoRI* e 8U da enzima *XhoI*, 1X de tampão próprio e água Milli-Q para um volume final de 30 µL. O produto da digestão foi separado por eletroforese em gel de agarose.

### IV.2.12.3 - LIGAÇÃO DO CDNA AO VETOR DE EXPRESSÃO pGEX-4T-3

O produto de 525 pb amplificado via PCR, digerido com as enzimas de restrição *EcoRI* e *XhoI*, foi subclonado nos sítios *EcoRI/XhoI* do vetor pGEX-4T-3 para construir pGEX-4T-3-LS. A razão molar da concentração de DNA do vetor e do fragmento cDNA foi de 1:5. O sistema foi composto de: 1,8 µL do inserto a 10 ng/µL; 1,2 µL de vetor pGEX-4T-3 a 25 ng/µL; 5 µL de tampão de ligação(T4) 1 X ; 1 µL de ATP 10 mM e 1 µL de T4 DNA ligase 4 U .O sistema foi incubado a 16°C por 16 h e depois armazenado a 4°C.

O plasmídeo recombinante foi utilizado para transformação em células competentes *E.coli* BL21 por choque térmico.

#### **IV.2.12.4–PREPARO DE CÉLULAS COMPETENTES PARA TRANSFORMAÇÃO POR CHOQUE TÉRMICO EM *E.coli* BL21**

O método utilizado para preparo de células competentes foi descrito por **INOUE *et al.* (1990)**. Uma colônia de *E.coli* BL21 foi crescida em 5 mL de meio LB líquido, a 37°C, sob agitação de 150 rpm por 16 h. Uma alíquota de 0,5 mL dessa cultura foi inoculada em 250 mL de meio SOB em um frasco com capacidade para 1.000 mL e incubada a 37°C, sob agitação de 150 rpm, até atingir a D.O. de 0,5 em comprimento de onda de 600 nm. O frasco foi então retirado do agitador e levado a um banho de gelo onde se procedeu ao resfriamento da cultura por 10 min. As células foram em seguida coletadas por centrifugação a 5000 g a 4°C, por 5 min e ressuspensas cuidadosamente em 30 mL de CaCl<sub>2</sub> 100 mM a 4°C e a cultura foi deixada no gelo por mais 30 min. As células foram novamente coletadas por centrifugação a 5000 g a 4°C, por 7 min e ressuspensas gentilmente em 30 mL de CaCl<sub>2</sub> 100 mM com 15% de glicerol, gelado. Após esse período a cultura foi alíquotada em quantidades de 200 µL, congelada em nitrogênio líquido e estocada a - 80°C até o momento do uso.

#### **IV.2.12.5 – TRANSFORMAÇÃO DE CÉLULAS *E.coli* BL21 POR CHOQUE TÉRMICO**

O método utilizado para a transformação foi descrito por **SAMBROOK *et al.*, (1989)**. Para a transformação as bactérias foram retiradas do freezer -80°C e deixadas no gelo por 10 min. O sistema foi constituído de 200 µL de células competentes e 4 µL do sistema de ligação. O material foi incubado em gelo por 45 min, e a seguir foi dado um choque térmico à temperatura de 42°C por 1 min e 15 seg. Imediatamente as células foram retornadas ao gelo. Adicionou-se ao sistema 300 µL de meio SOC e glicose a 20 mM, incubando-se sob lenta agitação, a 37°C, por 1 h, com a finalidade de se recuperar as células transformadas. Após este período, o sistema foi semeado em placas de Petri contendo meio LB ágar com ampicilina a 100 µg/mL e glicose a 20 mM. As placas foram incubadas em estufa a 37°C por

16 a 18 h. Para confirmação da clonagem, uma colônia foi submetida à reação de PCR e o produto analisado em gel de agarose 0,8% .

#### **IV.2.13 – EXPRESSÃO HETERÓLOGA DA PROTEÍNA RECOMBINANTE**

##### **IV.2.13.1 – INDUÇÃO DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE**

###### **rPBLs-GST**

Células de *E. coli* BL21(DE3) transformadas com o plasmídeo pGEX-4T-3 contendo o cDNA *Pbls* foram semeadas em placas de Petri contendo meio LB ágar com ampicilina a 100 µg/mL e glicose a 20 mM. As placas foram incubadas em estufa a 37°C por 16 a 18 h. Uma única colônia de *E.coli* foi inoculada em meio líquido LB contendo ampicilina a 100 µg/mL e glicose 20 mM, e incubada a 37°C por 16 a 18 h, a 120 rpm. O material crescido foi diluído 1:100 em 250 mL de meio líquido LB. Incubou-se a 37°C com agitação vigorosa até atingir a D.O. de 0,7–0,8, no comprimento de onda de 600 nm. Uma alíquota desse material foi retirada para se avaliar o nível de expressão protéica basal na ausência do indutor, por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida. Em seguida, adicionou-se IPTG na concentração final de 0,05 mM, prosseguindo-se com incubação adicional por 16 h a temperatura de 15°C. A cultura foi centrifugada a 3000 g por 10 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 50 µL de PBS 1X gelado para cada 1 mL da cultura. Uma alíquota desse material foi analisada em gel de poliacrilamida e o restante foi estocado a –20°C.

##### **IV.2.13.2– SOLUBILIZAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE**

O material obtido foi incubado com Lisozima na concentração final de 100 µg/mL, por 30 min. O material foi transferido para um sonicador Branson Ultrasonic Cleaner–Branson 2210R, até ocorrer o rompimento das células de *E. coli* e conseqüente liberação das proteínas. Para se amplificar o processo de lise, acrescentou-se ao material pérolas de vidro com subseqüentes agitações no vortex. O processo de lise celular foi visualizado em microscópio óptico pela montagem de lâminas do material, que foram coradas

com fucsina (**MERCK**), a cada 5 min. Após 60 min de sonicação e solubilização, o lisado de *E. coli* foi filtrado em sistema Millipore (0,45 µm). Em seguida centrifugou-se o material a 3000 g por 20 min a 4°C. Coletou-se a fração solúvel que foi estocada a -20°C. Procedeu-se a análise de uma alíquota do material em gel de poliacrilamida.

### **IV.2.13.3 – PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE**

#### **IV.2.13.3.1 – PREPARAÇÃO DA RESINA**

A proteína de fusão foi purificada do lisado bacteriano por cromatografia de afinidade sob condições não desnaturantes, usando-se Glutathione Sepharose 4B contida no sistema Bulk GST Purification Module. Para a preparação da resina de Glutathione Sepharose 4B, 1,33 mL do material foi centrifugado por 5 min. a 500 g. O sobrenadante foi descartado e a resina foi lavada 3X pela adição de 10 mL PBS 1X, gelado. Posteriormente, a resina foi ressuspensa com 1 mL de PBS 1X gelado.

#### **IV.2.13.3.2 - PURIFICAÇÃO E CLIVAGEM DA PROTEÍNA rPBLs**

Após preparação da resina adicionou-se o lisado de *E.coli* que foi sonicado e solubilizado (item IV.2.11.2), na proporção especificada na **Tabela 3**. Esta mistura foi incubada a temperatura ambiente por 1 h, seguida de suave centrifugação e lavagens da resina com 5 ml de PBS 1X, gelado, para cada mL de resina. Em seguida a proteína recombinante foi clivada pela adição de 50 µL Trombina protease (50 unidades de clivagem) (**Amersham Pharmacia Biotech®**) e 1,95 mL de PBS 1X. A reação foi incubada à temperatura ambiente por 16 h. Após esse período coletou-se o material cromatografado através da coluna. A pureza e o tamanho da proteína recombinante foram avaliados em gel de poliacrilamida com gradiente de concentração de 5% à 15%, segundo a descrição de **LAEMMLI (1970)**.

**Tabela 3** – Componentes e volumes usados para purificação da proteína.

<b>Componentes</b>	<b>Volume</b>
Volume de cultura	1 L
Volume de sonicado	50 mL
Glutathione Sepharose 4B	2 mL
PBS 1X	10 mL
Trombina 1U/ $\mu$ L	0,05 mL

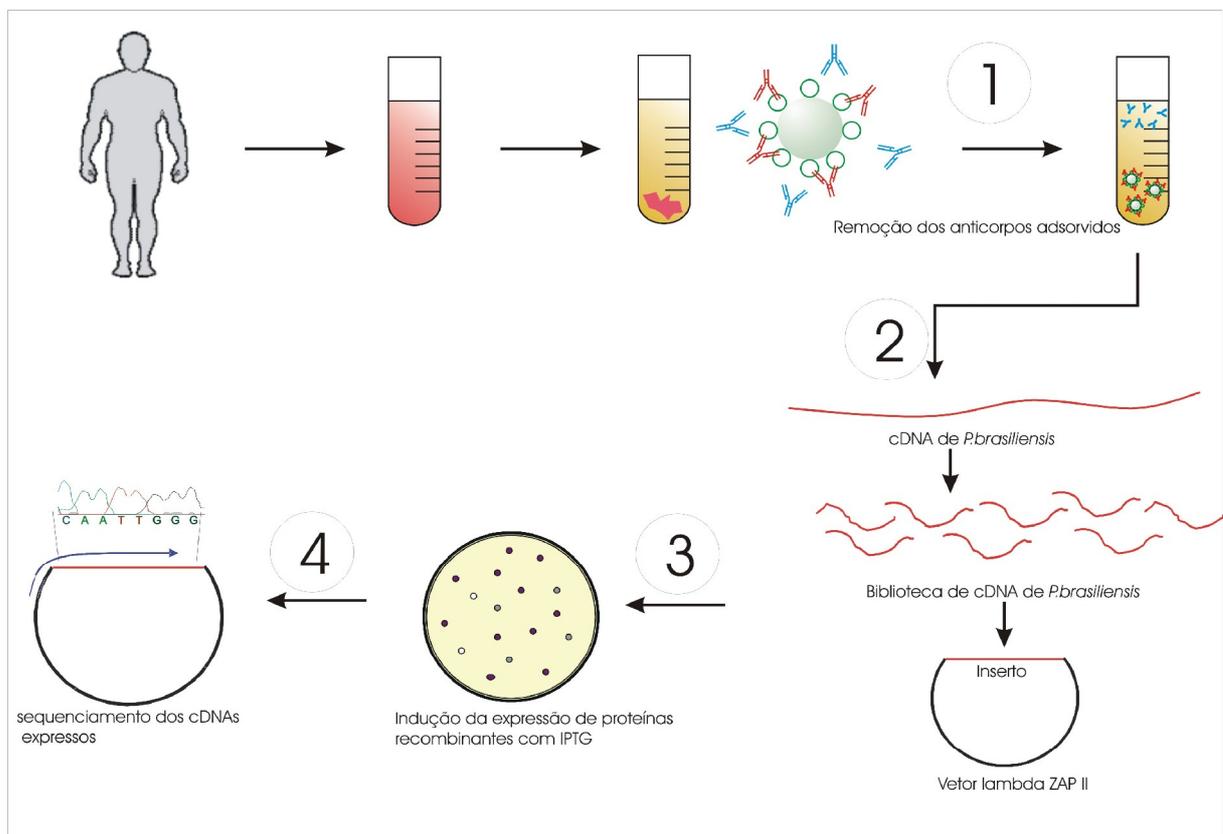
#### **IV.2.13.4 – REATIVIDADE IMUNOLÓGICA DA LS RECOMBINANTE**

Após a purificação da LS recombinante, a mesma foi fracionada através de SDS-PAGE e transferida para membrana de Nitrocelulose. A reatividade imunológica foi testada com amostras de soros controle e soros de pacientes com PCM através da técnica de *Western blotting*, descrita no item IV-.2.6.

## V - RESULTADOS

### V.1-ESQUEMA EXPERIMENTAL DA TÉCNICA IVIAT (*In vivo* INDUCED ANTIGEN TECHNOLOGY)

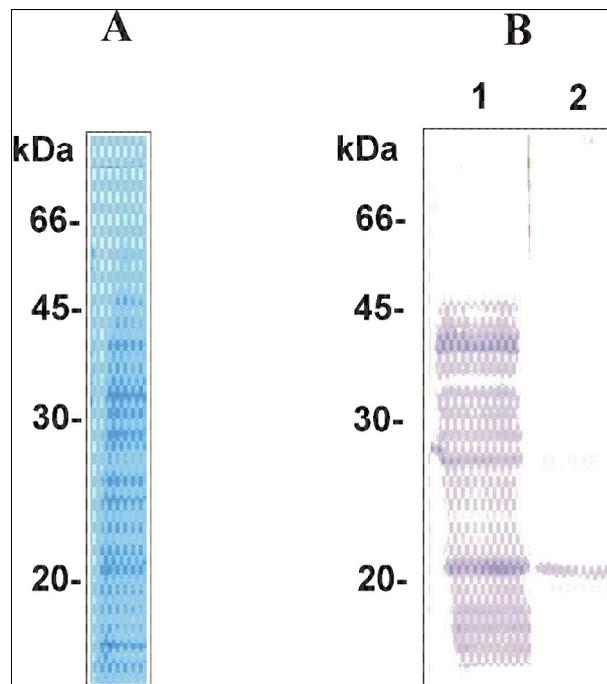
Os genes do *P. brasiliensis* provavelmente expressos durante a infecção foram rastreados utilizando-se a técnica do IVIAT (HANDFIELD *et al.*, 2000). Nessa técnica, os soros dos pacientes são misturados e adsorvidos com o patógeno crescido em condições de cultivo, com a finalidade de se remover os anticorpos que reconhecem antígenos expressos *in-vitro*. Uma biblioteca de expressão representativa do patógeno é utilizada e rastreada com uma combinação de soros de pacientes coletados durante a infecção e, posteriormente, adsorvidos com o patógeno crescido *in-vitro*. Os clones reativos serão submetidos à identificação e caracterização. A **Figura 1** representa um resumo da estratégia de IVIAT.



**Figura 1—*In-vivo* Induced Antigen Technology (IVIAT).** Soros de pacientes com PCM foram misturados e adsorvidos com extrato total de células leveduriformes de *Pb* 01 crescido *in-vitro* (passo 1). Uma biblioteca de expressão da fase leveduriforme de *P. brasiliensis* (ATCC MYA826) foi construída no vetor lambda ZAP II (passo 2) e as proteínas expressas foram rastreadas com soro adsorvido (passo 3). Clones reativos foram purificados e sequenciados (passo 4).

## V.2-ADSORÇÃO DOS SOROS DE PACIENTES PORTADORES DE PCM COM EXTRATO DE *E.coli*

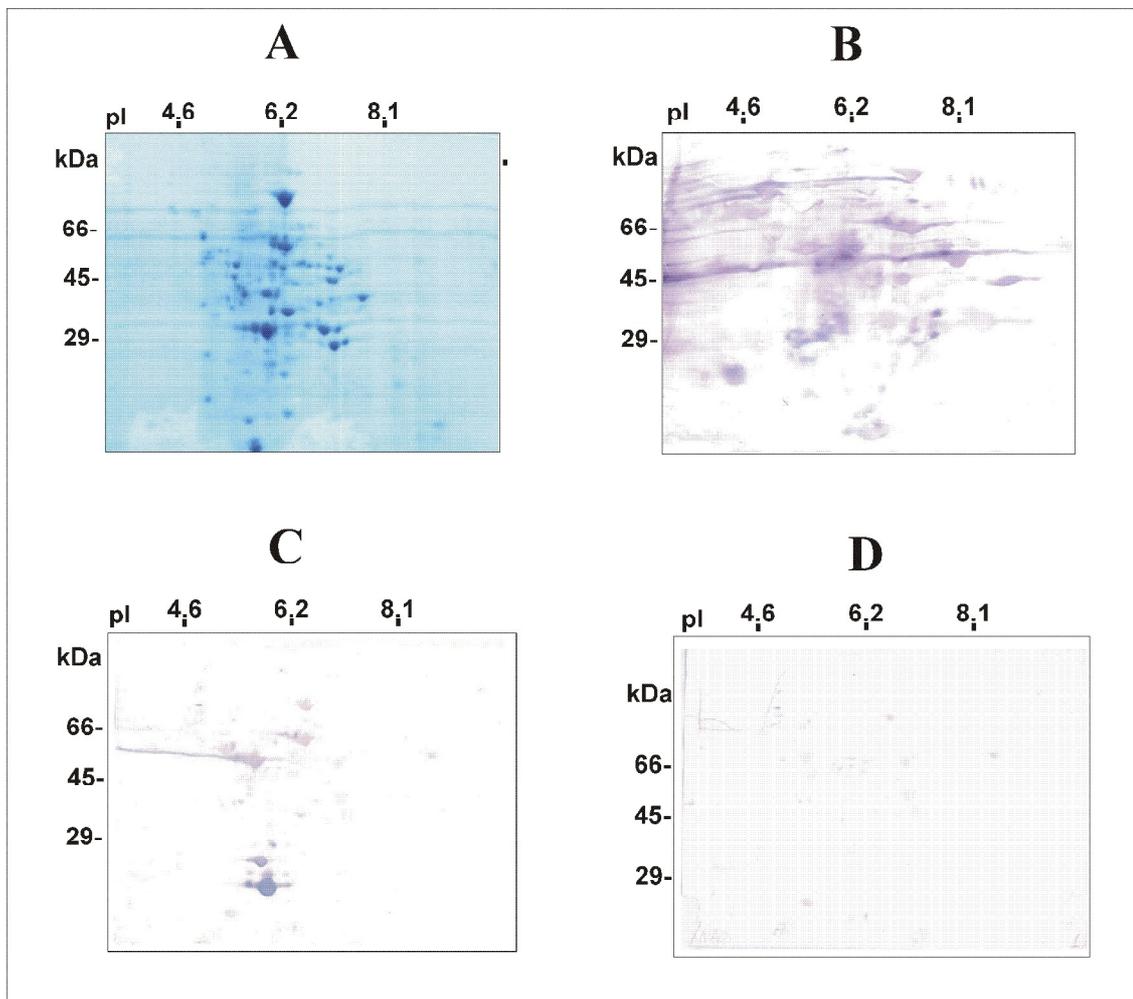
Uma combinação de soros de pacientes com PCM foi adsorvido com extrato de células *E. coli* XL1-Blue MRF'. Como mostra a **Figura 2B (Linhas 1 e 2)**, considerável declínio na reatividade com proteínas de *E.coli* foi observado após a adsorção dos soros.



**Figura 2 – Análise de proteínas de extrato de *E.coli* através de eletroforese unidimensional e de *Western blotting*.** 20 µg de extrato de células *E.coli* XL1-Blue MRF' foram fracionados através de eletroforese unidimensional. (A) proteínas coradas por azul de *Coomassie*. (B) *Western blotting* (Linha 1) reação com soros de pacientes com PCM não adsorvidos e diluídos à concentração de 1:100; (Linha 2) reação com soros de pacientes com PCM adsorvidos com extrato de *E.coli* e diluídos à concentração de 1:100. As proteínas foram reagidas com anticorpo secundário anti-IgG humano acoplado à fosfatase alcalina. A reação foi revelada com BCIP/NBT.

### V.3-ADSORÇÃO DOS SOROS DE PACIENTES PORTADORES DE PCM COM EXTRATO CELULAR TOTAL DE *P.brasiliensis*

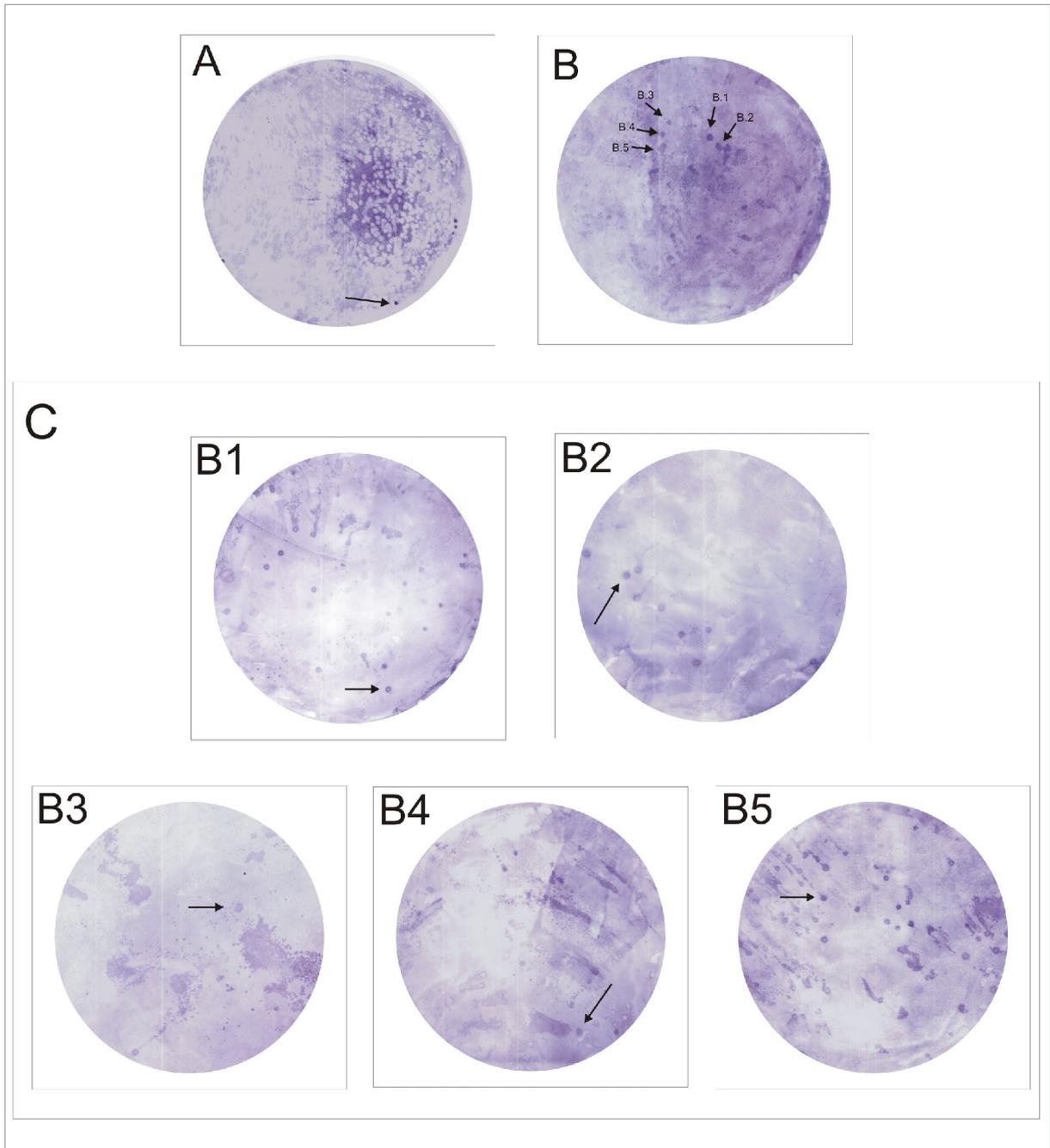
Uma combinação de soros de pacientes com PCM foi adsorvido com extratos protéicos totais de células leveduriformes de *P.brasiliensis*, isolado *Pb* 01 (ATCC-MYA-826) crescidas *in-vitro*. Como mostra a **Figura 3 (Painéis B e C)**, declínio na reatividade das proteínas do *P.brasiliensis* foi observado após a adsorção dos soros.



**Figura 3 – Análise das proteínas de *P.brasiliensis* através de eletroforese bidimensional e de *Western blotting*.** 200 µg de extrato protéico de células leveduriformes de *P.brasiliensis* foram fracionados através de eletroforese bidimensional. (A): Proteínas coradas por azul de *Coomassie*. (B, C e D): *Western blotting* (B) - reação com soros de pacientes com PCM não adsorvidos e diluídos à concentração de 1:100; (C) - reação com soros de pacientes com PCM adsorvidos com extrato de células leveduriformes de *P.brasiliensis* e diluídos à concentração de 1:100; (D) - reação com soros de indivíduos controle. As proteínas foram reagidas com anticorpo secundário anti-IgG humano acoplado à fosfatase alcalina. A reação foi revelada com BCIP/NBT. Os números na parte superior indicam o pH da primeira dimensão e os da esquerda são relativos ao marcador de massa molecular de segunda dimensão (SDS-PAGE).

#### V.4–RASTREAMENTO IMUNOLÓGICO DA BIBLIOTECA DE cDNA

Aproximadamente  $1 \times 10^5$  fagos da biblioteca de cDNA, construída em  $\lambda$  Zap II, foram rastreados com soros de pacientes com PCM adsorvidos com extrato de *E.coli* e células leveduriformes de *P.brasiliensis*. Os clones que mostraram forte sinal foram selecionados e identificados sua posição na placa mestra. No rastreamento primário, um clone (**Figura 4, Painel A**) foi coletado em tampão SM contendo clorofórmio e, depois, submetido ao rastreamento secundário (**Figura 4, Painel B**). Cinco clones positivos foram submetidos ao rastreamento terciário (**Figura 4, Painel C**.) Um clone positivo de cada placa (**Figura 4, Painel C**), foi retirado e submetido à excisão *in-vivo* do fagomídeo pBluescript (**Stratagene Cloning Systems®**) em *E.coli* XL1 blue MRF'. A **Figura 4 (Painéis A, B e C)** mostra as três etapas de rastreamento dos clones de cDNA .



**Figura 4 – Etapas do rastreamento imunológico da biblioteca de cDNA utilizando-se a Tecnologia do IVIAT.** Bactérias *E. coli* XL1 Blue MRF<sup>r</sup> foram infectadas com fagos da biblioteca de cDNA de *P. brasiliensis* ( $\lambda$  Zap II) e incubados a 37°C até o início da lise. As placas de lise foram recobertas com membranas de Nitrocelulose saturadas com 10 mM de IPTG e incubadas por 12 h. As membranas foram tratadas com anticorpo primário (soros de pacientes com PCM adsorvidos com extrato celular total de *P. brasiliensis* e de *E. coli*) diluído à 1:100. O anticorpo secundário (Anti-IgG humano acoplado à fosfatase alcalina) foi adicionado à 1:2000 e a reação foi desenvolvida com BCIP/NBT. Uma região na placa do rastreamento primário (A) foi retirado e submetida ao rastreamento secundário (B). Cinco clones positivos (B.1, B.2, B.3, B.4 e B.5) foram retirados e retestados no rastreamento terciário (C).

## V.5 – IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE CDNAS DE *P.brasiliensis* CODIFICANTES DE PROTEÍNAS IMUNOGÊNICAS

### V.5.1 – SEQÜENCIAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE CLONES DE cDNA

A partir do rastreamento terciário da biblioteca de expressão um clone de cada placa (**Figura 4 C**) foi selecionado e submetido à excisão *in-vivo*. O DNA plasmidial do vetor pBluescript SK (Stratagene/La Jolla/USA) foi purificado e submetido ao seqüenciamento automático no aparelho Megabace 1000.

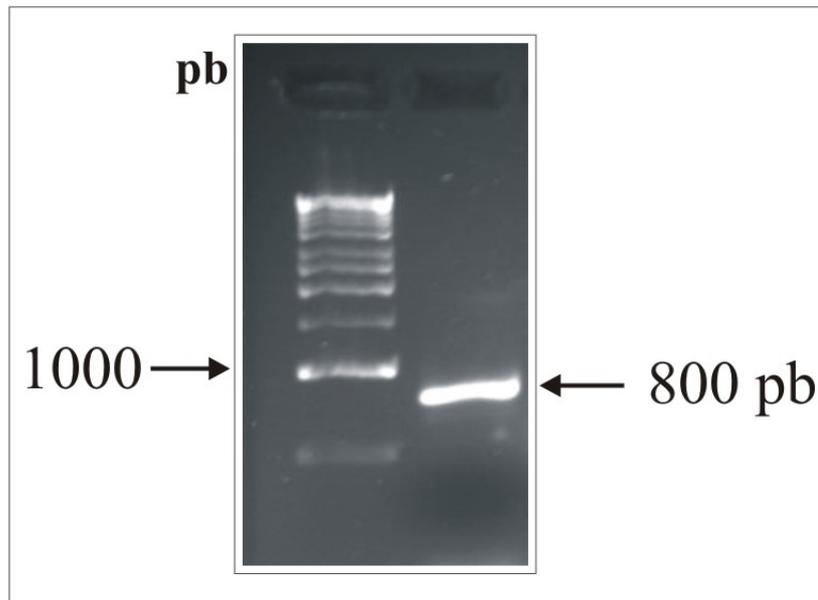
As seqüências de cDNA foram comparadas com outras depositadas em banco de dados. Um total de 627 nucleotídeos foram seqüenciados (**Figura 5**) apresentando 36 nucleotídeos não traduzidos na região 5' e 66 nucleotídeos não traduzidos na região 3'. A seqüência apresenta um único quadro de leitura aberto (ORF) codificando uma proteína de 174 aminoácidos com massa molecular predita de 18,8 kDa e pI de 6,61, segundo o programa "Peptide Mass" (**WILKINS *et al.*, 1997**). Uma forma abreviada do sinal de poliadenilação ATAA é identificada 28 nucleotídeos abaixo do códon de terminação TAG. A comparação em banco de dados mostrou identidade com o gene codificante para LS. Em função destes resultados o cDNA seqüenciado passou a ser denominado de *Pbls*. A seqüência foi depositada em banco de dados (GenBank) sob o número de acesso DQ081183.

```
1 M A T L K G L G V S E I H D G S T L R I A
-36 ttctcatatcatcccaactacatcaattttactcaaaATGCTACTCTCAAAGTTTGGAGTCTCTGAAATCCATGACGGATCCACTCTGCGCATCGCCA
22 I V H A R W N D T I I A A L V E G A K K A L L A A G V R G S N I V V
65 TCGTCCACGCGCTGGAATGACACCATAATCGCCGCCCTGGTGGAGGGGCGAAGAAGGCTCTGTTAGCCGCTGGTGTGCGGGGAGTAATATCGTTGT
56 Q S V P G S W E L P I A M E R I Y A G S Q S E Q P F D A M I A I G
165 GCAGAGCGTGCCGGGAGTTGGGAGTTGCCTATTGCTATGGAGAGAATATACGCCGCTCCAGTCCGAGCAGCCCTTCGACGCGATGATCGCCATTGGC
89 T L I K G E T M H F E Y I A D A V S H G L M R I Q L D K D V P V I
265 ACCCTAATAAAAGGAGAAACAATGCACTTCGAATACATCGCCGATGCTGTCTCCACGACTCATGCGCATACAACCTGATAAAGACGTACCTGTCATAT
122 F G V L T V L N E E Q A L V R A G L A K G E G S A G H N H G E D W G
365 TCGGGTGTGACGGTGTGAATGAGGAGCAAGCGCTGGTGGGGGGTCTGGCGAAGGGGAGGGGAGCGCAGGACATAATCATGGGAGGACTGGGG
156 R A A V E L G V K R K Q W A M G K F S @
465 ACGCGCTGCGGTTGAGCTTGGTGTGAAGAGGAAGCAGTGGGCAATGGGGAAGTTTTCGTTAGgggtgtagacacgcatatggtatggttatataatggtggtt
565 ttatttagtttgaaaaaaaaaaaaaaa
```

**Figura 5:** Seqüência de nucleotídeos do cDNA do *P. brasiliensis* de 627 pb, codificante para LS. Os oligonucleotídeos senso e anti-senso (S-4T3 e AT-4T3) construídos para amplificação e obtenção do DNA genômico estão sublinhados. Os códons de iniciação e terminação estão em retângulo pontilhado. A região 3' mostra a seqüência de nucleotídeos consenso para adição de cauda Poli-A e estão marcados em caixa dupla.

## V.6 - OBTENÇÃO DE FRAGMENTO GENÔMICO CODIFICANTE DA LS, VIA PCR

O DNA genômico total de *P. brasiliensis* foi amplificado, via PCR, com o objetivo de se obter um fragmento genômico codificante da LS. Para isso, foram construídos oligonucleotídeos AT-4T3 e S-4T3 (**Tabela 1**) baseados na seqüência dos nucleotídeos de seqüência de cDNA. A **Figura 6** mostra o fragmento amplificado de 800 pb, que foi quantificado e eluído do gel de agarose 0,8%, e em seguida, clonado em vetor pGEM-T-Easy (**Promega Co., Madison, USA**) para posterior sequenciamento.



**Figura 6 – Produto de PCR obtido por amplificação do DNA genômico:** Análise por eletroforese em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídeo, do fragmento de 800 pb, obtido por amplificação do DNA genômico total de *P. brasiliensis*, utilizando-se os oligonucleotídeos AT-4T3 e S-4T3. O fragmento foi subclonado em vetor pGEM-T-Easy (Promega) e submetido a sequenciamento. Os números a esquerda referem-se ao padrão de tamanho “1 Kb Ladder” (GIBCO™ Invitrogen Corporation) e a seta à direita refere-se ao tamanho calculado do fragmento obtido.

Após o sequenciamento a seqüência genômica completa foi obtida e comparada com a cDNA utilizando-se o programa BLAST (ALTSCHUL *et al.*, 1990), como mostra a **Figura 7**. As análises revelaram um total de 800 pb, codificando uma proteína de 174 resíduos de aminoácidos (*Pbls*) e depositada em banco de dados (GenBank) sob o número de acesso DQ186604. O gene homólogo do *P.brasiliensis* contém três exons interrompidos por dois íntrons. O primeiro íntron possui 110 pb e localiza-se na posição 80-189; o segundo possui 165 pb e localiza-se na posição 320-484. Todas as seqüências intervenientes são flanqueadas por 5' GT e 3' AG (**Figura 7**).

```

1 M A T L K G L G V S E I H D
-36 ttctcatatcatcccactacatcaattttactcaaaaATGGTACTCTCAAGGTTTGGGAGTCTCTGAAATCCATGACGgtatgcaatacaccatacgc
15 G S T L
65 actcacgccaatgcaatcgataaccccgaccataccaaccaatgtaacaaaatgtcaaatatataatataatataatataatgtataggATCCACTCTG
19 R I A I V H A R W N D T I I A A L V E G A K K A L L A A G V R G S
165 CGCATCGCCATCGTCCACGCGCTGGAATGACACCATAATCGCCGCCCTGGTGGAGGGGCGAAGAAGGCTCTGTTAGCCGCTGGTGTGCGGGGAGTA
52 N I V V Q S V P G S W E L P I A M E R
265 ATATCGTTGTGCAGAGCGTCCGGGGAGTTGGGAGTTGCCTATTGCATATGGAGAGgtattgtattcccatacttttcttattgtctgcttggatcggagt
365 gtcggccatggtgtggattttcaatgcatataaattatccgatttatgggattcctttgaggtttggtgcaaggggagagtggtgcatatcatggcatt
71 I Y A G S Q S E Q P F D A M I A I G T L I K G E T M
465 aaaaaaaggcccaatataagAATATACGCCGGTCCAGTCCGAGCAGCCCTTCGACGCGATGATCGCCATTGGCACCTAATAAAAGGAGAAAACAATGC
97 H F E Y I A D A V S H G L M R I Q L D K D V P V I F G V L T V L N E
565 ACTTCGAATACATCGCCGATGCTGTCTCCACGGCCTCATGCGCATAACAACCTCGATAAAGACGTACCTGTTCATATTGGGGTGTGACGGTGTGAATGA
131 E Q A L V R A G L A K G E G S A G H N H G E D W G R A A V E L G V
665 GGAGCAAGCGCTGGTGGGGGGGTCTGGCGAAGGGGAGGGGAGCGCAGGACATAATCATGGGAGGACTGGGGACGCGCTGCGGTTGAGCTTGGTGTG
164 K R K Q W A M G K F S @
765 AAGAGGAAGCAGTGGGCAATGGGGAAGTTTTCGTAGggtgtagacacgcatatggttatgtttatataaatgtggttttatttagtttg
```

**Figura 7 - Seqüência de nucleotídeos do fragmento genômico, de cDNA e da seqüência de aminoácidos da *PbLS*.** O sequenciamento dos nucleotídeos revelou 800 pb codificando uma proteína de 174 resíduos de aminoácidos caracterizada como LS. A região sombreada representa os oligonucleotídeos construídos para amplificação da seqüência descrita. Os íntrons estão representados em letras minúsculas e os nucleotídeos em itálico indicam a seqüência conservada consenso 5' e 3' dos íntrons. A numeração para a seqüência dos aminoácidos começa com a metionina codificada pelo primeiro códon de iniciação e termina no códon de terminação, ambos sublinhados.

### V.6.1–ANÁLISES COMPARATIVAS DOS AMINOÁCIDOS DA PROTEÍNA DE 18,8 KDA E PI DE 6,61 COM SEQÜÊNCIAS DEPOSITADAS EM BANCOS DE DADOS

A seqüência de aminoácidos que codificam para *PbLS* foi comparada com outras seqüências depositadas no banco de dados. As análises computacionais revelaram identidade com LS de *Magnaporthe grisea*, *Neurospora crassa*, *Gibberella zea* e *Cryptococcus neoformans var. neoformans* (**Tabela 4**). Os valores de identidade entre a seqüência deduzida de aminoácidos de *PbLS* e outras depositadas em bancos de dados variaram entre 46% a 59%.

**Tabela 4** – Comparação entre a seqüência deduzida de aminoácidos do *PbLS* com outras depositadas em banco de dados.

<i>SEQÜÊNCIA</i>	<i>Acesso GenBank</i>	<i>Identidade (%)</i>	<i>Similaridade (%)</i>
<i>M.grisea</i>	XM_362181.1	59%	68%
<i>N.crassa</i>	XP_332062.1	59%	64%
<i>G.zea</i>	AACM01000058.1	58%	68%
<i>C.var.neoformans</i>	AE0173	46%	60%

A seqüência deduzida de aminoácidos de *PbLS* também foi comparada com outras através de alinhamento, utilizando-se o programa CLUSTAL X (**THOMPSON et al., 1997**), como mostra a **Figura 8**. Na seqüência de aminoácidos foram observadas regiões de identidade entre a LS de *P.brasiliensis* quando comparada com LS de *M. grisea*, *N. crassa*, *G. zea* e *C. neoformans var. neoformans*.

O alinhamento (**Figura 8**) mostra que existem quatro resíduos invariantes, Gly<sup>60</sup>(Glicina), Gly<sup>88</sup>, Pro<sup>119</sup>(Prolina) e Gly<sup>138</sup> na LS de *P.brasiliensis*, em concordância com outras seqüências. A LS contém 20 resíduos de glicina, sendo 13 altamente conservados. Das 4 prolinas, 3 são altamente conservadas. Na LS de *M. grisea*, os resíduos de glicina são necessários para manutenção da dobra da hélice e para arquitetura do sítio ativo (**PERSSON et al., 1999**). Os aminoácidos que provavelmente fazem parte do sítio ativo são bem conservados e estão destacados na **Figura 8**. O provável sítio catalítico foi identificado nas posições Trp<sup>27</sup>, His<sup>97</sup> e Arg<sup>136</sup> e mostraram-se bastante conservados em todas as LS homólogas. Os aminoácidos Lys<sup>135</sup> (Lisina) e Glu<sup>138</sup> (Glutamato) foram encontrados na *PbLS*, mas em locais distantes, nas posições 141 e 131, respectivamente. Estudos de mutação com

esses dois aminoácidos inativaram completamente a LS de *A. aeolicus* (ZHANG *et al.*, 2003). Dois sítios possíveis de fosforilação foram encontrados nas posições 3-5 e 17-19. Aminoácidos envolvidos na glicosilação estão presentes na posição 28-31.

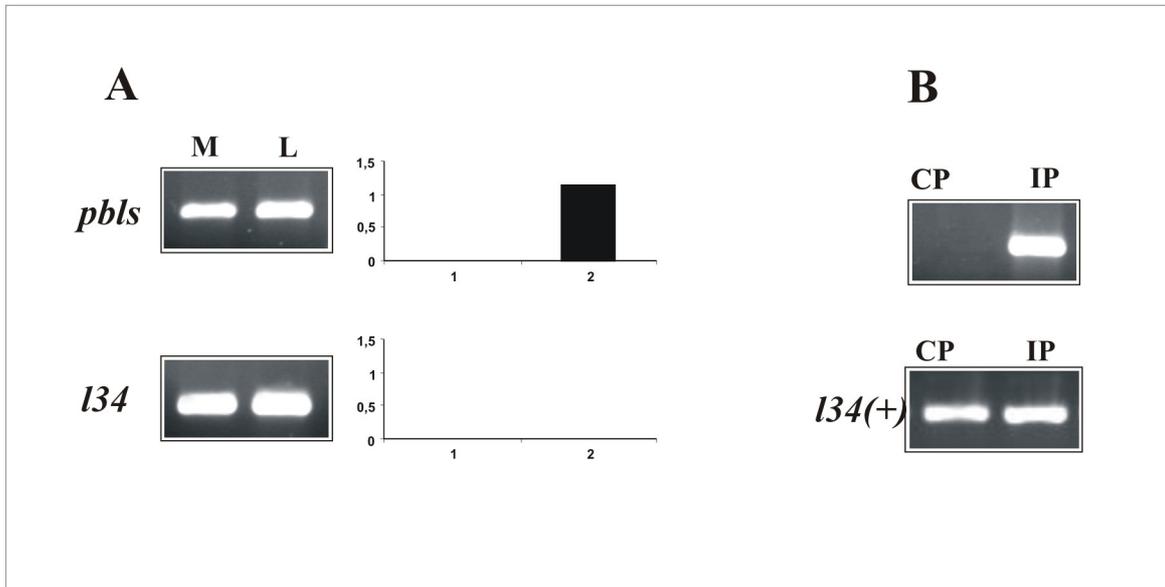
Os resíduos de aminoácidos envolvidos na ligação ao anel aromático da pirimidina e ao grupo ribitol, ambos do substrato 1, foram encontrados na *PbLS* e mostram-se conservados. Diversos resíduos responsáveis pela estabilidade do pentâmero na LS de *B.subtilis* também foram encontrados na *PbLS* e são mostrados na **Figura 8**.

A **Figura 8** mostra a comparação da *PbLS* com seqüências de LS de outros Eucariotos.



## V.7 – ANÁLISE DE EXPRESSÃO DA LS POR RT-PCR SEMIQUANTITATIVO

A quantificação relativa dos níveis de expressão gênica envolveu a otimização da reação de RT-PCR. A análise semiquantitativa dos diferentes níveis de expressão de mRNA entre as fase micélio e levedura foi realizada com à relação da diferença de intensidade entre o produto amplificado por RT-PCR em micélio e levedura, usando o programa Scion Image Beta 4.03. Como mostra a **Figura 9 (Painel A)** o transcrito codificante de *Pbls* foi 1,15 vezes mais expresso na fase leveduriforme, quando comparado com a forma miceliana. O transcrito l34 utilizado no controle da reação teve sua expressão constante. O **Painel B** mostra a amplificação de *Pbls* em pneumócitos infectados com *P.brasiliensis* na forma leveduriforme, sugerindo que esse transcrito seja expresso durante a infecção do fungo em tecidos do hospedeiro. Um controle da cultura de pneumócitos foi realizado e não apresentou a presença do *Pbls* (**Figura 9- Painel B**).

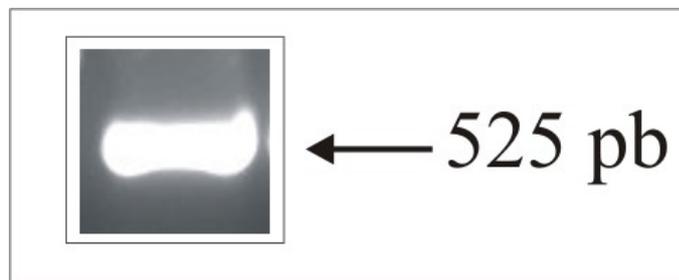


**Figura 9 – Validação dos resultados IVIAT por RT-PCR semiquantitativa.** A análise de RT-PCR foi realizada com oligonucleotídeos específicos, como descrito. **Painel A:** Os números na barra indicam uma diferença relativa entre a expressão do gene *Pbls* em leveduras e de micélio, estabelecido por análise densitométrica. Nomes dos clones estão escritos à esquerda da figura. Os tamanhos dos fragmentos amplificados foram: *Pbls* (525 pb); *l34*(398 pb). Amostras de cDNA utilizadas foram extraídas de RNAs de: células leveduriformes (L) cultivadas *in-vitro*, micélio (M) cultivado *in-vitro*. A proteína *L34* foi utilizada como controle interno da reação e não mostrou variação. **Painel B:** Detecção do transcrito de *Pbls* (525 pb) em pneumócitos humanos infectados com levedura de *P.brasiliensis*. **IP**-pneumócitos infectados, **CP**-cultura controle de pneumócito. Reações controle foram realizadas com oligonucleotídeos da proteína ribossomal *l34* (*l34 C+*) de pneumócitos.

## V.8 – EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE PBLs

### V.8.1 – CLONAGEM DO CDNA EM VETOR DE EXPRESSÃO PGEX-4T-3

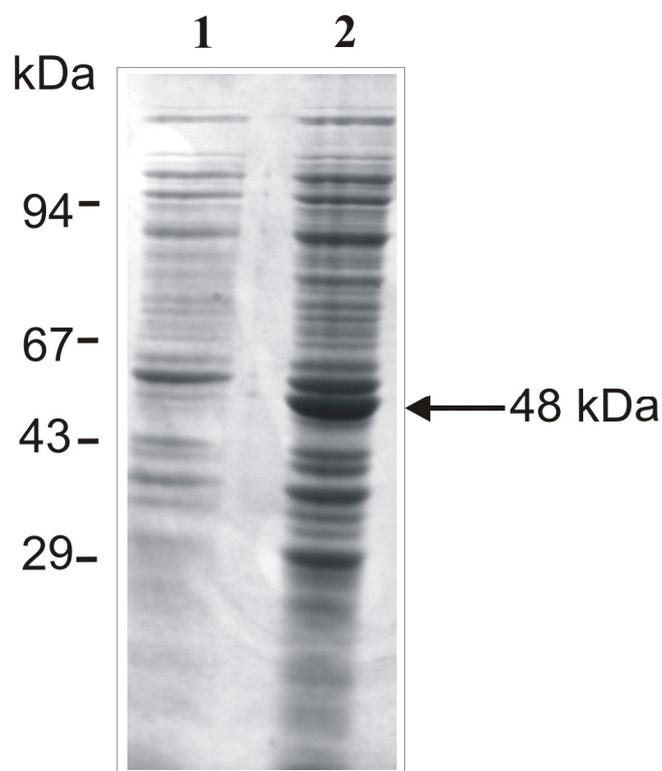
O cDNA codificante de *Pbls* foi digerido com as enzimas de restrição *EcoRI* e *XhoI* e clonado em fase de leitura no vetor de expressão pGEX-4T-3 para obter uma construção pGEX-4T-3-*ls* em fusão com a proteína glutathione S transferase (GST). Após a transformação de *E.coli* BL21(DE3) uma colônia bacteriana foi submetida à amplificação via PCR, utilizando-se os oligonucleotídeos S-4T3 e AT-4T3, e em seguida, os produtos foram analisados em gel de agarose 0,8% (**Figura 10**). O tamanho do fragmento esperado corresponde a 525 pb, o que confirma a clonagem.



**Figura 10** – Análise eletroforética da transformação do plasmídeo pGEX-4T-3-*ls* em *E.coli* BL21. Uma colônia proveniente da transformação em *E.coli* BL21 foi submetida à amplificação via PCR, realizada com os oligonucleotídeos S-4T3 e AT-4T3. Após a amplificação, parte do sistema da reação foi analisada em gel de agarose 0,8%. O número à direita refere-se ao tamanho calculado do produto amplificado.

### V.8.2 – ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA rPbLS

A síntese da proteína recombinante fusionada à GST foi induzida com 0,05 mM de IPTG. A análise da expressão da rPbLS de *P. brasiliensis* foi realizada através eletroforese unidimensional dos produtos protéicos induzidos em um clone da bactéria *E. coli* BL 21 contendo o plasmídeo pGEX-4T-3-PbIs. Uma proteína de 48,8 kDa (referente à massa molecular da proteína de fusão de 29 kDa da GST e 18,8 kDa da PbLS) foi observada no clone induzido pela adição de 0,05 mM de IPTG (**Figura 11, Linha 2**).

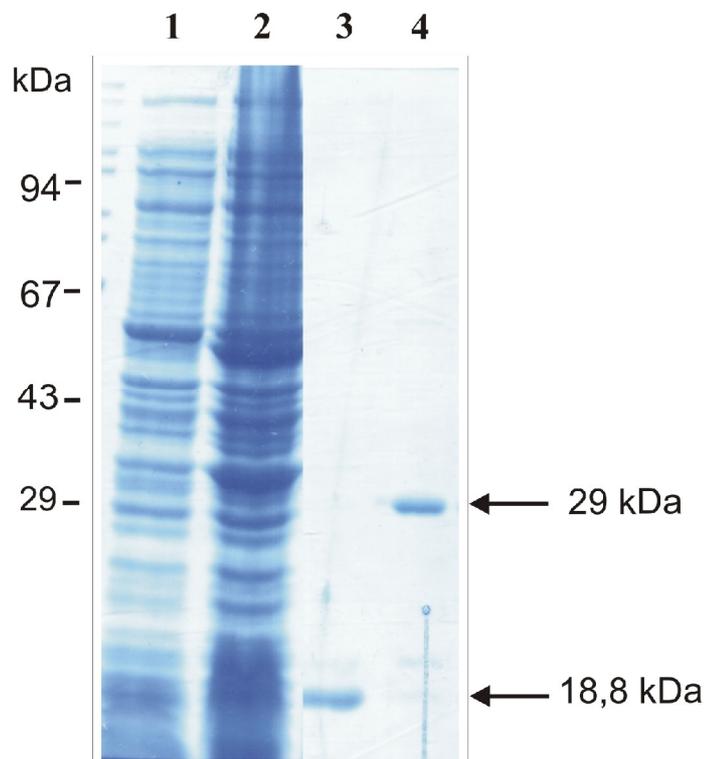


**Figura 11**–Análise em SDS-PAGE da Expressão da rPbLS. Células da bactéria *E. coli* BL 21 contendo o plasmídeo pGEX-4T-3-PbLS foram crescidas a 37°C até atingir uma D.O.<sub>(600 nm)</sub> de 0,7-0,8 e coletadas antes (Linha 1) e após (Linha 2) a incubação por 16 h a 15°C com IPTG 0,05 mM.. As proteínas foram fracionadas em eletroforese unidimensional sob gradiente de 5% e 15% e coradas por azul de *Coomassie*. Os números à esquerda representam o marcador de massa molecular e a direita referem-se a massa molecular da proteína recombinante.

### V.8.3 - PURIFICAÇÃO E CLIVAGEM DA PROTEÍNA rPbLS

O vetor pGEX-4T-3 possui um promotor *tac* que é quimicamente indutível e contém sítios para reconhecimento para Trombina, sendo possível separar a GST da proteína de interesse (**Protocolo Kit Bulk GST Purification Module–Amersham Pharmacia Biotech®**).

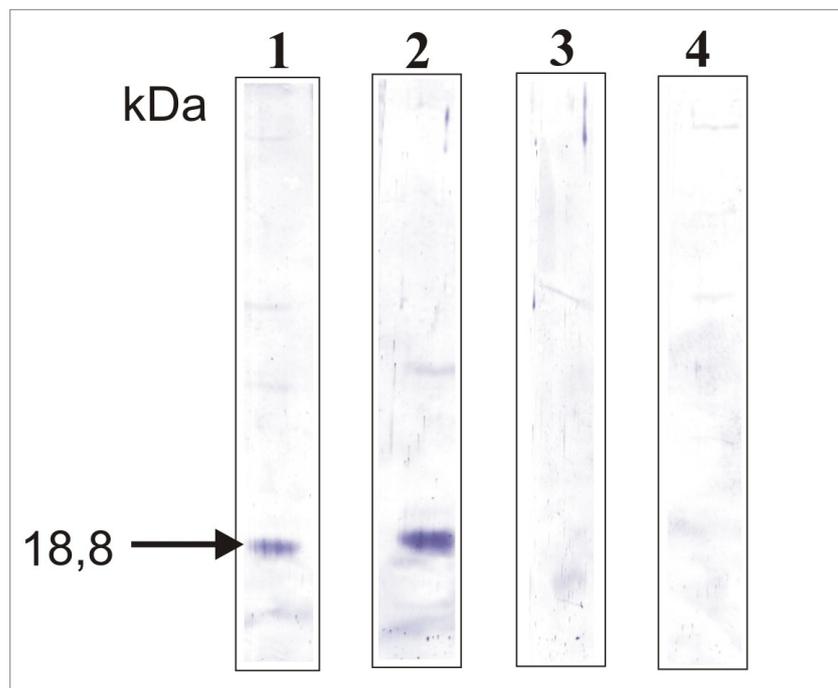
A proteína de fusão rPbLS-GST produzida em *E.coli* BL 21 foi inicialmente solubilizada e, em seguida, purificada através de cromatografia de afinidade em resina Glutathione Sepharose 4B (**Amersham Pharmacia Biotech®**). Após a proteína fusionada GST ter sido ligada à matriz, procedeu-se à clivagem ainda na coluna, pela adição de Trombina. Como pode observar-se na **Figura 12**, a proteína recombinante de 48,8 kDa, cuja expressão foi induzida por IPTG, foi purificada e clivada obtendo-se um produto de 18,8 kDa.



**Figura 12** – Análise em SDS-PAGE da proteína recombinante rPbLS. A proteína foi expressa em *E.coli* BL 21, ligada em resina Glutathione Sepharose 4B e clivada após adição de Trombina. O material foi fracionado em gel de gradiente 5% a 15 % (SDS-PAGE) e as proteínas coradas por azul de *Coomassie*. **Linha 1** - Extrato de *E.coli* BL 21 contendo o plasmídeo pGEX-4T-3-*ls*, na ausência de IPTG; **Linha 2** - Extrato de *E.coli* BL 21 contendo o plasmídeo pGEX-4T-3-*ls*, na presença de IPTG (0,05 mM); **Linha 3** - rPbLS purificada (18,8 kDa); **Linha 4** - Proteína de 29 kDa referente a GST. Os números à esquerda representam o marcador de massa molecular e à direita à massa molecular da proteína purificada e da GST.

## V.9 – ANÁLISE DA REATIVIDADE IMUNOLÓGICA DA PROTEÍNA PbLS RECOMBINANTE COM SOROS DE PACIENTES PORTADORES DE PCM

Para avaliarmos o potencial imunogênico da proteína recombinante *PbLS* testamos a reação da proteína *rPbLS* com soros de pacientes portadores de PCM, como mostra a **Figura 13**. A proteína de 18,8 kDa é reconhecida pelos soros de pacientes (**Linhas 1 e 2**) e não é reativa com soros controle (**Linhas 3 e 4**).



**Figura 13– Western blotting da proteína *rPbLS* com soros de pacientes com PCM.** A proteína *rPbLS* expressa em *E.coli* BL21, foi purificada e fracionada através de eletroforese unidimensional em gel de gradiente 5% e 15%. Em seguida, foi transferida para membrana de nitrocelulose, a qual foi reagida com soros de dois pacientes com PCM (diluídos 1:100) (Linha 1 e 2) e soros controle diluídos 1:100 (Linhas 3 e 4). Após reação com o anticorpo anti-IgG humano acoplado à fosfatase alcalina, procedeu-se a revelação por BCIP/NBT.

## VI – DISCUSSÃO

A interação entre fungos patogênicos e seus hospedeiros durante a infecção é muito complexa, envolvendo múltiplos fatores produzidos pelo patógeno e pelos mecanismos de resistência do hospedeiro (**THEIB *et al.*, 2002**). O patógeno é capaz de adaptar-se dentro da célula do hospedeiro causando, assim, a infecção. Qualquer função que contribua para a adaptação do fungo nesse ambiente pode ser percebida como um determinante de virulência e, sua seqüência de DNA cognata é definida como gene de virulência, os quais devem ser modulados por sinais genéticos e do micro ambiente (**MAHAN *et al.*, 2000**). Pouco é conhecido acerca da virulência do *P. brasiliensis*, mas sabe-se que diversos tipos de isolados influenciam a relação parasito-hospedeiro, como demonstrado por **ZACCHARIAS *et al.*, (1986)** e **FRANCO *et al.*, (1993)**.

Nosso objetivo foi identificar determinantes antigênicos que são mais expressos durante a infecção. Diversas tecnologias têm sido desenvolvidas para identificar esses genes. Essas incluem: (1) **IVET** (Tecnologia da expressão *in-vivo*), uma estratégia baseada na inserção aleatória de fragmentos DNA genômico de um patógeno em fase ao gene repórter *lacZ* (codifica a enzima  $\beta$ -galactosidase). O gene *lacZ* é fundido à região promotora do gene de interesse e a expressão desse gene irá permitir a sobrevivência do microorganismo dentro do modelo animal. Apenas os patógenos recuperados do hospedeiro que expressar o gene repórter, sob controle do gene induzido *in-vivo*, serão selecionados. (**HEITHOFF *et al.*, 1997**; **MAHAN *et al.*, 1995**; **MERRELL e CAMILLI, 2000**). (2) **RIVET** (Tecnologia da expressão *in-vivo* baseada na recombinase) é designada para monitorar a expressão gênica durante a infecção. É uma adaptação do IVET e é baseada na fusão transcricional de promotores dos genes induzidos *in-vivo*, expressos transitoriamente ou em baixos níveis. (3). **DFI** (Fluorescência da indução diferencial): é um método de seleção positiva dos genes induzidos *in-vivo* durante a infecção de culturas de células. Baseia-se na expressão da proteína fluorescente verde (GFP) como gene repórter e a expressão gênica é monitorada em tempo real. Nessa técnica, o fragmento do DNA genômico é fusionado aleatoriamente em fase ao gene *gfp* sem o promotor, seguido pela inserção no patógeno. O patógeno bactéria que tiver a fusão *gfp* e o DNA é selecionado para infectar células de mamíferos. O (4) **FACS** (Fluorescence activated cell sorting - rastreamento de células ativadas por fluorescência) é utilizado para identificar e isolar a bactéria que expressa a GFP fusionada, liberada das células lisadas e comparado com fluorescência do patógeno crescido em condições de cultivo. Tanto

o IVET quanto a DFI que não diferenciam genes que são expressos *in-vitro* daqueles expressos durante a infecção. São técnicas que baseiam-se na fusão transcricional e não detectam genes que são regulados a nível pós-transcricional (**HAUTEFORT e HINTON, 2000**). (4) **SMT** (Mutagênese direcionada a um seqüência): é uma técnica de seleção negativa utilizada na identificação de genes envolvidos na virulência e na sobrevivência intracelular, empregando-se transposons. Os mutantes são obtidos em cultura bacteriana e posteriormente, utilizados na infecção de macrófagos *in-vitro*, permitindo a verificação da incapacidade de se estabelecerem dentro das células. Tem a desvantagem de necessitar passagem por um animal. (5) **Hibridização subtrativa**: é baseada no isolamento de RNAm do patógeno crescido sob condições de cultivo (células infectadas ou modelo animal) e usado para gerar cDNA. Esse cDNA é utilizado para subtrair os genes constitutivamente expressos por hibridização. O cDNA não hibridizado é usado para identificar os genes induzidos *in-vivo*, do patógeno em estudo (**HAUTEFORT & HINTON, 2000**). (6) **DD** (apresentação diferencial) é uma técnica de hibr

idização subtrativa que envolve a construção de uma biblioteca de cDNA a partir do RNA mensageiro do patógeno crescido em diferentes condições. O cDNA do patógeno extraído do tecido infectado é hibridizado com a biblioteca de cDNA do patógeno crescido em condições de cultivo. Os cDNAs resultantes e específicos do hospedeiro são usados como sonda para isolar genes que são preferencialmente expressos no tecido do hospedeiro. Pode ser usado para detectar genes expressos *in-vivo* que são muito ou pouco regulados (**MAHAN et al., 2000**). Tanto a hibridização subtrativa quanto a DD não demonstram se a expressão de um gene particular é requerida para um aspecto particular da virulência, sendo necessário ser submetido a mutações genéticas e estudos de virulência num modelo apropriado. (7) **SAGE** (Análise serial da expressão gênica) envolve a extração do RNAm do tecido e a transcrição reversa para cDNA e pode ser usada para analisar e quantificar um grande número de transcritos (**VELCULESCU et al., 1995**). (8) **SCOTS** (Captura seletiva das seqüências transcritas) é um outro método de hibridização subtrativa desenvolvido para comparar indução gênica durante infecção em culturas de células ou em modelo animal. Tem a vantagem de detectar baixa quantidade de RNAm, mas não pode ser usado para quantificar níveis de expressão gênica *in-vivo* por necessitar de normalização do cDNA (**HAUTEFORT e HINTON, 2001**).

O IVIAT é uma nova técnica que permite identificar genes do patógeno que são induzidos durante infecção, sem a necessidade de passagem por um modelo animal ou *in-vitro* (**HAUTEFORT e HINTON, 2001**). O IVIAT é baseado no rastreamento imunológico

de uma biblioteca de expressão do patógeno em estudo com vários soros obtidos de pacientes infectados por este organismo (**HANFIELD *et al.*, 2000**). Em cada bateria de soros são retirados os anticorpos que reagem com proteínas constitutivamente expressas. O IVIAT é aplicável a todos os organismos procarióticos e eucarióticos e tem a grande vantagem de não utilizar modelo animal, além de ser uma técnica fácil e simples (**HAUTEFORT e HINTON 2001**). **CHENG *et al.*, (2003)** utilizaram a tecnologia de IVIAT para identificar possíveis genes envolvidos com a virulência de *C. albicans*. Foram identificados vários genes relacionados a processos biológicos e importantes para a sobrevivência do patógeno dentro do hospedeiro, incluindo genes relacionados a: regulação da morfogênese, adesão às células do hospedeiro, produção de nutrientes, biossíntese de fosfolípidios, catabolismo de aminoácidos e transporte. Nosso laboratório tem utilizado a técnica de IVIAT, que resultou previamente na identificação do gene codificante para DOPA descarboxilase de *P. brasiliensis* (dados não publicados) que catalisa, possivelmente, a conversão de triptofano a triptamina e CO<sub>2</sub>. Nesse estudo atual, nós identificamos um gene (lumazina sintase) que pode estar envolvido nos processos biológicos de oxidação e redução, que é crucial para a sobrevivência do patógeno.

Uma combinação de onze soros de pacientes com PCM foi adsorvido com extrato de células leveduriformes de *P. brasiliensis* crescidas *in-vitro*, para remoção de anticorpos reativos com proteínas expressas em condições de cultivo. Houve uma progressiva diminuição da reatividade, confirmando que a etapa de adsorção teve êxito. Os soros de 11 pacientes com diagnóstico clínico e imunológico (imunodifusão e imunoprecipitação) de PCM foram combinados para serem utilizados nos experimentos de adsorção e no rastreamento da biblioteca de expressão. Do total de onze soros coletados, dez foram provenientes de indivíduos do sexo masculino, todos eles com idade superior a trinta anos, sendo que apenas um apresentava disseminação da doença. Sangue de um indivíduo do sexo feminino com idade inferior a 30 anos foi coletado. Com relação à procedência, verificou-se que nove pacientes foram provenientes da zona rural, sendo todos relacionados às atividades agrícola e pecuária.

O rastreamento da biblioteca de expressão com os soros de pacientes adsorvidos resultou em 45 clones que foram reativos até o terceiro rastreamento imunológico. Um clone reativo foi aleatoriamente selecionado, isolado e seqüenciado. O cDNA apresentou homologia a lumazina sintase (LS) e apenas um quadro de leitura aberto (ORF) codificando para uma proteína de 174 aminoácidos denominada *PbLS*, com massa molecular predita de 18,6 kDa e pI de 6,6. O ATG na posição 157 codifica para a possível metionina iniciadora que

está no contexto de um sítio consenso de iniciação (**KOZAK, 1986**). Um sinal de poliadenilação é encontrado 29 nucleotídeos após o códon de terminação TAG.

Para obtenção do gene codificante para LS foram construídos oligonucleotídeos e o DNA total de *P. brasiliensis* foi utilizado para amplificação, via PCR. Um fragmento de 800 pb foi submetido a sequenciamento em ambas as fitas obtendo-se, assim, as o gene codificante para lumazina sintase de *P. brasiliensis*. A seqüência genômica foi denominada *Pbls* e apresentou três exons intercalados por dois introns. Os introns localizam-se nas posições 80-189 e 320-484, com 110 e 165 pb, respectivamente. Comparações da seqüência de aminoácido da *PbLS* mostraram identidade com outros organismos como, *M. grisea*, *N. crassa*, *G. zeae* e *C. neoformans var. neoformans*.

Os elementos da estrutura secundária da *PbLS* foram definidos pelo programa FUGUE (<http://www-cryst.bioc.cam.ac.uk/cgi-bin/cgiwrap/kenji/fugue/align.cgi>) e comparadas com outros organismos, apresentando uma estrutura na forma  $\beta 2\alpha 1\beta 3\alpha 2\beta 4\alpha 3\beta 5\alpha 4\alpha 5$ , refletindo a equivalência da topologia da *PbLS* com a LS de outros organismos estruturalmente estudados (**FORNASARI et al., 2004**). Com relação à possível estrutura quaternária e a montagem da *PbLS*, podemos observar que *PbLS* não apresenta resíduo de prolina nos onze primeiros aminoácidos na região N-terminal. **FORNASARI et al. (2004)** descreveram que a presença de prolina na região N-terminal não é um determinante na montagem da LS. Foi verificado que enzimas icosaédricas possuem prolina nessa região e algumas enzimas pentaméricas não possuem esse aminoácido nessa região, contradizendo o critério estabelecido por alguns autores (**GERHARDT et al., 2002**). Portanto, a ausência da prolina na região N-terminal da *PbLS* não exclui a possibilidade de esta ser uma enzima pentamérica, a forma estrutural encontrada na LS de fungos e leveduras.

Os motivos (G[T/G]K[A/H]GN) existentes entre as hélices  $\alpha 4$  e  $\alpha 5$  e envolvidos na formação de capsídeo (**MORGUNOVA et al., 2005**) estão ausentes na LS de *P. brasiliensis*. A LS de *S. pombe* apresenta inserção de um único resíduo de leucina na região entre  $\alpha 4$  e  $\alpha 5$ , o que a torna incapaz de formar o capsídeo (**GERHARDT et al., 2002**). No entanto, verificamos uma inserção desse mesmo resíduo na posição 139, no final das hélices  $\alpha 4$  e  $\alpha 5$ , sugerindo que na enzima de *P. brasiliensis* esse mesmo resíduo também possa impedir a montagem da cadeia polipeptídica na forma de capsídeo. Os estudos de **FORNASARI et al. (2004)** revelaram que nem todas as seqüências pentaméricas apresentam inserções nessa região. Estudos de cristalografia deverão ser necessários para definir a forma quaternária da *PbLS*.

**MEINING et al. (2000)** descreveram os resíduos de aminoácidos da LS de *B.subtilis* que contribuem para estabilidade do pentâmero (Met<sup>1</sup>, Ile<sup>48</sup>, Arg<sup>21</sup>, Met<sup>146</sup>, Val<sup>53</sup>, Pro<sup>110</sup>, Phe<sup>113</sup>, Glu<sup>145</sup>, Tyr<sup>91</sup>, Lys<sup>64</sup>, Pro<sup>54</sup>, Gln<sup>123</sup> e Thr<sup>86</sup>) são bastante conservados; ao contrário dos resíduos envolvidos no contato icosaédrico (Arg<sup>40</sup>, His<sup>41</sup>, Gln<sup>5</sup>, Asp<sup>36</sup>, Val<sup>9</sup>, Asp<sup>36</sup>, Lys<sup>29</sup>, Asp<sup>24</sup>, Glu<sup>126</sup>, Phe<sup>25</sup>, Phe<sup>22</sup>, Thr<sup>130</sup>) que são pouco conservados. Uma inspeção do alinhamento da seqüência do *P. brasiliensis* mostra que esses resíduos envolvidos na estabilidade do pentâmero são também bastante conservados na *PbLS*.

A identificação dos aminoácidos provavelmente envolvidos no sítio ativo da *PbLS* foi baseado no modelo da LS de *S. cerevisiae*. **MEINING et al. (2000)** descreveram os aminoácidos que contribuem em cada subunidade: a subunidade 1 contribui com os resíduos 26 (localizado entre  $\beta 2$  e  $\alpha 1$ ), 58-62 (conectando  $\beta 3$  e  $\alpha 2$ ), 89-101 (envolvendo  $\beta 4$  e  $\alpha 3$ ). A subunidade 2 contribui com os resíduos 121-123 ( $\beta 5$ ), 136 ( $\alpha 4$ ), 146-155 ( $\alpha 5$ ). Resíduos similares foram encontrados na LS de *P. brasiliensis*. Como esses resíduos mostraram-se conservados, sugere-se um possível envolvimento desses aminoácidos na formação do sítio ativo da *PbLS*.

Os resíduos Trp<sup>26</sup>, Leu<sup>91</sup>, Ile<sup>101</sup>, Ile<sup>91</sup> e Ser<sup>61</sup> envolvidos na ligação da LS ao anel pirimidina do substrato 1 (**MEINING et al., 2000**) foram encontrados na *PbLS*. Os aminoácidos Tyr<sup>62</sup> (tirosina), Ser<sup>61</sup> (serina), Glu<sup>63</sup> (glutamato) e Phe<sup>122</sup> (fenilalanina) que formam um grande número de contatos com a cadeia ribitol (**MEINING et al., 2000**) também se apresentam conservados na *PbLS*.

Os resíduos envolvidos no mecanismo catalítico da LS de *A. aeolicus* são conservados em *PbLS*. A Arg<sup>127</sup>, que faz uma interação iônica com o grupo fosfato do substrato 2 (**ZHANG et al., 2003**) é encontrada altamente conservada na posição 136. A transferência de prótons realizada pela His<sup>88</sup>, poderia corresponder à posição His<sup>97</sup> na *PbLS*, como evidenciado na LS de outros fungos como de *S. cerevisiae* (**MEINING et alii., 2000**), *S. pombe* (**GERHARD et al., 2002**) e *M. grisea* (**PERSSON et al., 1999**). O aminoácido Phe<sup>22</sup>, substituído pelo Trp em leveduras e fungos (**PERSSON et al., 1999**) ocupa a posição 27 na *PbLS*, semelhante à LS de *S. cerevisiae* (**MEINING et al., 2000**) *S. pombe* (**GERHARD et al., 2002**) e *M. grisea* (**PERSSON et al., 1999**). Na *PbLS* encontramos os aminoácidos Lys<sup>135</sup> (lisina) e Glu<sup>138</sup> (glutamato) em locais distantes, nas posições 141 e 131, respectivamente. Na LS de *M. tuberculosis* esses resíduos de aminoácidos foram substituídos por Lys<sup>138</sup> e Gln<sup>141</sup> (glutamina), respectivamente. Essa alteração impede a formação de interações iônicas com o fosfato do substrato 2, resultando num decréscimo da velocidade da reação enzimática da LS (**MORGUNOVA et al., 2005**). Em relação a outras LS, os

aminoácidos envolvidos no sítio ativo e na catálise da *PbLS* apresentam-se conservados. No entanto, caracterização estrutural por cristalografia será necessária e irá confirmar ou redefinir essas informações, as quais irão contribuir para o desenvolvimento de inibidores da LS.

A clonagem, expressão e purificação da proteína recombinante LS foram realizadas em sistema heterólogo. O objetivo foi de se iniciar estudos funcionais da proteína e da reatividade imunológica com soros de pacientes com PCM. O cDNA de 525 pb foi subclonado nos sítios *EcoRI/XhoI* do vetor de expressão pGEX-4T-3. O plasmídeo contendo o cDNA sob controle do promotor *tac*, produziu a proteína *PbLS* fusionada ao domínio GST, após indução com IPTG. A proteína recombinante foi purificada e clivada com trombina exibindo uma banda monomérica com massa molecular em torno de 18 kDa, quando submetida à análise no SDS-PAGE, o que está de acordo com a massa molecular predita para LS na sua composição de aminoácidos.

A detecção de anticorpos em testes sorológicos pode ser útil para um rápido diagnóstico da PCM (CAMARGO *et al.*, 1984, 1988), mas esse teste pode ser dificultado por variações nas preparações do antígeno (FRANCO *et al.*, 1996). Para se investigar a reatividade imunológica da LS de *P. brasiliensis* a proteína *rPbLS* purificada foi submetida à análise através de *Western blotting*. Os resultados mostraram que a *rPbLS* é reconhecida por soros de pacientes com PCM e não por soros de indivíduos controle, em concordância com estudos anteriores, no qual a LS de *B. abortus* tem-se mostrado um marcador útil no diagnóstico sorológico da brucelose em humanos e em animais (GOLDBAUM *et al.*, 1993; BALDI *et al.*, 1996; BALDI *et al.*, 1997).

A patogenicidade do *P. brasiliensis* está ligada ao dimorfismo, por isso a importância da identificação de genes diferencialmente expressos em leveduras e micélio. Com o propósito de se caracterizar a expressão do gene *PbLS* utilizamos a técnica de RT-PCR semiquantitativo (MARONE *et al.*, 2001). Os resultados mostram que os transcritos para a LS estão presentes em maior quantidade na forma leveduriforme do que na forma miceliana, indicando um possível papel da proteína na forma parasitária do fungo. As análises do transcriptoma de *P. brasiliensis* (FELIPE *et al.*, 2003, 2005) mostraram que existem 06 ESTs (Expressed Sequence Tags) codificantes da LS na forma leveduriforme, ao contrário da forma miceliana na qual não foi encontrada nenhuma EST.

O acúmulo de transcrito codificante de LS foi maior na fase leveduriforme, que é a fase infectante, sugerindo um possível papel da LS na virulência do *P. brasiliensis*. Além disso, reforçando esta observação, o transcrito para esta enzima foi detectado nos cDNAs

obtidos de culturas de pneumócitos infectados com *P.brasiliensis* sugerindo um papel provável da proteína no processo infectivo.

Plantas, bactérias e fungos dependem da síntese interna de riboflavina e são vulneráveis a inibidores da síntese de riboflavina (MÖRTL *et al.*, 1996; MORGUNOVA *et al.*, 2005). Como a enzima LS não está presente em mamíferos, o conhecimento da estrutura tridimensional da *PbLS* poderá servir como uma base para o desenvolvimento de inibidores da enzima com finalidades terapêuticas. Trabalhos adicionais (silenciamento do gene por RNA de interferência e ensaios atividade enzimática da proteína recombinante) deverão ser necessários para se investigar a função precisa desse gene e revelar a natureza de sua relação com o hospedeiro.

## VII - PERSPECTIVAS

A partir dos resultados obtidos, as perspectivas deste trabalho são:

- Obtenção de anticorpos para a proteína recombinante visando estudos de citolocalização;
- Ensaio de atividade enzimática da rPbLS;
- Análise da reatividade imunológica da rPbLS com soros de pacientes com PCM e com outras micoses através de *Western blotting*;
- Silenciamento do gene codificante da LS, através de RNA de interferência;
- Modelagem da proteína através de cristalografia;
- Ensaio de Imunoproteção com a proteína recombinante;

## VIII - BIBLIOGRAFIA

- ABAD, A., I. GOMEZ, P. VELEZ, AND A. RESTREPO. 1986. Adrenal function in paracoccidioidomycosis. A prospective study in patients before and after ketoconazole therapy. *Infection* **14**:22-26
- AJELLO, L., POLONELLI. 1985. Imported paracoccidioidomycosis: a public health problem in non-endemic areas. *Eur. J. Epidemiol.* **1**:160-165
- ALBORNOZ, M.C.B. 1971. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from rural soil in Venezuela. *Sabouraudia* **9**:248-253
- ALBUQUERQUE, C.F., MARQUES DA SILVA, S.H and CAMARGO, Z.P. 2005. Improvement of the Specific of Enzyme-linked Immunosorbent Assay for Diagnosis of paracoccidioidomycosis. *Journal of Clinical Microbiology* **43**: 1944-1946.
- ALMEIDA, F. Estudos comparativos do granuloma coccidioico nos Estados Unidos e no Brasil. Novo gênero para o parasita brasileiro. *An. Fac. Med. S. Paulo*, v.5, p.125-141, 1930.
- ALMEIDA, I. C., NEVILLE, D. C. A., MEHLERT, A., TREUMANN, A., FERGUSON, M. A. J., PREVIATO, J. O., TRAVASSOS, L. R. 1996. Structure of the N-linked oligosaccharides of the main diagnostic antigen of the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Glycobiol.* **6**:507-515
- ALTBOUM, Z. 1994. Genetic studies in *Candida albicans*, p. 33-48. In E. Segal and G. Baum (ed.), Pathogenic yeasts and yeast infections. CRC Press, Boca Raton, Fla.
- ALTSCHUL, S. F., GISH, W., MILLER, W., MYERS, E. W., LIPMAN, D. A. 1990. Basic local alignment search tools. *J. Mol. Biol.* **215**:403-410
- AMERY, L., BREES, C., BAES, M., SETOYAMA, C., MIURA, R., MANNAERTS, G. P., VAN VELDHOVEN, P. P. 1998. C- terminal tripeptide Ser-Asn-Leu (SNL) of human D-aspartate oxidase is a functional peroxisome-targeting signal. *Biochem. J.* **336**:367-371
- ANGULO-ORTEGA, A., POLLAK, L. 1971. Paracoccidioidomycosis, p. 507-560. In R.D.Baker (ed.), The pathological anatomy of the micoses. Human infections with fungi, actinomycetes and algae. Springer-Verlag, Berlin.
- ANGULO-ORTEGA, A. 1972. Calcifications in paracoccidioidomycosis: are they the morphological manifestations of sub clinical infections? In: Paracoccidioidomycosis. First Panam Symp. Washington: PAHO Sci Public **254**:129-133.
- ANGULO-ORTEGA, A. 1975. Lesiones numulares de origen inflamatorio. Paracoccidioidomas. *Tórax, Bol Postgr Neumol Clin Integr (Venezuela)* **11**:25-34
- ARANGO, M., OROPEZA, F., ANDERSON, O., CONTRERAS, C., ARZÁBAL, L. 1982. Circulation immune complexes and in vivo cell reactivity in paracoccidioidomycosis. *Mycopathologia.* **79**:115-123

- ATKINS, S.D., and CLARK, I.M.2004. Fungal molecular diagnosis: a mini review. *J.Appli. Genet.* **45**: 3-5.
- BAGAGLI, E., SANO, A., COELHO, K. I., ALQUATI, S., MIYAJI, M., CAMARGO, Z. P., GOMES, G. M., FRANCO, M., MONTENEGRO, M. R. 1998. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillos (*Dasypus noveminctus*) captured in endemic area of paracoccidioidomycosis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **58**:505-12.
- BAGAGLI, E., FRANCO, M., BOSCO, S.M.G., HEBELER-BARBOSA, F., TRINCA, L., MONTENEGRO, M.R., 2003. High frequency of *Paracoccidioides brasiliensis* infection in armadillos (*Dasypus noveminctus*): an ecological study. *Med.Mycol.* **41**, 217–223.
- BAGAGLI, E., BOSCO, S.M.G., THEODORO, R.C., FRANCO, M. 2006. Phylogenetic and evolutionary aspects of *Paracoccidioides brasiliensis* reveal a long coexistence with animal hosts that explain several biological features of the pathogen. *Infect Genet Evol.* Feb 9
- BAIDA, H., BISELI, P. J. C., JUVENALE, M., DEL NEGRO, G. M. B., MENDES-GIANNINI, M. J. S., DUARTE, A. J. S., BERNARD, G. 1999. Differential antibody isotype expression to the major *Paracoccidioides brasiliensis* antigen in juvenile and adult form paracoccidioidomycosis. *Microbes and Infection.* **1**:273-278
- BAKOS, L., KRONFELD, M., HAMPE, S., CASTRO, I., ZAM, M. 1989. Disseminated paracoccidioidomycosis with skin less in a patient with acquired immunodeficiency syndrome. *J.Acad.Dermatol.***20**:854-855
- BALDI, P. C., G. H. GIAMBARTOLOMEI, F. A. GOLDBAUM, L. F. ABDÓN, C. A. VELIKOVSKY, R. KITTELBERGER, AND C. A. FOSSATI. 1996. Humoral immune response against lipopolysaccharide and cytoplasmic proteins of *Brucella abortus* in cattle vaccinated with *B.abortus* S19 or experimentally infected with *Yersinia enterocolitica* serotype 0:9. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **3**:472– 476.
- BALDI, P.C., M. M. WANKE, M. E. LOZA, N. MONACHESI, AND C. A. FOSSATI. 1997. Diagnosis of canine brucellosis by detection of IgG antibodies against an 18 kDa cytoplasmic protein of *Brucella spp.* *Vet. Microbiol.* **57**:273–281.
- BALDI, P.C., VELIKOVSKY1, C.A., BRADEN, B.C. , GIAMBARTOLOMEI, G.H. , FOSSATI, C.A. AND GOLDBAUM, F.A.2000. Structural, functional and immunological studies on a polymeric bacterial protein. Structural and immunological studies on a polymeric bacterial protein. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* **33**: 741-747.
- BALANCE, D. J. 1986. Sequences important for gene expression in filamentous fungi. *Yeast.* **2**:229-236.
- BARBOSA, M. S., FELIPE, M. S. S., JESUÍNO, R. S. A., PEREIRA, M., SOARES, C. M. A. 2004. The glyceralhyde-e-phosphate dehydrogenase is differentially regulated in phases of *Paracoccidioides brasiliensis*: molecular and phylogenetic analysis. *In Press.*
- BARBOSA,M. S., BAO, S.N., ANDREOTTI,P.F., FARIA, P.P.,FELIPE, M. S. S., FEITOSA, L.S., MENDES-GIANNINI, M. J. S., SOARES, C. M. A. 2006. Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase of *Paracoccidioides brasiliensis* Is a Cell Surface Protein

Involved in Fungal Adhesion to Extracellular Matrix Proteins and Interaction with Cells. *Infection And Immunity*, Jan. p. 382–389.

BARBOSA W., DAHER, R.R. 1991. Blastomicose sul-americana (paracoccidioidomicose). In R Veronesi, R Focaccia, R Dietze. *Doenças infecciosas e parasitárias, 8 ed., Editora Guanabara Koogan AS, Rio de Janeiro.*

BATEMAN, A., BIRNEY, E., CERRUTI, L., DURBIN, R., ETWILLER, L., EDDY, S. R., GRIFFITHS-JONES S., HOWE, K. L., MARSHALL, M., SONNHAMMER, E. L. 2002. *Nucl. Acids Res.* **30**: 276-280

BAUER, S., KEMTER, K., BACHER, A., HUBER, R., FISCHER, M., STEINBACHER, S., 2003. Crystal structure of *Schizosaccharomyces pombe* riboflavin kinase reveals a novel ATP and riboflavin-binding fold. *J.Mol.Biol.* **326**:1463-1473.

BENARD, G., ROMANO, C. C., CACERE, C. R., JUVENALE, M., MENDES-GIANNINI, M. J. S., DUARTE, A. J. S. 2001. Imbalance of IL-2, IFN- $\gamma$  and IL-10 secretion in the immunosuppression associated with human paracoccidioidomycosis. *Cytokine.* **13**:248-252

BERGUER, P.M., MUNDIÑANO, J., PIAZZON, I. and GOLDBAUM, F.A. 2006. A Polymeric Bacterial Protein Activates Dendritic Cells via TLR4. *Journal of Immunology.* Feb 15; **176**(4):2366-72

BEYER, W. F. JR., FRIDOVICH, I. 1987. Catalases with and without heme. In Simic, M. G., Taylor, K. A., Ward, J. F., Sonntag, C. V., eds., *Oxygen Radicals in Biology and Medicine. Plenum, New York*, pp 651-661

BIALEK, R., IBRICEVIC, A., FOTHERGILL, A., BEGEROW, D. 2000. Small subunit ribosomal DNA sequence shows *Paracoccidioides brasiliensis* closely related to *Blastomyces dermatitides*. **38**:3190-3193

BLANKENHORN, D., PHILLIPS, J. & SLONCZEWSKI, J. L. 1999. Acid and base-induced proteins during aerobic and anaerobic growth of *Escherichia coli* revealed by two-dimensional gel electrophoresis. *J. Bacteriol.* **181**: 2209-2216.

BLOTTA, M. H., MAMONI, R. L., OLIVEIRA, S. J. 1999. Endemic regions of paracoccidioidomycosis in Brasil: a clinical and epidemiologic study of 584 cases in the southeast region. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **61**: 390-394

BLUM, H., BEIER, H., GROSS, H. 1987. Improves silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamid gels. *Electrophoresis.* **8**:93-99

BOCCA, A. L., HAYASHI, E. E., PINHEIRO, A. G., FURIANETTO, A. B., CAMPANELLI, A. P., CUNHA, F. Q., FIGUEIREDO. 1998. Treatment of *Paracoccidioides brasiliensis*-infected mice with a nitric oxide inhibitor prevents the failure of cell-mediated immune response. *J. Immunol.* **161**:3056-3063

BOPP C, BERNARDI CDU. 1967. Geopatologia da blastomicose sulamericana no Rio Grande do Sul. *O Hospital* **71**: 113-130.

- BOEKHOUTH, T., RENTING, M., SCHEFFERS, A. W., BOSBOOM, R. 1993. The use of karyotyping in the systematic of yeast. *Antoine van Leeuwenhoek*. **63**: 157-163
- BORELLI, D. 1962. Hipoteses sobre ecologia de *Paracoccidioides brasiliensis*. *Dermatol. Venez.* **3**:130-135
- BORELLI, D. 1964. Concepto de Reserváreas. La reducida reservárea de la paracoccidioidomycosis. *Dermatol. Venez.* **4**:71-77
- BORELLI D. 1971. Some ecological aspects of paracoccidioidomycosis. In: Paracoccidioidomycosis. Proceedings of the First Pan American Symposium, Medellin. Pan Amer Hlth Org Scient Public 1971; **254**: 59-64.
- BORELLI, D. 1972. Some ecological aspects of paracoccidioidomycosis, p.59-64. In: Paracoccidioidomycosis. Proc.First Pan American Health Organization, Washington, D. C.
- BORGES-WALMSLEY, WALMSLEY, A.R. 2002. cAMP signaling in pathogens fungi control of dimorphic switching and pathogenicity. *Trends Microbiol.* **8**:133-141.
- BORGES, C.L., PEREIRA, M., FELIPE, M.S.S., FARIA, F.P., GOMEZ, F.J., DEEPE, G.S., SOARES, C.M.A.2005. The antigenic and catalytically active formamidase of *Paracoccidioides brasiliensis*: protein characterization, cDNA and gene cloning, heterologous expression and functional analysis of the recombinant protein. *Microb. and Infection* **7**:66-77.
- BOWMAN, B.H., WHITE, T. J., TAYLOR, J. W. 1996. Human pathogenic fungi and their close nonpathogenic relatives. *Mol. Phylogenet. Evol.* **6**:89-96
- BRADFORD, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**:248-254
- BRUMMER, E., CASTÁNEDA, E., RESTRPO, A. 1993. Paracoccidioidomycose: an Update. *Microbiol Rev.* **6**: 89-117
- BULITTA, C., GANEA, C., FAHIMI, H. D., VOLKI, A. 1996. Cytoplasmic and peroxisomal
- BUSTAMANTE-SIMON, B., MCEWEN, J. G., TABARES, A. M., ARANGO, M., RESTREPO, A. 1985. Characteristics of the conidia produced by the mycelial from of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Sabouraudia J. Med. Vet. Mycol.* **23**:407-414.
- CALICH, V.L., VAZ, C.C., BURGER, E.1998. Immunity to *Paracoccidioides brasiliensis* infection. *Res.Immunolog.* **149**:407-417
- CAMARGO, Z. P., GUESDON, J. L., DROUHET, E., IMPROVISI, L. 1984. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) in paracoccidioidomycosis. Comparison with counterimmunoelectrophoresis and erythoimmunoassay. *Mycopathol.* **88**:31-37
- CAMARGO, Z. P., GESZTESIS, J-L. 1994. Saraiva ECO, *et al.* Monoclonal antibody capture enzyme immunoassay for detection of *Paracoccidioides brasiliensis* antibodies in paracoccidioidomycosis. *J. Clin. Microbiol.* **32**:2377-2381

- CAMARGO, Z. P., BARUZZI, R. G., MAEDA, S. M., FLORIANO, M. C. 1998. Antigenic relationship between *Loboa lobo* and *Paracoccidioides brasiliensis* as shown by serological methods. *J. Ned. Vet. Mycol.* **36**:413-417
- CAMARGO, Z. P., FRANCO, M. F. 2000. Current Knowledge on Pathogenesis and immunodiagnosis of paracoccidioidomycosis. *Rev.Iberoam. Micol.* **17**:41-48
- CAMPOS, E. P., C. R. PADOVANI, AND A. M. J. CATANEO. 1991. Paracoccidioidomycose: estudo radiológico e pulmonar de 58 casos. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* **33**:267-276.
- CANO, L. E., RESTREPO, A. 1987. Predictive value of serologic tests in the serodiagnosis and follow up of patients with paracoccidioidomycosis. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.* **29**:276-283
- CANO, L. E., GÓMEZ, B., BRUMMER, E., RESTREPO, A., STEVENS, D. A. 1994. Inhibitory effect of deferoxamine or macrophage activation on transformation of *Paracoccidioides brasiliensis* conidia ingested by macrophages: reversal by holotransferrin. *Infect. Immun.* **62**:1494-1496
- CANO, M. I. N., CISALPINO, P. S., GALINDO, I., RAMÍREZ, J. L., MORTARA, R. A., SILVEIRA, J. F. 1998. Electrophoretic karyotypes and genome sizing of the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *J. Clin. Microbiol.* **36**:742-747
- CANO, L. E., KASHINO, S. S., ARRUDA, C., ANDRÉ, D., XIDIEH, C. F., SINGER-VERMES, L. M., VAZ, C. A. C., BURGER, E., CALICH, V. L. G. 1998. Protective role of gamma interferon in experimental pulmonary paracoccidioidomycosis. *Infect. Immun.* **66**:800-806
- CANVIN, D. T. 1990. Photorespiration and CO<sub>2</sub> concentrating mechanisms. In Dennis, D. T., Turpin, D. H., eds, *Plant Physiology, Biochemistry and Molecular Biology. Longman Scientific and Technical, Harlow, Essex, UK*, pp 253-273
- CARBONELL, L.M, RODRÍGUEZ, J. 1965. Transformation of mycelial and yeast forms of *Paracoccidioides brasiliensis* in cultures and in experimental inoculations. *J Bacteriol* **90**: 504-510.
- CARBONELL, L. M., GIL, F. 1982. Ultraestructura del *Paracoccidioides brasiliensis* in Paracoccidioidomycosis, Del Negro, G., Lacaz, C. S., and Fiorillo, A. M. Eds., Sarvier-Edusp, São Paulo. Chap. 3
- CARLE, G. F., OLSON, M. V. 1984. Separation of chromosomal DNA molecules from yeast by orthogonal-field alternation gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res.* **12**:5647-5664
- CARLE, G. F., FRANK, M., OLSO, M. V. 1986. Electrophoretic separations of large DNA molecules by periodic inversion of the electric field. *Science.* **233**:65-68
- CARNEIRO, L.C., FARIA, F. P., FELIPE, M.S.S., PEREIRA, M., SOARES, C.M.A. 2004.

*Paracoccidioides Brasiliensis* Presents Two Different cDNAs Encoding Homologues of the Fructose 1,6-Biphosphate Aldolase: Protein Isolation, Cloning Of The cDNAs and Genes, Structural, Phylogenetic, and Expression Analysis. *Fungal, Genetics and Biology* **42**:51-60.

CARVALHO, M. J. A., JESUINO, R. S.A., DAHER, B. S., PEREIRA-SILVA, I., FREITAS, S. M., SOARES, C. M. A., FELIPE, M. S. S. 2003. Functional e Genetic Characterization of Calmodulin from the Dimorphic e Pathogenic Fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Fungal Genet. Biol.* In press.

CASOTTO, M. 1990. Characterization of the cellular antigens of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast form. *J. Clin. Microbiol.* **28**:1766-1769

CASTAÑEDA, E., BRUMMER, E., PERLMAN, A. M., McEWEN, J. G., STEVENS, D. A. 1988. A culture medium for *Paracoccidioides brasiliensis* with high plating efficiency and the effect of siderophores. *J. Med. Vet. Mycol.* **26**:351-358

CHENG, S., CLANCY, C.J., CHECKLEY, M.A., HANDFIELD, M., HILLMAN, J.D., FOX-PROGULSKE, A., LEWIN, A.S., FIDEL, P.L., NGUYEN, M.H. 2003. Identification of *Candida albicans* induced during thrush offers insight into pathogenesis. *Molec. Microbiol.* **48**:1275-1288.

CHIKAMORI, T., SAKA, S., NAGANO, H. 1984. Paracoccidioidomycosis in Japan: Report of a case. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.* **26**:267-271

CHIRIFE AV, DEL-RIO CA. Geopatologia de la blastomicosis Sudamericana. *Prensa Med Argent* 1965; **52**: 54\_ 59.

CISALPINO, P. S., PUCCIA, R., YAMAICHI, L., CANO, M. I., FRANCO- DA-SILVEIRA, J., TRAVASSOS, L. R. 1996. Cloniging, characterization and epitope expression of the major diagnostic antigen of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J. Biol. Chem.* **271**:4553-4560

CLEMONS, K.V., SCHAR, G., STOVER, E. P., FELDMAN, D., STEVENS, D. A. 1988. Dermatophyte – hormone relationships: characterization of progesterone binding specificity and growth inhibition in the genera *Trichophyton* and *Microsporum*. *J. Clin. Microbiol.* **26**:2110-2115

CLEMONS, K.V., FELDMAN, D., STEVENS, D. A. 1989. Influence of estradiol on protein expression and methionine utilization during morphogenesis of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J. Gen. Microbiol.* **135**:1607-1617

CLEMONS, K. V., STEVENS, D. A. 1990. Interactions of mammalian steroid hormones with *Paracoccidioides brasiliensis*: estradiol receptor binding and mediation of cellular functions. *Interciencia.* **15**:206-208

CONTI-DIAZ, L. A., RILLA, F. D. 1989. Hipóteses sobre el nicho ecológico del *Paracoccidioides brasiliensis*. *Rev. Med. Urug.* **5**:97

COSTA, A. A., GOMEZ, F. J., PEREIRA, M., FELIPE, M. S. S., JESUINO, R. S. A., DEEP JR, G. S., SOARES, C. M. A. 2002. Characterization of the gene coding for mannosyltransferase, a yeast antigen of *Paracoccidioides brasiliensis*. **4**:1027-1034

- COUTINHO, Z., SILVA, D., LAZERA, M., OLIVEIRA, R.M., SABROZA, P. C., WANKE, B. 2002. Paracoccidioidomycosis mortality in Brasil 1980-1995. *Cad.Saúde Pública* 18:1441-1454. reativity of a recombinant HSP60 from *Paracoccidioides brasiliensis*. *Clin. Diag. Lab. Imm.* **9**:374-377
- CUNHA, A. F., SOUSA, M. V., SILVA, S. P., JESUÍNO, R. S. A., SOARES, C. M. A., FELIPE, M. S. S. 1999. Identification, N-terminal region sequencing and similarity analysis of differentially expressed proteins in *Paracoccidioides brasiliensis*. *Med. Mycol.* **37**:115-121
- CUNHA, D. A., ZANCOPÉ-OLIVEIRA, R. M., FELIPE, M. S. S., IZACC, S. M. S. DEEPE, G. S. SOARES, C. M. A. 2002. Heterologous expression, purification and immunological reativity of a recombinant HSP60 from *Paracoccidioides brasiliensis*. *Clin. Diag. Lab. Imm.* **9**:374-377
- DAHER, B.S., VENANCIO, E.J., FREITAS, S.M., BÁO, S.N., VIANNEY, P.V.R., ANDRADE, R.V., DANTAS, A.S., SOARES, C.M.A., SILVA-PEREIRA, I., FELIPE, M. S.S. 2005. The Highly Expressed Yeast gene Pby20 from *Paracoccidioides brasiliensis* Encodes a Flavodoxin-Like Protein. *Fungal Genetics and Biology* **42**:434-443
- DEB, D.K., DAHIYA, P., SRIVASTAVA, K.K., SRIVASTAVA, R., SRIVASTAVA, B.S. 2002. Selective identification of new therapeutic targets of *Mycobacterium tuberculosis* by IVIAT approach. *Tuberculosis (Edinb)*. **82**(4-5):175-82.
- DEL NEGRO, G. M. B., BENARD, G., ASSIS, C. M. 1995. Lack of reactivity of paracoccidioidomycosis sera in the double immunodiffusion test with the gp43 antigen: report of two cases. *J. Med. Vet. Mycol.* **33**:113-116
- DEL SAL, G., MANFIOLETTI, G., SCHNEIDER, C. 1989. The CTAB-DNA precipitation meted: a common mini-scale preparation of template DNA from phagemids, phages or plasmids suitable for sequencing. *Biotechniques.* **7**:514-520
- DE MATTOS GROSSO, D., ALMEIDA, S.R., MARIANO, M., LOPES, J.D. Characterization of gp70 and Anti-gp-70 Monoclonal Antibodies in *Paracoccidioides brasiliensis* pathogenesis. *Inf. and Immunity*, Nov. 2003, p.6534-6542
- DEMPLE, B. 1999. Radical ideas: genetic responses to oxidative stress. *Clin Exp. Pharmacol Physiol.* **26**:64-68
- DÍEZ, S., GÓMEZ, B. L., RESTREPO, A., HAY, R. J., HAMILTON, A. J. 2002. *Paracoccidioides brasiliensis* 87- kilodalton antigen, a heat shock protein useful in diagnosis: characterization, purification and detection in biopsy material via immunohistochemistry. *J. Clin. Microbiol.* **40**:359-365
- DIEZ, S., GÓMEZ, B. L., McEWEN, J.G., RESTREPO, A., HAY, R. J., HAMILTON, A. J. 2003. Combined Use of *Paracoccidioides brasiliensis* Recombinant 27 Kilodalton and Purified 87 Kilodalton antigens in an Enzyme-Liked Immunosorbent Assay for Serodiagnosis of Paracoccidioidomycosis 2003. *J. Clin. Microbiol.* **41**:1536-1542

- DINIZ, S. N., CARVALHO, K. C., CISALPINO, P. S., SILVEIRA, J. F., TRAVASSOS, L. R., PUCCIA, R. 2002. Expression in bacteria of the gene encoding the gp43 antigen of *Paracoccidioides brasiliensis*: immunological reactivity of recombinant fusion proteins. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **6**:1200-1204
- DINIZ, S.N., REIS, B.S., GOES, T.S., ZOUAIN, C.S., LEITE, M.F., GOES, A.M., 2004. Protective immunity induced in mice by F0 and FII antigens purified from *Paracoccidioides brasiliensis*. *Vaccine* **22**:485-492.
- DOI, M., HOMMA, M., CHINDAMPORN, A., TANAKA, K. 1992. Estimation of chromosome number and size by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) in medically important *Candida* species. *J. Gen. Microbiol.* **138**:2243-2251.
- DOS SANTOS, W.A., DA SILVA, B.M., PASSOS, E.D., ZANDONADE, E., FALQUETO A. 2003. Association between smoking and Paracoccidioidomycosis: a case-control study in the State of Espírito Santo, Brazil. *Cad Saude Publica*; **19**: 245-53.
- EDWARDS, M. R., SALAZAR, M. E., SAMSONOFF, W. A., CANO, L. E., OSTRANDER, G. A., RESTREPO, A. 1991. Electron microscopy study of conidia produced by the mycelium of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Mycopathol.* **114**:169-177
- EWING, B., GRANDEN, P. 1998. Base-calling of automated sequencer traces using phred II. Error probabilities. *Genome Res.* **8**:186-194.
- EWING, B., HILLIER, L., WENDL, M. C., GRANDEN, P. 1998. Base-calling of automated sequencer traces using phred I. Accuracy assessment. *Genome Res.* **8**:175-185
- FAVA-NETO, C. 1955. Estudos quantitativos sobre a fixação do complemento na blastomicose sul-americana com antígeno polissacarídeo. *Arq. Cir. Clin. Exp.* **18**:197-253
- FAVA-NETO, C. 1990. Antígeno polissacarídico do *Paracoccidioides brasiliensis*. *Interciencia* (Venezuela) **15**:209-211.
- FEITOSA, L. S., CISALPINO, P. S., SANTOS, M. R. M., MORTARA, R. A., BARROS, T. F., MORAIS, F. V., PUCCIA, R., SILVEIRA, J. F., CAMARGO, Z. P. 2003. Chromosomal polymorphism, syntenic relationships, and ploidy in the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Fung. Genet. Biol.* **39**:60-69.
- FELIPE, M. S. S., ANDRADE, R. V., PETROFEZA, S. S., MARANHÃO, A. Q., TORRES, F. A. G., ALBUQUERQUE, P., ARRAES, F. B. M., ARRUDA, M., AZEVEDO, M. O., BAPTISTA, A. J., BATAUS, L. A. M., BORGES, C. L., CAMPOS, E. G., CRUZ, M. R., DAHER, B. S., DANTAS, A., FERREIRA, M. A. S., GHIL, G. V., JESUINO, R. S. A., KYAW, C. M., LEITÃO, L., MARTINS, C. R., MORAIS, L. M. P., NEVES, E. O., NICOLA, A. M., ALVES, E. S., PARENTE, J. A., PEREIRA, M., POÇAS-FONSECA, M. J., RESENDE, R., RIBEIRO, B. M., SALDANHA, R. R., SANTOS, S. C., SILVA-PEREIRA, I., SILVA, M. A. S., SILVEIRA, E., SIMÕES, I. C., SOARES, R. B. A., SOUZA, D. P., DE-SOUZA, M. T., ANDRADE, E. V., XAVIER, M. A. S., VEIGA, H. P., VENANCIO, E. J., CARVALHO, M. J. A., OLIVEIRA, A. G., INOUE, M. K., ALMEIDA, M. F., WALTER, M. E. M. T., SOARES, C. M. A. S., BRÍGIDO, M. M. 2003.

Transcriptome characterization of the dimorphic and pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* by EST analysis. *Yeast*. **20**:263-271

FELIPE, M.S.S., ANDRADE, R.V., ARRAES, F.B., NICOLA, A.M., MARANHÃO, A.Q., TORRES, F.A.G., SILVA-PEREIRA, I., POÇAS-FONSECA, M.J., CAMPOS, E.G., MORAES, L.M., ANDRADE, P.A., TAVARES, A.H., SILVA, S.S., KYAW, C.M., SOUZA, D.P., PEREIRA, M., JESUINO, R.S., ANDRADE, E.V., PARENTE, J.A., OLIVEIRA, G.S., BARBOSA, M.S., MARTINS, N.F., FACHIN, A.L., CARDOSO, R.S., PASSOS, G.A., ALMEIDA, N.F., WALTER, M.E., SOARES, C.M.A., CARVALHO, M.J., BRIGIDO, M.M.; PBGENOME NETWORK. Transcriptional profiles of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* in mycelium and yeast cells. *J Biol Chem*. Jul 1;280(26):24706-14. Epub 2005 Apr 22.

FERREIRA, M. S. FREITAS L. H., LACAZ, C. S., DEL NEGRO, G. M., AIELO, N. T., GARCIA M. N., ASSIS, C. M., SALEBIAN A., HERIS-VACCARI, E. M. 1990. Isolation and characterization of a *Paracoccidioides brasiliensis* strains from dogs food probably contaminated with soil in Uberlândia. Brazil. *J. Med. Vet. Mycol*. **28**:253-256

FERREIRA, K.S. LOPES, J.D., ALMEIDA, S.R.2004. Down-regulation of dendritic cell activation induced by *Paracoccidioides brasiliensis*. *Immunology Letter* **94**:107-114.

FIGUEROA, J. I., HAMILTON, A., ALLEN, M.,HOY, R. 1994. Immunohistochemical detection of a novel 22- to 25 - kilodalton glycoprotein of *Paracoccidioides brasiliensis* in biopsy material and partial characterization using species-specific monoclonal antibodies. *J. Clin. Microbiol*. **32**:1566-1574

FONSECA, C. A., JESUINO, R. S. A., FELIPE, M. S. S., CUNHA, D. A., BRITO, W. A ., SOARES, C. M. A. 2001. Two-dimensional electrophoresis and characterization of antigens from *Paracoccidioides brasiliensis*. *Microbes and Infect*. **3**:535-541

FONSECA, E. R., PARDAL, P. P., SEVERO, L. C. 1999. Paracoccidioidomicose em crianças em Belém do Pará. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop*. **32**:31-33

FORJAZ, M. H. H. 1989. Estudo da epidemiologia da Paracoccidioidomicose. Rastreamento de áreas endêmicas e de “reservareas” no Brasil, através do traçado do perfil migratório-residencial-profissional, de pacientes diagnosticados em São Paulo. PhD. Thesis, Escola Paulista de Medicina São Paulo.

FORJAZ, M. H. FISCHMAN, O., MEIRELES, M. C. A. 1992. Reservária de *Paracoccidioides brasiliensis*: Como localizar? *Rev. Arg. Micol*. **15**: 63-73

FORNASARI, M.S., LAPLAGNE, D.A., FRANKEL, N., CAUERHFF, A.A., GOLDBAUM, F.A., ECHAVE, J.2004. Sequence Determinants of Quaternary Structure in Lumazine Synthase. *Molec.Biol. Evol*.**21**: 97-107

FRANCO, M. 1987. Host-parasite relationships in paracoccidioidomycosis. *J. Med. Vet. Mycol*.**25**:5-18

- FRANCO, M., SANO, A., KERA, K., NISHIMURA, K., TAKEO, K., MIYAJI, M. 1989. Clamydospore formation by *Paracoccidioides brasiliensis* mycelial form. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*. **31**:151-157.
- FRANCO, M., PERAÇOLLI, M.T., SOARES, A., MONTENEGRO, M.R. MENDES, R.P. MEIRE, D.A.1993. Host-parasite relationship in paracoccidioidomycosis. *Curr.Top.Méd. Mycol*. 5:115-149.
- FRANCO, M., LACAZ, C. S., RESTREPO-MORENO, A., DEL NEGRO, G. 1994. Paracoccidioidomycosis. Boca Ratón, Florida:CRC Press.
- FREITAS, M. R., NASCIMENTO, O. J., CHIMELLI, L. 1991. Tapia's syndrome caused by *Paracoccidioides brasiliensis*. *J. Neurol. Sci*. 103:179-181
- FREEMAN,W.M., WALKER, S.J., and VRANA, K.E., 1999. Quantitative RT-PCR: Pitfalls and Potencial. *BioTechniques* 26:112-125
- FREITAS-DA-SILVA, G., ROQUE-BARRERA, M. C. 1992. Antigenemia in paracoccidioidomycosis. *J. Clin. Microbiol*.30:381-385
- FURTADO J.S, BRITO, T., FREYMULLER, E. 1967. The structure and reproduction of *Paracoccidioides brasiliensis* in human tissue. *J Med Vet Mycol* **5**: 226-229.
- GEZUELE, E. 1989. Aislamiento de *Paracoccidioides* sp. De heces de un pingüino de la Antártida. In: Proceedings IV International Symposium on Paracoccidioidomycosis, Caracas, Venezuela, April 10-14. 1989. Caracas, Venezuela: Instituto Venezolano de investigacionescientificas (IVIC). Abstract B-2.
- GERHARDT, S., HAASE,I., STEINBACHER,S., KAISER, J.T., CUSHMAN, M., BACHER, A., HUBER, R., FISCHER, M..2002. The Structural Basis of Riboflavin Binding to *Schizosaccharomyces pombe* 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazine Synthase. *J. Mol. Biol.* **318**, 1317–1329
- GOLDANI, L. Z., MARTINEZ, R., LANDELL, G. A. M., MACHADO, A. A., COUTINHO, V. 1989. Paracoccidioidomycosis in a patient with acquired immunodeficiency syndrome. *Mycopatol*. **105**:71-74
- GOLDANI, L. Z., COELHO, I. C., MACHADO, A. A. 1991. Paracoccidioidomycosis and AIDS. *Scand. J. Infect. Dis.* **23**:393(Letter.)
- GOLDANI, L. Z., MAIA, A. L., SUGAR, A. M. 1995. Cloning and nucleotide sequence of a specific DNA fragments from *Paracoccidioides brasiliensis*. *J. Clin. Microbiol.* **33**:1652-1654
- GOLDBAUM, F. A., J. LEONI, J. C. WALLACH, AND C. A. FOSSATI. 1993. Characterization of an 18-kilodalton *Brucella* cytoplasmic protein which appears to be a serological marker of active infection of both human and bovine brucellosis. *J. Clin. Microbiol.* **31**:2141–2145.

- GOMES, G. M., CISALPINO, P. S., TABORDA, C. P., CAMARGO, Z. P. 2000. PCR for diagnosis of paracoccidioidomycosis. *J. Clin. Microbiol.* **38**:3478-3480
- GÓMEZ, B. L., FIGUEROA, J. I., HAMILTON, A. J., ORTIZ, B., ROBLEDO, M. A., HAY, R. J., RESTREPO, A. 1997. Use of monoclonal antibodies in diagnosis of paracoccidioidomycosis: new strategies for detection of circulating antigens. *J. Clin. Microbiol.* **35**:3278-3283
- GÓMEZ, B. L., FIGUEROA, J. I., HAMILTON, A. J., DÍEZ, S., ROJAS, M., TOBÓN, A. M., HAY, R. J., RESTREPO, A. 1998. Antigenemia in patients with paracoccidioidomycosis detection of the 87-kDa determinant during and after antifungal therapy. *J. Clin. Microbiol.* **36**:3309-3316
- GONZALEZ, A., GREGORI, W., VELEZ, D., RESTREPO, A., CANO, L. E. 2000. Nitric oxide participation in the fungicidal mechanism of gamma interferon-activates murine macrophages against *Paracoccidioides brasiliensis* conidia. *Infect. Immun.* **68**:2546-2552
- GROSE, E., TAMSITT, J. R. 1965. *Paracoccidioides brasiliensis* recovered from the intestinal tract of 3 bats (*Artibeus lituratus*) in Colombia. *Sabouraudia.* **4**: 125
- GUPTARAY, B., DATTA, A. 1987. A calmodulin inhibitor blocks morphogenesis in *Candida albicans*. *FEMS Microbiol. Lett.* **41**:327-329
- HALLAK, J., SAN-BLAS, F., SAN-BLAS, G. 1982. Isolation and wall analysis of dimorphic mutants of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Sabouraudia* **20**: 51-62.
- HAMDAN, J. S., FERRARI, T. C. A. 1995. An atypical isolate of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Mycoses* **38**:481-484
- HANFIELD, M., BRADY, L.J., PROGULSKE-FOX, A.E HILLMAN, L.D. 2000. IVIAT: a novel method to identify microbial genes expressed specifically during human infections. *Trends Microbiol* **8**, 336-339.
- HANFIELD, M., SEIFERT, T., HILLMAN, J.D., 2003. *In-vivo* expression of bacterial genes during human infections. *Methods Mol.* **71**: 225-243.
- HANG, L., HOHN, M., ASADUZZAMAN, M., BRIDGES, E.A., VANDERSPURT, C., KIRN, T.J., TAYLOR, R.K., HILLMAN, J.D., PROGULSKE-FOX, A., HANFIELD, M., RYAN, E.T., CALDERWOOD, E.B. 2003. Use of in vivo-induced antigen technology (IVIAT) to identify genes uniquely expressed during human infection with *Vibrio cholerae*. *PNAS.* **100**: 8508-8513.
- HANSBERG, W. 1996. A hyperoxidant states at the start of each developmental stage during *Neurospora crassa* conidiation. *Cienc. Cult.* **48**:68-74
- HARRIS, J. E., DEEPE, G. S. 1988. Characterization of antigenic determinants in histoplasmin that stimulate *Histoplasma capsulatum* reactive T cells *in vitro*. *Infect. Immun.* **56**: 2343-2349

HAUTEFORT, I., HINTON, J.C.D.2000. Measurement of Bacterial Gene Expression *In-vivo*. Institute of Food Research, Norwich Research Park, Colney lane, Norwich NR4 7UA,UK. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* **355**: 601-611

HAUTEFORT, I., HINTON, J.C.D.2001. Molecular Methods for Monitoring Bacterial Gene Expression During Infection. Institute of Food Research, Norwich Research Park, Colney lane, Norwich NR4 7UA,UK.

HAYNES, G. M., WESTERNENG, T. J., FELL, J. W., MOENS, W. 1995. Rapid detection and identification of pathogenic fungi by polymerase chain reaction amplification of large subunit ribosomal DNA. *J. Med. Vet. Mycol.* **33**: 319-325

HEITHOFF, D. M., C. P. CONNER, P. C. HANNA, S. M. JULIO, U. HENTSCHEL and M. J. MAHAN. 1997. Bacterial Infection As Assessed By *In Vivo* Gene Expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 934-939.

HOFMANN, K., BUCHER, P., FALQUET, L., BAIROCH, A. 1999. The Prosite database, it's status in 1999. *Nucleic Acids Res.* **27**:215-219

INOUE, H. H., NOJIMA, K., OKAYAMA, H. 1990. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene.* **96**:23-28

IMAI, T., SANO, A., MIKAMI, Y., WATANABE, K., AOKI, F.H., BRANCHINI, M.L.M.2000. A new PCR primer for the identification of *Paracoccidioides brasiliensis* based on rRNA sequences coding the internal transcribed spacers (ITS) and 5.8S regions. *Med Mycol.* **38**: 323-326.

JAMES, S. A., COLLINS, M .D., ROBERTS, I. N. 1996. Use of an rRNA internal transcribed spacer regions distinguish phylogenetically closely related species of the genera *Zygosacchromyces* and *Torulaspora*. *Int. J. System Bacteriol.* **33**:390-392

JESUINO, R. S. A., AZEVEDO, M. O., FELIPE, M. S. S., PEREIRA, M., SOARES, C. M. A. 2003. Characterization of a chaperone ClpB homologue of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Yeast.***19**:963-972

JOHNSON W., LANG C. 1977. Paracoccidioidomycosis (South American Blastomycosis) in a squirrel monkey (*Saimiri sciureus*). *Vet. Pathol.* **14**:368-371

JOSEPH, E. A., MARE, A., IRVING, W. R. 1966. Oral South American blastomycosis in the United States of America. *Oral Surg. Oral. Med. Oral. Pathol.* **6**:732-737

KARHAWI, A. S. K., COLOMBO, A. L., SALOMÃO, R. 2000. Production of IFN- $\gamma$  is impaired in patients with paracoccidioidomycosis during active disease and is restored after clinical remission. *Medic. Mycol.* **38**:225-229

KASHINO, S. S., CALICH, V.L.G., BURGER, E., SINGER-VERMES, L. M. 1985. In vivo and in vitro characteristics of six *Paracoccidioides brasiliensis* strains. *Mycopathol* **92**:173-178

KASHINO, S. S., CALICH, V. L. G., SINGER-VERMES, L. M., ABRAHAMSOHN, P. A., BURGER, E. 1987. Grow curves, morphology and ultrastructure of ten *Paracoccidioides brasiliensis* isolates. *Mycopatol* **99**:119-128

KASHINO, S. S., FAZIOLI, R. A., MOSCARDI-BACCHI, M., FRANCO, M., SINGER-VERMES, L. M., BURGER, E., CALICH, V. L. G. 1995. Effect of macrophage blockade on the resistance of inbred mice to *Paracoccidioides brasiliensis* infection. *Mycopathologia*. **130**:131-140

KAUFMAN, L., KOVACS, J. A., REISS, E. 1997. Clinical immunomycology, p. 575-584. In Rose, N. R., Macario, E. C., Folds, J. D., Lane, H. C., Nakamura, R. M. (ed.), Manual of clinical laboratory immunology. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

KIM Y.R., LEE S.E., KIM C.M., KIM S.Y., SHIN D.H., CHUNG S.S., CHOY H.E., PROGULSKE-FOX A., HILLMAN J.D., HANDFILED M. & RHEE J.M. 2003. Characterization and pathogenic significance of *Vibrio vulnificus* antigens preferentially expressed in septicemic patients. *Infect Immun* **71**: 5461-5471.

KIS, K., VOLK, R., BACHER, A. 1995. Biosynthesis of riboflavin. Studies on the reaction mechanism of 6,7-dimethyl-8-ribityllumazine synthase. *Biochemistry*, **34**, 2883–2892.

KIS, K. & BACHER, A. (1995). Substrate channeling in the lumazine synthase/riboflavin synthase complex of *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.* **270**, 16788–16795.

KLINKE, S., ZYLBERMAN, V., VEGA, D.R., GUIMARAES, B.G., BRADEN, B.C., GOLDBAUM, F.A. 2005. Crystallographic Studies on Decameric *Brucella spp.* Lumazine Synthase: A Novel Quaternary Arrangement Evolved for a New Function?

KLOTZ, M. G., KLASSEN, G. R., LOEWEN, P. C. 1997. Phylogenetic relationships among prokaryotic and eukaryotic catalases. *Mol. Biol. Evol.* **14**:951-958

KOCH, M., BREITHAUPT, C., GERHARDT, S., HAASE, I., WEBER, S., CUSHMAN, M., HUBER, R., BACHER, A., FISCHER, M. 2004. Structural basis of charge transfer complex formation by riboflavin bound to 6,7-dimethyl-8-ribityllumazine synthase.

KOZAK, M. 1986. Point mutations define a sequence flanking the AUG initiation codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. *Cell*. **144**:283-292

KURITA, N., OARADA, M., ITO, E., MIYAJI, M. 1999. Antifungal activity of human polymorphonuclear leucocytes against yeast cells of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Medic. Mycol.* **37**:261-267

KUROKAWA, C. S., SUGIZAKI, M. F., PERAÇOLI, M. T. S. 1998. Virulence factors in fungi of systemic mycosis. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*. **40**:125-135

LACAZ, C. S. 1949. Novos dados em relação à blastomicose sul americana e o seu agente etiológico. *Rev. Med. Cir. S. Paulo*. **9**:303-340

LACAZ, C. S. 1982. Diagnostico micologico, p. 245-251. In G.Del Negro, C. S. LACAZ, AND A. M. FIORILLO (ED.), Paracoccidioidomicose.Blastomicose sul-americana. Sarvier-EDUSP,Sao Paulo, Brazil.

LACAZ, C. S., PORTO E., MARTINS, J. E. C. 1991. Paracoccidioidomycosis, p.248-261 In: *Micologia Médica*, 8th ed. Sarvier Editora, São Paulo, Brasil.

LACAZ, C. S. 1994. *Paracoccidioides brasiliensis*: morphology, evolutionary cycle; maintenance during saprophytic life; biology, virulence, taxonomy. In: Franco, M., LACAZ, C. S., RESTRO-MORENO, A., DEL NEGRO, A. eds. Paracoccidioidomycosis. Boca Raton, Florida, USA: CRC Press.1994:13-25

LAEMMLI, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T<sub>4</sub>. *Nature* **227**:680-685

LADENSTEIN, R., SCHNEIDER, M., HUBER, R., BARTUNIK, H.D., WILSON, K., SCHOTT, K., BACHER, A. 1988. Heavy riboflavin synthase from *Bacillus subtilis*. Crystal structure analysis of the icosahedral b60 capsid at 3.3 Å resolution. *J Mol Biol* **203**:1045-1070.

LECLERC, M. C., PHILLIPE, H., GUÉHO, E. 1994. Phylogeny of dermatophytes and dimorphic fungi based on large subunit ribosomal RNA sequence comparisons. *J. Med. Vet. Mycol.* **32**:331-341

LEHRACH, H., WUZNEY, J. M., BOEDTKER, K. 1977. RNA molecular weight determinations by gel electrophoresis under denaturing conditions, a critical reexamination. *Biochemistry* **16**:4743-4758

LINDSLEY, M.D., HURST, S.F., IQBAL, N.J., MORRISON, C.J. 2001. Rapid identification of dimorphic and yeast-like fungal pathogens using specific DNA probes. *J.Clin.Microbiol.* **39**:3505-3511.

LÓPEZ-MEDRANO, R., OVEJERO, M. C., CALERA, J. A., PUENTE, P., LEAL, F. 1995. *Aspergillus fumigatus* antigens. *Microbiol.* **141**:2699-2704

LONDERO, A.T.1986. Paracoccidioidomicose. Patogenia, formas clínicas, manifestações pulmonares e diagnóstico. *J.Pneumol.* (Brazil) **12**:41-57.

LONDERO, A.T., and MELO, I.S.1983. Paracoccidioidomycose in childhood. A critical review. *Mycopathologia* **82**:49-55.

LONDERO, A. T., AND C. D. RAMOS. 1990. Paracoccidioidomicose: estudo clinico-micologico de 260 casos observados no interior do Estado do Rio Grande do Sul. *J. Pneumol.* (Brazil) **16**:129-132.

LOOSE, D. S., STOVER, E. P., RESTREPO, A., STEVENS, D. A., FELDMAN, D. 1983. Estradiol binds to a receptor-like cytosolbinding protein and initiates a biological response in *Paracoccidioides brasiliensis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**:7659-7663

- LUTZ, A. 1908. Uma micose pseudo-coccídica localizada na boca e observada no Brasil: contribuição ao conhecimento das hipo-blastomicoses americanas. *Brasil Med.* **22**:121-124
- MAHAN, M.J., TOBIAS, J.W., SLAUCH, J.M., HANNA, P.C., COLLIER, R.J. and MEKALANOS, J.J. 1995. Antibiotic-based selection for bacterial genes that are specifically induced during infection of a host. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **92**:669-673.
- MAHAN, M.J., HEITHOFF D.M., SINSHEIMER R.L. & LOW D.A. 2000. Assessment of bacterial pathogenesis by analyses of gene expression in the host. *Annu. Rev. Genet.* **34**: 139-164.
- MAMONI, R. L., NOUÉR, S. A., OLIVEIRA, S. J., MUSATTI, C. C., ROSSI, C. L., CAMARGOS, Z. P., BLOTTA, M. H. S. L. 2002. Enhanced production of specific IgG4, IgE, IgA and TGF- $\beta$  in sera from patients with the juvenile form of paracoccidioidomycosis. *Med. Mycol.* **40**:153-159
- MAMONI, R.L., BLOTTA, M.H.S.L. Kinetics of Cytokines and Chemokines Gene Expression Distinguishes *Paracoccidioides Brasiliensis* Infection From Disease. *Cytokine* 2005 Oct 7; **32**(1):20-9.
- MANGIATERRA, M. L.; GIUSIANO, G. E.; ALONSO, J. M.; GORODNER, J. O. 1999. *Paracoccidioides brasiliensis* infection in a subtropical region with important environmental changes. *Bull. Soc. Pathol. Exot.* **92**:173-176
- MANNS, B. J., BAYLIS, B. W., URBANSKI, S. J., GIBB, A. P., RABIN, H. R. 1996. Paracoccidioidomycosis: case report and review. *Clin. Infec. Dis.* **23**:1026-1032
- MARCHLER, G., SCHÜLLER, C., ADAM, G., RUIS, H. 1993. A *Saccharomyces cerevisiae* UAS element controlled by protein kinase A activates transcription in response to a variety of stress conditions. *EMBO J.* **12**: 1997-2003
- MARGULIS, L., SCHWARTZ, K. V. 1998. Five kingdoms, an illustrated guide to the phyla of life on earth. In: Feeman, W. H. and Co., 3 th edn.
- MARESCA, B., KOBAYASHI, G.S. Dimorphism in *Histoplasma capsulatum* and *Blastomyces dermatitidis*. In: Ernst JF, Schimidt A, eds. Dimorphism in Human Pathogenic and Apathogenic Yeast. *Contrib. Microbiol. Basel*: Karger, 2000, **5**: 2001-216.
- MARONE, M., MOZZETTI, S., DE RITIS, D., PIERELLI, L., SCAMBIA, G. 2001. Semiquantitative RT-PCR analysis to assess the expression levels of multiple transcripts from the same sample.
- MARQUES, S.A., FRANCO, M.F., MENDES, R.P., 1983. Aspectos epidemiológicos da paracoccidioidomicose na área endêmica de Botucatu. (São Paulo-Brasil). *Rev Inst Med trop São Paulo* 1983; **25**: 87-92.
- MARTINEZ, R. 1997. Blastomicose-Sul-Americana (Paracoccidioidomicose)-Etiologia e Ecologia. In: Veronesi, R., Focaccia, R. tratado de infectologia. Vol II. Ateneu. 1082

MARTINEZ, R., MOYA, M.J. The relationship between paracoccidioidomycosis and alcoholism 1992. *Rev Saude Publica*; **26**:12 e 6.

MATTAR-FILHO, R., AZEVEDO, M. O., PEREIRA, M., JESUÍNO, R. S. A., SALEM-IZACC, S. M., BRITO, W. A., GESZTESI, J. L., SOARES, R. B. A., FELIPE, M. S. S., SOARES, C. M. A. 1997. Expression of glycoprotein gp43 in stage-specific forms and during dimorphic differentiation of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J. Med. Vet. Mycol.* **35**:341-345

MATTOS GROSSO, D., ALMEIDA, S.R., MARIANO, M., LOPES, J.D.2003. Characterization of gp70 and Anti-gp70 Monoclonal Antibodies in *Paracoccidioides brasiliensis* Pathogenesis. *Infection And Immunity*, Nov. 2003, p. 6534–6542.

MARTINEZ,R.1997. Blastomicose-sul-americana (Paracoccidioidomicose) Etiopidemiologia e Etiologia. In R Veronesi, R Focaccia, *Tratado de Infectologia*, vol II, Ed. Atheneu, p. 1094.

McEWEN, J. G., SUGAR, A. M., BRUMMER, E., RESTREPO, A., STEVENS, D. A. 1984. Toxic effect of products of oxidative metabolism on the yeast form of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J. Med. Microbiol.* **18**:423-428.

McEWEN, J. G., RESTREPO, B.I., SALAZAR, M.E., RESTREPO, A.,1987. Nuclear staining of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J. Med.Vet. Mycol.* **25**:343-345.

McEWEN, J. G., ORTIZ, B. L., GARCIA, A . M., FLOREZ, A. M., BOTERO, S., RESTREPO, A. 1996. Molecular cloning nucleotide sequencing and characterization of a 27 kDa antigenic protein from *Paracoccidioides brasiliensis*. *Fung. Gen. Biol.* **20**:125-131

MEDINA H., BODZIAK JR. C. 1949. Contribuição ao ciclo extraparitário do *Paracoccidioides brasiliensis* II. Cultura do *Paracoccidioides brasiliensis* em terra e influencia exercida pelo pH. *Bio. Technol.* **4**:3-8.

MEINING, W., MÖRTL, S., FISCHER, M., CUSHMAN, M., BACHER, A., LADENSTEIN, R.2000. The Atomic Structure of Pentameric Lumazine Synthase from *Saccharomyces cerevisiae* at 1.85 Å Resolution Reveals the Binding Mode of a Phosphonate Intermediate Analogue. *J. Mol. Biol.* **299**:181-197.

MELONI-BRUNERI, L. H., CAMPA, A., ABDALLA, D. S. P., CALICH, V. L. G., LENZI, H. L., BURGER, E. 1996. Neutrophil oxidative metabolism and killing of *Paracoccidioides brasiliensis* after air pouch infection of susceptible and resistant mice. *J. Leuk. Biol.* **59**:526-553.

MENDES, E., RAPHAEL, M. 1971. Impaired delayed hypersensitivity in patients with South American blastomycosis. *J. Allergy.* **47**:17-22.

MENDES-GIANNINI, M. J. S., BUENO, J. P., SHIKANAI-YASHUDA, M. A., FERREIRA, A. W., MASUDA, A. 1989. Detection of 43,000 molecular-weight glycoprotein in sera of patients with paracosidioidomycosis. *J. Clin. Microbiol.* **27**: 2842-2845.

- MERRELL, D.S. and CAMILLI, A. 2000. Detection and analysis of gene expression during infection by in vivo expression technology. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, **355**:587-599.
- MINGUETTI, G., HOFMEISTER, R. M., FAVARO, M., FREITAS, O. T., 1983. Ultrastructure of *Paracoccidioides brasiliensis* In the mycelial phase. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*. **25**:152-160.
- MONTENEGRO M, FRANCO M. Pathology. In: FRANCO M, LACAZ CS, RESTREPO-MORENO A, DEL NEGRO G (eds). *Paracoccidioidomycosis*. Boca Rato'n, FL: CRC Press, 1994: 131-150.
- MONTENEGRO, M.R., MIYAJI, M., FRANCO, M., NISHIMURA, K., COELHO, K.I., HORIE, Y., MENDES R.P., SANO, A., FUKUSHIMA, K., FECCHIO, D. 1996. Isolation of fungi from Nature in Region of Botucatu, State of São Paulo, Brazil, an Endemic Area of Paracoccidioidomycosis. *Men Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*. **91**:665-670
- MONTOYA, A. E., MORENO, M. N., RESTREPO, A., MCEWEN, J. G. 1997. Electrophoretic karyotype of clinical isolates of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Fun. Genet. Biol.* **21**:223-227
- MONTOYA, A. E., ALVAREZ, A. L., MORENO, M. N., RESTREPO, A., MCEWEN, J. G. 1999. Electrophoretic karyotype of environmental isolates of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Med. Mycol.* **37**:219-222
- MONTOYA, A.B., VENANCIO, E.J., BRANDAO, G.O., PETROFEZA-SILVA, I.S., PEREIRA, M., SOARES, C.M.A., FELIPE, M.S.S.2000. Molecular identification of *Paracoccidioides brasiliensis* by PCR amplification of ribosomal DNA. *Clin.Microbiol.* **38**:3106-3109.
- MOK, P. W., GREER, D. L. 1977. Cell-mediated immune responses in patients with paracoccidioidomycosis. *Clin. Exp. Immunol.* **28**:89-98
- MORAIS, F. V., BARROS, T. F., FUKADA, M. K., CISALPINO, P. S., PUCCIA, R. 2000. Polymorphism in the gene coding for the immunodominant antigen gp43 from the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *J. Clin. Microbiol.* **38**:3960-3966
- MOREIRA, S.I.F., BAILÃO, A.M., BARBOSA, M.S., JESUÍNO, R.S.A., FELIPE, M.S.S., PEREIRA, M. SOARES, C.M.A. 2004. Monofunctional catalase P of *Paracoccidioides brasiliensis*: Identification and Expression analysis. *Yeast* **21**: 173–182.
- MORNUGOVA,E., MEINING,W., ILLARIONOV,B., HAASE, I., JIN, G., BACHER, A., CUSHMAN, M., FISCHER, M., LANDENSTEIN,R. 2005.Crystal structure of lumazine synthase from *Mycobacterium tuberculosis* as a target for drug design: binding mode of a new class of purinetriene inhibitors. *Biochemistry*, **44**: 2746-2758
- MÖRTL, S., FISCHER, M., RICHTER, G., TACK, J., WEINKAUF, S., BACHER, A. 1996. Biosynthesis of riboflavin: lumazine synthase of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **271**:33201–33207.

- MOSCARDI-BACCHI, M., FRANCO, M. 1985. Experimental paracoccidioidomycosis in the mouse III. Histopathological and immunological findings after intravenous infection in the presence or absence of previous immunization. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **18**:101-8
- MOTA, N. G. S., REZKALLAH-IWASSO, M. T., PERAÇOLI, M. T. S., AUDI, R. C., MENDES, R. P., MARCONDES, J., MARQUES, S. A., DILLON, N. L., FRANCO, M. F. 1985. Correlation between cell-mediated immunity and clinical forms of paracoccidioidomycosis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **79**:765-772
- MOTOYAMA, A. B., VENANCIO, E. J., BRANDÃO, G. O., SILVA, S. P., PEREIRA, I. S., SOARES, C. M. A., FELIPE, M. S. S. 2000. Molecular identification of *Paracoccidioides brasiliensis* by PCR amplification of ribosomal DNA. *J. Clin. Microbiol.* **38**:3106-3109
- MURAD, J. M., CALVI, S. A., SOARES, A. M. V. C., BANKOVA, V., SFORCIN, J. M. 2002. Effects of propolis from Brazil and Bulgaria on fungicidal activity of macrophages against *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Ethnopharmacol.* **79**:331-334
- MURPHY, J.W., BISTONI, F., DEEPE Jr, G.S., BLASCKTOCK, R.A., BUCHANAN, K., ASHMAN, R.B. 1998. Type I and type 2 cytokines: from basic science to fungal infections. *Med Mycol.* **36**:109-127
- MUSATTI, C. C., PERAÇOLI, M. T. S., SOARES, A. M. V. C., REZKALLAH-IWASSO, M. T. 1994. Cell-mediated immunity in patients with paracoccidioidomycosis, p. 175-186. In Franco M. F., Lacaz, C. S., Restrepo, A., Del-Negro, G. (ed) Paracoccidioidomycosis. CRC Press. Inc., Boca Raton. Fla.
- NAIFF R. D., FERREIRA L. C. L., BARRET, T. V., NAIFF M. F., ARIAS J. R. 1986. Paracoccidioidomycose enzootica em tatus (*Dasybus novencinctus*) no Estado do Pará. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* **28**:19-27
- NEGRONI, P. 1966. El *Paracoccidioides brasiliensis* vive saprofiticamente en el suelo argentino. *Prensa Med* **53**:2831-2832
- NEUHOFF, V., AROLDO, N., TAUBE, D., EHRHADT, W. 1988. Improved staining of protein in polyacrilamide gels including isoelectric focussing gels with close background at monogram sensitivity using *Comassie Brilliant Blue G250* and *R-250*. *Electrophoresis* **9**:255-262
- NICHOLLS, P., SCHONBAUM, G. R. 1963. In: The enzymes (Boyer, P. D., Lardy, H., Myrback, K., eds) pp.147-225, Academic, New York
- NIEBA, L., BACHMANN, M. F. 2000. A new generation of vaccines. *Mod. Asp. Immunobiol.* **1**:36-39
- NIÑO-VEGA, G. A., RUIZ-HERRERA, J., SORAIS, F., CALCAGNO, A. M., SAN-BLAS, G. 2000. Sequencing analysis and expression of the ornithine decarboxylase gene of the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Unpublished*. Submitted to the EMBL/GenBank/DBJ databases in dec

- O'FARREL, P.H. 1975. Hight two dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* **250**:4007-4021
- OLIVEIRA, S.J., MAMONI, R.L., MUSATTI, C.C., PAPAORDANOU, P.M., BLOTTA, M.H. 2002. Cytokines and lymphocyte proliferation in juvenile and adult forms of paracoccidioidomycosis: comparison with infected and non-infected controls. *Microbes Infect* **4**:139-144
- OLSON, L. P., BRUCE, T. C. 1995. Mechanism of aldehyde oxidation catalyzed by horse liver alcohol dehydrogenase. *Biochim.* **34**:7335-7347
- ONO, M.A., BRACARENSE, A.P., MORAIS, H.S., TRAP, S.M., BELITARDO, D.R., CAMARGO, Z.P., 2001. Canine Paracoccidioidomycosis: a seroepidemiologic study. *Med. Mycol.* **39**: 277-282.
- ORTIZ, B. L., DIEZ, S., URAN, M. E., RIVAS, J. M., ROMERO, M., CAICEDO, V., RESTREPO, A., MCEWEN, J. G. 1997. Use of the 27 kilodalton recombinant protein from *Paracoccidioides brasiliensis* in serodiagnosis of paracoccidioidomycosis. *Clin. Diag. Lab. Immunol.* **6**:826-830
- ORTIZ BL, DÍEZ S, URÁN ME, RIVAS JM, ROMERO M, CAICEDO V, RESTREPO A, MCEWEN JG 1998. Use of the 27-kilodalton recombinant protein from *Paracoccidioides brasiliensis* in serodiagnosis of Paracoccidioidomycosis. *Clin Diag Lab Immunol* **6**: 826-830.
- PAN, S., COLE, G.T. 1992. Electrophoretic karyotypes of clinical isolates of *Coccidioides immitis*. *Infect. Immun.* **60**:4872-4880
- PAGE, R. D. M. 1996. TREEVIEW. An application to display phylogenetic trees on personal computers applications in the Biosciences. **12**:357-358
- PARIS, S., PREVOST, M. C., LATGE, J. P., GARRISON, R. G. 1986. Cytochemical study of the yeast and mycelial cell walls of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Exp. Mycol.* **10**:228-242
- PATIÑO, M. M., BURGOS, L. C., RESTREPO A. 1984. Effect of temperature on the mycelium to yeast transformation of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Sabouraudia. J. Med. Vet. Mycol.* **22**:509-511
- PEDRO, R., AOKI, F. H., BOCCATO, R. S., BRAMCHINI, M. L., GONCALES, F. L., PAPAORDANOU, P. M., RAMOS, M. 1989. Paracoccidioidomycose e infecção pelo vírus da imunodeficiência humana. *Rev. Inst. Med. Trp. São Paulo.* **31**:119-125
- PEDROSA P. N. 1976. Paracoccidioidomycose, inquérito intradérmico com paracoccidioidina em zona rural do Estado do Rio de Janeiro. Tese de Mestrado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.
- PEREIRA, L.A., PEREIRA, M., FELIPE, M. S. S., ZANCOPÉ-OLIVEIRA, R.M., SOARES, C. M. A. 2004. Proteomic identification, nucleotide sequence, heterologous expression and immunological reactivity of the triosephosphate isomerase of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Microbes and Infection* **6**: 892–900

- PERSSON, K., SCHNEIDER, G., JORDAN, B.D., VIITANEN, P.V., SANDALOVA, T., Crystal structure analysis of a pentameric fungal and an icosahedral plant lumazine synthase reveals the structural basis for differences in assembly. *Protein Science* (1999) **8**:2355–2365.
- PETERSON, S., SIGLER, L. 1998. Molecular genetic variation in *Emmonsia crescens* and *Emmonsia parva*, etiologic agents of adiaspiromycosis and their phylogenetic relationship to *Blastomyces dermatitidis* (*Ajellomyces dermatitidis*) and other systemic fungal pathogens. *J. Clin. Microb.* **36**:2918-2925.
- PINTO, A. R., PUCCIA, R., DINIZ, S. N., FRANCO, M. F., TRAVASSOS, L. R. 2000. DNA-based vaccination against murine paracoccidioidomycosis using the gp43 gene from *Paracoccidioides brasiliensis*. *Vaccine*. **18**:3050-3058
- PLAUT, G.W., BEACH, R.L., AOGAICHI, T. 1970. Studies on the mechanism of elimination of protons from the methyl groups of 6,7-dimethyl-8-ribityllumazine by riboflavin synthetase. *Biochemistry* **9**:771–785.
- POLACHEK, I., LEBENS, G. A. 1989. Electrophoretic karyotypes of the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans*. *J. Gen. Microbiol.* **135**:65-71
- POPI, A. F., LOPES, J. D., MARIANO, M. 2002. Gp43 from *Paracoccidioides brasiliensis* inhibits macrophage function. An evasion mechanism of the fungus. *Cel. Immunol.* **218**:87-94
- PUCCIA, R., SCHENKMAN, S., GORIN, P. A. J., TRAVASSOS, L. R. 1986. Exocellular components of *Paracoccidioides brasiliensis*: Identification of a specific antigen. *Infect. Immun.* **53**:199-206
- PUCCIA, R., TAKAOKA, D. T., TRAVASSOS, L. R. 1991. Purification of the 43 kDa glycoprotein from exocellular components excreted by *Paracoccidioides brasiliensis* in liquid culture (TOM medium). *J. Med. Vet. Mycol.* **29**:57-60
- PUCCIA, R., TRAVASSOS, L. R. 1991. A 43-kDa glycoprotein from *Paracoccidioides brasiliensis*: Immunochemical reactions with sera from patients with paracoccidioidomycosis, histoplasmosis and Jorge Lobo's disease. *J. Clin. Microbiol.* **29**:1610-1615
- QUEIROZ-TELLES, F. 1994. *Paracoccidioides brasiliensis* ultrastructural findings. In: Franco, M., Lacaz, C. S., Restrepo-Moreno, A., Del-Negro, G. (Eds.), Paracoccidioidomycosis, CRC Press, Boca Ratón, Chapter 3:27-47
- GARCIA-RAMIREZ, J.J., SANTOS, M.A., REVUELTA, J.L. The *Saccharomyces cerevisiae* RIB4 Gene Codes for 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazine Synthase Involved in Riboflavin Biosynthesis 1995. *The Journal Of Biological Chemistry* **270**, **40**, 23801–23807.
- REIS, B.S., BOZZI, A., PRADO, F.L.S., PEREIRA, M.C.N., FERREIRA, F.E., GODOY, P., MORO, L., PEDROSO, E.P., LEITE, M.F., GOES, A.M. 2005. Membrana and extracellular antigens of *Paracoccidioides brasiliensis* (Mexo): Identification of a 28-kDa protein suitable for immunodiagnosis of paracoccidioidomycosis. *J. Immunol.* 2005 Oct;62(4):325-33.
- RESTREPO, A. 1978. Paracoccidioidomycosis. *Acta Med. Colomb.* 33-66.

- RESTREPO, A., ROBLEDO, M., OSPINA, S., RESTREPO, M., CORREA, A. 1968. Distribution of paracoccidioidomycosis sensitivity in Colombia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **17**:25-37
- RESTREPO, A., M. ROBLEDO, R. GIRAILO, H. HERNANDEZ, F.SIERRA. 1976. The gamut of paracoccidioidomycosis. *Am. J. Med.* **61**:33-41.
- RESTREPO, A., M. ROBLEDO, F. GUTIERREZ, M. SANCLEMENTE, E.CASTAFIEDA, AND G. CALLE. 1970. Paracoccidioidomycosis. study of 39 cases observed in Medellin, Colombia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **19**:68-76.
- RESTREPO, A., L. E. CANO, AND A. M. TABARES. 1983. A comparison of mycelial filtrate and yeast lysate paracoccidioidin in patients with paracoccidioidomycosis. *Mycopathologia* 84:49-54
- RESTREPO, A., L. E. CANO, AND M. T. OCHOA. 1984. A yeast derived antigen from *Paracoccidioides brasiliensis* useful for serologic testing. *Sabouraudia J. Med. Vet. Mycol.* **22**:23-29.
- RESTREPO, A., SALAZAR, M. E., CANO, L. E., STOVER, E. P., FREDMAN, D., STEVENS, D. A. 1984. Estrogens inhibit mycelium - to- yeast transformation in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*: implications for resistance of females to paracoccidioidomycosis. *Infect. Immun.* **46**:346-353
- RESTREPO, A. 1985. The ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*: a puzzle still unsolved. *J. Med. Vet. Mycol.* **23**:323-334
- RESTREPO, A. 1988. Immune responses to *Paracoccidioides brasiliensis* in human and animal hosts. In: M. Mc Ginnis (Ed.) *Current Tropics in Medical Mycology.* **2**:239-277. Springer-Verlag. New York.
- RESTREPO, A., M. TRUJILLO, I. GOMEZ. 1989. Inapparent Lung Involvement In Patients With The Subacute Juvenile Type Of Paracoccidioidomycosis. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* **31**:18-22.
- RESTREPO, A. 1990. *PARACOCIDIOIDES BRASILIENSIS*, P. 2021-2031. IN G. L. D. MANDELL, G. R. DOUGLAS, AND J. E. BENNET (ed.), Principles and practice of infectious diseases. *Churchill Livingstone, London.*
- RESTREPO-MORENO, A. Paracoccidioidomycose. 1993. In *Fungal Infections and Responses* (Murphy, J.W., FRIEDMAN, H., BERDINELLI, M. eds) Plenum Press, New York, NY, USA, pp.251-276.
- RESTREPO-MORENO, A. Ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*. 1994. In: Franco, M., Lacaz, C. S., Restrepo-Moreno, A., Del Negro, G. (eds). *Paracoccidioidomycosis.* Boca Raton: CRC Press, 121-30
- RESTREPO, A. 1994. Ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*. In Franco, M., Lacaz, C. S., Restrepo-Moreno, A., and Del Negro, G. (Eds) *Paracoccidioidomycoses.* CRC Press, Boca Raton, Fla. 121-128

- RESTREPO, A. 2000. Morphological aspects of *Paracoccidioides brasiliensis* in lymph nodes: implications for the prolonged latency of paracoccidioidomycosis? *Med. Mycol.* **38**:317-322
- RESTREPO, A., MCEWEN, J.G., CASTAÑEDA, E. 2001. The habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*: how far from solving the riddle? *Med. Mycol. Rev* 39:233-241.
- RICHARDSON, J., CRAIGHEAD, J.C., CAO, S.L., HANDFIELD, M. 2005. Concurrence between the gene expression pattern of *Actinobacillus actionomycetemcomitans* in localized aggressive periodontitis and in human epithelial cells. *J.Med.Mycrob.* 54:497-504.
- RITSERT, .K, HUBER, R., TURK, D., LADENSTEIN, R., SCHMIDT-BÄSE, K., BACHER, A. 1995. Studies on the lumazine synthase complex of *Bacillus subtilis*. Crystal structure analysis of reconstituted, icosahedral b-subunit capsids with bound substrate analogue inhibitor at 2.4 Å resolution. *J Mol Biol* 253:151–167.
- RIVITTI, E. A., AOKI, V. 1999. Deep fungal infections in tropical countries. *Clin. Dermatol.* 17:171-190
- SALAZAR, M. E., RESTREPO, A. 1984. Morphogenesis of the mycelium to yeast transformation in *Paracoccidioides brasiliensis*. *Sabouraudia J. Med. Vet. Mycol.* 22:7-11
- SALAZAR, M. E., RESTREPO, A., STEVENS, D. A. 1988. Inhibition by Estrogens of Conidium-to-Yeast Conversion in fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Infection and Immunity.* **56**:711-713
- SALEM-IZAAC, S. M., JESUINO, R. S. A ., BRITO, W. A., PEREIRA, M., FELIPE, M. S.S., SOARES C. M. A. 1997. Protein synthesis patterns of *Paracoccidioides brasiliensis* isolates in stage-specific forms and during cellular differentiation. *J. Med. Vet. Mycol.* 35:205-211
- SALEM-IZAAC, S. M., GOMEZ, J., JESUINO, R. S. A., FONSECA, C. A., PEREIRA, M. , FELIPE, M. S.S., DEEPE, G. S. J., SOARES C. M. A. 2001. Molecular Cloning, Characterization and Expression of a Gene Encoding the Heat Shock Protein 60 from *Paracoccidioides brasiliensis*. *Med. Mycol.* **39**:445-455
- SALINA, M.A., SHIKANAI-YASUDA, M.A, MENDES, R.P., BARRAVIERA, B, MENDES-GIANNINI, M.J.1998. Detection of circulating *Paracoccidioides brasiliensis* Antigen in Urine of Paracoccidioidomycosis Patients Before and During Treatment. *J.Clin. Microbiol.* **36**:1723-1728
- SALIM, K.Y., DENNIS, G.C., CHANG, P., BAST, D.J., HANDFIELD, M., HILMAN, J.D. and AZEVEDO, J.C.S. 2005. Identification of Group A Streptococcus Antigenic Determinants Upregulated *In Vivo*. *Infection and Immunity*, Sept(73)2005, p.6026-6038.
- SALINS, M. A., SHIKANAI-YASUDA, M. A., MENDES, R. P., BARRAVIERA, B., MENDES-GIANNINI, M. J. S. 1998. Detection of circulating *Paracoccidioides brasiliensis* antigen in urine of paracoccidioidomycosis patients before and during the treatment. *J. Clin. Microbiol.* 36:1723-1728

- SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F., MANIATIS, T. 1989. Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor, New York.
- SAMSONOFF, W. A., SALAZAR, M. E. MCKEE, M. L., RESTREPO, A., CANO, L. E., EDWARDS, M. R. 1991. Scanning electron microscopy of the conidia produced by the mycelial form of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Mycopathol.* 114:9-5
- SANGER, F., NICKLEN, S., COULSON, A. R. 1977. DNA sequencing with chain termination inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 74:5463-5467
- SANO, A., NISHIMURA, K., MYAJI, M. 1999. The research encouragement award. Effects of sex hormone on sexual difference of experimental paracoccidioidomycosis. *Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi.* 40:1-8.
- SAN-BLAS, G., SAN-BLAS, F. 1986. Effect of nucleotides on glucan synthesis in *Paracoccidioides brasiliensis*. *J. Med. Vet. Mycol.* 24:243-245
- SAN-BLAS, G., SAN-BLAS, F., RODRIGUEZ, L. E., CASTRO, C. J. 1987. A model of dimorphism in pathogenic fungi: *Paracoccidioides brasiliensis*. *Acta Cient. Venez.* 38:202-211.
- SAN-BLAS, G., AND F. SAN-BLAS. 1989. Antigenic structure of *Paracoccidioides brasiliensis*, p. 171-192. In E. Kurstak (ed.), Immunology of fungal diseases. Marcel Dekker Inc., New York.
- SAN-BLAS, G. 1993. Paracoccidioidomycosis and its etiologic agent *Paracoccidioides brasiliensis*. *J. Med. Vet. Mycol. Rev* 31:99-113
- SAN-BLAS, G., NIÑO-VEGA, G. 2001. *Paracoccidioides brasiliensis*: virulence and host response. In: Cihlar, R. L., Calderone, R. A., eds. Fungal Pathogenesis: Principles and clinical applications. New York:Marcel Dekker.pp.205-226
- SAN-BLAS, G., NIÑO-VEGA, G., ITURRIAGA, T. 2002. *Paracoccidioides brasiliensis* and paracoccidioidomycosis: molecular approaches to morphogenesis, diagnosis, epidemiology, taxonomy and genetics. *Med. Mycol.* 40:225-242
- SAN-BLAS, G., NIÑO-VEGA, G., BARRETO, L., HEBELER-BARBOSA, F., BAGAGLI, E., BRICEÑO, R.O. AND MENDES, R.P. Primers for Clinical Detection of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Journal Clinical Microbiology, Aug. 2005, p. 4255-4257*
- SEOVAL, M., BRITO, T., SOTTO, M. N. 1996. Antigen distribution in mucocutaneous biopsies of human paracoccidioidomycosis. *Int. J. Surg. Pathol.* 3:181-188
- STORZ, G., TARTAGLIA, L. A. 1992. OxyR: a regulator of antioxidant genes. *J. Nutr.* 122:627-630
- SILVA, S. P., FELIPE, M. S. S., PEREIRA, M., AZEVEDO, M. O., SOARES, C. M. A. . 1994. Phase transition and stage-specific protein synthesis in the dimorphic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Exp. Mycol.* 18:294-299

- SILVA, S. P., BORGES-WALMSLEY, M. I., PEREIRA, I. S., SOARES, C. M. A., WALMSLEY, A. R., FELIPE, M. S. S. 1999. Differential expression of an *hps70* gene during transition from the mycelium to the infective yeast form of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Mol. Microbiol.* **31**:1039-1050
- SILVA-VERGARA, M.L., MARTINEZ, R., 1999. Role of the armadillo *Dasypus novemcinctus* in the epidemiology of paracoccidioidomycosis. *Mycopathologia* **144**:131–133.
- SILVA-VERGARA, M.L., MARTINEZ, R., CAMARGO, Z.P., MALTA, M.H., MAFFEI, C.M., CHADU, J.B., 2000. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillos (*Dasypus novemcinctus*) in an area where the fungus was recently isolated from soil. *Med. Mycol.* **38**:193–199.
- SINGER-VERMES, L. M., BURGER, E., RUSSO, M., VAZ, C. A. C., CALICH, V. L. G. 1993. Advances in experimental Paracoccidioidomycosis using a isogenic murine model. *Arch. Med. Res.* **24**:23 9-245
- SHOME S.K., BATISTA A.C. 1963. Occurrence of *Paracoccidioides brasiliensis* in the soil in Recife, Brazil. *Rev. Fac. Med. Univ. Federal Ceará* **3**:90-94
- SOARES, A.M.V.C. ET AL. Modulatory effect of prostaglandins on human monocyte activation for killing of high- and low-virulence strains of *Paracoccidioides brasiliensis*. 2001. *Immunology* **102**:480–485
- SOMMER, J. M., CHEMG, Q. L., KELLER, G. A., WANG, C. C. 1992. *In vivo* import of firefly luciferase into the glycosomes of *Trypanosoma brucei* and mutational analysis of the C-terminal targeting signal. *Mol. Biol. Cell.* **3**:749-759
- SOUTO, J.T. *et al.* Interferon- $\gamma$  and tumor necrosis factor- $\alpha$  determine resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* infection in mice. 2000. *Am. J. Pathol.* **156**:1811–1820
- SPLENDORE, A. Un'affezione micotica com localizzazione nella mucosa della bocca, osservata in Brasile, determinata da funghi appartenenti alla tribu degli Exoascei (*Zymonema brasiliensis*, n. sp.), In: Volume in onore del Prof. Angelo Celli nel 25° anno di insegnamento, Roma, G. Bertero, 1912.
- STEELE, P. E., CARLE, G. F., KOBAYASHI, G. S. 1989. Electrophoretic analysis of *Histoplasma capsulatum* chromosomal DNA. *Mol. Cell. Biol.* **9**:983-987
- STEVENS, D. A. 1989. The interface of mycology and endocrinology. *J. Med. Vet. Mycol* **27**:133-140
- STEWART, P. R., ROGERS, P. J. 1978. Fungal dimorphism: A particular expression of cell wall morphogenesis. In *The filamentous Fungi*. Smith, J. E., Berry, D. R. (Eds) Edward Arnol, London. **3**:164-196
- STORZ, G., TARTAGLIA, L. A. 1992. OxyR: a regulator of antioxidant genes. *J. Nutr.* **122**:627-630
- STORZ, G., IMLAY, J. A. 1999. Oxidative stress. *Curr Opin Microbiol* **2**:188-194

STOVER, E. P., SCHAR, G., CLEMONS, K. V., STEVENS, D. A., FELDMAN, D. 1986 Estradiol-binding proteins from mycelial and yeast-form cultures of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Infect. Immun.* **51**:199-203

SVIDZINSKI, T. I., MIRANDA NETO, M. H., SANTANA, R. G., FISCHMAN, O., COLOMBO, A. L. 1999. *Paracoccidioides brasiliensis* isolates obtained from patients with acute and chronic disease exhibit morphological differences after animal passage. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.***41**:279-83

TABOR, C. W., TABOR, H. 1984. POLYAMINES. *ANNU. REV. BIOCHEM.* **53**: 749-790

TABORDA, C. P., CAMARGO, Z. P. 1993. Diagnosis of paracoccidioidomycosis by passive haemagglutination assay of antibody using a purified and specific antigen gp43. *J. Med. Vet. Mycol.* **31**:155-150

TABORDA, C. P., CAMARGO, Z. P. 1994. Diagnosis of paracoccidioidomycosis by dot blot immunobinding assay for antibody detection using the purified and specific antigen gp43. *J. Clin. Microbiol.* **32**:554-556

TABORDA CP, JULIANO MA, PUCCIA R, FRANCO M, TRAVASSOS LR 1998. Mapping of the T-cell epitope in the major 43-kilodalton glycoprotein of *Paracoccidioides brasiliensis* which induces a Th-1 response protective against fungal infection in BALB/c mice. *Infect Immun* **66**: 786-793.

TENDRICH, M., F. DE LUCA, E. K. TOURINHO, B. WANKE, J. CUBA, A. BUESCU, M. VASIMAN, A. B. PEREIRA, W. EL-ANDERE, AND B. L. WAJCHENBERG. 1991. Computed tomography and ultrasonography of the adrenal glands in paracoccidioidomycosis. Comparison with cortisol and aldosterone responses to ACTH stimulation. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **44**:83-92.

THEIß, S., KOHLER, G.A., KRETSCHMAR, M., NICTERLEIN, T., HACKER J. New molecular methods to study gene functions in *Candida infections* . *Mycoses.* 2002. Nov; **45**(9-10):345-50.

THOMPSON, J. D., GIBSON, T. J., PLEWNIAK, F., JEANMOUGIN, F., HIGGINS, D. G. 1997. The clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucl. Acids. Res.* **24**:4876-4882.

TORRES-GUZMÁN, J. C., XOCONOSTLE-CAZARES, B., GUEVARA-OLVERO, L. 1996. Comparison of fungal ornithine descarboxylases. *Curr. Microbiol.* **33**:390-392.

TRAVASSOS, L. R., PUCCIA, R., CISALPINO, P. 1995. Biochemistry and molecular biology of the main diagnostic antigen of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Arch. Med. Res.* **26**:297-304.

TURNER, G. 1993. The eucaryotic genome organization and regulation society for general microbiology, symposium 60. (Ed) Broda, P. M. A., Oliver, S. G., Sims, P. F. G., Cambridge University Press.

VELIKOVSKY, C.A., CASSATARO, J., GIAMBARTOLOMEI, G.H., GOLDBAUM, F.A., ESTEIN, S., BOWDEN, R.A., BRUNO, L., FOSSATI, C.A., SPITZ, M. 2002. A DNA Vaccine encoding lumazine synthase from *Brucella abortus* induces protective immunity in BALB/c mice. *Infection and Immunity*, Oct.2002, p. 2507-2511.

VELIKOVSKY, C.A., GOLDBAUM, F.A., CASSATARO, J., ESTEIN, S., BOWDEN, R.A., BRUNO, L., FOSSATI, C.A., GIAMBARTOLOMEI, G.H. 2003. *Brucella* lumazine synthase elicits a mixed Th1-Th2 immune response and reduces infection in mice challenged with *Brucella abortus* 544 independently of the formulation used. *Infection and Immunity*, Oct.2003, p. 5750-5755.

VECAHUIS, M., MATEBLOWSKI, M., KUNAU, W. H., HARDER, W. 1987. Proliferation of microbodies in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. **3**:77-84.

VELCULESCU, V.E., ZHANG, I., VOGELSTEIN, B. AND KINZLER, K.W. (1995). Serial analysis of gene expression. *Science*, 270:484-487.

VENANCIO, E. J., KYAW, C. M., MELLO, C. V., SILVA, S. P., SOARES, C. M., FELIPE, M. S., SILVA-PEREIRA, I. 2002. Identification of differentially expressed transcripts in the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* by differential display. *Med. Mycol.* **40**: 45-51

VERAS, K. N. 1995. Paracoccidioidomicose. Estudo epidemiológico e clínico de pacientes internados no hospital de doenças infecto-contagiosas (HDIC) em Teresina (PI). Identificação de reservatórios nos Estados do Pará e Maranhão. Dissertação de Mestrado em Medicina Tropical. Fundação Oswaldo Cruz, Universidade Federal do Piauí, Teresina, PI, 1995.

VICENTINI, A. P., GESZTESI, J. L., FRANCO, M. F., SOUZA, W., MORAES, J. Z., TRAVASSOS, L. R., LOPES, J. D. 1994. Binding of *Paracoccidioides brasiliensis* to Laminin through surface glycoprotein gp43 leads to enhancement of fungal pathogenesis. *Infet. Immun.* **62**:1465-1469

VILLAR, L. A., TOBÓN, A., CALLE, D., ROSERO, D.S., GÓMEZ, B. L., RESTREPO, A. 2000. Central nervous system paracoccidioidomycosis. Report of a case successfully treated with itraconazol. *SciELO*. **42**:231-234

VOLK, R., and BACHER, A. 1990. Studies on the 4-carbon precursor in the biosynthesis of riboflavin. Purification and properties of L-3,4-dihydroxy-2butanone-4-phosphate synthase. *J. Biol. Chem.* **265**: 19479-19485.

VON OSSOWSKI, J., HAUSNER, G., LOEWEN, P. C. 1993. Molecular evolutionary analysis based on the amino acid sequence of catalase. *J. Mol. Evol.* **37**:71-76

YARZABAL, L. 1982. Composición antigenica de *Paracoccidioides brasiliensis*, p. 59-67. In G. Del Negro, C. S. Lacaz, and A. M. Fiorillo (ed.), Paracoccidioidomicose. Blastomicose sul-americana. Sarvier-EDUSP, Sao Paulo, Brazil.

XU, X. Q., PAN, S. Q. 2000. Na *Agrobacterium* catalase is a virulence factor involved in tumorigenesis. *Mol. Microbiol.* **35**: 407-414

WANG J., MUSHEGIAN A., LORY S. & JIN S. 1996. The large-scale isolation of candidate virulence genes of *Pseudomonas aeruginosa* by *in-vivo* selection. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 10434-10439.

WANKE, B., LONDERO, A. T. 1994. Epidemiology and paracoccidioidomycosis infection *In* Franco, M., Lacaz, C. S., Restrepo-Moreno. A., Del Negro, G. (Eds) Paracoccidioidomycoses. CRC Press, Boca Raton, Fla. 109-120

WHEAT, L. J., FRENCH, M. L. V., KOHLER, R. B., ZIMMERMAN, S. E., SMITH, W. R., NORTON, J. A., EITZEN, H. E., SMITH, C. D., SLAMA, T. G. 1982. The diagnostic laboratory tests for histoplasmosis. *Ann. Intern. Med.* **97**:680-685.

WILKINS, M. R., LINDSKOG, I., GASTEIGER, E., BAIROCH, A., SANCHEZ, J. C., HOCHSTRASSER, D. F., APPEL, R. D. 1997. Detailed peptide characterization using PEPTIDEMASS – a world-wide web accessible tool. *Electrophoresis.* **18**:403-408

ZACCHARIAS, D., UEDA, A., MOSCARDI-BACCHI, M., FRANCO, M., SAN-BLAS, G.A. 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.

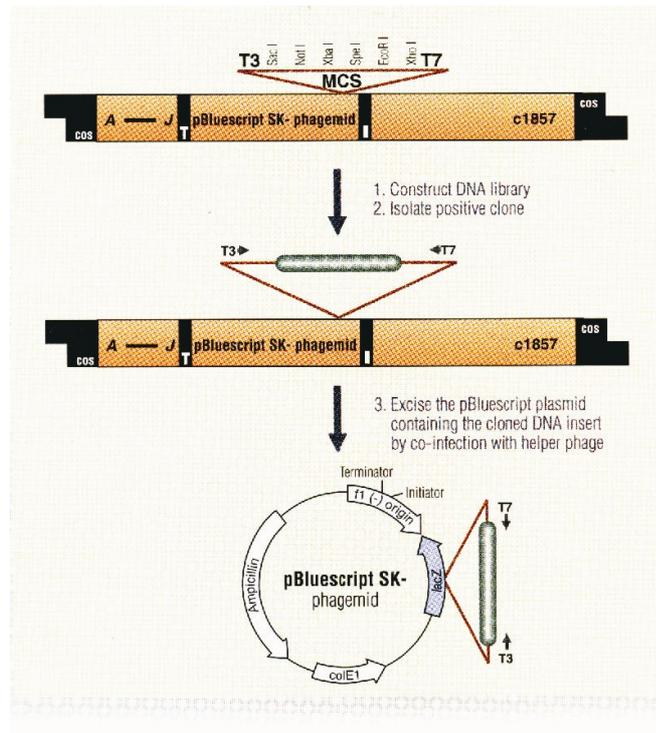
ZANCOPE-OLIVEIRA, R. M., REISS, E., LOTT, T. J., MAYER, L. W., DEEPE, G. S. JR. 1999. Molecular cloning, characterization, and expression of the M antigen of *Histoplasma capsulatum*. *Infect Immun* **67**:1947-1953

ZHANG, X., MEINING, W., FISCHER, M., BACHER, A. & LADENSTEIN, R. (2001). X-ray structure analysis and crystallographic refinement of lumazine synthase from the hyperthermophile *Aquifex aeolicus* at 1.6 Å resolution: determinants of thermostability revealed from structural comparisons. *J. Mol. Biol.* **306**, 1099–1114.

ZHANG, X., MEINING, W., CUSHMAN, M., HAASE, I., FISCHER, M., BACHER, A., LANDENSTEIN, R. 2003. A structure-based model of the reaction catalyzed by lumazine synthase from *Aquifex aeolicus*. *J.Mol.Biol*(2003) **328**, 167-182.

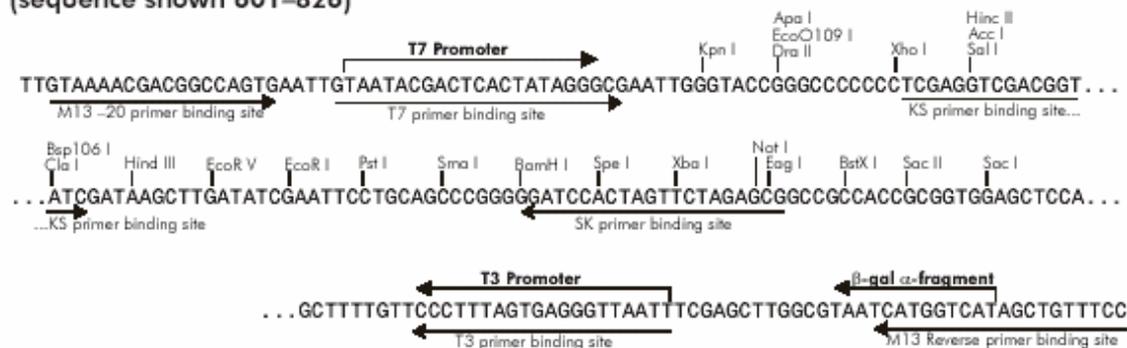
ZYBERMAN, V., CRAIG, P.O., KLINKE, S., BRADEN, B.C., CAUERHFF, A., GOLDBAUM, F.A. 2004. High order quaternary arrangement confers increased structural stability to *Brucella sp.* lumazine synthase. *Journal of Biological Chemistry* **279**: 8093-8101.

## IX - ANEXOS

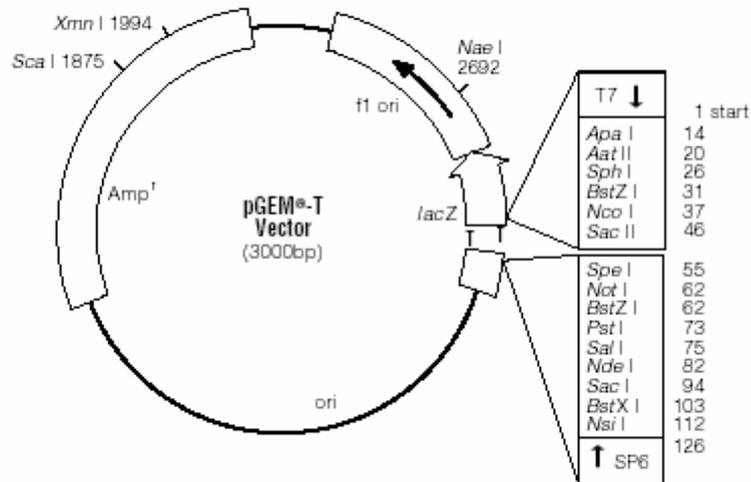


**Anexo 1** – Excisão do vetor  $\lambda$  ZAP II e construção do plasmídeo pBluescript SK (Stratagene Cloning Systems®).

### pBluescript SK (-) Multiple Cloning Site Region (sequence shown 601–826)

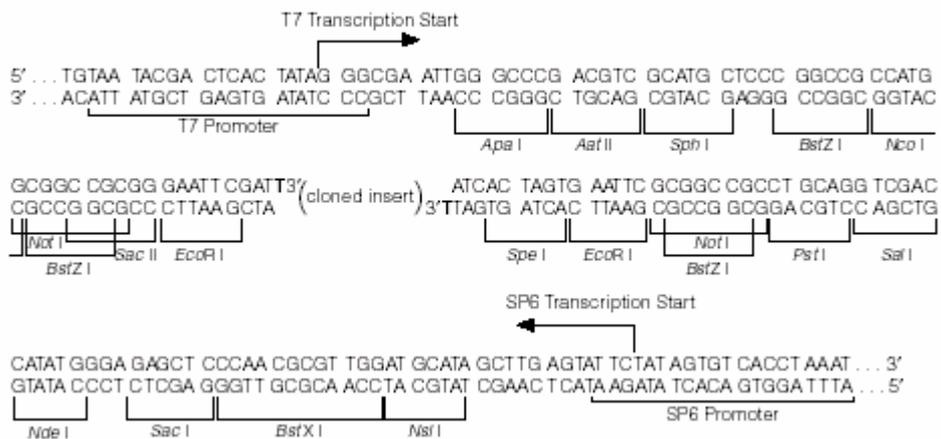


**Anexo 2** – Sequência de nucleotídeos do vetor plasmidial pBluescript SK – (Stratagene Cloning Systems®), evidenciando os sítios de clonagem.



Anexo 3 – Vetor pGEM – T Easy (Promega Co<sup>®</sup>).

**pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector**



Anexo 4 – Sequência nucleotídica do vetor pGEM – T Easy (Promega Co<sup>®</sup>) na qual estão destacados vários sítios de clonagem.