



**VACINAÇÃO COM A PROTEÍNA DE CHOQUE TÉRMICO HSP60  
INDUZ RESPOSTA IMUNE PROTETORA CONTRA A INFECÇÃO  
PULMONAR INDUZIDA PELO *Paracoccidioides brasiliensis***

**E**

**TRANSFORMAÇÃO EM *Paracoccidioides brasiliensis***

TESE DE DOUTORADO APRESENTADA AO  
CURSO DE DOUTORADO EM PATOLOGIA  
MOLECULAR, DA FACULDADE DE  
MEDICINA, DA UNIVERSIDADE DE  
BRASÍLIA COMO REQUISITO À OBTENÇÃO  
DO TÍTULO DE DOUTOR EM PATOLOGIA  
MOLECULAR

---

**Candidata: *Renata de Bastos Ascenço Soares***

**Orientador: *Dra Célia Maria de Almeida Soares*  
Instituição: Universidade Federal de Goiás**

**Co-orientador: *Dr George S. Deepe Jr*  
Instituição: University of Cincinnati - USA**

TESE DESENVOLVIDA NA DIVISION OF INFECTIOUS DISEASES, COLLEGE OF MEDICINE, UNIVERSITY OF CINCINNATI E 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 DOUTOR EM PATOLOGIA MOLECULAR.

### **APOIO FINANCEIRO**

CNPq n. SWE 200002-2004-0 e NIH grants AI-34361 e 427747

---

## **BANCA EXAMINADORA**

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

PROF. DR. GIL BENARD, FACULDADE DE MEDICINA, DEPARTAMENTO DE MEDICINA  
TROPICAL, UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO.

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

PROF. DR. HORÁCIO FRIEDMAN, FACULDADE DE MEDICINA, UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA.

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

## **SUPLENTE**

PROF. DRA. ANAMÉLIA LORENZETTI BOCCA, INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS,  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR, UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA.

## MENSAGEM ESPECIAL

*“Pouca gente conhece a importância  
da boa execução das coisas mínimas.*

*Há homens que, com falsa superioridade,  
zombam das tarefas humildes,  
como se não fossem imprescindíveis ao êxito  
dos trabalhos de maior envergadura.*

*Um sábio não pode esquecer-se de que, um dia,  
necessitou aprender com as letras simples do alfabeto.*

*Além disso, nenhuma obra é perfeita se  
as particularidades não foram  
devidamente consideradas e compreendidas.*

*De modo geral, o homem está sempre fascinado  
pelas situações de grande evidência,  
pelos destinos dramáticos e empolgantes.*

*Destacar-se, entretanto, exige muitos cuidados.*

*Os espinhos também se destacam,  
as pedras salientam-se na estrada comum.*

*Convém, desse modo, atender às coisas mínimas  
da senda que Deus nos reservou,  
para que a nossa ação se fixe com real proveito à vida.*

*A sinfonia estará perturbada se faltou uma nota,  
o poema é obscuro quando se omite um verso.*

*Estejamos zelosos pelas coisas pequeninas.  
São parte integrante e inalienável dos grandes feitos.*

*Compreendendo a importância disso, o Mestre  
nos interroga no Evangelho de Lucas:  
“Pois se nem podeis ainda fazer as coisas mínimas,  
por que estais ansiosos pelas outras?”*

*Livro Caminho, Verdade e Vida. Pelo Espírito de Emmanuel,  
psicografia de Francisco Cândido Xavier*

## DEDICATÓRIA

*\*A minha família, mãe e pai† (in memoriam) que me ensinaram que amar não significa apoiar-se, e que companhia nem sempre significa segurança. E mais: a aprender que beijos não são contratos e presentes não são promessas.*

*\*Ao meu esposo Fabrizzio, pela paciência, amor e zelo.  
Por ser forte e acreditar sempre que podemos ir muito mais longe.*

## AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

*À Deus, pela presença, sabedoria, poder e amor constantes dedicados a nós no ser e fazer.*

*À Profa. Dra Célia Maria de Almeida Soares por ser um exemplo de profissional, dedicada e ética. Obrigada pela orientação durante todos esses anos e pela grande contribuição com a minha formação profissional. E ainda, pela oportunidade de ter acompanhado até aqui, o crescimento da linha de pesquisa da Biologia Molecular do P. brasiliensis no cenário nacional junto a todo o grupo do Laboratório.*

*A Coordenação de Pós Graduação em Patologia Molecular, Universidade de Brasília, na pessoa do Prof. Jaime Santana, que definitivamente, foi peça imprescindível em todo o processo de formação durante o meu doutoramento.*

*À amiga Meire Lima pela sua delicadeza, bondade e amizade sempre doados sem nada em troca.*

*À Profa. Dra Rosália, pela grande e eterna amizade, carinho, disposição e apoio constantes.*

*Às Profa. Dra Úrsula Kreisel e Maristela, pelo carinho e maravilhosa convivência!*

*Ao queridos estudantes Yuri e Gabriela pela agradabilíssima convivência, confiança e valiosa amizade. Pelo sorriso fácil, pela bondade e amor que vocês têm de sobra no coração!*

*Um agradecimento especial aos queridos amigos do peito Clayton, Daniela, Alexandre, Mônica Oliveira e Luiz Augusto pela constante e preciosa ajuda durante a toda a realização deste trabalho, mesmo à distância.*

*À amiga Tereza Cristina, pela tranquilidade e apoio que sempre me passou. E logicamente, pela lindíssima capa e apresentação da tese!*

*Aos colegas do laboratório Juliana Parente, Zilma, Bruno, Milce, Sabrina, Karinne, Ronney, Nádyá e Mônica Santiago pela fácil convivência e lealdade, que sempre me motivaram a seguir em frente durante **TODOS** os momentos difíceis.*

## VERY SPECIAL THANKS!

*... And I would like to thank, my supervisor, Dr George Deepe Jr for receiving me at his lab, for supporting all my experiments, and for letting me free to make any decision that was necessary during the course of my "sandwich" time.*

*My friend Dr Francisco Gomez, for his very helpful comments, suggestions, improvements, corrections, scientific discussion, fun, support (whenever necessary), for everything, even when I was crabby.*

*Dr George Smulian for the wonderful scientific discussions, for handwriting every single transformation protocol to always make sure that I understood everything, for hosting me during the weekends and taking me to the lab on Sundays, for the Christmas Eve 2004, for making me feel like I had a family in Ohio, even though he is also foreign, from South Africa!*

*my friends Robyn Pilcher-Roberts, Debbie Spaulding and Emily Dorton who showed me the good side of America: sweet, friendly and warm especially when we were gathered together!*

*My friend Dr Helmer Figueiredo for the "psychological" help and keeping all Brazilian memories "on" during very special moments of friendship!*

*My friend Marcy for making my shopping time and life in America easy. Your friendship is precious.*

*Reta Gibbons and Holly Allen, for being pals the whole time and providing all techniques in animal work. And All Deepe's lab team Mike Winters, Wendy Szymczak, Mick McGinnis and George Brunner for making better days.*

## ÍNDICE

<b>RESUMO</b>	8
<b>ABSTRACT</b>	9
<b>PARTE I - VACINAÇÃO COM A PROTEÍNA DE CHOQUE TÉRMICO HSP60 INDUZ RESPOSTA IMUNE PROTETORA CONTRA A INFECÇÃO PULMONAR INDUZIDA PELO <i>Paracoccidioides brasiliensis</i></b>	
I – INTRODUÇÃO.....	11
I.1- O FUNGO <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> .....	11
I.2 – PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO (HSPs) e RESPOSTA PROTETORA CONTRA INFECÇÕES.....	21
II – OBJETIVOS.....	28
III – DISCUSSÃO.....	29
IV – MANUSCRITO I.....	36
<b>PARTE II - TRANSFORMAÇÃO EM <i>Paracoccidioides brasiliensis</i></b>	
I – INTRODUÇÃO.....	62
I.1– TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA MEDIADA POR <i>Agrobacterium tumefaciens</i> (ATMT).....	62
I.2 – TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA EM FUNGOS.....	65
II – OBJETIVOS.....	71
III – MATERIAL E MÉTODOS.....	72
IV – RESULTADOS.....	75
V – DISCUSSÃO.....	80
VI – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	86
VII – MANUSCRITO II.....	94

## RESUMO

*Paracoccidioides brasiliensis* causa uma micose crônica granulomatosa prevalente na América Latina. O sucesso da resolução da infecção por este fungo é dependente da ativação da imunidade celular. Nós identificamos previamente a proteína de choque térmico 60 (HSP60) como um alvo da resposta humoral na paracoccidioidomicose. Neste trabalho nós expressamos o gene codificante para a proteína de choque térmico 60 em *Escherichia coli* e a atividade imunobiológica deste antígeno recombinante foi analisada. A imunização de camundongos BALB/c com a proteína recombinante emulsificada em adjuvante estimulou a resposta imune celular como acessado pela proliferação e produção de interferon-gama. A vacinação com a HSP60 reduziu a carga fúngica em camundongos infectados com  $10^6$  ou  $10^7$  leveduras. As células T CD4<sup>+</sup> foram necessárias para a eficácia da vacinação e ambas as fases: aferente e eferente. Contudo, nós demonstramos que o antígeno imunodominante é um candidato para o desenvolvimento de uma vacina contra este fungo. Na segunda parte do trabalho, leveduras de *P. brasiliensis* foram convertidas em resistentes a higromicina B pelo sistema de transformação mediado por *Agrobacterium-tumefaciens* utilizando um vetor binário plasmidial pCB301 contendo os genes da higromicina B fosfotransferase (hph) e o repórter *green fluorescent protein* (GFP) controlados pelo promotor CBP1 de *Histoplasma capsulatum* e o terminador Ura5. A transformação mediada por *Agrobacterium-tumefaciens* produziu transformates estáveis capazes de crescer em altas concentrações de higromicina B. A expressão de GFP foi analisada por microscopia confocal e a variação da intensidade de fluorescência sugeriu a integração do T-DNA em sítios randômicos do genoma do fungo.

**Palavras-chave:** *Paracoccidioides brasiliensis*, HSP60, vacinação, transformação.

## ABSTRACT

*Paracoccidioides brasiliensis* causes a chronic granulomatous mycosis prevalent in Latin America. Successful resolution of infection with this fungus is dependent on activation of cellular immunity. We previously identified heat shock protein 60 as a target of the humoral response in paracoccidioidomycosis. Herein we expressed the gene encoding the heat shock protein 60 in *Escherichia coli* and analyzed the immunological activity of this recombinant antigen. Immunization of BALB/c mice with recombinant protein emulsified in adjuvant stimulated a cellular immune response as assessed by proliferation and interferon-gamma production. Vaccination with heat shock protein 60 reduced fungal burden in mice given  $10^6$  or  $10^7$  yeasts.  $CD4^+$  cells were necessary for the efficacy of vaccination in both the afferent and efferent phases. Thus, we have demonstrated that this immunodominant antigen is a candidate for development of a vaccine against this fungus. In a second part of this work, yeasts of *P. brasiliensis* were transformed to hygromycin B resistance by a *Agrobacterium-tumefaciens*-mediated transformation system using a binary plasmid vector pCB301 containing the hygromycin B phosphotransferase (hph) and the enhanced green fluorescent protein (GFP) genes controlled by the CBP1 promoter from *Histoplasma capsulatum* and the Ura5 terminator. *Agrobacterium-tumefaciens*-mediated transformation yielded stable transformants capable of growing on increased concentrations of hygromycin B. The expression of GFP was analyzed by confocal microscopy and the intensity fluorescence variation suggested an integration of the T-DNA at random sites in the genome of the fungus.

**Keywords:** *Paracoccidioides brasiliensis*, HSP60, vaccination, transformation

## PARTE I

VACINAÇÃO COM A PROTEÍNA DE CHOQUE TÉRMICO HSP60 INDUZ  
RESPOSTA IMUNE PROTETORA CONTRA A INFECÇÃO PULMONAR  
INDUZIDA PELO *Paracoccidioides brasiliensis*

---

## I - INTRODUÇÃO

### I.1- O FUNGO *Paracoccidioides brasiliensis*

*Paracoccidioides brasiliensis* é um fungo dimórfico, agente etiológico da paracoccidioidomicose (PCM) (**Almeida, 1930**), uma micose endêmica na América Latina (**Franco, 1987, Restrepo, 1990**). O fungo cresce como levedura a 36 °C *in vitro* e no hospedeiro, e como micélio a temperaturas de 22 °C – 26 °C (**Carbonell & Rodriguez, 1965**). Em humanos a infecção se inicia pela inalação dos propágulos produzidos pelo fungo, os quais atingem o epitélio dos alvéolos pulmonares e se convertem na forma leveduriforme parasitária (**McEwen et al., 1987**). A via inalatória é a principal porta de entrada do fungo (**Pedrosa, 1976**), podendo, porém, ocorrer penetração via pele e mucosa, através de traumatismos (**Castro et al., 1975**).

A apresentação clínica e o curso da doença variam entre pacientes (**Brummer et al., 1993**). A PCM aguda e a subaguda que afetam indivíduos de ambos os sexos progridem rapidamente e as leveduras se disseminam através do sistema linfático. Em casos severos ocorre hepatoesplenomegalia intensa e envolvimento de outros órgãos além dos pulmões (**Cock et al., 2000, Martinez, 1997**). A forma crônica da doença, que é a mais comum, afeta principalmente homens adultos e desenvolve-se gradualmente nos pulmões (**Mendes, 1994**). As formas severas da PCM, que podem ser agudas ou crônicas, são caracterizadas por inibição da imunidade celular, permitindo o crescimento do fungo e apresentando

títulos altos de anticorpos específicos, os quais não conferem proteção (**Franco, 1987**).

## I.2 – A DOENÇA PARACOCCIDIOIDOMICOSE

### I. 2.1 - PATOGENIA

A patogenia do fungo *P. brasiliensis* ainda não está totalmente esclarecida. Têm sido descrito que 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 radicais 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 & Daher, 1991**). Fatores relacionados à resistência ou susceptibilidade em humanos têm sido amplamente estudados (**Calich et al., 1985, Cano et al., 1998, Kashino et al., 2000, 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 comprometimento de órgãos como baço, fígado, gânglios linfáticos e medula óssea. A resposta imune mediada por células é gravemente deprimida nesses pacientes, provavelmente devido ao comprometimento medular **(Londero & 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 assistência médica somente quando apresenta sintomas de comprometimento extrapulmonar. Nestes casos se constata o envolvimento de órgãos como pele, mucosas das vias aéreas superiores, tubo digestivo e linfonodos (forma multifocal) **(Franco et al., 1987, 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, 1986, Londero & Ramos, 1990, McEwen 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 freqüentemente, pode ocorrer envolvimento ocular, comprometimento dos sistemas nervoso e vascular, destruição óssea. O envolvimento da glândula tireóide também é raro (**Abad et al., 1986, Angulo-Ortega & Pollak, 1971; Franco et al., 1989, Londero & Ramos, 1990, Restrepo et al., 1978, Tendrich et al., 1991**).

### I. 2.3 - RESPOSTA IMUNE NA PCM

Para todos os fungos patogênicos, a ativação de células T é um elemento crucial no desenvolvimento de boa imunidade protetora. Ambas células T, CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, são necessárias para eliminação do patógeno, entretanto, nos estágios primários da doença, para muitos fungos, a presença de células T CD4<sup>+</sup> é vital para a sobrevivência do hospedeiro, enquanto as células T CD8<sup>+</sup> são necessárias para restringir a infecção. (**Huffnagle & Deepe, 2003**). Na doença secundária, cada tipo de célula T é dispensável, no entanto, a ausência tanto de células CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup> não leva a uma sobrecarga da doença.

Um papel discutido para anticorpos na defesa contra doenças fúngicas parece estar em conflito com o direcionamento da resposta imune para Th1, que é a explicação mais largamente aceita para a imunidade específica adquirida pelo hospedeiro contra fungos. Examinando mais de perto, entretanto, existe um caso descrito onde os anticorpos derivados da resposta Th2 têm um efeito protetor aumentando a imunidade mediada por células (**Casadevall & Pirofski, 2005**). Em outros casos, anticorpos podem funcionar como opsoninas, promovendo a ingestão

de fungos e mesmo a morte pelos fagócitos, e vários anticorpos são diretamente fungicidas (**Pirofski & Casadevall, 1998, Torosantucci et al.2005, Xin & Cutler, 2006**). Esses tipos de atividades são complementares, se não exclusivas dos mecanismos mediados por células. A importância central dos granulócitos e macrófagos na defesa inata contra fungos patogênicos oportunistas, e de neutrófilos e macrófagos contra fungos em geral, é consistente com a expectativa de que anticorpos opsonizados facilitam a defesa do hospedeiro. Do mesmo modo, anticorpos fungicidas agindo independentemente de fatores intrínsecos ao hospedeiro seria um benefício óbvio para o hospedeiro.

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 para o teste de hipersensibilidade tardio (**Bernard et al., 2001**). Embora os anticorpos possam aumentar a opsonização 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 (Th-2), enquanto que a resistência está relacionada com a predominância de resposta T auxiliares tipo 1 (Th-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 Th-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 Th-1 com produção de INF- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  e níveis basais de IL-4, IL-5 e IL-10 (**Oliveira et al., 2002**). O desenvolvimento da resposta se Th-1 ou Th-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 tabagismo (**Ferreira et al., 2004, 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; González 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., (1994)** desenvolveram um modelo de PCM em murinos e mostraram uma associação entre a resposta Th-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 Th-1, enquanto que os pacientes com a forma juvenil mostraram altos níveis de expressão de citocinas Th-2. Na forma adulta um perfil de citocinas Th-1 e Th-2 foi encontrado, o que confirma o padrão heterogêneo da doença.

## I. 2.4 - 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 de notificação compulsória (**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 & 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 (**Manns 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 (**Svidzinski et al., 1999, Villar et al., 2000**). Durante a infância a doença acomete ambos os sexos com igual intensidade fortalecendo ainda mais a hipótese de que os fatores hormonais possam desempenhar papel na patogênese da doença (**Martinez, 1997, Restrepo et al., 1984, Clemons & Stevens, 1990, Sano et al., 1999**).

### **I.3 – PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO (HSPs) e RESPOSTA PROTETORA CONTRA INFECÇÕES**

Em geral, a resposta fisiológica de células ou de um organismo como um todo a aumentos súbitos de temperatura é designada de resposta ao estresse e é caracterizada por uma rápida ativação transcricional de genes de HSPs (**Morimoto, 1993**). A produção das HSPs contribui para a proteção e reparos de danos celulares promovidos pelo estresse, bem como está associada à termoadaptação nos organismos dimórficos (**Lindquist, 1986, Lindquist & Craig, 1988**). Muitas HSPs são sintetizadas constitutivamente, o que reflete o papel dessas proteínas em condições celulares normais. Intracelularmente, as HSPs são chaperones de outras proteínas durante a síntese, translocação, enovelamento (**Frydman et al., 1994, Hartl, 1996**).

A correlação entre morfologia e patogenicidade tem sido o maior incentivo para a elucidação das bases moleculares do dimorfismo presente em

fungos. *P. brasiliensis* provê um modelo para estudos de morfogênese celular, visto que a transição de fases *in vitro* ocorre em resposta a mudanças na temperatura de incubação. Vale ressaltar que a alteração de temperatura é condição essencial para o estabelecimento da infecção no hospedeiro humano (**San Blas & San Blas, 1985**). Em *P. brasiliensis*, têm sido clonados e caracterizados alguns genes que apresentam expressão diferencial durante a transição de fases, o que sugere associação com o processo de morfogênese do fungo (**Costa et al., 2002, Felipe et al., 2003, Fonseca et al., 2001, Moreira et al., 2004, Salem-Izacc et al., 2001, Silva et al., 1999**).

Existem múltiplas linhas de pesquisa aprofundando-se no uso de moléculas da família das HSPs como vacinas profiláticas, marcadores de diagnóstico para doenças inflamatórias, agentes imunomoduladores em doenças autoimunes. Cpn60 são também adjuvantes moleculares que incrementam a antigenicidade de outras moléculas ligadas a ela. Vários progressos no desenvolvimento de ferramentas terapêuticas de Cpn60 têm sido impedidos pela complexidade da imunobiologia da Cpn60. Além disso, o grau de conservação das seqüências das moléculas de Cpn60 através da evolução tem salientado a preocupação que o uso clínico dessas moléculas pode estimular reações autoimunes (**Yang 1992, Birk et al., 1996, Cohen, 1997, Metzler et al., 1998, Wick 2000**).

Vários membros da família HSPs têm sido descritos como candidatos a vacinas tanto em infecções como em micoses, sejam gerais ou oportunistas. O principal fundamento do dogma acerca do desenvolvimento de vacinas é que a imunidade mediada por células, em especial a Th1, é essencial na ação destes candidatos. A vacinação deve, no entanto, direcionar a resposta imune

para Th1, com a indução de IL-12 e IFN- $\gamma$ , as duas principais citocinas de suprema importância na resposta Th1. Nesse aspecto, a vacinação com vários antígenos protéicos que conferem imunidade protetora estimula a produção de IL-12 ou IFN- $\gamma$  dentro dos dias da vacinação (**Abuodeh et al., 1999, Deepe & Gibbons, 2002, Wüthrich et al., 2003, Taborda et al., 2004**).

Em *Candida albicans*, um antígeno imunodominante de 47 kDa foi identificado como um produto termoestável da quebra da HSP90 (**Matthews & Burnie, 1989**). Anticorpos anti-47kDa estão presentes na maioria dos pacientes com candidíase mucocutânea crônica e AIDS, tendo sido sugerido que a proteína induziria o efeito protetor da imunidade humoral na candidíase sistêmica (**Matthews et al., 1991, Matthews et al., 1988**).

Membros da família HSP60 são descritos como imunogênicos em outros microrganismos patogênicos, tais como *Helicobacter pylori*, *Yersinia enterocolitica*, *Mycobacterium tuberculosis* e *M. leprae* (**Noll & Autenrieth, 1996, Nomaguchi et al., 2002, Tascon et al., 1996**). O provável papel protetor da HSP60 de *H. pylori* foi descrito recentemente. A proteína recombinante foi reconhecida por soros de pacientes infectados com *H. pylori* e camundongos BALB/c imunizados com a HSP60. Dessa maneira, os autores sugerem que a HSP60 recombinante poderia se tornar uma provável vacina para controle e tratamento da infecção por *H. pylori* (**Bai et al., 2003**).

Em *Y. enterocolitica* foi estudado o efeito modulatório das interleucinas (IL)-2, IL-4, e interferon (IFN)- $\gamma$  co-expressos com a HSP60. Vacina de DNA com IFN- $\gamma$ -hsp60 evocou imunidade humoral específica e resposta imune celular, bem como a redução da carga bacteriana esplênica após o desafio com *Y. enterocolitica* em modelo animal experimental (**Hornef et al., 2000**).

Um sistema de expressão de determinantes antigênicos de superfície foi estabelecido para isolados de *Salmonella* no intuito de otimizar a liberação de antígenos utilizando uma via de secreção de autotransporte de bactérias gram-negativas. Um sistema modular para *display* de superfície mostrou ser um alvo eficaz de antígenos heterólogos para a superfície pela domínio do autotransportador AIDA-I, adesina de *E. coli* envolvida em aderência difusa. O epítipo restrito ao complexo de histocompatibilidade principal de classe II, compreendendo aminoácidos de 74 a 86 da Hsp60 de *Y. enterocolitica* [Hsp60 (Hsp60(74-86))], foi fusionada ao domínio do autotransportador AIDA-I, e a proteína de fusão resultante foi super expressa na superfície de *E. coli* e *Salmonella enterica serovar Typhimurium*. Estudos de colonização em camundongos vacinados com isolados de *Salmonella* expressando o cassete de fusão demonstrou estabilidade genética da vacina produzida em isolados *in vivo* (**Kramer et al., 2003**).

Em *M. tuberculosis* a HSP65 é suficiente para proteger camundongos BALB/c contra infecção quando administrada como vacina de DNA em um cronograma de três doses (**Lima et al., 2003**) ou na presença de diferentes adjuvantes (**Baek et al., 2003**). Camundongos imunizados com a HSP65 de *M. leprae* clonada em vetor contendo seqüências de DNA imunoestimulatórias também foram protegidos (**Nomaguchi et al., 2002**).

Já em fungos patogênicos, tais como *H. capsulatum*, a proteína HIS-62, um membro da família HSP60, isolada de frações de parede e membrana da fase leveduriforme do fungo, bem como a proteína recombinante, conferem proteção, em camundongos, contra a histoplasmose (**Gomez et al., 1995**). O mapeamento da eficácia de proteção de regiões da proteína permitiu a identificação de um domínio da HSP60, o qual confere proteção contra doses subletais e letais de

*H. capsulatum* (Deepe et al., 1996). A resolução da infecção é coincidente com a liberação de citocinas e proliferação de células T (Cain & Deepe Jr., 1998). A HSP60 de *H. capsulatum* promove a ativação de células T e protege os animais infectados e tem sido testada como vacina profilática na histoplasmose (Deepe Jr & Gibbons, 2002). Adicionalmente, verificou-se, através de experimentos de citolocalização, que a HSP60 de *H. capsulatum* está localizada na superfície de células leveduriformes sob a forma de pequenos agrupamentos e media a ligação de células leveduriformes a macrófagos CD11/CD18 (Long et al., 2003). Em *C. immitis* a HSP60 induz, em camundongos imunizados com o patógeno, resposta proliferativa de células T (Li et al., 2001, Thomaz et al., 1996).

Com relação às proteínas HSP 70 e 60 de *P. brasiliensis*, verificou-se que são preferencialmente expressas em leveduras, quando comparadas a micélio. O fato da expressão dos genes que codificam para essas proteínas serem induzidos por estresse térmico é sugestivo do possível envolvimento destas na transição de *P. brasiliensis* (Salem-Izacc et al., 1997, Silva et al., 1994). Walmsley & Walmsley (2000) sugerem que as HSPs, ao detectar mudança de temperatura, iniciem a sinalização intracelular para que o processo de dimorfismo ocorra. O cDNA codificante para a proteína HSP60 foi clonado e caracterizado em nosso laboratório (Salem-Izacc et al., 2001). O cDNA foi expresso em *Escherichia coli* para produção da proteína recombinante, a qual foi purificada por cromatografia de afinidade. Um total de 169 amostras de soros de pacientes foi testado através de *Western blotting* com a proteína recombinante purificada. Ensaios de immunoblotting indicaram que a proteína recombinante foi reconhecida por anticorpos em 72 dos 75 soros testados de pacientes com PCM. Não foi detectada reação cruzada com soros individuais de pacientes com aspergilose, esporotricose, criptococose e tuberculose. A reatividade

da HSP60 foi observada em 9,52% dos soros de pacientes controle e 11,5% de pacientes com histoplasmose. A alta sensibilidade e especificidade (97,3 e 92,5% respectivamente) para HSP60 sugeriu que a proteína recombinante pode ser usada sozinha ou associada a outros antígenos recombinantes, para detectar resposta a anticorpos em pacientes infectados com *P. brasiliensis* (Cunha et al., 2002). Em nosso trabalho nós avaliamos a *PbHSP60* como um alvo da resposta imune mediada por células T contra *P. brasiliensis* e rastreamos os requisitos celulares para sua atividade protetora durante a fase indutiva e expressiva da resposta imune.

## II – OBJETIVOS

- Avaliar a antigenicidade e imunogenicidade de *PbHSP60* como um alvo da resposta imune mediada por células ao *P. brasiliensis*.
  
- Determinar as subpopulações de células T envolvidas na resposta imune protetora a *PbHSP60*.

### III – DISCUSSÃO

A Paracoccidioidomicose é classificada como uma das micoses profundas endêmicas que divide várias características clínicas com outras micoses tais como histoplasmose, blastomicose e coccidioidomicose. A nível histológico, a infecção por *P. brasiliensis* é caracterizada por um infiltrado crônico mononuclear e linfocítico, formação de granulomas, necrose caseosa e fibrose. Estas características podem também ser observadas em outras micoses profundas e infecções por patógenos intracelulares facultativos. Do ponto de vista clínico, a PCM pode se apresentar como uma infecção crônica, disseminada com episódios de latência que podem geralmente ser vistos em infecções com parasitas intracelulares facultativos (**Anderton et al., 1994, Blander 1993, LaVerda, 1999**). Epidemiologicamente, a PCM pode geralmente afetar indivíduos imunocompetentes, mas a prevalência da severidade, o caráter invasivo e as formas clínicas letais são mais prevalentes em pacientes com defeitos na resposta imune celular, sugerindo fortemente que a imunidade mediada por células T tem um importante papel na resistência contra *P. brasiliensis* (**Kashino et al., 2000, Souto et al., 2000**).

Subpopulações distintas de células T auxiliares são conhecidas por estar envolvidas em vias divergentes da resposta imune (**Deepe Jr et al., 1996**). A imunidade ao *P. brasiliensis* pode ser regulada pela resposta Th1 ou Th2 que finalmente determinaria a resolução da infecção (**Gomez et al., 1995**). Existem poucos relatos descrevendo o papel de antígenos de *P. brasiliensis* na indução da resposta imune de proteção na PCM experimental. Muitos dos trabalhos com

antígenos tem focado na resposta immune humoral especificamente para sorodiagnóstico. Uma molécula exocelular conhecida como gp43 é um antígeno candidato para diagnóstico da infecção por *P. brasiliensis*. A vacinação com a gp43 recombinante ou o DNA codificante para gp43 protege camundongos susceptíveis a infecção (Taborda et al., 1998). O sucesso da vacinação tanto com a proteína completa tanto com o peptídeo é dependente do estímulo da resposta Th1. O domínio P10 da gp43 também estimula a imunidade celular e tem efeito protetor contra a infecção intraqueal por um isolado virulento de *P. brasiliensis* (Taborda et al., 2004, Taborda et al., 1998). Esta atividade protetora está correlacionada com a indução de uma população de linfócitos T secretores de IFN- $\gamma$ . A atividade protetora de antígenos de *P. brasiliensis* fracionados por cromatografia de troca iônica tem sido estudada. Duas frações chamadas de F0 e FII tem demonstrado conferir proteção em camundongos, enquanto outra fração, chamada FIII, exacerba a doença (Diniz et al., 1999). A imunização dos camundongos com F0 e FII, predominantemente localizados na superfície da célula, estimularam um efeito protetor contra formas leveduriformes altamente infectivas de *P. brasiliensis*. Embora, a fração FIII induz a produção de IFN- $\gamma$ , esta propriedade não resultou em proteção contra a infecção (Diniz et al., 2004, Goes et al., 2005).

Previamente, a HSP60 de *H. capsulatum* foi identificada como um proeminente alvo da imunidade mediada por células T e uma vacina protetora em histoplasmose pulmonar experimental (Deepe & Gibbons, 2002, Scheckelhoff & Deepe, 2005). Outros autores tem descrito observações similares em vários modelos de infecção com parasitas intracelulares. Dado o alto nível de conservação evolutiva dentre os membros da família das proteínas de choque térmico, e particularmente entre o gene e a proteína HSP60 de *H. capsulatum* e *P. brasiliensis*,

nós postulamos que a *PbHSP60* dividiria algumas de suas propriedades imunobiológicas com a HSP60 de *H. capsulatum*. Nós utilizamos um modelo respiratório de infecção por *P. brasiliensis* em camundongos BALB/c. Esse isolado tem sido usado em outros estudos por vários grupos para análise da infecção pulmonar com *P. brasiliensis* (**Aristizabal et al., 2002, Cock et al., 2000, Diniz et al., 2004, Gonzalez et al., 2005, Marques et al., 2006, Pinto et al., 2000**). Os camundongos inoculados com  $1,0 \times 10^6$  ou  $1,0 \times 10^7$  células leveduriformes de *P. brasiliensis* desenvolveram um previsível curso da infecção, onde o agente infeccioso pode ser recuperado e quantificado até 12 semanas após o desafio inicial. Nós fomos capazes de detectar disseminação para o baço e fígado, mas a carga fúngica foi máxima nos pulmões.

Tem sido estabelecido que IFN- $\gamma$  tem um papel crucial na proteção contra vários patógenos através do aumento da atividade citotóxica do macrófagos (**Cano et al., 1998**). Baixos níveis ou ausência de secreção de IFN- $\gamma$  tem sido associados com formas severas da PCM. Achados experimentais mostram que camundongos diferentes previamente infectados com MAb anti-IFN- $\gamma$  preveniram a depuração das células leveduriformes dos pulmões e promoveram a disseminação para o fígado e baço (**Cano et al., 1998, Kashino et al., 2000**). Nós inicialmente determinamos que a exposição a células leveduriformes viáveis de *P. brasiliensis* estimularam o reconhecimento da *PbHSP60* recombinante, demonstrado pela resposta proliferativa de esplenócitos. Esses achados estão de acordo com o que tem sido relatado em outros modelos de infecção: moléculas de HSP60 de origem microbiana têm sido caracterizadas como alvo do reconhecimento de células T, como frações substanciais de clones de células T são reativas a epítomos contidos dentro desta molécula (**Deepe & Gibbons, 2003, Scheckelhoff & Deepe, 2005**).

Quando nós imunizamos os animais com a proteína recombinante *PbHSP60*, também detectamos uma vigorosa resposta proliferativa de esplenócitos em associação com a secreção significativa de IFN- $\gamma$  e não de IL-4. Estes resultados indicam que a imunização com a *PbHSP60* estimula a resposta imune Th1. Estudos prévios em modelo de infecção experimental por *H. capsulatum* tem destacado o papel crucial da produção de IFN- $\gamma$  na resistência contra patógenos intracelulares. Tem sido postulado que o estímulo de IFN- $\gamma$  é necessário para a transição de macrófagos de um estado permissivo, que permite a sobrevivência e replicação intracelular de leveduras de *H. capsulatum*, para um estado ativado, capaz de restringir e matar o fungo intracelular. Inversamente, a neutralização de IFN- $\gamma$  por anticorpos monoclonais resulta na falha do controle e/ou reativação da infecção **(Scheckelhoff & Deepe, 2005)**.

No intuito de fornecer uma importante ligação entre a imunidade inata e adquirida vários grupos de investigadores têm tentado elucidar o papel da IL-12, a citocina pro-inflamatória principalmente produzida pelas células fagocitárias (células dendríticas, monócitos/macrófagos e neutrófilos polimorfonucleares) **(Trinchieri, 1995)**. IL-12 é requisitada para o desenvolvimento da resposta Th1 contra infecções fúngicas. O tratamento de camundongos com IL-12, no início da infecção, via intravenosa ou intraqueal, com *Cryptococcus neoformans*, *H. capsulatum*, ou *C. immitis* fornece proteção aos animais **(Jiang et al., 1999, Kawakami et al., 1996, Zhou et al., 1997)**. O efeito protetor da IL-12 está associado com o deslocamento da expressão das citocinas Th1 e Th2. A neutralização *in vivo* de IL-12 agrava a PCM pulmonar de ambos os camundongos, resistentes e susceptíveis. A importância desta citocina no desenvolvimento de células Th1 é peça chave para elucidar os mecanismos de resposta imune mediada por células e, em nossos experimentos,

não pudemos estabelecer, por enquanto, uma correlação entre produção de IL-12 e proteção mediada por vacina. Uma investigação mais detalhada está sendo desenvolvida para responder a essas questões pertinentes (**Benard et al., 2001**).

Na PCM experimental, tanto células CD4 quanto CD8 participam na depuração da infecção (**Arruda et al., 2002, Cano et al., 1998, Kashino et al., 2000, Souto et al., 2000**). Nós demonstramos que ambas foram importantes na fase aferente da vacinação, mas na fase eferente, a eliminação dos dois tipos de células aboliu a proteção. Esses achados são similares aos encontrados para a HSP60 de *H. capsulatum* (**Deepe Jr & Gibbons, 2002**), mas diferem daqueles quando leveduras vivas são usadas como antígeno (**Wuthrich et al., 2003**). Neste cenário, células CD4<sup>+</sup> são indispensáveis e CD8<sup>+</sup> compensam pela sua ausência em mediar a imunidade protetora. Estes resultados claramente demonstram que a imunização com microrganismos viáveis não ativam os dois subtipos de células T, onde a proteína recombinante parece produzir apenas um tipo de população de células T. Modificar uma proteína para traficar em ambas as classes do complexo de histocompatibilidade principal pôde ser de grande valor na produção de células protetoras CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>.

Concluindo, nós pudemos demonstrar que a proteína recombinante HSP60 de *P. brasiliensis* pode conferir uma resposta protetora em camundongos BALB/c. Este trabalho estende o número de antígenos que podem ser considerados para o desenvolvimento de vacinas contra este patógeno e estende o número de patógenos que podem ser protegidos com HSP60.

## IV – MANUSCRITO I

### – Versão submetida a *Infection and Immunity*

#### VACCINATION WITH HEAT SHOCK PROTEIN 60 INDUCES A PROTECTIVE IMMUNE RESPONSE AGAINST EXPERIMENTAL *Paracoccidioides brasiliensis* PULMONARY INFECTION.

**RUNNING TITLE:** *Pb*HSP60 vaccination against Paracoccidioidomycosis

Renata de Bastos Ascenço Soares<sup>1,2</sup>, Francisco J. Gomez<sup>2</sup>, Célia Maria de Almeida Soares<sup>1</sup>,  
George S. Deepe, Jr<sup>2\*</sup>†

Laboratório de Biologia Molecular, ICBII, Universidade Federal de Goiás, 74001-970  
Goiânia, Goiás, Brazil<sup>1</sup>; Veterans Affairs Hospital, Division of Infectious Diseases,  
Department of Medicine, University of Cincinnati, College of Medicine, Cincinnati, Ohio  
45267-0560<sup>3</sup>

\***Corresponding author:** †Mailing Address: Division of Infectious Diseases, Dept. of  
Medicine, 231 Albert Sabin Way, University of Cincinnati, College of Medicine, Cincinnati,  
OH 45267-0560. Phone: (513) 558-4704. Fax: (513) 558-2089. E-mail: [george.deepe@uc.edu](mailto:george.deepe@uc.edu)

## ABSTRACT

*Paracoccidioides brasiliensis* causes a chronic granulomatous mycosis prevalent in Latin America. Successful resolution of infection with this fungus is dependent on activation of cellular immunity. We previously identified heat shock protein 60 as a target of the humoral response in paracoccidioidomycosis. Herein we expressed the gene encoding the heat shock protein 60 in *Escherichia coli* and analyzed the immunological activity of this recombinant antigen. Immunization of BALB/c mice with recombinant protein emulsified in adjuvant stimulated a cellular immune response as assessed by proliferation and interferon-gamma production. Vaccination with heat shock protein 60 reduced fungal burden in mice given  $10^6$  or  $10^7$  yeasts. CD4<sup>+</sup> cells were necessary for the efficacy of vaccination in both the afferent and efferent phases. Thus, we have demonstrated that this immunodominant antigen is a candidate for development of a vaccine against this fungus.

## INTRODUCTION

The dimorphic fungus, *Paracoccidioides brasiliensis*, is the etiological agent of paracoccidioidomycosis (PCM), a deep mycosis endemic in Latin America, including Brazil (43). *P. brasiliensis* infection is caused by the inhalation of air-borne conidia. PCM exhibits a wide spectrum of clinical and pathological manifestations, ranging from benign and localized forms to severe disseminated disease (10, 34). In most cases, the infection is localized primarily to the lungs, but can disseminate to other organs (43).

Experimental (14, 15, 45) and clinical (12, 36, 37, 38) studies have indicated the relevance of humoral and/or cellular immune responses in the pathogenesis and evolution of PCM. Specific T cell-mediated immune responses play a fundamental role in resistance to *P. brasiliensis*. When compared to individuals with localized disease, patients with systemic PCM display several defects in cellular immunity characterized by impaired *in vivo* delayed type hypersensitivity reactivity, alterations in the ratio of CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> cells, an imbalance in cytokine levels, and a depressed *in vitro* T cell proliferation to fungal antigens (2, 5, 6, 7, 11, 37, 38).

Heat shock protein 60 (HSP60) from fungal, protozoal and bacterial pathogens has been identified as a prominent antigen recognized by CD4<sup>+</sup> cells. Recombinant preparations of pathogen-derived HSP60 have been successfully used as vaccines in infection models (18, 24, 31, 35, 39, 40, 42, 48, 49). In murine histoplasmosis, both native and recombinant HSP60 mediate a protective immune response. Vaccination with recombinant HSP60 reduces the fungal burden in mice given a sublethal inoculum of yeast cells and improves survival in animals challenged intranasally with a lethal inoculum (20, 24). A surface form of *H. capsulatum* HSP60 is involved in adhesion of parasite yeast cells to host macrophages via interaction with CD18 integrin receptors (32).

Intrigued by the immunological properties of the highly conserved family of HSP60 proteins, recently, our group isolated the complete coding cDNA of HSP60 from *P. brasiliensis*. Initially, we studied the humoral immune responses to this antigen among human subjects. By immunoblot analysis, recombinant *P. brasiliensis* HSP60 was recognized by antibodies in 72 of 75 sera from paracoccidioidomycosis patients. No cross-reactivity was detected with individual sera from patients with aspergillosis, sporotrichosis, cryptococcosis and tuberculosis. Reactivity to HSP60 was observed in sera from 9.52% of control healthy individuals and 11.5% of patients with histoplasmosis (17, 26).

In the present study we developed a murine model of pulmonary PCM in order to examine the cellular immune responses against *PbHSP60* antigen. We endeavored to delineate the protective immune response elicited by recombinant HSP60 in the inductive and expressive phases of vaccine-induced immunity, and identified the T cell subpopulations responsible for HSP60 protective properties. Our results suggest that vaccination with the recombinant protein *PbHSP60* conferred protection in mice against a pulmonary PCM in mice. Depletion of CD4<sup>+</sup> cells during the inductive and expressive phase of vaccination abrogated the protective activity of *PbHSP60*.

## **MATERIALS AND METHODS**

**Animals.** BALB/c (*H-2<sup>d</sup>*) mice were purchased from Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine. Animals were housed in isolator cages and were maintained by the University of Cincinnati, Department of Laboratory Animal Medicine, which is accredited by the American Association for Accreditation of Laboratory Animal Medicine. All animal experiments were done in accordance with the Animal Welfare Act guidelines of the National Institutes of Health.

**Preparation of *P. brasiliensis* yeast cells and infection of mice.** *P. brasiliensis* isolate 01 (ATCC MYA-826), was cultured on liquid media Ham's F- supplemented with 18 g of

glucose, 0.6% HEPES, 1% cystine, 0.1% L-glutamic acid at 37°C in an orbital incubator at 200 rpm. After 7 days, log phase cultures were harvested by centrifugation, washed 3 times with HBSS (Mediatech, Inc., Herndon, VA) and yeasts were enumerated in a hemocytometer. Experimental infection was initiated by lightly anesthetizing the animals with 3% isofluorane, followed by intranasal inoculation of  $1 \times 10^6$  or  $1 \times 10^7$  *P. brasiliensis* yeast cells in a volume of 50  $\mu$ l.

***Pb* HSP60 production.** To generate recombinant protein, the intron-free *Pb*HSP60 was incubated with the following set of primers (the positions of the bases are given in relation to the ATG starting codon): NH<sub>2</sub>-terminal sense (bases 1 to 17), 5'-GCGGCCGCCCATATGCAGCGAGCTTTTAC -3'; and carboxy-terminal antisense (bases 1764 to 1776), 5'-GCGGCCGCCCAGATCTCTGAACATACCCCCG-3'. The sense primer introduces an *Nde*I site (underlined), and the carboxyterminal antisense primer introduces a *Bgl*III site (underlined). The material was amplified by polymerase chain reaction using the following conditions: 94°C for 60 s and 72°C for 3 min for 35 cycles with High Fidelity Taq polymerase (Invitrogen, San Diego, CA). The gene product was gel purified and cloned into the *Nde*I and *Bam*HI sites of pET19b (Novagen, Madison, Wis.). The plasmids were transformed into BL21 (DE3) lysogen host cells. To express the recombinant protein, transformed *Escherichia coli* cells were grown in Luria-Bertani medium (1000 ml) at 37°C in a shaking incubator with the Overnight Express™ Autoinduction System (Novagen, Madison, WI) at 200 rpm, overnight. Cells were harvested by centrifugation at 5,000  $\times$  g. *E. coli* pellets were resuspended in a buffer consisting of 10 mM imidazole, 500 mM NaCl, and 50 mM Tris-Cl (pH 7.9) and lysed by a freeze-thaw cycle followed by sonication. Soluble and insoluble fractions were separated by centrifugation at 20,000  $\times$  g. The insoluble pellet fraction was found to contain the recombinant product when analyzed by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE).

**HSP60 purification.** The insoluble pellet fraction was resuspended by sonication in a denaturing solubilization buffer consisting of 4 M urea, 500 mM NaCl, 10 mM imidazole, and 50 mM Tris (pH 7.9). The denatured material was recovered in supernatants after a centrifugation at  $20,000 \times g$  and filtered through a 0.22- $\mu\text{m}$ -pore-size cellulose acetate membrane to remove particulate material. The protein was purified by metal chelate affinity chromatography with a  $\text{Ni}^{2+}$ -Sepharose affinity column (His-Bind; Novagen, Madison, Wis) and washed with 60 mM imidazole. The recombinant product was eluted with 140 mM imidazole in the same buffer. Eluted material was dialyzed against 20 mM Tris (pH 7.4) – 200 mM NaCl containing decreasing concentrations of urea. The eluate was concentrated by ultrafiltration and the protein concentration was determined by the Bradford method (9).

**Immunization of mice with *Pb*HSP60.** Groups of mice were immunized subcutaneously at the base of the tail with *Pb*HSP60 or an equal amount of bovine serum albumin (BSA). Antigens were suspended in adjuvant containing monophosphoryl lipid A, synthetic trehalose dicorynomycolate, and cell wall skeleton (Corixa, Hamilton, Mont.). The cell wall skeleton was derived from streptococcal species. Animals were injected subcutaneously with 0.1 mL of emulsion (10  $\mu\text{g}$  of protein) twice. Injections were separated by 2 weeks. BSA was purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, Mo.).

**Depletion of T cell subsets.** To determine the influence of  $\text{CD4}^+$  or  $\text{CD8}^+$  cells on the inductive phase of vaccination, mice were injected intraperitoneally with 100  $\mu\text{g}$  of monoclonal antibody (MAb) to CD4 or CD8 on days -7 and -3 and on the day of the first immunization. This amount of MAb achieved a  $\geq 95\%$  depletion of both cell populations as determined by flow cytometry. Subsequently, mice received 100  $\mu\text{g}$  of MAb each week until the end of the experiment. Mice were challenged with *P. brasiliensis* 2 weeks postvaccination.

**Organ culture for *P. brasiliensis*.** Groups of four to six mice of each treatment were sacrificed at 2, 4 and/or 6, 8, 12 weeks post infection. Lungs, livers and spleens were removed aseptically and homogenized individually in 10 mL of sterile saline solution by a Teflon tissue grinder. Homogenates were diluted serially and 0.1 mL of each dilution was plated in duplicate onto brain heart infusion agar (Difco) (5% agar [wt/vol] supplemented with 4% (vol/vol) fetal bovine serum (Atlanta Biologicals) and 10 µg of gentamicin per mL. Plates were incubated at 37°C, and colonies were counted daily until no increase in counts was observed. The fungal burden was expressed as the mean number of CFU per whole organ ± the standard error of the mean (SEM). The limit of detection was 10<sup>2</sup> CFU.

**Splenocyte preparation.** Spleens from mice were teased apart between frosted ends of two glass slides. Cells were washed three times with HBSS (BioWhittaker, Walkersville, Md.) and resuspended at a concentration of 2.5 × 10<sup>6</sup> cells per mL in RPMI medium containing 10% fetal bovine serum, 1% L-glutamine, 1% sodium pyruvate, 1% nonessential amino acids, and 10 µg of gentamicin/mL.

**Proliferation assay.** Male BALB/c mice were subcutaneously immunized with 10 µg and 100 µg of *PbHSP60* in an adjuvant containing monophosphoryl lipid A, synthetic trehalose dicorynomycolate, and cell wall skeleton (Corixa, Hamilton, Mont.). Control mice were injected with BSA alone. Splenocytes were prepared as described above. To each well of a microtiter plate, 5 × 10<sup>5</sup> splenocytes in 0.1 mL of medium were added (RPMI 1640 containing 10% FBS, 10 mg of gentamicin/mL); 50 µL of either medium or antigen (*PbHSP60*) was added to each well in different concentrations (0.5, 2.5, 5, 25, 50 µg/ml). The cells were incubated for 120 h. Cells were pulsed 18 h before being harvested with the addition of 1 µCi of [<sup>3</sup>H]thymidine (specific activity, 6.7 Ci/mmol; New England Nuclear, Boston, Mass.). Cells were harvested to glass fiber filter paper, and the incorporation of radioactivity was measured by a liquid scintillation counter. Activity was analyzed as the

stimulation index: the counts per minute of cells stimulated with antigen divided by the counts per minute of cells in media alone. Reactivity to *PbHSP60* was defined as a stimulation index indicating a  $\geq 2.5$ -fold increase in the proliferation of cells compared to that of cells that were cultured in medium alone. The experiments were performed at least three times.

**Determination of cytokine production *in vitro*.** Splenocyte suspensions were prepared from BALB/c mice immunized with *PbHSP60*, or BSA at 14 days after each vaccination.  $5 \times 10^5$  splenocytes per well of suspension was added to each well of a 24-well plate. Cells were exposed to (0, 0.5, 1.0, 10  $\mu\text{g}$ ) of antigen in a volume of 25  $\mu\text{L}$  or were incubated with an equal volume of buffer. The cell suspensions were cultured for 24 h at 37°C in 5%  $\text{CO}_2$ , and the supernatant from cultures was harvested, filter sterilized, and stored at -70°C until assayed. The cytokine concentrations in splenocyte supernatants were determined by antigen capture, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). We measured interferon (IFN)-gamma, interleukin (IL)-4, IL-12p70, tumor necrosis factor (TNF)-alpha, (Endogen, Cambridge, Mass.), and IL-10 (PharMingen, San Diego, Calif.). We expressed the results as the change in the level of cytokine, by subtracting the amount of cytokine detected in non-stimulated splenocytes from that found in the supernatant of antigen-stimulated cells.

**Statistical analysis.** The protective activity of *PbHSP60* was determined by comparing the organism burden in organs from immunized and control animals using ANOVA a  $P < 0.05$  was considered significant. The levels of cytokine production were compared in response to *PbHSP60*.

## RESULTS

***P. brasiliensis* pulmonary infection and dissemination.** The evolution of the disease in BALB/c mice infected intranasally was monitored by CFU counts in the lungs, livers and spleens at different post infection periods (2, 4, 8, and 12 weeks). The number of CFU in the lungs of BALB/c mice at week 2 postinfection was significantly higher than after week 4.

Thereafter, the CFU counts in lungs were steady for weeks 4, 8 and 12. Yeast cells were recovered in the liver and spleen during weeks 2 to 12, and their numbers remained constant over that interval (Fig. 1).

**Splenocytes from mice injected with yeast cells or with *PbHSP60* proliferate in response to *PbHSP60*.** To determine if *PbHSP60* elicits a specific cellular immune response, BALB/c mice were immunized subcutaneously twice with 10 µg, 100µg of *PbHSP60* or with BSA as a control. Figure 2 shows that splenocytes from animals immunized with 10µg of *PbHSP60* or with 100 µg of *PbHSP60* proliferate when exposed to the protein *in vitro*, while splenocytes from control mice did not. The proliferative response by cells from animals injected with 10µg of antigen exceeded that of mice given immunized with 100 µg of HSP60 at the higher *in vitro* concentrations.

***PbHSP60* vaccination specifically enhances *in vitro* production of IFN-gamma.** Splenocytes from mice immunized with *PbHSP60* or BSA, as a control, were stimulated with increasing concentrations of *PbHSP60 in vitro*. The production of IFN-gamma by splenocytes from the immune group was significantly greater ( $P < 0.01$ ) than that the control group with BSA at 10 µg of *PbHSP60 in vitro* concentration (Fig. 3). IL-4, IL-10, IL-12 and TNF-alpha levels were assayed concomitantly, but we found no significant differences between immune and control groups (data not shown).

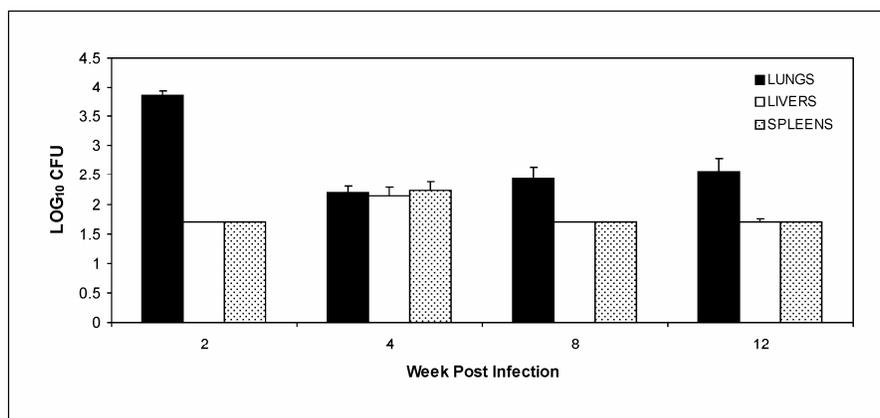
**Protective activity of *PbHSP60*.** We sought to determine whether the observed Th1 T cell recognition of *PbHSP60* antigen could confer protective immunity in BALB/c mice. Groups of six mice were injected with a total of 10 µg of *PbHSP60* or with an equal amount of BSA emulsified in RIBI adjuvant. As an additional control, a group of mice were unimmunized. Two weeks after immunization, mice were challenged with  $1 \times 10^6$  or  $1 \times 10^7$  yeast cells intranasally, and we analyzed the fungal burden in lungs following immunization. Fungal burden was assessed for 12 weeks in mice that were infected with the smaller inoculum and

for 6 weeks in mice that received the higher inoculum (Fig. 4). In mice that received  $1 \times 10^6$  yeasts, there was a significant decrease in fungal burden ( $P < 0.01$ ) at weeks 2 and 4 (Fig. 4A). At weeks 8 and 12 the fungal burden in lungs was not different (Fig. 4B). With the higher inoculum, a significant effect ( $P < 0.01$ ) was observed at weeks 2 and 6 (Fig. 4B).

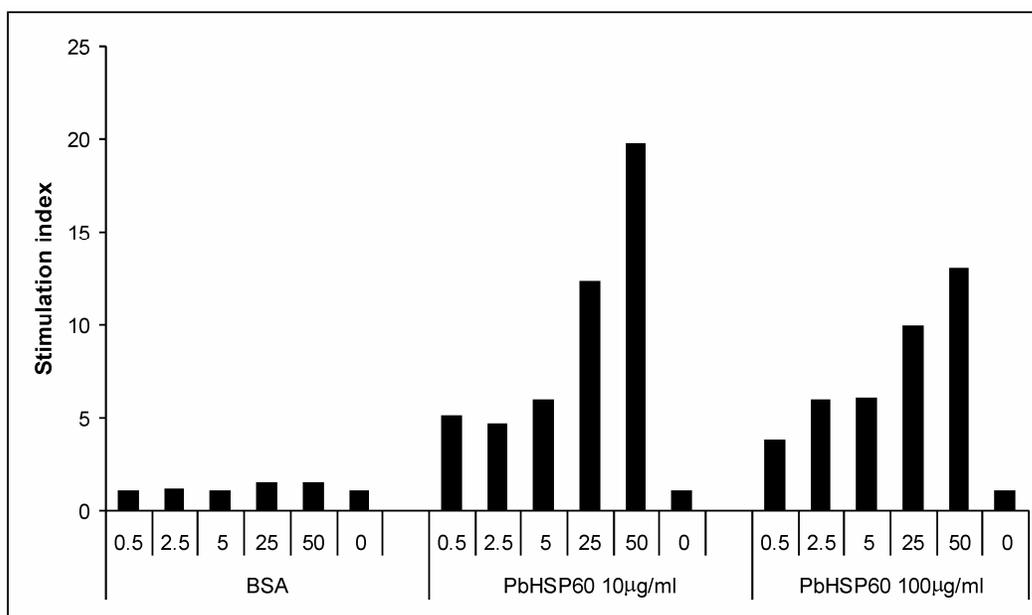
**Requirement for CD4<sup>+</sup> or CD8<sup>+</sup> cells in vaccine-mediated protection.** Groups of mice were depleted of either CD4<sup>+</sup> or CD8<sup>+</sup> or both by MAb injections, before immunization with *PbHSP60*. As a control, groups of vaccinated mice were given rat IgG. After the second immunization with antigen, treatment with MAb was discontinued, and cells were allowed to repopulate over a period of six weeks. Subsequently, mice were challenged with  $1.0 \times 10^6$  yeast cells i.n. Depletion of CD4<sup>+</sup> or both CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> cells during the inductive phase of immunization effectively abolished the protective efficacy of *PbHSP60* as observed at 2 weeks (Fig. 5A). At 4 weeks, the effect of CD4<sup>+</sup> cell depletion was not as dramatic as at 2 weeks. However, elimination of both subsets eliminated the effect of *PbHSP60*. Animals depleted of CD8<sup>+</sup> were protected by the vaccine and were able to control the fungal burden as well as controls.

Subsequently, we examined the role of CD4<sup>+</sup> and/or CD8<sup>+</sup> cells during the expressive phase of immunization. In this experimental design, animals were vaccinated with *PbHSP60* while their T cell subpopulations were intact. Then, 2 weeks after vaccination, mice were administered MAb to either CD4, CD8, or both, while other groups received rat IgG as a control. Infection was initiated by intranasal inoculation 1 week after the cell depletion. All unvaccinated mice succumbed to infection, whereas all vaccinated mice administered rat IgG survived. Depletion of CD8<sup>+</sup> cells did not alter the efficacy of vaccination at week 2 (Fig. 5, panel B). Vaccinated mice in depleted of CD4<sup>+</sup> cells or CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> subsets failed to control infection ( $P < 0.05$  compared to HSP60-immunized mice given rat IgG, MAb to CD4, MAb to CD8 or both).

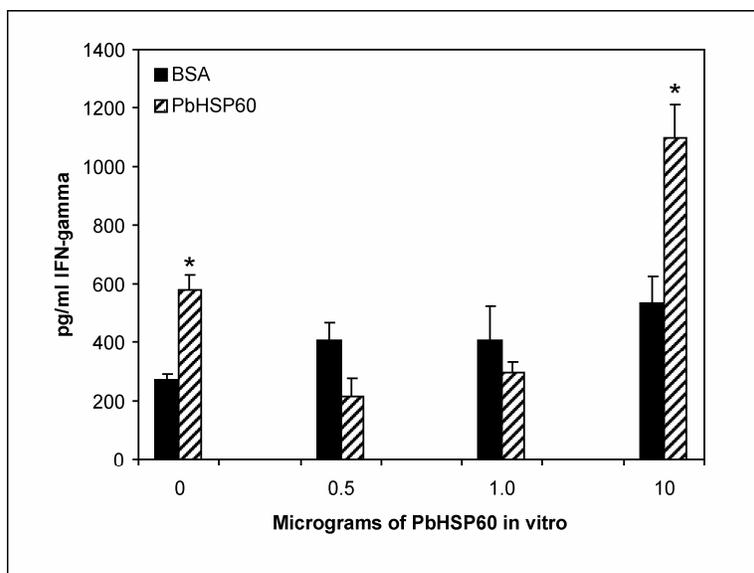
## FIGURES



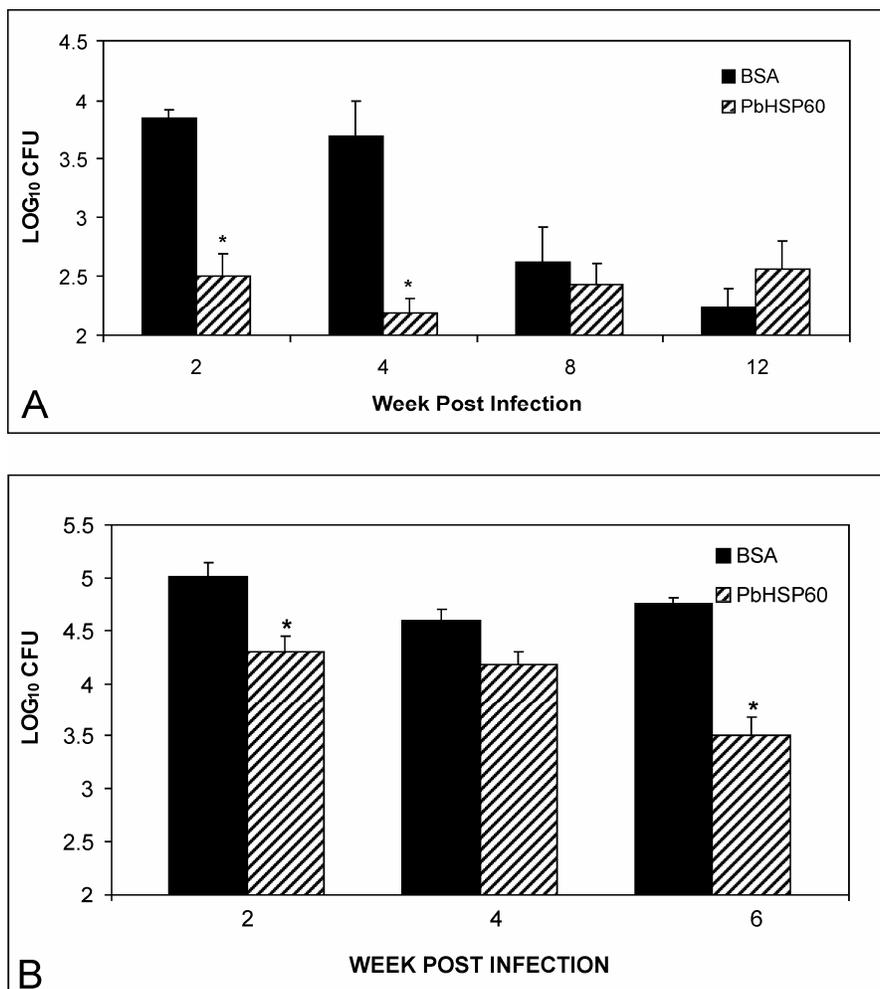
**Figure 1. Time course of *P. brasiliensis* infection.** Mice were infected i.n. with  $1 \times 10^6$  *P. brasiliensis* isolate *Pb01* yeast cells, and groups of mice euthanized at weeks 2, 4, 8, and 12 post infection. Each bar represents the mean of six animals. Range bars represent standard errors of the means.



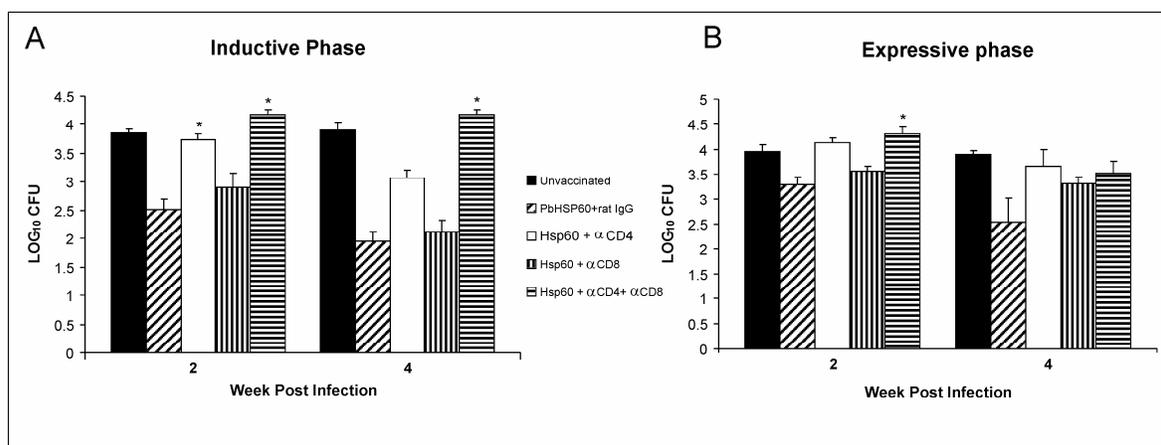
**Figure 2.** *PbHSP60* is a target of the cellular immune response to *P. brasiliensis*. Increasing concentrations of *PbHSP60* (0.5, 2.5, 5, 25, 50 µg/ml) were incubated with  $5 \times 10^5$  splenocytes from BSA immunized mice or mice immunized with 10 or 100 µg of *P. brasiliensis* recombinant HSP60. [ $^3\text{H}$ ]thymidine incorporation was measured after 6 days of culture. Pooled results of three experiments are illustrated.



**Figure 3.** Cytokine levels in supernatants from splenocytes of mice injected with BSA, or *PbHSP60* and stimulated with cognate antigen. At serial intervals after immunization, spleen cells from mice were stimulated for 48 h with equal amounts of BSA, or *PbHSP60*, and the levels of IFN- $\gamma$  in supernatants were determined by ELISA. Results represent the means  $\pm$  SEM for six mice at each time point. \*,  $P \leq 0.01$  compared to BSA.



**Figure 4.** Protective efficacy of *PbHSP60*. Groups of BALB/c mice was immunized with 10  $\mu$ g of *PbHSP60* or with an equal amount of BSA. Two weeks after the last injection of antigen, the animals were challenged with  $1 \times 10^6$  or  $1 \times 10^7$  yeast cells intranasally. **(A)** Time course of animals immunized with *PbHSP60* or BSA and infected with  $1 \times 10^6$  yeast cells. **(B)** Time course of animals immunized with *PbHSP60* or BSA and infected with  $1 \times 10^7$  yeast cells.



**Figure 5.** CFU in lungs of T-cell-depleted and *PbHSP60*-vaccinated mice. **(A)** Mice (n = 6) were immunized, concomitantly depleted of CD4 or CD8 cells or both and challenged with  $1 \times 10^6$  yeast cells. A group of immunized mice was administered rat IgG. **(B)** In the expressive phase, groups of mice (n = 6) were vaccinated and then depleted of CD4 or CD8 cells or both cells challenged with  $1 \times 10^6$  yeast cells. Immunized controls received rat IgG. CFU were enumerated at week 2 and 4 of infection. The data represent mean log<sub>10</sub> CFU  $\pm$ SEM. The results of one of two experiments are shown. \*,  $P \leq 0.05$  compared to immunized controls.

## DISCUSSION

PCM is classified as one of the deep endemic mycoses, sharing several clinical and pathological characteristics with histoplasmosis, blastomycosis, and coccidioidomycosis. At the histological level, *P. brasiliensis* infection is characterized by a chronic mononuclear and lymphocytic infiltrate, the formation of granulomas, caseating necrosis, and fibrosis. These features may also be observed in other deep mycoses and infections with facultative intracellular pathogens such as *Mycobacteria*. From the clinical point of view, PCM may present as a chronic, disseminated infection with episodes of latency and relapses that is characteristically seen in infections with facultative intracellular parasites (1, 8, 30). Epidemiologically, PCM may often affect otherwise immunocompetent individuals, but the prevalence of severe, invasive and lethal clinical forms is more prevalent in patients with defects in cellular immune responses, strongly suggesting that the T cell mediated immunity plays a central role in resistance against *P. brasiliensis* (28, 46).

Distinct subpopulations of helper T cells are known to be involved in divergent pathways of immune responses (20). Immunity to *P. brasiliensis* may be regulated by Th1 or Th2 subsets that would ultimately determine the outcome of the infection (24). There are only few reports describing the role of *P. brasiliensis* antigens on induction of protective immune response in experimental PCM. Much of the work with antigens has focused on the humoral response specifically for serodiagnosis. An exocellular molecule termed gp43 is a candidate antigen for PCM diagnosis of *P. brasiliensis* infection. Vaccination with recombinant gp43 protein or the DNA encoding gp43 protects susceptible mice from infection (48). The success of vaccination with either the entire protein or the peptide is dependent on eliciting Th1 response. The P10 domain of gp43 also stimulates cellular immunity and is protective against intratracheal infection by a virulent strain of *P. brasiliensis* (47, 48). This protective activity is correlated with the induction of an IFN-gamma secreting Th-1 lymphocyte population. *P.*

*brasiliensis* antigens fractionated by anion exchange chromatography have been examined for protective activity. Two fractions termed F0 and FII have been demonstrated to confer protection in mice, whereas another fraction, FIII, exacerbates diseases (22). The immunization of mice with F0 and FII, predominantly surface-localized antigens, elicited a protective effect against highly infective yeast forms of *P. brasiliensis*. Although, FIII fraction induces IFN-gamma, this property did not result in protection against challenge infection (21, 23).

Previously, we had identified *H. capsulatum* HSP60 as a prominent target of T cell mediated immunity and a protective vaccine in experimental pulmonary histoplasmosis (18, 44). Others have reported similar observations in several models of infection with intracellular parasites. Given the high level of evolutionary conservation among the heat shock protein family, and particularly among *H. capsulatum* and *P. brasiliensis* HSP60 gene and protein sequence, we postulated that *PbHSP60* would share some of the immunobiological properties of *H. capsulatum* HSP60. We utilized a model of respiratory *P. brasiliensis* infection in BALB/c mice. This strain has been used previously by several groups for analysis of pulmonary infection with *P. brasiliensis* (3, 16, 21, 25, 33, 41). Mice inoculated with  $1 \times 10^6$  or  $1 \times 10^7$  *P. brasiliensis* yeasts developed a predictable course of infection, in which the infectious agent could be recovered and quantified up to 12 weeks after the initial challenge. We were also able to detect dissemination to spleen and liver organs (data not shown), but organism burden was maximal in the lungs.

It has been well established that IFN-gamma plays a pivotal role in protective against various pathogens through enhancement killing activity of macrophages (13). Low levels or absence of IFN-gamma secretion have been associated with severe forms of PCM. Experimental findings show that different mouse strains previously infected with anti-IFN-gamma MAb prevent the clearance of yeast cells from the lungs and promotes their

dissemination to the liver and to the spleen (13, 28). We initially determined that exposure to viable *P. brasiliensis* yeast elicited recognition of recombinant *PbHSP60*, demonstrated by splenocyte proliferative responses. These findings are in line with what has been reported in other infectious models: HSP60 molecules of microbial origin have been characterized as targets of T cell recognition, as substantial fraction of T cell clonotypes are reactive to epitopes contained within this molecule (19, 44).

When we immunized animals with recombinant *PbHSP60*, we also detected a vigorous splenocyte proliferative response in association with secretion of significant of IFN-gamma and not IL-4. These results indicate that *PbHSP60* immunization elicited a Th1 immune response. Our previous studies in *H. capsulatum* experimental model of infection have highlighted the pivotal role of IFN-gamma production in resistance against intracellular pathogens. It has been postulated that IFN-gamma stimulation is necessary for the transition of macrophages from a permissive state, which allows the intracellular survival and replication of *H. capsulatum* yeasts, to an activated state, able to restrict and kill intracellular fungus. Conversely, neutralization of IFN-gamma by MAb results in failure to control and/or infection reactivation.

To provide an important link between innate and acquired immunity many groups of investigators have tried to elucidate the role of IL-12, the proinflammatory cytokine mainly produced by phagocytic cells (dendritic cells, monocytes/macrophages and polymorphonuclear neutrophils) (50). IL-12 is required for the development of Th1 responses against fungal infections. Treatment of mice with IL-12 at the onset of an intravenous or intratracheal infection with *Cryptococcus neoformans*, *H. capsulatum*, or *C. immitis* provides protection to the animals, (27, 29, 52). The protective effect of IL-12 was associated with a shift in the expression of Th1 and Th2 cytokines. *In vivo* neutralization of IL-12 aggravates the pulmonary PCM of both susceptible and resistant mice. Despite the relative importance of

this cytokine in the development of Th1 cells, we could not establish a correlation between the IL-12 production and vaccine-mediated protection.

In murine PCM, both CD4 and CD8 cells participate in the clearance of infection. (4, 13, 28, 46). Herein, we demonstrated that both that CD4<sup>+</sup> cells were important in the afferent phase of vaccination but that in the efferent phase elimination of both subsets abolished protection. These findings are similar to that found for HSP60 from *H. capsulatum* (18) but differ from that when live yeasts are used as an antigen (51). In that scenario, CD4<sup>+</sup> cells are dispensable and CD8<sup>+</sup> compensate for their absence in mediating protective immunity. These results clearly demonstrate that immunization with a viable microbe does activate both subsets of T cells whereas a protein appears to generate only a single protective T cell population. Modifying a protein to traffic in both the class I and class II major histocompatibility complex pathways might be of great value in generating protective CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> cells.

In summary, we have demonstrated that HSP60 from *P. brasiliensis* can confer a protective immune response in BALB/c mice. This work extends the number of antigens that might be considered for vaccine development against this fungal pathogen and extends the number of pathogens that can be protected with HSP60.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

This work was supported by Grants from CNPq. Renata de Bastos Ascenço Soares had a fellowship from CNPq n. SWE 200002-2004-0 and by NIH grants AI-34361 and 427747.

We would like to thank Reta Gibbons and Holly Allen for their support, especially in animal work.

## REFERENCES

1. **Anderton, S.M., R. van der Zee, A. Noordzij, and W. van Eden.** 1994. Differential mycobacterial 65-kDa heat shock protein T cell epitope recognition after adjuvant arthritis-inducing or protective immunization protocols. *J. Immun.* **152**:3656-3664.
2. **Arango, M. and L. Yarzabal.** 1982. T-cell dysfunction and hyperimmunoglobulinemia E in paracoccidioidomycosis. *Mycopathologia.* **79**:115-123.
3. **Aristizabal, B. H., K. V. Clemons, A. M. Cock, A. Restrepo, D. A. Stevens.** 2002. Experimental *Paracoccidioides brasiliensis* infection in mice: influence of the hormonal status of the host on tissue responses. *Med. Mycol.* **40**:169-178.
4. **Arruda, C., M. F. Franco, S. S. Kashino, F. R. Nascimento, F. R. A. Fazioli, C. A. C. Vaz, M. Russo, and V. L. G. Calich.** 2002. Interleukin-12 Protects Mice against Disseminated Infection Caused by *Paracoccidioides brasiliensis* but Enhances Pulmonary Inflammation. *Clin. Immunol.* **103**:185-195.
5. **Bava, A. J., A. S. Mistchenko, M. F. Palacios, M. E. Estevez, N. I. Tiraboschi, L. Sen, R. Negroni, R. A. Diez.** 1991. Lymphocyte subpopulations and cytokine production in paracoccidioidomycosis patients. *Microbiol. Immunol.* **35**:167-74.
6. **Benard, G., M. J. Mendes-Giannini, M. Juvenale, E. T. Miranda, A. J. Duarte.** 1997. Immunosuppression in paracoccidioidomycosis: T cell hyporesponsiveness to two *Paracoccidioides brasiliensis* glycoproteins that elicit strong humoral immune response. *J. Infect. Dis.* **175**:1263-1267.
7. **Biagione, L., M. J. Souza, L. G. Chamma, R. P. Mendes, S. A. Marques, N. G. S. Mota, and M. F. Franco.** 1984. Serology of paracoccidioidomycosis. Part II. Correlation between class-specific antibodies and clinical forms of the diseases. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **78**:617-621.
8. **Blander, S. J., and M. A. Horwitz.** 1993. Major cytoplasmic membrane protein of *Legionella pneumophila*, a genus common antigen and member of the hsp 60 family of heat shock proteins, induces protective immunity in a guinea pig model of Legionnaires' disease. *J. Clin. Invest.* **91**:717-723.
9. **Bradford, M. M.** 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**:248-254.
10. **Brummer, E., E. Castaneda, and A. Restrepo.** 1993. Paracoccidioidomycosis: an update. *Clin. Microbiol. Rev.* **6**:89-117.
11. **Calich, V. L. G., L. M. Singer-Vermes, A. M. Siqueira, and E. Burger.** 1985. Susceptibility and

- resistance of inbred mice to *Paracoccidioides brasiliensis*. Br. J. Exp. Pathol. **66**:585-594.
12. **Camargo, Z. P., and L. E. Cano.** 1994. Humoral immunity, p. 187–201. In M. F. Franco, C. S. Lacaz, A. Restrepo, and G. Del Negro (ed.), *Paracoccidioidomycosis*. CRC Press, Boca Raton, Fla.
  13. **Cano, L. E., S. S. Kashino, C. Arruda, D. Andre, C. F. Xidieh, L. M. Singer-Vermes, C. A. C. Vaz, E. Burger, V. L. G. Calich.** 1998. Protective Role of Gamma Interferon in experimental pulmonary *Paracoccidioidomycosis*. Infect. Immun. **66**:800-806.
  14. **Castaneda, E., E. Brummer, D. Pappagianis, and D. A. Stevens.** 1987. Chronic pulmonary and disseminated paracoccidioidomycosis in mice: quantitation of progression and chronicity. J. Med. Vet. Mycol. **25**:377-387.
  15. **Castaneda, E., E. Brummer, D. Pappagianis, and D. A. Stevens.** 1988. Impairment of cellular but not humoral immune response in chronic pulmonary and disseminated paracoccidioidomycosis in mice. Infect. Immun. **56**:1771– 1777.
  16. **Cock, A. M., L. E.Cano, D. Velez, B.H. Aristizabal, J. Trujillo, A. Restrepo.** 2000. Fibrotic sequelae in pulmonary paracoccidioidomycosis: histopathological aspects in BALB/c mice infected with viable and non-viable *Paracoccidioides brasiliensis* propagules. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo. **42**:59-66.
  17. **Cunha, D.A., R. M. Z. Oliveira, M. S. S. Felipe, S. M. Salem-Izacc, G. S. Jr. Deepe, and C. M. A. Soares.** 2002. Heterologous expression, purification and immunological reactivity of a recombinant HSP60 from *Paracoccidioides brasiliensis*. Clin. Diagn. Lab. Immun. **9**:374-377.
  18. **Deepe, G. S. Jr., and R. S. Gibbons.** 2002. Cellular and Molecular Regulation of Vaccination with Heat Shock Protein 60 from *Histoplasma capsulatum*. Infect. Immun. **70**:3759-3767.
  19. **Deepe, G. S. Jr., and R. S. Gibbons.** 2003. Protective and Memory Immunity to *Histoplasma capsulatum* in the Absence of IL-10. J. Immunol. **171**:5353–5362.
  20. **Deepe, G. S. Jr., R. S. Gibbons, G. D. Brunner, and F. J. Gomez.** 1996. A protective domain of heat-shock protein 60 from *Histoplasma capsulatum*. J. Infect. Dis. **174**:828-834.
  21. **Diniz, S. N., B. S. Reis, T. S. Goes, C. S. Zouain, M. F. Leite, A. M. Goes.** 2004. Protective immunity induced in mice by F0 and FII antigens purified from *Paracoccidioides brasiliensis*. Vaccine. 2004. **22**:485-492.
  22. **Diniz, S.N., P. S. Cisalpino, M. C. Koury, G. M. Andrade, M. G. Nogueira, and A. M. Goes.** 1999. *In vitro* human immune reactivity of fast protein liquid chromatography fractionated *Paracoccidioides brasiliensis* soluble antigens. Microbes Infect. **1**:353–360.

23. **Goes, T. S., V. S. Goes, E. Kalapothakis, M. F. Leite, A. M. Goes.** 2005. Identification of immunogenic proteins from *Paracoccidioides brasiliensis* antigenic fractions F0, FII and FIII. *Immunol. Letters.* **101**:24-31.
24. **Gomez, F.J., R. Allendoerfer, and G. S. Jr. Deepe.** 1995. Vaccination with recombinant heat shock protein 60 from *Histoplasma capsulatum* protects mice against pulmonary histoplasmosis. *Infect. Immun.* **63**:2587-2595.
25. **Gonzalez, A., H. L. Lenzi, E. M. Motta, L. Caputo, J. H. Sahaza, A. M. Cock, A. C. Ruiz, A. Restrepo, L. E. Cano.** 2005. Expression of adhesion molecules in lungs of mice infected with *Paracoccidioides brasiliensis* conidia. *Microbes and Infection* **7**:666-673.
26. **Izacc, S. M. S, F. J. Gomez, R. S. A. Jesuino, C. A. Fonseca, M. S. S. Felipe, G. S. Jr. Deepe, and C. M. A. Soares.** 2001. Molecular cloning characterization and expression of the heat shock protein 60 gene from the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Med. Mycol.* **39**:445–455.
27. **Jiang, C., D. M. Magee, and R. Cox.** 1999. Coadministration of interleukin-12 expression vector with antigen 2 cDNA enhances induction of protective immunity against *Coccidioides immitis*. *Infect. Immun.* **67**:5848–5853.
28. **Kashino, S. S., R. A. Fazioli, C. Cafalli-Favati, L. H. Meloni-Bruner, C. A. C. Vaz, E. Burger, L. M. Singer, and V. L. G. Calich.** 2000. Resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* infection is linked to a preferential Th1 immune response, whereas susceptibility is associated with absence of IFN- $\gamma$  production. *J Interferon Cytokine Res.* **20**:89-97.
29. **Kawakami, K., M. Tohyama, Q. Xie, and A. Saito.** 1996. Interleukin-12 protects mice against pulmonary and disseminated infection caused by *Cryptococcus neoformans*. *Clin. Exp. Immunol.* **104**:208–214.
30. **LaVerda, D., M. V. Kalayoglu, and G. I. Byrne.** 1999. Chlamydial heat shock proteins and disease pathology: new paradigms for old problems? *Infect. Dis. Obstet. Gynecol.* **7**:64-71.
31. **Lima, K. M., S. A. Santos, V. M. Lima, A. A. Coelho-Castelo, J. M. Jr. Rodrigues, and C. L. Silva.** 2003. Single dose of a vaccine based on DNA encoding mycobacterial hsp65 protein plus TDM-loaded PLGA microspheres protects mice against a virulent strain of *Mycobacterium tuberculosis*. *Gene Ther.* **10**:678-685.
32. **Long, K. H., F. J. Gomez, R. E. Morris, and S. L. Newman.** 2003. Identification of Heat Shock Protein 60 as the ligand on *Histoplasma capsulatum* that mediates binding to CD18 receptors on

- human macrophages. *J. Immunol.* **170**:487-494.
33. **Marques, A. F., M. B. da Silva, M. A. Juliano, L. R. Travassos, C. P. Taborda.** 2006. Peptide Immunization as an Adjuvant to Chemotherapy in Mice Challenged Intratracheally with Virulent Yeast Cells of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**:2814–2819.
34. **Mendes, R. P.** 1994. The gamut of clinical manifestations, p. 233–258. *In* M. F. Franco, C. S. Lacaz, A. Restrepo, and G. Del Negro (ed.), *Paracoccidioidomycosis*. CRC Press, Boca Raton, Fla.
35. **Milan, R., R. Alois, C. Josef, B. Jana, W. Evzen.** 2004. Recombinant protein and DNA vaccines derived from hsp60 *Trichophyton mentagrophytes* control the clinical course of trichophytosis in bovine species and guinea-pigs. *Mycoses* **47**:407-17.
36. **Mota, N. G. S., M. T. Rezkallah-Iwasso, M. T. S. Peracoli, R. C. Audi, R. P. Mendes, J. Marcondes, S. A. Marques, N.L. Dillon, and M.F. Franco.** 1985. Correlation between cell-mediated immunity and clinical forms of paracoccidioidomycosis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **79**:765–772.
37. **Mota, N.G.S., M. T. S. Peracoli, R. P. Mendes, C. R. Gattass, S. A. Marques, A. M. V. C. Soares, I. C. Izato, and M. T. Rezkallah-Iwasso.** 1988. Mononuclear cell subsets in patients with different clinical forms of paracoccidioidomycosis. *J. Med. Vet. Mycol.* **26**:105–111.
38. **Musatti, C. C., M. T. Rezkallah, E. Mendes, and N.F. Mendes.** 1976. *In vivo* and *in vitro* evaluation of cell-mediated immunity in patients with paracoccidioidomycosis. *Cell. Immunol.* **24**:365–378.
39. **Noll, A. and I. B. Autenrieth.** 1996. Immunity against *Yersinia enterocolitica* by vaccination with *Yersinia* Hsp60 immunostimulating complexes or *Yersinia* Hsp60 plus interleukin-12. *Infect. Immun.* **64**:2955-2961.
40. **Penttila, T., J.M. Vuola, V. Puurula, M. Anttila, M. Sarvas, N. Rautonen, P. H. Makela, M. Puolakkainen.** 2000. Immunity to *Chlamydia pneumoniae* induced by vaccination with DNA vectors expressing a cytoplasmic protein (Hsp60) or outer membrane proteins (MOMP and Omp2). *Vaccine* **19**:1256-1265.
41. **Pinto, A.R., R. Puccia, S. N. Diniz, M. F. Franco, L. R. Travassos.** 2000. DNA-based vaccination against murine paracoccidioidomycosis using the gp43 gene from *Paracoccidioides brasiliensis*. *Vaccine.* **18**:3050-3058.
42. **Quintana, F.J., P. Carmi, F. Mor, I. R. Cohen.** 2003. DNA fragments of the human 60-kDa heat shock protein (HSP60) vaccinate against adjuvant arthritis: identification of a regulatory HSP60 peptide. *J. Immunol.* **171**:3533-3541.

43. **Restrepo-Moreno, A.** 2003. Paracoccidioidomycosis, p. 328-345. In W.E. Dismukes, P.G. Pappas, and J. D. Sobel (ed.), Clinical mycology. Oxford University Press, New York, N.Y.
44. **Scheckelhoff, M. and G. S. Jr. Deepe.** 2005. A Deficiency in Gamma Interferon or Interleukin-10 Modulates T-Cell-Dependent Responses to Heat Shock Protein 60 from *Histoplasma capsulatum*. Infect. Immun. **73**:2129–2134.
45. **Singer-Vermes, L. M., C. B. Caldeira, E. Burger, and V. L. G. Calich.** 1993. Experimental murine paracoccidioidomycosis: relationship among dissemination of the infection, humoral and cellular immune responses. Clin. Exp. Immunol. **94**:75–79.
46. **Souto J. T., F. Figueiredo, A. Furlanetto, K. Pfeffer, M. A. Rossi, J. S. Silva.** 2000. Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha determine resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* infection in mice. Am. J. Pathol. **156**:1811-1820.
47. **Taborda, C. P., C. R. Nakaie, E. M. Cilli, E. G. Rodrigues, L. S. Silva, M. F. Franco, and L. R. Travassos.** 2004. Synthesis and Immunological Activity of a Branched Peptide Carrying the T-cell Epitope of gp43, the Major Exocellular Antigen of *Paracoccidioides brasiliensis*. Scand. J. Immunol. **59**:58–65.
48. **Taborda, C.P., M. A. Juliano, R. Puccia, M. Franco, L. R. Travassos.** 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.
49. **Thomaz, P.W., E. E. Wyckoff, E. J. Pishko, J. J. Yu, T. N. Kirkland, and G. T. Cole.** 1997. The hsp60 gene of the human pathogenic fungus *Coccidioides immitis* encodes a T cell reactive protein. Gene **199**:83-91.
50. **Trinchieri, G.,** 1995. Interleukin-12: A proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptative immunity. Annu. Rev. Immunol. **13**: 251–276.
51. **Wuthrich, M., H. I. Filutowicz, T. Warner, G. S. Jr Deepe, and B.S. Klein.** 2003. Vaccine immunity to pathogenic fungi overcomes the requirement for CD4 help in exogenous antigen presentation to CD8+ T cells: implications for vaccine development in immune-deficient hosts. J. Exp. Med. **197**:1405-1416.
52. **Zhou, P., M. C. Sieve, R. P. Tewari, and R. A. Seder.** 1997. Interleukin- 12 modulates the protective immune response to SCID mice infected with *Histoplasma capsulatum*. Infect. Immun. **65**:936– 942.

## PARTE II

### TRANSFORMAÇÃO EM *Paracoccidioides brasiliensis*

---

## I – INTRODUÇÃO

### I.1 – TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA mediada por *Agrobacterium tumefaciens* (ATMT)

A metodologia de transformação que utiliza a bactéria *A. tumefaciens* vem sendo empregada há muitos anos para transformar plantas superiores. Recentemente foi mostrada a capacidade dessa bactéria em transferir DNA para leveduras, fungos filamentosos, *Streptomyces lividans* e células humanas (Hela) (Bundock et al., 1995, De Groot et al., 1998, Kado & Kelly, 2006, Kunik et al., 2001.).

*A. tumefaciens* é um bacilo Gram-negativo aeróbico, flagelado e encontrado no solo. Pertence a classe das  $\alpha$ -proteobactérias e família Rhizobiaceae que inclui, entre outros, gêneros de bactérias fixadoras de nitrogênio como *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* e *Phyllobacterium* (Lipp-Nissinen, 1993). No gênero *Agrobacterium*, as espécies *A. tumefaciens* e *A. rhizogenes* destacam-se por serem patógenos de diversas espécies de vegetais por apresentarem os plasmídeos Ti e Ri, respectivamente. Estes conferem, às bactérias, capacidade para alterar o metabolismo e desenvolvimento das células vegetais, que resulta na doença conhecida como “galha da coroa” no caso de *A. tumefaciens*, e a síndrome da “raiz em cabeleira” por *A. rhizogenes*. O processo de colonização da planta requer a transferência de genes dos plasmídeos para o genoma da planta, resultando no desenvolvimento de um tumor na planta. Esse processo representa um mecanismo

de engenharia genética natural, de transferência de genes entre reinos diferentes **(Gelvin, 2003)**.

Em condições naturais, a bactéria transfere parte de seu plasmídeo Ti (“Tumor inducing”) para a célula vegetal infectada. Esta seqüência de DNA que é transferida (T-DNA) é capaz de se integrar eficientemente no genoma da planta hospedeira. O fragmento de T-DNA contém genes que codificam enzimas envolvidas na síntese de opinas e de fitohormônios **(Nam et al., 1997; Tinland, 1996)**, responsáveis pela formação do tumor e sobrevivência da bactéria. Os hormônios vegetais sintetizados – ácido indol acético (auxina) e isopentenil-AMP (citocinina) – induzem um desequilíbrio hormonal, que tem como consequência uma multiplicação descontrolada das células vegetais, resultando na formação do tumor **(Gelvin, 2003)**.

O mecanismo natural de transferência de genes entre *Agrobacterium* e plantas ainda não é totalmente compreendido, mas grande parte da base molecular envolvida nesse processo já foi caracterizada. A maioria das monocotiledôneas, incluindo muitos cereais, apresenta resistência à infecção pelo *A. tumefaciens*, o que dificulta a transformação por esta via **(De Groot et al., 1998)**.

As linhagens de *A. tumefaciens* são divididas em três grupos principais, que variam entre si quanto às espécies de plantas hospedeiras, características metabólicas e estrutura genômica, sendo que o grupo da linhagem C58 é o mais estudado. Seu genoma é formado basicamente por um cromossomo circular (2,84 Mb), um cromossomo linear (2,07 Mb), e dois megaplasmídeos: pAtC58 (542,8 kb) e pTiC58 (214,2 kb). Os genes envolvidos na transformação e na gênese do tumor estão localizados nos quatro elementos genéticos **(Wood et al., 2001)**.

O plasmídeo Ti (pTiC58) pode ser dividido em duas regiões principais: a região de virulência (*vir*) e a região de T-DNA (“Transferred DNA”). Além

destas duas regiões, o plasmídeo Ti possui genes de replicação e incompatibilidade (*ori* e *inc*), catabolismo de opina (*opc*) e função de conjugação (*tra*), sendo nenhuma destas seqüências necessárias à virulência **(Hooykaas & Beijersbergen, 1994)**.

A região de virulência é composta por um agrupamento gênico (denominado genes *vir*) e é responsável pela regulação da transferência do T-DNA. Esse conjunto de operons possui aproximadamente 40 kb e está localizado adjacente à borda esquerda do T-DNA **(Hooykaas & Beijersbergen, 1994)**. As unidades transcricionais dos genes *vir* são denominadas *virA*, *virB*, *virC*, *virD*, *virE*, *virF*, *virG* e *virH*. Somente quatro *locus vir* são essenciais para a formação do tumor (*virA*, *virB*, *virD* e *virG*), enquanto os outros afetam somente a eficiência da transferência **(Weising & Kahl, 1996)**. A região de T-DNA é a única parte do plasmídeo transferida para a célula hospedeira, e abriga os oncogenes (*onc*) responsáveis pela produção de fitohormônios. O tamanho do T-DNA varia de 10 a 30 kb e é limitada por duas regiões ou bordas constituídas de 25 pb denominadas borda direita (RB – “Right Border”) e borda esquerda (LB – “Left Border”). Estas bordas são seqüências altamente homólogas e estão orientadas de forma repetida direta **(Gelvin, 2003)**. A presença dessas seqüências é que define o tamanho do T-DNA, e experimentos mostraram que a borda direita é essencial para a ocorrência da transferência **(Wang et al., 1984)**.

O processo de infecção e transferência do T-DNA ocorre por uma série de etapas: quimiotaxia, adesão, indução da expressão dos genes *vir*, processamento do T-DNA, transferência do T-DNA, direcionamento do T-DNA até o núcleo e integração do T-DNA no genoma **(Sheng & Citovsky, 1996; Ziemienowicz, 2001; Gelvin, 2003)**.

## I.2 – TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA EM FUNGOS

A manipulação genética de fungos patogênicos permite um grande avanço na investigação de mecanismos de patogenicidade, virulência, muitos ainda desconhecidos. Alguns fungos dimórficos não possuem um sistema de transformação reprodutível, o que torna difícil a caracterização e identificação desses fatores. Fungos como *H. capsulatum*, *Cryptococcus neoformans*, *Blastomyces dermatitidis*, espécies de *Candida*, *Aspergillus fumigatus* e *Coccidioides posadassi* já possuem sistema de transformação adequado. O desenvolvimento do sistema de transformação em fungos patogênicos foi mais tardio e só foi possível com a introdução das técnicas de eletroporação e biobalística.

O plasmídeo pDH33, contendo o gene *hph* flanqueado pelo promotor *glaA* de *A. niger* e uma região terminadora *trpC* de *A. nidulans*, foi usado para construir um vetor pWI-1 para a transformação de *B. dermatitidis*. O promotor *glaA* foi substituído por um fragmento de 375pb de *B. dermatitidis* que continha o sítio de iniciação do gene WI-1 e elementos promotores. As células leveduriformes do isolado ATCC 60915 foram transformadas com o pWI-1P linearizado por eletroporação. Outros isolados também foram submetidos à transformação pelo mesmo protocolo. Análises do DNA genômico destes transformantes mostraram múltiplas inserções do DNA plasmidial no cromossomo. Este fato contrasta com a formação freqüente de plasmídeo episomal contendo seqüências teloméricas tanto em *H. capsulatum* quanto em *C. neoformans* (Woods & Goldman, 1993, Woods et al., 1998<sup>a</sup>, Woods et al., 1998<sup>b</sup>). O estabelecimento de um sistema reprodutível de

transformação genética *B. dermatitidis* forneceu subsídios para análise, por exemplo, do papel da adesina WI-1 na aderência e virulência (**Brandhorst et al., 1999, Klein et al., 2000, Rooney et al., 2001**). O locus WI-1 foi alvo de uma substituição alélica por rompimento, usando uma marca de seleção dominante que codifica resistência a higromicina B. Em trabalho posterior, camundongos infectados com o isolado recombinante nocauteado apresentaram pulmões com aparência normal, sugerindo que o isolado atenuado pode vacinar contra a blastomicose pulmonar (**Wüthrich et al., 2000, Nemecek et al., 2006**).

Em *C. neoformans* os métodos de biobalística e eletroporação foram usados para transformação (**Edman & Kwon-Chung, 1990, Toffaletti et al., 1993**). Análises dos transformantes mostraram que a frequência de transformação era variável e dependia de fatores como o isolado do fungo, plasmídeos e o método de liberação do DNA. As integrações genômicas ocorriam com mais frequência em sítios ectópicos e eventos de integração homóloga não eram comuns (**Varma et al., 1992**). Posteriormente, Cox *et al.*, 2001, clonaram o gene que codifica para uma fosfolipase (PLB1) de *C. neoformans* e construíram mutantes *plb1* usando o rompimento do gene alvo. Testes *in vivo* demonstraram que o isolado *plb1* era significativamente menos virulento que o isolado controle em modelos experimentais.

Experimentos de transformação são descritos para *C. posadasii*. Acredita-se que a quitinase tenha um papel crucial na autólise da parede celular durante a endoesporulação do fungo. Neste sentido dois genes de quitinase (CTS1 e CTS2) foram clonados. O papel de CTS1 na morfogênese de *C. posadassi* foi verificado através da técnica de rompimento do único gene alvo. Isto resultou em uma integração homóloga do plasmídeo pAN7.1 que continha um fragmento de 1.1kb do gene de quitinase no DNA cromossomal de *C. posadassi*. Entretanto, a perda da

função do gene CTS1 não tinha efeito na virulência e endosporulação de *C. posadassi* (Reichard et al., 2000). Outro gene avaliado quanto à função através do rompimento gênico foi a urease de *C. posadassi* (Li et al., 2001, Mirbod-Donovan et al., 2006). O nocaute do gene resultou na redução na quantidade de amônia secretada pelo fungo. Os camundongos BALB/c desafiados com o isolado mutante através da via intranasal mostraram aumento na sobrevivência, resposta à infecção granulomatosa bem organizada e uma melhor depuração do patógeno do que os animais desafiados com o isolado parental ou o reconstituído. A amônia e a urease enzimaticamente ativa liberada pelas esférulas durante a fase parasítica de *C. posadassi* contribui para o dano tecidual e exacerba a severidade da infecção aumentando a virulência do patógeno respiratório (Mirbod-Donovan et al., 2006).

Uma outra estratégia desenvolvida originalmente para transformação em plantas e adaptada para fungos é a transferência genética mediada por *A. tumefaciens*. Este método de transformação tem sido descrito em espécies de *Aspergillus*, *Fusarium*, *Neurospora*, *Saccharomyces cerevisiae* e *C. immitis* (Abuodeh et al., 2000, Bundock et al., 1995, De Groot et al., 1998). Em *B. dermatitidis* a transformação mediada por *A. tumefaciens* produziu um alto rendimento de transformantes e integração genética em um único locus cromossomal (Rooney et al., 2001, Sullivan et al., 2002).

A transformação de *P. brasiliensis* ainda não está estabelecida e tem sido alvo de estudos de vários grupos (Borba et al., 1994, San Blas et al., 1994). San Blas et al., 1994, estabeleceram um protocolo de produção de protoplastos. Porém, a regeneração da parede celular, após a digestão com enzimas líticas e adaptação do fungo às condições de cultivo, foi um processo lento. Nosso laboratório descreveu um procedimento para a transformação de leveduras de *P.*

*brasiliensis* por eletroporação utilizando o plasmídeo pNA7.1 (Punt et al., 1987), que carrega o gene *hph* que confere resistência a higromicina às células transformadas (Soares et al., 2005). Recentemente, foi desenvolvido um sistema alternativo de transformação para *P. brasiliensis* utilizando uma transformação mediada por *A. tumefaciens* que é objeto de estudo deste trabalho.

Em paralelo, outro grupo determinou vários parâmetros que influenciam a transformação mediada por *A. tumefaciens* (ATMT) e *P. brasiliensis*, tais como as condições de co-cultivo e a susceptibilidade da célula hospedeira. A recuperação celular e o aeramento das culturas durante o co-cultivo de *A. tumefaciens*:*P. brasiliensis* são essenciais para a ATMT (Almeida et al., 2007).

O estabelecimento destas condições de transformação deverá abrir novas perspectivas na investigação da biologia, diferenciação, interação patógeno-hospedeiro, incluindo virulência e patogenicidade. Os mecanismos utilizados por este patógeno durante a invasão e proliferação no hospedeiro humano poderão ser elucidados. Como uma aplicação desta tecnologia, foi padronizado um experimento para avaliar a interação entre um *P. brasiliensis* transgênico e fluorescente com células RAW, uma linhagem de macrófagos de murinos.

## II – OBJETIVOS

- Transformar o isolado *Pb01* de *P. brasiliensis* através de eletroporação.
- Transformar o isolado *Pb01* através de *A. tumefaciens* utilizando protocolos desenvolvidos para *H. capsulatum* e *B. dermatitidis*.

### III – MATERIAL E MÉTODOS

#### III.1 - ISOLADO DO FUNGO E CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO

Foi utilizado o isolado, já caracterizado, *Pb01* (ATCC, MYA, 826) de *P. brasiliensis*, padrão de nosso laboratório (Costa et al., 2002). O fungo foi crescido em meio HMM agar (Worsham & Goldman, 1988) temperatura de 36°C para a forma leveduriforme segundo as condições estabelecidas para *H. capsulatum*, no laboratório do Dr George Deepe Jr., University of Cincinnati.

#### III.2 - VETORES E CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO

O protocolo utilizado para transformar *P. brasiliensis* utilizando a transformação mediada por *A. tumefaciens* foi uma adaptação de um protocolo recentemente utilizado para *H. capsulatum* e *B. dermatitidis*. Modificações posteriores foram realizadas baseadas nos dados da literatura que dizem respeito à expressão de genes *vir* de *Agrobacterium* e estabilidade de proteínas.

Um vetor binário de *Agrobacterium*, pCB301-UGFP, foi construído pela ligação de um cassette de resistência a higromicina derivado do pAN7 e um cassette GFP compreendendo a GFP flaqueada pelo promotor CBP1 de *H.*

*capsulatum* e um terminador Ura5 derivado do pBY33 (Kugler *et al.*, 2000) dentro do MCS do plasmídeo pCB301 no meio das duas bordas de T-DNA. O plasmídeo pCB301-UGFP foi introduzido no *A. tumefaciens*, isolado LBA 1100 por eletroporação.

Como os níveis de crescimento não diferiram significativamente nas temperaturas entre 25 a 37°C, isolados de *Agrobacterium*, contendo pCB301-UGFP, foram crescidos 2 a 3 dias antes da co-cultura com *P. brasiliensis* (ATCC-MYA 826), a temperatura ambiente em meio LC contendo o plasmídeo Ti e os antibióticos que selecionam os plasmídeos binários (espectinomicina 250µg/ml e kanamicina 100µg/ml, respectivamente). Um *swab* dessa cultura foi usado para inocular meio líquido LC com as mesmas drogas para uma cultura *overnight* crescida à temperatura ambiente. Dois mililitros da cultura estacionária foram centrifugados e lavados com meio de indução (IM contendo 3% de sacarose). O *pellet* foi ressuscitado em 300µl e usado para inocular uma cultura líquida de meio de indução (IM), contendo antibióticos e 200µM do indutor acetosiringona (AS) para uma DO<sub>600</sub> de aproximadamente 0.15. A expressão do gene *vir* e a estabilidade da proteína foram mais eficazes à temperatura ambiente. Esta cultura foi crescida a temperatura ambiente com agitação, *overnight* (~12horas) para uma DO<sub>600</sub> de 0.6 a 0.7.

No intervalo entre o 5º e o 7º dia de uma cultura líquida de *P. brasiliensis* sem antibióticos, a cultura foi coletada, centrifugada, e o *pellet* ressuscitado em 5ml de meio HMM. Uma contagem em hemocítômetro neste ponto deve estar ~10<sup>8</sup> células/ml. Um volume de 1:1 numa cultura líquida de *A. tumefaciens*, contendo pCB301-UGFP, e *P. brasiliensis* foi então misturadas e 400µl plaqueados numa membrana de *nylon* não-carregada (Pall Biotyne A 0.45µ) em meio HMM sólido

contendo o indutor acetosiringona. As co-culturas foram incubadas à temperatura ambiente por 2 a 3 dias, na presença de acetosiringona, antes que as membranas fossem transferidas para o meio seletivo contendo HMM padrão, 100µg/ml de higromicina e 200µM de cefotaxima, incubados a 37° C. As colônias transformantes puderam ser contadas/selecionadas após 15 dias.

A expressão do GFP transgênico foi detectada por microscopia de fluorescência e confocal.

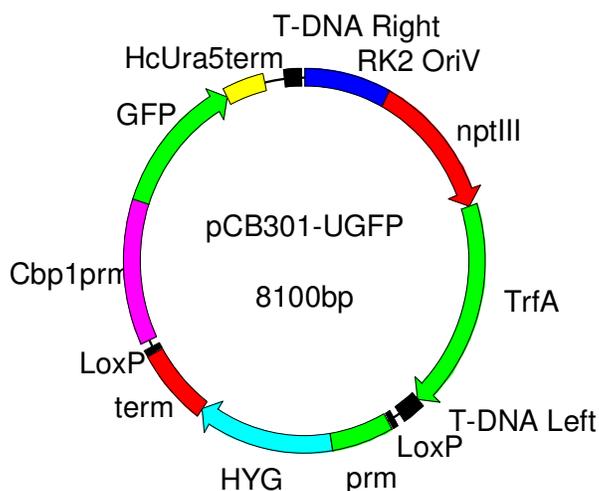
### **III.3 - ENSAIO DE LIGAÇÃO**

GFP *P. brasiliensis* foram incubados com monocamadas de células RAW, na presença de meio de cultura e EDTA. A expressão do GFP transgênico do fungo e a interação com fagócitos hospedeiros foram observados através de microscopia óptica e confocal.

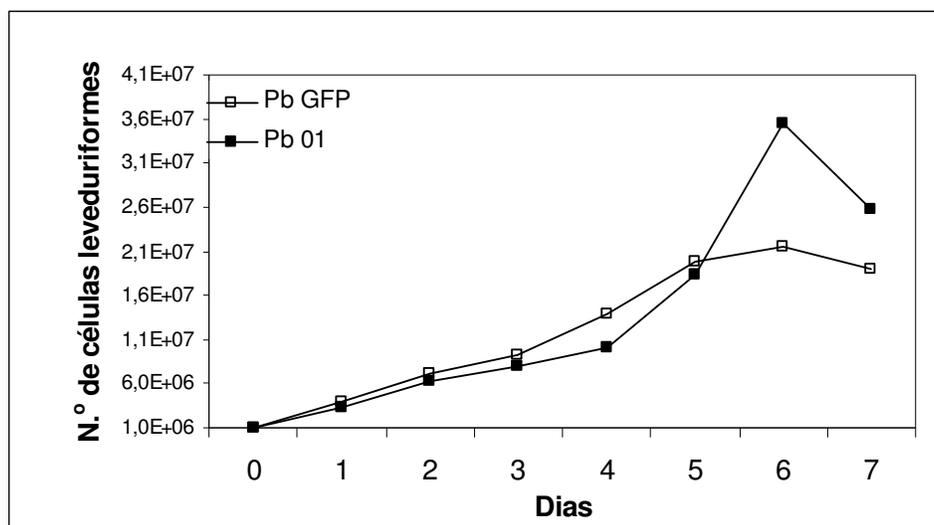
## IV – RESULTADOS

Numa segunda fase de experimentos, desenvolvemos um sistema de transformação utilizando *A. tumefaciens*, a partir de protocolos desenvolvidos para *H. capsulatum* e *B. dermatitidis*. Uma modificação no cassete do vetor binário pCB301 proporcionou a inserção de um gene para resistência a higromicina e o cassete de GFP flanqueado pelo promotor de *H. capsulatum* CBP1. O terminador Ura5 utilizado é derivado do plasmídeo pBY33 (**Figura 01**).

O isolado de *P. brasiliensis*, isolado *Pb* 01 (ATCC MYA 826) foi co-cultivado com culturas de *A. tumefaciens* carregando o cassete pCB301-UGFP, isolado LBA 1100. As colônias de *P. brasiliensis*-GFP foram observadas ao microscópio de fluorescência. As colônias que apresentaram cor verde foram crescidas em meio líquido HAMS F-12 (Difco) em paralelo com o isolado parental e, quantificadas em hemocítômetro (**Figura 02**). O isolado transgênico crescia da mesma maneira que o parental num intervalo de 07 dias.



**Figura 01 – pCB301-UGFP, um vetor binário *Agrobacterium* que codifica para GFP.** Dois cassetes foram clonados entre as bordas do T-DNA do vetor binário pCB301. Um cassete de resistência para HYG (azul claro) derivado do pAN7 e um cassete GFP (verde) compreendendo a GFP flanqueada pelo promotor CBP1 (rosa) de *Histoplasma capsulatum* e o terminador Ura5 (amarelo) derivado do pBY33 (Kugler *et al.*, 2000) foram ligados no MCS do plasmídeo pCB301.

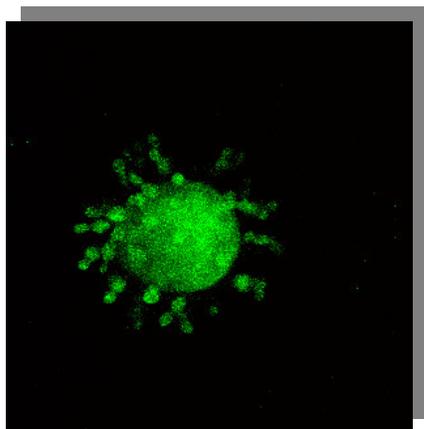


**Figura 02** – Uma cultura de *P. brasiliensis* expressando a GFP demonstrou características de crescimento similares em cultura líquida como o seu isolado parental ATCC MYA 826.

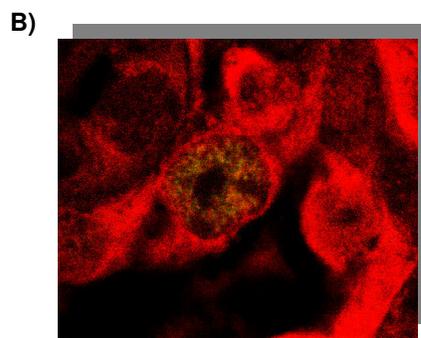
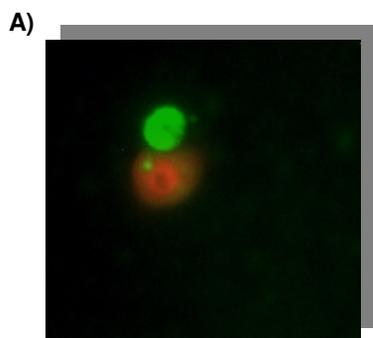
Colônias transgênicas de *P. brasiliensis* carregando o gene GFP foram analisadas em microscopia de fluorescência e confocal. A cor verde apresentava-se difusa em toda área citoplasmática e alcançava as células filhas (**Figura 03**).

Vários transformantes apresentavam diferentes intensidades na expressão da GFP. Isto sugere uma integração do cassete transformante de forma randômica no genoma de *P. brasiliensis*.

Numa tentativa de elucidar o processo de invasão de *P. brasiliensis* com a célula hospedeira foram realizados ensaios de ligação *in vitro* utilizando microscopia de fluorescência e confocal para visualização. Macrófagos murinos do tipo células RAW transgênicos, expressando uma proteína fluorescente vermelha, fagocitam preferencialmente *P. brasiliensis* proveniente de células filhas expressando GFP (**Figura 04**).



**Figura 03 – Expressão citoplasmática difusa de GFP em transformantes de *P. brasiliensis*.** Microscopia confocal revelou difusa coloração citoplasmática em >90% dos transformantes resistentes à Higromicina B. A intensidade da fluorescência variou entre os transformantes sugerindo integração randômica dentro do genoma.



**Figura 04 – Interação de transformantes de *P. brasiliensis* expressando GFP, e resistentes à higromicina B com fagócitos hospedeiros.** *P. brasiliensis* expressando GFP são avidamente fagocitados por células RAW de macrófagos murinos expressando uma proteína fluorescente vermelha. Os macrófagos captam preferencialmente células filhas menores de *P. brasiliensis*.

## V – DISCUSSÃO

O desenvolvimento de um eficiente sistema de transformação para fungos tem sido crucial para o estabelecimento de uma ligação entre análise da função do DNA *in vitro* e *in vivo*. Ferramentas genéticas clássicas tais como eletroporação, protoplastização, permeabilização celular com acetato de lítio foram inicialmente desenvolvidos para a transformação de vários fungos não patogênicos. Métodos alternativos tais como biobalística e transformação mediada por *A. tumefaciens* levaram a uma expansão de uma variedade de fungos que poderiam ser transformados utilizando essas ferramentas.

Nosso laboratório desenvolveu primeiramente um sistema de eletroporação para *P. brasiliensis*. Para estes experimentos foi escolhido o plasmídeo pAN7.1 por conter sequências altamente conservadas e tem sido usado na transformação de diferentes fungos filamentosos tais como *Aspergillus terreus*, *Schizophyllum commune*, *Gibberella fujikuroi*, *Humicola grisea* var *thermoidea* e *H. capsulatum* (Woods & Goldman, 1993, Woods et al., 1998). A eficiência do sistema de transformação pode ser comparável, por exemplo, a *H. grisea* no qual a amplitude do campo de 5.0 e 7.5 forneceu 5.0 e 2.8 transformantes/mg de DNA, respectivamente (Dantas-Barbosa et al., 1998). Concentrações mais elevadas de higromicina para seleção dos transformantes (100/200 µg/ml) têm sido relatadas para outros fungos; os baixos níveis de higromicina adquiridos nesse trabalho pode ser uma característica intrínseca do *Pb01*, ou talvez refletir as condições de plaqueamento das células leveduriformes não isoladas. Em função disso, reações

de PCR e análise por Southern-blotting confirmaram a presença da integração da marca seletiva hph no genoma dos transformantes de *P. brasiliensis*. A estabilidade mitótica dos transformantes após 4 passagens em meio não seletivo foi somente 8%. Um baixo nível de estabilidade da sequência de hph integrada no genoma dos transformantes foi observada, provavelmente devido à multinuclearidade das células leveduriformes de *P. brasiliensis* (Soares et al., 2005). Adicionalmente, a expressão transitória do gene hph aconteceu, provavelmente devido à pequena habilidade do fungo reconhecer o promotor de *A. nidulans* e sequências do terminador presentes no plasmídeo pAN7.1.

O sistema de transformação mediada por *A. tumefaciens* tira vantagem de um processo natural de transformação trazido pelo *A. tumefaciens*, uma bactéria patogênica de plantas que carrega um plasmídeo (Ti) indutor de tumor contendo DNA (T-DNA), um segmento que é inserido randomicamente no genoma da planta durante a infecção (Hoekema et al., 1984). Extensivas modificações do plasmídeo Ti têm levado ao desenvolvimento de vetores binários, que não possuem a maquinaria genética do T-DNA transferência/integração, que naturalmente existe no T-DNA, apresenta um gene para seleção das células hospedeiras transformadas, e pode ser usado para clonagem em *E. coli* (Hellens et al., 2000). O sistema de transformação mediado por *A. tumefaciens* em fungos apresenta a vantagem sobre outros métodos devido a sua alta eficiência e simplicidade, economizando tempo e equipamento especializado bem como, o fato levar à integração de uma única cópia do T-DNA (Michielse et al., 2005). Esta técnica tem sido aplicada a uma diversidade de formas celulares de fungos, células leveduriformes, hifas, conídios, e protoplastos) fornecendo uma ferramenta valiosa para o estudo de fungos patogênicos dimórficos humanos tais como *C. immitis*, *C. neoformans*, *H.*

*capsulatum*, e *B. dermatitidis* (Abuodeh et al., 2000, McClelland et al., 2005, Sullivan et al., 2002). Leal et al. 2004 utilizaram *A. tumefaciens* para a transformação de *P. brasiliensis*, e reportaram inabilidade em observar transformantes utilizando um plasmídeo contendo o promotor *trpC* de *A. nidulans*, o que corrobora com nossos achados experimentais. A estabilidade mitótica dos transformantes só foi alcançada quando os autores utilizaram um promotor e terminador contendo sequências de *N. crassa* (Leal et al., 2004). Adicionalmente, o uso de conídios mononucleares de *P. brasiliensis* irá ultrapassar os efeitos da instabilidade mitótica, e irá contribuir com a melhora do protocolo de transformação para este patógeno.

No intuito de contribuir para o desenvolvimento de novas ferramentas moleculares mais eficientes para a transformação e expressão de genes de *P. brasiliensis*, o presente estudo utiliza o sistema de transformação mediado por *A. tumefaciens* e analisou fatores que influenciam sua eficiência, como por exemplo, condições de co-cultivo e obtenção de transformantes *P. brasiliensis green fluorescent protein* (GFP) que foram construídos pela inserção do gene GFP sob o controle do promotor CBP1 de *H. capsulatum*. GFP tem sido comumente usado na última década como um valioso gene marcador no estudo de vários organismos, sendo que sua aplicação para *P. brasiliensis* ainda não estava relatada.

A visualização e expressão de GFP foram confirmadas por observação microscópica. As variações na intensidade da cor verde foram observadas dentre distintas formas fenotípicas (células mãe e filha) dentro da mesma população de células. O verdadeiro significado biológico dessa expressão diferencial de GFP permanece sem explicação e elucidação deste mecanismo pode trazer a tona informações moleculares relevantes sobre a biologia do fungo *P. brasiliensis*. No

entanto, a utilização de promotores endógenos pode permitir a geração de isolados alvo com fluorescência mais homogênea e/ou aumentada.

A transformação mediada por *Agrobacterium* é um efetivo e eficiente método de transferência genética em *P. brasiliensis*. É extremamente apropriado para a expressão de transgenes heterólogos. Através de inserção randômica no genoma do hospedeiro, o *P. brasiliensis* transgênico pode ser útil como ferramenta para estudar a interação entre o patógeno e as células hospedeiras. A manipulação genética de fungos patogênicos permite um grande avanço na investigação de mecanismos de patogenicidade, virulência, muitos ainda desconhecidos.

Os estágios iniciais da interação hospedeiro-parasita na PCM são desconhecidos devido ao fato de que o habitat do fungo ainda não está completamente elucidado e conseqüentemente, o momento preciso da infecção não está documentado. Os estágios iniciais da infecção são importantes porque é um momento particular em que macrófagos pulmonares interagem com o fungo pela primeira vez e tornam-se ativados. É por esta razão que mostramos pela primeira vez a interação de transformantes de *P. brasiliensis* expressando GFP, resistentes à higromicina B, com fagócitos hospedeiros também transformados. Vários experimentos para elucidação de alguns desses mecanismos de interação hospedeiro-parasita são necessários, especialmente utilizando a ferramenta de transformação para silenciamento de genes nessa fase da infecção.

## VII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Abad, A., I. Gomez, P. Velez, A. Restrepo.** 1986. Adrenal function in paracoccidioidomycosis. A prospective study in patients before and after ketoconazole therapy. *Infection* **14**:22-26.
2. **Abuodeh, R. O., M. J. Orbach, M. A. Mandel, A. Das, J. N. Galgiani.** 2000. Genetic transformation of *Coccidioides immitis* facilitated by *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Infect. Dis.* **181**:216-2110.
3. **Ajello, L. & L. Polonelli.** 1985. Imported paracoccidioidomycosis: a public health problem in non-endemic areas. *Eur. J. Epidemiol.* **1**:160-165.
4. **Almeida, F.** 1930. Estudos comparativos do granuloma coccidióico nos Estados Unidos e no Brasil. Novo gênero para o parasita brasileiro. *An. Fac. Méd. São Paulo.* **5**:125-46.
5. **Almeida, A. J., J. A. Carmona, C. Cunha, A. Carvalho, C. A. Rappleye, W. E. Goldman, P. J. Hooykaas, C. Leão, P. Ludovico, F. Rodrigues.** 2007. Towards a molecular genetic system for the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Fungal Genet Biol Article in Press.*
6. **Anderton, S.M., R. van der Zee, A. Noordzij, W. van Eden.** 1994. Differential mycobacterial 65-kDa heat shock protein T cell epitope recognition after adjuvant arthritis-inducing or protective immunization protocols. *J. Immun.* **152**:3656-3664.
7. **Angulo-Ortega, A., & L. Pollak,** 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.
8. **Aristizabal, B. H., K. V. Clemons, A. M. Cock, A. Restrepo, D. A. Stevens.** 2002. Experimental *Paracoccidioides brasiliensis* infection in mice: influence of the hormonal status of the host on tissue responses. *Med. Mycol.* **40**:169-178.
9. **Arruda, C., M. F. Franco, S. S. Kashino, F. R. Nascimento, F. R. A. Fazioli, C. A. C. Vaz, M. Russo, V. L. G. Calich.** 2002. Interleukin-12 Protects Mice against Disseminated Infection Caused by *Paracoccidioides brasiliensis* but Enhances Pulmonary Inflammation. *Clin. Immunol.* **103**:185-195.
10. **Baek, K. M., S. Y. Ko, M. Lee, J. S. Lee, J. O. Kim, H. J. Ko, J. W. Lee, S. H. Lee, S. N. Cho, C. Y. Kang.** 2003. Comparative analysis of effects of cytokine gene adjuvants on DNA vaccination against *Mycobacterium tuberculosis* heat shock protein 65. *Vaccine* **21**:3684-3689.
11. **Bagagli, E., S. M. G. Bosco, R.C. Theodoro, M. Franco.** 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.* **5**:344-351.
12. **Bai, Y., L. R. Li, J. D. Wang, Y. Chen, J. F. Jin, Z. S. Zhang, D. Y. Zhou, Y. L. Zhang.** 2003. Expression of *Helicobacter pylori* Hsp60 protein and its immunogenicity. *World. J. Gastroenterol.* **9**:2711-2724.
13. **Barbosa W, & R. R. Daher** 1991. Blastomicose sul-americana (paracoccidioidomycose). In R Veronesi, R Focaccia, R Dietze. *Doenças infecciosas e parasitárias*, 8 ed., Editora Guanabara Koogan AS, Rio de Janeiro.
14. **Benard, G., C. C. Romano, C. R. Cacere, M. Juvenale, M. J. S. Mendes-Giannini, A. J. S. Duarte,** 2001. Imbalance of IL-2, IFN- $\gamma$  and IL-10 secretion in the immunosuppression associated with human paracoccidioidomycosis. *Cytokine.* **13**: 248-252.
15. **Birk, O.S., D. Elias, A.S. Weiss, A. Rosen, R. van-der Zee, M.D. Walker, I.R. Cohen,** 1996. NOD mouse diabetes: the ubiquitous mouse hsp60 is a beta-cell target antigen of autoimmune T cells. *J Autoimmun* **9**:159-166.
16. **Blander, S. J. & M. A. Horwitz.** 1993. Major cytoplasmic membrane protein of *Legionella pneumophila*, a genus common antigen and member of the hsp 60 family of heat shock proteins, induces protective immunity in a guinea pig model of Legionnaires' disease. *J. Clin. Invest.* **91**:717-723.
17. **Bocca, A. L., E. E. Hayashi, Pinheiro, A. G. Furlanetto, 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.
18. **Borba, C. de M, M. N. Meirelles, A. M. da Silva, P. C. de Oliveira.** 1994. *Paracoccidioides brasiliensis* protoplast production by enzymatic treatment. *Mycoses.* **37**:317-323.
19. **Borelli, D.** 1972. Hipoteses sobre ecologia de *Paracoccidioides brasiliensis*. *Dermatol. Venez.* **3**:130-135.
20. **Brandhorst, T.T., M. Wüthrich, T. Warner, B. S. Klein.** 1999. Targeted gene disruption reveals an adhesin indispensable for

- pathogenicity of *Blastomyces dermatitidis*. J. Exp. Med. **189**:1207-1216.
21. **Brummer, E., E. Castañeda, A. Restrepo.** 1993. Paracoccidioidomycosis: an update. Clin. Microbiol. **6**:87-117.
  22. **Bundock, P., A. den Dulk-Ras, A. Beijersbergen, P. J. Hooykaas.** 1995. Trans-kingdom T-DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to *Saccharomyces cerevisiae*. EMBO J. **14**:3206-3214.
  23. **Cain, J. A., & G. S. Deepe Jr.** 1998. Evolution of the primary response to *Histoplasma capsulatum* in murine lung. Infect. Immun. **66**:1473-1481.
  24. **Camargo, Z. P., & M. F. Franco.** 2000. Current Knowledge on Pathogenesis and immunodiagnosis of paracoccidioidomycosis. Rev. Iberoam. Micol. **17**:41-48.
  25. **Campos, E. P., C. R. Padovani, A. M. J. Cataneo.** 1991. Paracoccidioidomycose: estudo radiológico e pulmonar de 58 casos. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo **33**:267-276.
  26. **Cano, L. E., B. Gómez, E. Brummer, A. Restrepo, D. A. Stevens,** 1994. Inhibitory effect of deferroxamine or macrophage activation on transformation of *Paracoccidioides brasiliensis* conidia ingested by macrophages: reversal by holotransferrin. Infect. Immun. **62**:1494-1496.
  27. **Cano, L. E., S. S. Kashino, C. Arruda, D. Andre, C. F. Xidieh, L. M. Singer-Vermes, C. A. C. Vaz, E. Burger, V. L. G. Calich.** 1998. Protective Role of Gamma Interferon in experimental pulmonary Paracoccidioidomycosis. Infect. Immun. **66**:800-806.
  28. **Carbonell, L. M. & J. Rodriguez.** 1965. Transformation of mycelial and yeast forms of *Paracoccidioides brasiliensis* in cultures and in experimental inoculations. Microbiol. **90**:504-510.
  29. **Castro, R. M., L. E. Cucé, C. Fava-Netto.** 1975. Paracoccidioidomycose. Inoculação experimental in "anima nobile". Relato de um caso. Med. Cutn. Ibero. Lat. Amer. **3**:289-292.
  30. **Chikamori, T., S. Saka, H. Nagano,** 1984. Paracoccidioidomycosis in Japan: Report of a case. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo. **26**:267-271.
  31. **Clemons, K. V. & D. A. Stevens,** 1990. Interactions of mammalian steroid hormones with *Paracoccidioides brasiliensis*: estradiol receptor binding and mediation of cellular functions. *Interciencia*. **15**:206-208.
  32. **Cock, A. M., L. E. Cano, D. Velez, B.H. Aristizabal, J. Trujillo, A. Restrepo.** 2000. Fibrotic sequelae in pulmonary paracoccidioidomycosis: histopathological aspects in BALB/c mice infected with viable and non-viable *Paracoccidioides brasiliensis* propagules. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo. **42**:59-66.
  33. **Cohen, I. R.** 1997. The Th1/Th2 dichotomy, hsp60 autoimmunity, and type I diabetes. Clin Immunol Immunopathol **84**:103-106.
  34. **Costa, A. A., F. J. Gomez, M. Pereira, M. S. S. Felipe, R. S. A. Jesuino, G.S. Deepe Jr, C. M. A. Soares.** 2002. Characterization of a gene which encodes a mannosyltransferase homolog of *Paracoccidioides brasiliensis*. Microbes Infect. **4**:1027-1034.
  35. **Coutinho, Z., D. Silva, M. Lazera, R.M. Oliveira, P. C. Sabroza, B. Wanke.** 2002. Paracoccidioidomycosis mortality in Brasil 1980-1995. Cad. Saúde Pública **18**:1441-1454.
  36. **Cox, G. M., H. C. McDade, S. C. Chen, S. C. Tucker, M. Gottfredsson, L. C. Wright, T. C. Sorrell, S. D. Leidich, A. Casadevall, M. A. Ghannoum, J. R. Perfect.** 2001. Extracellular phospholipase activity is a virulence factor for *Cryptococcus neoformans*. Mol. Microbiol. **39**:166-175.
  37. **Cunha, D.A., R. M. Z. Oliveira, M. S. S. Felipe, S. M. Salem-Izacc, G. S. Deepe Jr, C. M. A. Soares.** 2002. Heterologous expression, purification and immunological reactivity of a recombinant HSP60 from *Paracoccidioides brasiliensis*. Clin. Diagn. Lab. Immun. **9**:374-377.
  38. **Dantas-Barbosa, C., E. F. Araujo, L. M. Moraes, M. H. Vainstein, M. O. Azevedo.** 1998. Genetic transformation of germinated conidia of the thermophilic fungus *Humicola grisea* var thermoidea to hygromycin resistance. FEMS Microbiol. Lett. **169**:185-190.
  39. **de Groot, M. J., P. Bundock, P. J. Hooykaas, A. G. Beijersbergen.** 1998. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of filamentous fungi. Nat. Biotechnol. **16**:839-842.
  40. **Deepe Jr, G.S., & R. S. Gibbons.** 2002. Cellular and Molecular Regulation of Vaccination with Heat Shock Protein 60 from *Histoplasma capsulatum*. Infect. Immun. **70**:3759-3767.
  41. **Deepe Jr, G.S., R. S. Gibbons, G. D. Brunner, F. J. Gomez.** 1996. A protective domain of heat-shock protein 60 from *Histoplasma capsulatum*. J. Infect. Dis. **174**: 828-834.

42. **Deepe, G. S. Jr., & R. S. Gibbons.** 2002. Cellular and Molecular Regulation of Vaccination with Heat Shock Protein 60 from *Histoplasma capsulatum*. *Infect. Immun.* **70**:3759-3767.
43. **Deepe, G. S. Jr., & R. S. Gibbons.** 2003. Protective and Memory Immunity to *Histoplasma capsulatum* in the Absence of IL-10. *J. Immunol.* **171**:5353–5362.
44. **Deepe, G. S. Jr., R. S. Gibbons, G. D. Brunner, and F. J. Gomez.** 1996. A protective domain of heat-shock protein 60 from *Histoplasma capsulatum*. *J. Infect. Dis.* **174**:828-834.
45. **Diniz, S. N., B. S. Reis, T. S. Goes, C. S. Zouain, M. F. Leite, A. M. Goes.** 2004. Protective immunity induced in mice by F0 and FII antigens purified from *Paracoccidioides brasiliensis*. *Vaccine.* **22**:485-492.
46. **Diniz, S.N., P. S. Cisalpino, M. C. Koury, G. M. Andrade, M. G. Nogueira, A. M. Goes.** 1999. *In vitro* human immune reactivity of fast protein liquid chromatography fractionated *Paracoccidioides brasiliensis* soluble antigens. *Microbes Infect.* **1**:353–360.
47. **Dos Santos, W.A., B. M. da Silva, E. D. Passos, E. Zandonade, A. Falqueto** 2003. Association between smoking and Paracoccidioidomycosis: a case-control study in the State of Espírito Santo, Brazil. *Cad Saude Publica*; **19**: 245-53.
48. **Edman J. C., K. J. Kwon-Chung.** 1990. Isolation of the URA5 gene from *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* and its use as a selective marker for transformation. *Mol. Cell. Biol.* **10**:4538-4544.
49. **Felipe, M. S. S., R. V. Andrade, S. S. Petrofeza, A. Q. Maranhão, F. A. Torres, P. Albuquerque, F. B. Arraes, M. Arruda, M. O. Azevedo, A.J. Baptista, L. A. M. Bataus, C. L. Borges, E. G. Campos, M. R. Cruz, B. S. Daher, A. Dantas, M. A. Ferreira, G. V. Ghil, R. S. A. Jesuino, C.M. Kyaw, L. Leitao, C. R. Martins, L. M. Moraes, E. O. Neves, A. M. Nicola, E. S. Alves, J. A. Parente, M. Pereira, M. J. Poças-Fonseca, R. Resende, B. M. Ribeiro, R. R. Saldanha, S. C. Santos, I. Silva-Pereira, M. A. Silva, E. Silveira, I. C. Simoes, R. B. Soares, D. P. Souza, M. T. De-Souza, E. V. Andrade, M. A. Xavier, H. P. Veiga, E. J. Venancio, M.J. Carvalho, A. G. Oliveira, M. K. Inoue, N. F. Almeida, M. E. Walter, C. M. A. Soares, M. M. Brigido.** 2003. Transcriptome characterization of the dimorphic and pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* by EST analysis. *Yeast.* **20**:263-271.
50. **Ferreira, K. S., J. D. Lopes, S. R. Almeida,** 2004. Down-regulation of dendritic cell activation induced by *Paracoccidioides brasiliensis*. *Immunology Letter* **94**:107-114..
51. **Fonseca, C.A., R. S. A. Jesuino, M. S. S. Felipe, D. A. Cunha, W. A. Brito, C. M. A. Soares.** 2001. Two-dimensional electrophoresis and characterization of antigens from *Paracoccidioides brasiliensis*. *Microbes Infect.* **3**:535-542.
52. **Franco, M.** 1987. Host-parasite relationships in paracoccidioidomycosis. *J. Med. Vet. Mycol.* **25**:5-18.
53. **Franco, M., A. Sano, K. Kera, K. Nishimura, K. Takeo, M. Miyaji,** 1989. Clamydospore formation by *Paracoccidioides brasiliensis* mycelial form. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.* **31**:151-157.
54. **Frydman, J., E. Nimmesgern, K. Ohtsuka, F. U. Hartl.** 1994. Folding of nascent polypeptide chain in high molecular mass assembly with molecular chaperones. *Nature* **370**:111-117.
55. **Gelvin, S. B.** 2003. *Agrobacterium*-mediated plant transformation: The biology behind the "Gene-Jockeying" tool. *Microbiol Mol Biol Rev* **67**:16-37.
56. **Goes, T. S., V. S. Goes, E. Kalapothakis, M. F. Leite, A. M. Goes.** 2005. Identification of immunogenic proteins from *Paracoccidioides brasiliensis* antigenic fractions F0, FII and FIII. *Immunol. Letters.* **101**:24-31.
57. **Gomez, F.J., R. Alloenderfer, G. S. Deepe Jr.** 1995. Vaccination with the recombinant heat-shock protein 60 from *Histoplasma capsulatum* protects mice against pulmonary histoplasmosis. *Infect.Immun.* **63**:2587-2595.
58. **Gonzalez, A., H. L. Lenzi, E. M. Motta, L. Caputo, J. H. Sahaza, A. M. Cock, A. C. Ruiz, A. Restrepo, L. E. Cano.** 2005. Expression of adhesion molecules in lungs of mice infected with *Paracoccidioides brasiliensis* conidia. *Microbes and Infection* **7**:666-673.
59. **Hartl, F.U.** 1996. Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* **381**:571-581.
60. **Hellens,R., P. Mullineaux, H. Klee.** 2000. Technical Focus: a guide to *Agrobacterium* binary Ti vectors. *Trends Plant Sci* **5**: 446-451.
61. **Hoekema, A., P. W. Roelvink, P. J. Hooykaas, R. A. Schilperoort.** 1984. Delivery of T-DNA from the *Agrobacterium tumefaciens* chromosome into plant cells. *EMBO J* **11**:2485-2490.
62. **Hooykaas, P. J. J., A. G. M. Beijersbergen.**

1994. The virulence system of *Agrobacterium tumefaciens*. *Annl Rev Phytopathol*, **32**:157-179.
63. **Hornef, M. W., A. Noll, R. Schirmbeck, J. Reimann, I. B. Autenrieth.** 2000. DNA vaccination using coexpression of cytokine genes with a bacterial gene encoding a 60-kDa heat shock protein. *Med. Microbiol. Immunol. (Berl)*. **189**:97-104.
64. **Jiang, C., D. M. Magee, R. Cox.** 1999. Coadministration of interleukin-12 expression vector with antigen 2 cDNA enhances induction of protective immunity against *Coccidioides immitis*. *Infect. Immun.* **67**:5848-5853.
65. **Joseph, E. A., A. Mare, W. R. Irving,** 1966. Oral South American blastomycosis in the United States of America. *Oral Surg. Oral. Med. Oral. Pathol.* **6**:732-737.
66. **Kashino, S. S., R. A. Fazioli, C. Cafalli-Favati, L. H. Meloni-Bruner, C. A. C. Vaz, E. Burger, L. M. Singer, V. L. G. Calich.** 2000. Resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* infection is linked to a preferential Th1 immune response, whereas susceptibility is associated with absence of IFN- $\gamma$  production. *J Interferon Cytokine Res.* **20**:89-97.
67. **Kawakami, K., M. Tohyama, Q. Xie, A. Saito.** 1996. Interleukin-12 protects mice against pulmonary and disseminated infection caused by *Cryptococcus neoformans*. *Clin. Exp. Immunol.* **104**:208-214.
68. **Kado, C.I. & B. Kelly.** 2002. Actinomycetes. *Methods Mol Biol.* **344**:395-401.
69. **Klein, B. S.** 2000. Molecular basis of pathogenicity in *Blastomyces dermatitidis*: the importance of adhesion. *Cur. Opin. Microbiol.* **3**:339-343.
70. **Kramer, U., K. Rizos, H. Apfel, I. B. Autenrieth, C.T. Lattemann.** 2003. Autodisplay: development of an efficacious system for surface display of antigenic determinants in Salmonella vaccine strains. *Infect. Immun.* **71**:1944-1952.
71. **Kugler, S., Young, B., Miller, V.L. Goldman, W.E.** 2000. Monitoring phase-specific gene expression in *Histoplasma capsulatum* with telomeric GFP fusion plasmids. *Cell Microbiol.* **6**:537-47.
72. **Kunik, T., T. Tzfira, Y. Kapulnik, Y. Gafni, C. Dingwall, V. Citovsky.** 2001. Genetic transformation of HeLa cells by *Agrobacterium*. *Proc Natl Acad Sci USA.* **98**:1871-1976.
73. **Lacaz, C. S., E., Porto J. E. C. Martins,** 1991. Paracoccidioidomycosis, p.248-261 *In*: Micologia Médica, 8th ed. Sarvier Editora, São Paulo, Brasil.
74. **LaVerda, D., M. V. Kalayoglu, G. I. Byrne.** 1999. Chlamydial heat shock proteins and disease pathology: new paradigms for old problems? *Infect. Dis. Obstet. Gynecol.* **7**:64-71.
75. **Leal, C. V., B. A. Montes, A. C. Mesa, A. L. Rua, M. Corredor, A. Restrepo.** 2004. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Med Mycol* **42**:391-395.
76. **Li, K., J. J. Yu, C. Y. Hung, P. F. Lehmann, G. T. Cole.** 2001. Recombinant urease and urease DNA of *Coccidioides immitis* elicit an immunoprotective response against coccidioidomycosis in mice. *Infect Immun.* **69**:2878-2887.
77. **Lima, K. M., S. A. Santos, V. M. Lima, A. A. Coelho-Castelo, J. M. Rodrigues Jr, C.L. Silva.** 2003. Single dose of a vaccine based on DNA encoding mycobacterial hsp65 protein plus TDM-loaded PLGA microspheres protects mice against a virulent strain of *Mycobacterium tuberculosis*. *Gene Ther.* **10**:678-685.
78. **Lindquist, S. & E. A. Craig.** 1988. The heat shock proteins. *Ann. Rev. Genet.* **22**:631-677.
79. **Lindquist, S.** 1986. The heat shock response. *Ann. Rev. Biochem.* **55**:1151-1191.
80. **Lipp-Nissinen, K. H.** 1993. Molecular and cellular mechanisms of *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Ciência e Cultura*, **45**:104-111.
81. **Londero, A. T., & C. D. Ramos.** 1990. Paracoccidioidomycose: estudo clínico-micológico de 260 casos observados no interior do Estado do Rio Grande do Sul. *J. Pneumol. (Brazil)* **16**:129-132.
82. **Londero, A.T., & I. S. Melo,** 1983. Paracoccidioidomycose in childhood. A critical review. *Mycopathologia* **82**:49-55.
83. **Londero, A. T.** 1986. Paracoccidioidomycose. Patogenia, formas clínicas, manifestações pulmonares e diagnóstico. *J.Pneumol. (Brazil)* **12**:41-57.
84. **Long, K. H., F. J. Gomez, R. E. Morris, S. L. Newman.** 2003. Identification of Heat Shock Protein 60 as the ligand on *Histoplasma capsulatum* that mediates Binding to CD18 receptors on human macrophages. *J. Immunol.* **170**:487-494.
85. **Mamoni, R. L., Blotta, M. H. S. L.** 2005.

- Kinetics of Cytokines and Chemokines Gene Expression Distinguishes *Paracoccidioides brasiliensis* Infection From Disease. *Cytokine*. **32**:20-29.
86. **Manns, B. J., B. W., Baylis, S. J., Urbanski, A. P., Gibb, H. R. Rabin,** 1996. Paracoccidioidomycosis: case report and review. *Clin. Infect. Dis.* **23**:1026-1032.
87. **Marques, A. F., M. B. da Silva, M. A. Juliano, L. R. Travassos, C. P. Taborda.** 2006. Peptide Immunization as an Adjuvant to Chemotherapy in Mice Challenged Intratracheally with Virulent Yeast Cells of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**:2814–2819.
88. **Martinez, R.** 1997. Blastomicose Sul-Americana (Paracoccidioidomicose) - Etiopidemiologia e Ecologia. In: Veronesi, R. and R. Focaccia. *Tratado de infectologia Vol II.* Ateneu. 1082.
89. **Matthews, R. C. & J. P. Burnie.** 1989. Cloning of a DNA sequence encoding a major fragment of the 47 Kilodalton stress protein homologue of *Candida albicans*. *Fems Microbiol. Lett.* **60**:25-30.
90. **Matthews, R. C., J. P. Burnie, D. Howat, T. Rowland, F. Walton.** 1991. Autoantibodies to hsp90 can mediate protection against systemic candidosis. *Immunology* **74**:20-24.
91. **Matthews, R. C., J. P. Burnie, D. Smith, I. Clark, J. Midgley, M. Conolly, B. Gazzardi.** 1988. *Candida albicans* and AIDS: evidence for protective antibody. *Lancet.* **2**:263-266.
92. **McClelland, C. M., Y. C. Chang, K. J. Kwon-Chung.** 2005. High frequency transformation of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* by *Agrobacterium tumefaciens*. *Fungal Genet. Biol.* **42**:904-913.
93. **McEwen, J. G., V. Bedoya, M. M. Patino.** 1987. Experimental murine paracoccidioidomycosis induced by inhalation of conidia. *J. Med. Vet. Mycol.* **25**:165-75.
94. **Mendes, R. P.** 1994. The gamut of clinical manifestations. In: Franco, M.; Lacaz, C.S.; Restrepo-Moreno, A. & Del Negro, G. (eds.). *Paracoccidioidomycosis*, Boca Ratón, CRC Press. 233-258.
95. **Metzler, B., Q. Xu, G. Wick.** 1998. The role of (auto-) immunity in atherogenesis. *Wien Klin Wochenschr* **110**:350-355.
96. **Michielse, C. B., P. J. Hooykaas, C. A. van den Hondel, A. F. Ram.** 2005. *Agrobacterium* mediated transformation as a tool for functional genomics in fungi. *Curr. Genet.* **48**:1-17.
97. **Mirbod-Donovan F., R. Schaller, C. Y. Hung, J. Xue, U. Reichard, G. T. Cole.** 2006. *Infect Immun* **74**:504-15.
98. **Moreira, S. F. I., A. M. Bailão, M. S. Barbosa, R. S. A. Jesuino, M. S. S. Felipe, M. Pereira, C. M. A. Soares.** 2004. Monofunctional catalase P of *Paracoccidioides brasiliensis*: identification, characterization molecular cloning and expression analysis. *Yeast.* **21**:173-182.
99. **Morimoto, R. I.** 1993. Cells in stress: transcriptional activation of heat shock genes. *Science* **259**:1409-1410.
100. **Murphy, J. W., F. Bistoni, G.S. Deepe Jr, R.A. Blascktock, K. Buchanan, R. B. Ashman.** 1998. Type I and type 2 cytokines: from basic science to fungal infections. *Med Mycol.* **36**:109-127.
101. **Nam, J.; A. G. Matthysse, S. B. Gelvin.** 1997. Differences in susceptibility of Arabidopsis ecotypes to crown gall disease may result from a deficiency in T-DNA integration. *The Plant Cell* **9**:317-333.
102. **Nemecek J. C., M. Wuthric, B. S. Klein.** 2006. Global control of dimorphism and virulence in fungi. *Science.* **312**:583-588.
103. **Noll, A. & I. B. Autenrieth.** 1996. Immunity against *Yersinia enterocolitica* by vaccination with *Yersinia* Hsp60 immunostimulating complexes or *Yersinia* Hsp60 plus interleukin-12. *Infect. Immun.* **64**:2955-2961.
104. **Nomaguchi H., T. Mukai, F. Takeshita, M. Matsuoka, Y. Maeda, T. M. Aye, N. Jahan, Y. Yogi, M. Endo, Y. Sato.** 2002. Effect of hsp65 DNA vaccination carrying immunostimulatory DNA sequences (CpG motifs) against *Mycobacterium leprae* multiplication in mice. *Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.* **70**:182-190.
105. **Oliveira, S.J., R. L. Mamoni, C. C. Musatti, P. M. Papiordanou, M. H. Blotta.** 2002. Cytokines and lymphocyte proliferation in juvenile and adult forms of paracoccidioidomycosis: comparison with infected and non-infected controls. *Microbes Infect* **4**:139-144.
106. **Pedrosa, P. N.** 1976. Paracoccidioidomicose, inquérito intradérmico com paracoccidioidina em zona rural do estado do Rio de Janeiro: Dissertação de Mestrado-Universidade Federal do Rio de Janeiro.
107. **Pinto, A.R., R. Puccia, S. N. Diniz, M. F. Franco, L. R. Travassos.** 2000. DNA-based vaccination against murine paracoccidioidomycosis using the gp43 gene from *Paracoccidioides brasiliensis*. *Vaccine.* **18**:3050-3058.

108. **Punt, P. J., R. P. Oliver, M. A. Dingemane, P. H. Pouwels, C. A. van den Hondel.** 1987. Transformation of *Aspergillus* based on the hygromycin resistance marker from *Escherichia coli*. *Gene*. **56**:117-124.
109. **Reichard, U., C. Y. Hung, P.W. Thomas, G. T. Cole.** 2000. Disruption of the gene which encodes a serodiagnostic antigen and chitinase of the human fungal pathogen *Coccidioides immitis*. *Infect. Immun.* **68**:5830-5838.
110. **Restrepo, A.** 1978. Paracoccidioidomicose. *Acta Médica Colomb.* 33-66.
111. **Restrepo, A.** 1985. The ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*: a puzzle still unsolved. *J. Med. Vet. Mycol.* **23**:323-334
112. **Restrepo, A.** 1990. Actualización sobre paracoccidioidomycosis y su agente etiológico. *Interciencia.* **15**:193-99.
113. **Restrepo, A., M. Robledo, R. Giraido, H. Hernandez, F. Sierra.** 1976. The gamut of paracoccidioidomycosis. *Am. J. Med.* **61**:33-41.
114. **Restrepo, A., M. E. Salazar, L. E. Cano, E. P. Stover, D. Fredman, D. A. Stevens.** 1984. Estrogens inhibit mycelium - to- yeast transformation in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*: implications for resistance of females to paracoccidioidomycosis. *Infect. Immun.* **46**:346-353.
115. **Rooney, P. J., T. D. Sullivan, B. S. Klein.** 2001. Selective expression of the virulence factor BAD1 upon morphogenesis to the pathogenic yeast form of *Blastomyces dermatitidis* evidence for transcriptional regulation by a conserved mechanism. *Mol. Microbiol.* **39**:875-889.
116. **Salem-Izacc, S. M., F. J. Gomez, R. S. A. Jesuino, C. A. Fonseca, M. S. S. Felipe, G. S. Deepe Jr, C. M. A. Soares.** 2001. Molecular cloning, characterization and expression of the heat shock protein 60 gene from the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Med. Mycol.* **39**:445-455.
117. **Salem-Izacc, S. M., R. S. A. Jesuino, W. A. Brito, M. Pereira, M. S. S. Felipe, C. M. A. Soares.** 1997. Protein synthesis patterns of *Paracoccidioides brasiliensis* isolates in stage-specific forms and during cellular differentiation. *J. Med. Vet. Mycol.* **35**:205-211.
118. **San Blas, F. & G. San Blas.** 1985. *Paracoccidioides brasiliensis*. In: Szanizlo P. J. (ed). *Fungal dimorphism*. Plenum Press, New York, 93-120.
119. **San-Blas, F., G. San-Blas, F. Gil.** 1994. Production and regeneration of protoplasts from the Y-phase of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *J. Med. Vet. Mycol.* **32**:381-388.
120. **San-Blas, G.** 1993. Paracoccidioidomycosis and its etiologic agent *Paracoccidioides brasiliensis*. *J. Med. Vet. Mycol. Rev* **31**:99-113.
121. **Sano, A., K. Nishimura, M. Myaji.** 1999. The research encouragement award. Effects of sex hormone on sexual difference of experimental paracoccidioidomycosis. *Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi.* **40**:1-8.
122. **Scheckelhoff, M. & G. S. Deepe Jr.** 2005. A Deficiency in Gamma Interferon or Interleukin-10 Modulates T-Cell-Dependent Responses to Heat Shock Protein 60 from *Histoplasma capsulatum*. *Infect. Immun.* **73**:2129-2134.
123. **Sheng, J. & V. Citovsky.** 1996. *Agrobacterium*-plant cell DNA transport: have virulence proteins, will travel. *The Plant Cell* **8**:1699-1710.
124. **Silva, S. P., M. I. Borges-Walmsley, I. S. Pereira, C. M. A. Soares, A. R. Walmsley, M. S. S. Felipe.** 1999. Differential expression of an hsp70 gene during transition from the mycelial to the infective yeast form of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Mol. Microbiol.* **31**:1039-1050.
125. **Silva, S. P., M. S. S. Felipe, M. Pereira, M. O. Azevedo, C. M. A. Soares.** 1994. Phase transition and stage-specific protein synthesis in the dimorphic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Exp. Mycol.* **18**:294-299.
126. **Soares, A.M.V.C. ET AL.** 2001. Modulatory effect of prostaglandins on human monocyte activation for killing of high- and low-virulence strains of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Immunol* **102**:480-485.
127. **Soares, R. B. A., T. A. F. Velho, L. M. P. Moraes, M. O. Azevedo, C. M. A. Soares, M. S. S. Felipe.** 2005. Hygromycin B acquire phenotype in *Paracoccidioides brasiliensis* through plasmid DNA integration. *Med. Mycol.* **43**:719-723.
128. **Souto J. T., F. Figueiredo, A. Furlanetto, K. Pfeffer, M. A. Rossi, J. S. Silva.** 2000. Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha determine resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* infection in mice. *Am. J. Pathol.* **156**:1811-1820.
129. **Sullivan, T. D., P. J. Rooney, B. S. Klein.** 2002. *Agrobacterium tumefaciens* integrates transfer DNA into single chromosomal sites of dimorphic fungi and yields homokaryotic

- progeny from multinucleate yeast. Eukaryot. Cell. **1**:895-905.
130. **Svidzinski, T. I., M. H. Miranda Neto, R. G. Santana, O. Fischman, A. L. Colombo.** 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**:279-283.
131. **Taborda, C. P., C. R. Nakaie, E. M. Cilli, E. G. Rodrigues, L. S. Silva, M. F. Franco, L. R. Travassos.** 2004. Synthesis and Immunological Activity of a Branched Peptide Carrying the T-cell Epitope of gp43, the Major Exocellular Antigen of *Paracoccidioides brasiliensis*. Scand. J. Immunol. **59**:58-65.
132. **Taborda, C.P., M. A. Juliano, R. Puccia, M. Franco, L. R. Travassos.** 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.
133. **Tascon, R. E., M. J. Colston, S. Ragno, E. Stavropoulos, D. Gregory, D. B. Lowrie.** 1996. Vaccination against tuberculosis by DNA injection. Nat. Med. **2**:888-892.
134. **Tendrich, M., F. DE Luca, E. K. Tourinho, B. Wanke, J. Cuba, A. Buescu, M. Vasiman, A. B. Pereira, W. El-Andere, e 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.
135. **Thomaz, P. W., E. E. Wyckoff, E. J. Pishko, J. J. Yu, T. N. Kirkland, G. T. Cole.** 1996. The hsp60 gene of the human pathogenic fungus *Coccidioides immitis* encodes a T cell reactive protein. Gene **199**:83-91.
136. **Tinland, B. & B. Hohn.** 1996. Recombination between prokaryotic and eukaryotic DNA: Integration of *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA into the plant genome. Gen Eng **17**:209-229.
137. **Toffaletti, D. L., T. H. Rude, S. A. Johnston, D. T. Durack, J. R. Perfect.** 1993. Gene transfer in *Cryptococcus neoformans* by use of biolistic delivery of DNA. J. Bacteriol. **175**:1405-1411.
138. **Trinchieri, G.,** 1995. Interleukin-12: A proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. Annu. Rev. Immunol. **13**:251-276.
139. **Varma, A., J. C. Edman, K. J. Kwon-Chung.** 1992. Molecular and genetic analysis of URA5 transformants of *Cryptococcus neoformans*. Infect Immun. **60**:1101-1108.
140. **Villar, L. A., A. Tobón, D. Calle, D. S. Rosero, B. L. Gómez, A. Restrepo.** 2000. Central nervous system paracoccidioidomycosis. Report of a case successfully treated with itraconazol. Scielo. **42**:231-234.
141. **Walmsley, M. I. B., & A. R. Walmsley.** 2000. cAMP signaling in pathogenic fungi: control of dimorphic switching and pathogenicity. Trends in Microb. **8**:133-141.
142. **Wang, K., L. Herrera-Estrella, M. Van Montagu, P. Zambryski.** 1984. Right 25 bp terminus of the nopaline T-DNA is essential for and determines direction of DNA transfer from *Agrobacterium* to the plant genome. Cell. **38**:455-462.
143. **Weising, K & G. Kahl.** 1996. Natural genetic engineering of plant cells: the molecular biology of crown gall and hairy root disease. World J Microbiol & Biotech. **12**: 327-351.
144. **Wick, G.** 2000. Atherosclerosis--an autoimmune disease due to an immune reaction against heat-shock protein 60. Herz **25**:87-90.
145. **Wood D., J.C. Setubal, R. Kaul, D. E. Monks, J. P. Kitajima, V. K. Okura, Y. Zhou, L. Chen, G. E. Wood, N. F. Almeida Jr, L. Woo, Y. Chen, I. T. Paulsen, J. Eisen, P. D. Karp, D. Bovee Sr, P. Chapman, J. Clendenning, G. Deatherage, W. Gillet, C. Grant, T. Kutayavin, R. Levy, M. J. Li, E. McClelland, A. Palmieri, C. Raymond, G. Rouse, C. Saenphimmachak, Z. Wu, P. Romero, D. Gordon, S. Zhang, H. Yoo, Y. Tao, P. Biddle, M. Jung, W. Krespan, M. Perry, B. Gordon-Kamm, L. Liao, S. Kim, C. Hendrick, Z. Y. Zhao, M. Dolan, F. Chumley, S. V. Tingey, J. F. Tomb, M. P. Gordon, M. V. Olson, E. W. Nester.** 2001. The genome of the natural genetic engineer *Agrobacterium tumefaciens* C58. Science **294**:2317-2323.
146. **Woods, J. P. & W. E. Goldman.** 1993. Autonomous replication of foreign DNA in *Histoplasma capsulatum*: role of native telomeric sequences. J. Bacteriol. **175**:636-41.
147. **Woods, J. P., D. M. Retallack, E. L. Heinecke, W. E. Goldman.** 1998. Rare homologous gene targeting in *Histoplasma capsulatum*: disruption of the URA5Hc gene by allelic replacement. J. Bacteriol. **180**:5135-5143.
148. **Woods, J. P., E. J. Heinecke, W. E. Goldman.** 1998. Electrotransformation and expression of bacterial genes encoding

- hygromycin phosphotransferase and  $\beta$ -galactosidase in pathogenic fungus *Histoplasma capsulatum*. *Infect. Immun.* **66**:1697-1707.
149. **Worsham P. L. & W. E. Goldman.** 1988. Quantitative plating of *Histoplasma capsulatum* without addition of conditioned medium or siderophores. *J. Med. Vet. Mycol.* **26**:137-143.
150. **Wüthrich, M., H. I. Filutowicz, B. S. Klein.** 2000. Mutation of the WI-1 gene yields an attenuated *Blastomyces dermatitidis* strain that induces host resistance. *J. Clin. Invest.* **106**:1381-1389.
151. **Wüthrich, M., H. I. Filutowicz, T. Warner, G. S. Deepe Jr, B. S. Klein.** 2003. Vaccine immunity to pathogenic fungi overcomes the requirement for CD4 help in exogenous antigen presentation to CD8+ T cells: implications for vaccine development in immune-deficient hosts. *J. Exp. Med.* **197**:1405-1416.
152. **Yang, X. D., & U. Feige.** 1992. Heat shock proteins in autoimmune disease. From causative antigen to specific therapy? *Experientia* **48**:650-656.
153. **Zhou, P., M. C. Sieve, R. P. Tewari, R. A. Seder.** 1997. Interleukin- 12 modulates the protective immune response to SCID mice infected with *Histoplasma capsulatum*. *Infect. Immun.* **65**:936– 942.
154. **Ziemienowicz, A.** 2001. Odissey of *Agrobacterium* T-DNA. *Acta Biochimica Polonica*, **48**:623-635, 20.

## VI - MANUSCRITO II