



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL
E SAÚDE PÚBLICA

LUIZ AUGUSTO PEREIRA

**Identificação Proteômica, Seqüência de
Nucleotídeos, Expressão Heteróloga e Reatividade
Imunológica da Triose Fosfato Isomerase de
*Paracoccidioides brasiliensis***

Goiânia
2004

Termo de Autorização para Publicação de Teses e Dissertações Eletrônicas (TDE) na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD)



TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS (TEDE) NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: ☒ Dissertação ☐ Tese

2. Identificação da Tese ou Dissertação

Autor (a):	LUIZ AUGUSTO PEREIRA		
CPF:	81496737172	E-mail:	luiz.bmolecular@gmail.com
Seu e-mail pode ser disponibilizado na página? ☒ Sim ☐ Não			
Vínculo empregatício do autor	Aluno de Pós-Graduação		
Agência de fomento:	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de	Sigla:	CAPES
	Nível Superior		
País:	BRASIL	UF:	GO
		CNPJ:	
Título:	Identificação Proteômica, Sequência de Nucleotídeos, Expressão Heteróloga e Reatividade Imunológica da Triose Fosfato Isomerase de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>		
Palavras-chave:	Paracoccidioides brasiliensis; Triose fosfato isomerase; Clonagem do gene e análise estrutural; Proteína recombinante; Reatividade Imunológica		
Título em outra língua:	Proteomic identification, nucleotide sequence, heterologous expression and immunological reactivity of the triosephosphate isomerase of <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>		
Palavras-chave em outra língua:	Paracoccidioides brasiliensis; Triosephosphate isomerase; Gene cloning and structural analysis; Recombinant protein; Immunological reactivity.		
Área de concentração:	MICROBIOLOGIA		
Data defesa: (dd/mm/aaaa)	03/05/2004		
Programa de Pós-Graduação:	Medicina Tropical e Saúde Pública		
Orientador (a):	CÉLIA MARIA DE ALMEIDA SOARES		
E-mail:	cmasoares@gmail.com		
Co-orientador (a):*	N/C		
E-mail:	N/C		

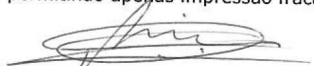
*Necessita do CPF quando não constar no SisPG

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento ☒ SIM ☐ NÃO¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF ou DOC da tese ou dissertação.

O sistema da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações garante aos autores, que os arquivos contendo eletronicamente as teses e ou dissertações, antes de sua disponibilização, receberão procedimentos de segurança, criptografia (para não permitir cópia e extração de conteúdo, permitindo apenas impressão fraca) usando o padrão do Acrobat.


Assinatura do (a) autor (a)

Data: 07/11/2014

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

LUIZ AUGUSTO PEREIRA

**Identificação Proteômica, Seqüência de Nucleotídeos,
Expressão Heteróloga e Reatividade Imunológica da Triose
Fosfato Isomerase de *Paracoccidioides brasiliensis***

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás para obtenção do Título de Mestre em Medicina Tropical e Saúde Pública.

Orientadora:

Prof^a Dr^a Célia Maria de Almeida Soares

**Goiânia
2004**

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA CENTRAL DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
UFG**

P436i	Pereira, Luiz Augusto. Identificação Proteômica, Seqüência de Nucleotídeos, Expressão Heteróloga e Reatividade Imunológica da Triose Fosfato Isomerase de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> [manuscrito] / Luiz Augusto Pereira. - 2004. 63 f. : il. Orientadora: Prof^a. Dr^a. Célia Maria de Almeida Soares Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, 2004. Bibliografia. Inclui lista de abreviaturas e siglas. 1. Triose fosfato isomerase 2. <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> 3. Reatividade imunológica. I. Título. CDU: 547.455.3
-------	--

BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Aluno: LUIZ AUGUSTO PEREIRA

Orientadora: Prof^a Dr^a Célia Maria de Almeida Soares

Membros:

- 1. Prof^a Dr^a Célia Maria de Almeida Soares, ICB – UFG**
- 2. Prof^a Dr^a Maristela Pereira, ICB – UFG**
- 3. Prof^a Dr^a Rosane Cristine Hahn – UFMT**

Data: 03/05/2004

*"Às vezes eu quase sonho!
Eu também tive uma vida solene, e percorri caminhos
mais familiares.
Por acaso pereci em arrogante auto confiança a uma
era atrás e nesse ato uma prece por mais uma chance
se elevou tão fervorosa, tão alta....
Um instinto mais iluminado deixou penetrar a morte e
a vida ficou tão maculada, não inteiramente, mas
estilhaçada o suficiente para que vagas lembranças
permanecessem, como agora, quando parece que
mais uma vez o propósito está a vista."*

"O campo onde morri"

Chris Charter - 1999

*"O homem usando o dom da inteligência tenta se
igualar a DEUS no poder da criação"*

"Autor desconhecido"

AGRADECIMENTOS

Agradeço:

A Deus, por me tornar capaz de realizar todos os meus empreendimentos;

À minha mãe, por ser uma inspiração constante de perseverança para mim, e me apoiar em todas as etapas da minha vida;

À professora Prof^a Dr^a Célia Maria de Almeida Soares pela orientação e incentivo, que foram singulares na realização deste trabalho;

Às Prof^{as} Dr^{as} Rosália, Maristela e Fabrícia, pelo apoio e colaboração constantes;

À Prof^a Dr^a Ursula Kreisel, pela amizade, alegria, e pelos ensinamentos;

À Prof^a Dr^a Maria do Rosário Rodrigues e Silva, por toda a colaboração e atenção prestadas a mim durante meu curso de Mestrado;

A todos os meus colegas do curso de Mestrado, que sempre prestaram maior apoio para realização de meus trabalhos;

A todos os colegas doutorandos do Laboratório de Biologia Molecular, Renata, Daniela, Mônica Oliveira, Mônica Santiago e Alexandre que com suas valiosas recomendações técnicas me auxiliaram na realização deste trabalho;

A todos os colegas mestrandos do Laboratório de Biologia Molecular, Clayton, LÍlian, Nadya, Sheila, Sabrina e Juliana que compartilharam e vivenciaram todas as alegrias e frustrações durante o curso;

Aos colegas da Iniciação Científica, Aline, Karine, Patrícia, Juliana, Thaís, Roney, Bruno, Yuri, Gabriela e Zilma que sempre foram prestativos, me auxiliando em várias ocasiões;

A toda equipe de trabalho do Laboratório de Biologia Molecular, que me recebeu de braços abertos e depositou em mim a confiança para a realização deste trabalho;

À Dona Zildete, pelo carinho e companheirismo sempre presentes comigo;

A todos os meus familiares e amigos que mesmo não estando perto de mim sempre me deram seu apoio;

A todas as pessoas que de alguma forma me auxiliaram a dar os pequenos passos conquistados que até hoje eu consegui, nesta grande escalada que é a vida;

A todos, MUITO OBRIGADO!

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	x
I. Introdução.....	11
I.1 <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	11
I.1.1- Taxonomia.....	11
I.1.2- Habitat.....	12
I.1.3- Dimorfismo de <i>P. brasiliensis</i>	13
I.2- Paracoccidioidomicose.....	14
I.2.1- Aspectos Gerais.....	14
I.2.2- Patogênese e Patogenia da PCM.....	15
I.2.3- Epidemiologia.....	16
I.2.4- Resposta Imune na PCM.....	17
I.3- Antígenos de <i>P. brasiliensis</i>	19
I.4- Triose Fosfato Isomerase.....	22
I.4.1- Características da TPI.....	22
I.4.2- Propriedades da TPI.....	23
I.5- Triose Fosfato Isomerase de <i>P. brasiliensis</i>	24
II. Justificativas.....	26
III. Objetivos.....	28
IV. Artigo.....	29
V. Conclusões.....	39
VI. Perspectivas.....	41
VII. Referências Bibliográficas.....	42
VIII. Anexos.....	55
Anexo I. – Seqüência do cDNA de <i>PbTPI</i> depositada no NCBI.....	55
Anexo II. – Seqüência do gene <i>Pbtpi</i> depositado no NCBI.....	56
Anexo III. – Alinhamento das seqüências de aminoácidos de TPI de fungos....	57
Anexo IV. – Imagem da estrutura terciária predita do monômero de <i>PbTPI</i> ...	58
Anexo V. – Gel de agarose 0,8% mostrando o produto de PCR de 1350 pb.....	59
Anexo VI. – Gel de agarose 0,8% mostrando o produto de PCR de 750 pb.....	60
Anexo VII. – Correspondência da revista <i>Microbes and Infection</i>	61

ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Porcentagem
µg	Micrograma
µL	Microlitro
dCTP	Desoxicitosina trifosfato
A	Absorbância
cDNA	DNA complementar
gp	Glicoproteína
g	Gramma
GST	Glutathione S-transferase
IPTG	Isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo
Kb	Kilobases
kDa	Kilodalton
L	Litros
mg	Miligramma
mL	Mililitros
mm	Milímetro
mM	Milimolar
ng	Nanograma
°C	Grau Celsius
ORF	“Open Reading Frame” – Quadro de leitura aberta
pb	pares de bases
PBS	Phosphate Buffer Solution - Tampão Fosfato
rRNA	RNA ribossomal
SDS	Sulfato Dodecil de Sódio
pH	Potencial hidrogeniônico
pI	Ponto isoelétrico
BCIP	5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate
NBT	Nitro blue tatrazólio
<i>Pb</i>	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
PCM	Paracoccidioidomicose
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida

RESUMO

Um antígeno de *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb) foi isolado do gel e caracterizado. Os peptídeos digeridos por Endoproteinase Lys-C da proteína purificada, que apresentou uma massa molecular de 29-kDA e pI de 5.8, foram submetidos à análise da sequência de aminoácidos. Uma busca em bancos de dados de sequências de aminoácidos comparados com os três peptídeos da proteína nativa revelou forte homologia com triose fosfato isomerase (TPI: E.C. 5.3.1.1) de vários organismos. O cDNA e o gene completos que codificam para PbTPI foram obtidos, e ambos contêm uma provável ORF que codifica para uma proteína com 249 aminoácidos que apresenta todos os peptídeos caracterizados na PbTPI nativa. O gene *Pbtpi* apresentou 6 exons interrompidos por 5 introns. Análises realizadas com a PbTPI deduzida sugerem sua utilidade em prover relações filogenéticas, como também evidenciou a correlação entre a filogenia gerada pelas proteínas deduzidas e as posições dos introns nos genes cognatos. A reatividade imunológica da PbTPI foi examinada. O cDNA completo que codifica para PbTPI foi altamente expresso no hospedeiro *Escherichia coli*, produzindo altos níveis de uma proteína recombinante fundida a glutathione S-transferase (GST), que foi purificada por cromatografia de afinidade. A TPI recombinante purificada foi reconhecida por soros de pacientes com paracoccidioidomicose confirmada e não por soros de indivíduos saudáveis. Assim, PbTPI recombinante pode ser uma adição valiosa para o pequeno arsenal de proteínas imunoreativas de *P. brasiliensis*, que poderiam ser testadas por incorporação em ensaios de sorodiagnóstico da doença.

Palavras chaves: *Paracoccidioides brasiliensis*; Triose fosfato isomerase; Clonagem do gene e análise estrutural; Proteína recombinante; Reatividade Imunológica.

ABSTRACT

An antigen of *Paracoccidioides brasiliensis* (*Pb*) was gel isolated and characterized. Endoproteinase Lys-C digested peptides of the purified protein which presented, molecular mass of 29-kDa and pI of 5.8, were subjected to sequence analysis of its amino acids. Search at databases comparing the sequence of amino acids from the three peptides of the native protein, revealed strong homology to triosephosphate isomerase (TPI: E.C. 5.3.1.1) from several sources. The complete cDNA and gene encoding *PbTPI* were obtained and both contained an open reading frame predicted to encode a 249 amino acid protein that presented all the peptides characterized in the native *PbTPI*. The *Pbtpi* gene contained 6 exons interrupted by 5 introns. Analysis performed with the deduced *PbTPI* suggested its usefulness in providing phylogenetic relatedness, as well as evidenced the correlation between the phylogeny provided by the deduced proteins and introns positions in the cognate genes. The immunological reactivity of *PbTPI* was examined. The complete coding cDNA of *PbTPI* was over expressed in an *Escherichia coli* host to produce high levels of recombinant fusion protein with glutathione S-transferase (GST) that has been purified by affinity chromatography. The purified recombinant TPI was recognized by sera of patients with confirmed Paracoccidioidomycosis and not by sera of healthy individuals. Thus, recombinant *PbTPI* can be a valuable addition to the still small arsenal of *P. brasiliensis* immunoreactive proteins, which could be tested for incorporation in assays for serodiagnosis of the disease.

Keywords: *Paracoccidioides brasiliensis*; Triosephosphate isomerase; Gene cloning and structural analysis; Recombinant protein; Immunological reactivity.

I- INTRODUÇÃO

I.1- *Paracoccidioides brasiliensis*

I.1.1- Taxonomia

O fungo *P. brasiliensis* foi denominado inicialmente de *Zymonema brasiliensis* por Splendore (1912). A caracterização do gênero *Paracoccidioides* e da espécie *brasiliensis* foi proposta por Almeida (1930), após a comparação das diferenças estruturais existentes entre esta espécie e *Coccidioides immitis*.

Lacaz et al. (1991) classificaram *P. brasiliensis* como pertencente ao reino: fungi; divisão: eumycota; sub-divisão: deuteromycotina; classe: hyphomycetes; ordem: moniliales; família: moniliaceae; gênero: *Paracoccidioides*; espécie: *brasiliensis*, devido ao não conhecimento da fase sexuada deste fungo. A caracterização do fungo como pertencendo ao filo ascomycota, mesmo não se conhecendo a fase teleomórfica, foi proposta por Leclerc et al. (1994) utilizando-se da comparação entre seqüências de DNA da subunidade ribossomal maior (28S) de dermatófitos e fungos dimórficos. Posteriormente, através de comparações de seqüências parciais de rRNA de fungos dimórficos, Guého et al. (1997) classificaram o gênero *Paracoccidioides* na família onygenaceae, juntamente com os gêneros *Histoplasma*, *Emmonsia* e *Blastomyces*. A proximidade filogenética de *P. brasiliensis* com os ascomicetos foi também reportada por Bialek et al. (2000), que analisando a seqüência da subunidade ribossomal menor de vários fungos, em análises filogenéticas, evidenciou que *P. brasiliensis*

deveria ser agrupado dentro da ordem onygenales, encontrando-se intimamente relacionado com membros da família onygenaceae.

Atualmente este fungo tem sido descrito como pertencendo ao reino Fungi, ao filo ascomycota, à ordem onygenales, à família onygenaceae, ao gênero *Paracoccidioides* e a espécie *brasiliensis*.

I.1.2- Habitat

A determinação exata do habitat de *P. brasiliensis* ainda é desconhecida, mas sugere-se que o fungo viva saprofiticamente na natureza (Lacaz 1994; Restrepo-Moreno 1994). O isolamento do fungo já foi obtido do solo (Albornoz 1971), de fezes de pingüim e de uma amostra comercial de ração canina, provavelmente contaminada com solo (Gezuele 1989; Ferreira et al. 1990). *P. brasiliensis* foi isolado de tatus (*Dasypus novemcinctus*) capturados em áreas endêmicas de São Paulo. Os estudos indicam que estes animais possam ser hospedeiros silvestres do fungo, podendo, desenvolver a doença, embora não se acredite que sejam hospedeiros intermediários no processo de infecção ao homem (Bagagli et al. 1998).

As regiões consideradas endêmicas deste fungo apresentam algumas características ambientais em comum, e que provavelmente determinariam sua sobrevivência e até mesmo as condições para a infecção (Mangiaterra et al. 1999). Desta forma, Blotta et al. (1999) observaram que o índice de exposição ao fungo era maior em locais que já sofreram modificações ambientais, que possuem altitude elevada, chuvas abundantes, vegetação rica e economia baseada principalmente na agricultura e pecuária.

I.1.3- Dimorfismo de *P. brasiliensis*

P. brasiliensis é um fungo caracterizado por apresentar dimorfismo térmico, característica presente também em outros fungos patogênicos humanos como, *Blastomyces dermatitidis*, *Histoplasma capsulatum* e *Coccidioides immitis*, e parece ser um importante mecanismo de virulência e de patogenicidade destes fungos (Kurokawa et al. 1998).

A temperatura é o principal fator responsável pela diferenciação celular de *P. brasiliensis* (San-Blas 1993). O processo de dimorfismo não é exclusivamente dependente da temperatura desta forma, outros fatores que influenciam no dimorfismo têm sido caracterizados. Estudos experimentais com o hormônio feminino 17- β -estradiol mostraram a capacidade deste de inibir a transição de micélio para levedura tanto *in vitro* (Restrepo et al. 1984), como *in vivo* (Sano et al. 1999), sendo relacionado como possível fator de proteção à infecção em mulheres. Walmsley & Walmsley (2000) observaram que a adição exógena de cAMP inibia a transição de levedura para micélio, mantendo a forma patogênica do fungo, sugerindo que a via de sinalização do cAMP apresenta importante papel na transição morfológica do fungo

Em temperaturas próximas a 25 °C as culturas de *P. brasiliensis* apresentam aspecto algodinoso e estruturas celulares que se apresentam sob a forma miceliana, com formação de hifas septadas, multinucleadas, com filamentos finos e artroconídios intercalares (San-Blas 1993; Brummer et al. 1993). Acredita-se que a fase miceliana seja saprofítica, encontrada principalmente no solo e em plantas, e que seria também a forma na qual o fungo se encontra quando do contágio do hospedeiro. No homem admite-se que o mecanismo de contágio ocorra através de contaminação por via inalatória com propágulos do fungo (Brummer et al. 1993).

À temperatura de 36 °C o fungo promove uma transição da estrutura filamentosa para uma estrutura globular, assumindo a forma leveduriforme (San-Blas, 1993). Esta seria sua forma parasitária, que assume características peculiares: apresenta brotamentos múltiplos, resultado de uma exoesporulação; uma membrana birrefringente, além de cromatina evidente. A morfologia única desta levedura é determinante no diagnóstico laboratorial da PCM, e em uma avaliação comparativa se assemelha a uma "roda-de-leme" (Furtado et al. 1967).

O dimorfismo em *P. brasiliensis* tem sido considerado como ponto principal no desenvolvimento da infecção, visto que a eficiência de instalação do patógeno no hospedeiro se dá pela transição da forma miceliana, infectante, para leveduriforme, no tecido do hospedeiro (Brummer et al. 1993).

I.2- Paracoccidioidomicose

I.2.1- Aspectos Gerais

A paracoccidioidomicose - PCM - (Blastomicose Sul-americana) é uma micose sistêmica que tem como agente etiológico o fungo dimórfico *P. brasiliensis*. A apresentação é de uma infecção granulomatosa, que determina dois quadros clínicos aparentes, uma forma crônica e outra aguda. A doença foi inicialmente descrita em São Paulo, em 1908, por Adolpho Lutz (Lutz 1908).

A PCM apresenta alta prevalência na América Latina, ocorrendo desde o México até a Argentina (Wanke & Londero 1994; Rivitti & Aoki, 1999). Estima-se que na América Latina, a doença afete aproximadamente dez milhões de pessoas. Sua distribuição nesse território não é uniforme, concentrando-se ao redor de florestas úmidas, tropicais ou

subtropicais (Brummer et al. 1993; Restrepo et al. 2001).

I.2.2- Patogênese e Patogenia da PCM

A inalação de propágulos de *P. brasiliensis* resulta na formação de um foco inflamatório nos pulmões que, geralmente regride com o estabelecimento da imunidade específica do hospedeiro (Brummer et al. 1993). A partir de um foco primário pulmonar, ocorre disseminação linfática ou hematogênica para diferentes regiões do organismo. O contato inicial do hospedeiro com o fungo aparentemente evolui para uma infecção subclínica ou assintomática (PCM infecção). Se há progressão da infecção, ocorre o estabelecimento da doença, que apresenta duas formas clínicas distintas: a forma aguda ou tipo juvenil e a forma crônica ou adulta (Franco et al. 1987).

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 (Reis et al. 1986; Brummer et al. 1993). O quadro da doença caracteriza-se por um desenvolvimento rápido e por marcante envolvimento de órgãos como baço, fígado, gânglios linfáticos e medula óssea. A função imune mediada por células é gravemente deprimida nesses pacientes, provavelmente devido ao comprometimento medular (Londero & Melo 1983; Brummer et al. 1993). Apesar de não haver manifestações clínicas ou radiológicas de comprometimento pulmonar evidente, pode-se isolar o fungo do lavado brônquico, evidenciando a participação do pulmão como porta de entrada do patógeno (Restrepo et al. 1989). Esta é a forma mais severa e com pior prognóstico (Brummer et al. 1993).

A forma crônica ou adulta representa mais de 90% dos casos, sendo a maioria dos pacientes constituída por homens adultos. Ao contrário da forma aguda, o quadro clínico

apresenta um desenvolvimento lento com comprometimento pulmonar evidente (Brummer et al. 1993). Em aproximadamente 25% dos casos, o pulmão é o único órgão afetado - forma unifocal. Muitas vezes, com o desenvolvimento silencioso da doença, o paciente busca auxílio médico somente quando apresenta sintomas de comprometimento extrapulmonar. Nestes casos se constata o envolvimento de órgãos como pele, mucosas das vias aéreas superiores, tubo digestivo e linfonodos - forma multifocal (Londero 1986; Brummer et al. 1993). Com frequência, ocorrem lesões nas mucosas orais e nasais, pele, gânglios linfáticos e adrenais, menos freqüentemente, podem ocorrer envolvimento ocular, destruição óssea, e comprometimento dos sistemas nervoso e vascular (Rivitti & Aoki 1999). A forma crônica apresenta notável tendência à disseminação, sendo pouco freqüente os quadros onde há somente comprometimento pulmonar (Restrepo et al. 1983).

I.2.3- EPIDEMIOLOGIA

A PCM é uma micose sistêmica de alta prevalência na América Latina, sendo a maior casuística registrada no Brasil, Argentina, Colômbia e Venezuela (Wanke & Londero 1994; Restrepo et al. 2001). Casos esporádicos nos Estados Unidos, alguns países da Europa e Japão foram relatados em indivíduos provenientes de áreas endêmicas da América Latina (Chikamori et al. 1984; Ajello & Polonelli 1985; Ginarte et al. 2003).

O Brasil é responsável por 80% das descrições na literatura, sendo a maioria dos casos reportados nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste (Blotta et al. 1999; Paniago et al. 2003). De caráter endêmico entre as populações rurais, onde os indivíduos estão possivelmente mais expostos ao contágio pelo agente etiológico (Manguiaterra et al. 1999), a PCM acomete principalmente indivíduos do sexo masculino entre 30 e 60 anos, sendo rara a

incidência abaixo de 14 anos de idade (Brummer et al. 1993). Segundo levantamento realizado por Coutinho et al. (2002) há um aumento no número de mulheres desenvolvendo PCM, provavelmente relacionado ao crescimento desta mão-de-obra nas atividades rurais.

O estabelecimento da verdadeira prevalência da PCM, tanto da infecção como da doença, são muito importantes na caracterização de regiões endêmicas (Wanke & Londero 1994). Inquéritos epidemiológicos realizados em indivíduos de áreas endêmicas sugerem que a infecção, medida como reação intradérmica positiva a paracoccidioidina, mostram igual prevalência para ambos os sexos (San-Blas 1993).

Um estudo de revisão de óbitos por PCM entre 1980 e 1995 (3.181 casos), realizado por Coutinho et al. (2002), mostrou que a mortalidade por PCM no Brasil é a oitava quando classificada entre as doenças crônicas e a primeira entre as micoses sistêmicas. A taxa de mortalidade média anual de 1,45/milhão de habitantes considerando ambos os sexos, sendo que o índice para homens é de 2,42 e para mulheres 0,43.

I.2.4- RESPOSTA IMUNE NA PCM

O mecanismo de defesa do hospedeiro interage com o fungo no foco inicial da infecção. Se o fungo persiste, uma resposta imunológica específica é elicitada para destruir o parasita. Se os mecanismos de defesa forem ineficientes ocorre a adaptação e transformação do fungo em leveduras e a instalação da doença. (Camargo & Franco 2000).

A proteção contra a PCM tem sido correlacionada com a presença de uma vigorosa resposta imune celular, limitando o processo de infecção (Moscardi-Bacchi & Franco 1985). Segundo Kashino et al. (1995) a depressão da atividade fagocítica de macrófagos e leucócitos polimorfonucleares em indivíduos contaminados, estaria relacionada com o agravamento da

infecção por *P. brasiliensis*. Estudos sugerem que determinadas citocinas, principalmente interferon gama (IFN- γ), são capazes de hiperativar macrófagos e leucócitos polimorfonucleares, os quais passam a apresentar um aumento da fagocitose de células de *P. brasiliensis* (Cano et al. 1994; Kurita et al. 1999; Karhawi et al. 2000).

Através das avaliações de modelos experimentais (Singer-Vermes et al. 1993; Calich et al. 1998) e quadros clínicos (Arango & Yarzabal 1982; Musatti et al. 1994) de PCM nas formas aguda e crônica, observou-se que a imunidade humoral não se apresentava diminuída, pelo contrário, altos títulos de anticorpos específicos são encontrados em ambas as formas da doença (Franco 1987; Oliveira et al. 1993). A ativação do sistema imune humoral, o qual determina a produção de anticorpos específicos das classes IgG, IgM e IgA (Blotta & Camargo 1993), está relacionada principalmente à ativação policlonal de células B (Chequer-Bou-Habib et al. 1989). Munk et al. (1992) descrevem a ativação da via alternativa do sistema complemento pela opsonização de células de *P. brasiliensis*, resultando na facilitação da fagocitose de células leveduriformes pelos macrófagos.

À medida que a doença cede, os títulos de anticorpos declinam, enquanto que na presença de enfermidade progressiva estes títulos permanecem altos (Franco 1987). Elevados títulos de anticorpos contra *P. brasiliensis* estão geralmente correlacionados com um mau prognóstico. Acredita-se que a ligação destes anticorpos com antígenos circulantes e/ou presentes no tecido lesado levariam à formação de “imuno-complexos”, os quais são capazes de promover uma depressão da resposta imune celular (Chequer-Bou-Habib et al. 1989; Camargo & Franco 2000).

Uma vacina de DNA contra a PCM foi desenvolvida usando o gene da glicoproteína gp43. Os resultados obtidos em modelos experimentais mostram que a vacina desencadeia uma resposta imune específica com capacidade protetora contra uma infecção

induzida com formas leveduriformes virulentas de *P. brasiliensis* (Pinto et al. 2000).

I.3- Antígenos de *P. brasiliensis*

Algumas moléculas antigênicas de *P. brasiliensis* são reconhecidas por anticorpos produzidos em pacientes com as formas aguda e crônica da doença, à semelhança do que ocorre em modelos animais. Dentre estas substâncias temos: heteropolissacarídeos, proteínas, glicolípídeos e glicoproteínas que são moléculas reconhecidamente antigênicas.

Diversos preparados antigênicos, obtidos a partir tanto da fase miceliana como leveduriforme de isolados de *P. brasiliensis*, tem sido usados em ensaios sorológicos de sensibilidade intradérmica (paracoccidioidina), bem como para diagnóstico (Fixação de complemento, Imunodifusão e “Immunoblotting”) (Mcgowan & Buckley 1985; Pereira & Barbosa 1988; Fava-Netto 1990; Blotta & Camargo 1993; Diniz et al. 1999; Panuto-Castelo et al. 2003).

De acordo com sua origem, os antígenos de *P. brasiliensis* têm sido caracterizados em derivados de parede celular, citoplasmáticos (intracelulares) e antígenos de filtrado de cultura (exocelulares) (Yarzabal 1982; Restrepo et al. 1983; Restrepo et al. 1984; San-Blas & San-Blas 1989; Fava-Netto 1990). Para a maioria desses antígenos, entretanto, é pouco conhecida a natureza química dos seus epítomos, sendo que problemas de reatividade cruzada com outras micoses, principalmente Histoplasmose, Lobomíose e Coccidioidomicose, foram reportados em alguns trabalhos (Mendes-Giannini et al. 1984; Camargo et al. 1984; Cano et al. 1986). Somente um pequeno grupo de moléculas já foram isoladas em sua forma pura e posteriormente caracterizadas (Kanetsuna et al. 1972; Yarzabal et al. 1973; Yarzabal et al. 1976; Yarzabal et al. 1977).

Puccia et al. (1986) estudaram um grupo de antígenos exocelulares de um isolado de *P. brasiliensis*. Os principais antígenos descritos neste estudo foram as glicoproteínas de 72-kDa, 55-kDa e 43-kDa, denominadas gp70, gp55 e gp43, respectivamente. A gp55 apresenta uma complexa estrutura heteropolissacarídica e não é produzida por alguns isolados de *P. brasiliensis* em determinados meios de cultura (Puccia et al. 1986). Camargo et al. (1989) descreveram que a gp70 apresentava reatividade com 96 % de soros de pacientes com PCM, sugerindo ser esta proteína um possível marcador na PCM.

A molécula antigênica de *P. brasiliensis* melhor caracterizada é uma glicoproteína de 43-kDa, denominada gp43. Essa proteína foi inicialmente identificada em filtrados de culturas de *P. brasiliensis*, com um perfil específico, por imunodifusão e imunoeletroforese (Yarzabal et al. 1977). A gp43 foi, subsequentemente caracterizada como uma glicoproteína de 43-kDa (Puccia et al. 1986), sendo posteriormente, o seu gene clonado, sequenciado e analisado por Cisalpino et al. (1996). Análises com a gp43 recombinante completa e de alguns de seus peptídeos apresentaram alta reatividade com soros de pacientes com PCM e não apresentou reatividade cruzada com soros de pacientes com outras micoses testadas (Diniz et al. 2002).

McEwen et al. (1996) clonaram e sequenciaram o gene de uma proteína antigênica de 27-kDa. O produto de clonagem, após expressão em sistema bacteriano heterólogo, foi reconhecido por soros de pacientes com PCM, demonstrando ser livre de reação cruzada significativa, com soros de pacientes portadores de outras micoses (Ortiz et al. 1996). A proteína recombinante foi purificada e mostrou-se reativa quando utilizada como antígeno no diagnóstico imunológico da PCM (Ortiz et al. 1998).

Um antígeno de 87-kDa de *P. brasiliensis* vem sendo usado no diagnóstico sorológico de PCM (Gómez et al. 1997; Gómez et al. 1998). Díez et al. (2002) purificaram e

caracterizaram este antígeno e o identificaram como pertencente à família das proteínas de choque térmico. Díez et al. (2003) mostraram que o uso combinado do antígeno recombinante de 27-kDa com o antígeno purificado de 87-kDa em experimentos de ELISA indireto, aumentam a sensibilidade e especificidade de reconhecimento de pacientes com PCM, em relação ao seu uso separadamente.

Salem-Izacc et al. (2001), clonaram, caracterizaram e expressaram o gene codificante para proteína mitocondrial HSP60 do fungo *P. brasiliensis*. Análises de “Immunoblotting” mostraram que tanto a proteína recombinante quanto a nativa são reconhecidas por anticorpos no soro de pacientes com PCM. Cunha et al. (2002) purificaram a *PbHSP60* recombinante e testaram sua reatividade imunológica com 196 amostras de soros humanos através de “Immunoblotting”. Os resultados obtidos indicaram que a mesma apresenta alta sensibilidade e especificidade (97,3 e 92,5%), sugerindo que a HSP60 purificada possa ser usada no diagnóstico da PCM.

Costa et al. (2002) caracterizaram a sequência de um gene que codifica para uma proteína imunoreativa de *P. brasiliensis* que apresenta identidade com sequências de manosiltrasferases de outros fungos.

Através das técnicas de eletroforese bidimensional e “Immunoblotting” Fonseca et al. (2001) identificaram determinantes antigênicos de *P. brasiliensis* utilizando combinações de soros de pacientes com diferentes manifestações clínicas da PCM. Os peptídeos sequenciados provenientes dos antígenos de *P. brasiliensis* apresentaram homologia com as seguintes proteínas: catalase (61-kDa), gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (36-kDa), malato desidrogenase (34-kDa), frutose bifosfato aldolase (39-kDa) e triose fosfato isomerase (29-kDa).

I.4- Triose Fosfato Isomerase

I.4.1- Características da TPI

Triose Fosfato Isomerase (TPI – 5.3.1.1) é uma enzima, pertencente à classe das isomerases e sub-classe das oxidoreduases intramoleculares (Knowles 1991). A TPI apresenta-se em sua forma ativa como homodímero, sendo responsável pela conversão reversível de diidroxiacetona fosfato em gliceraldeído 3-fosfato. Esta reação está relacionada com importantes vias metabólicas, como glicólise, gliconeogênese e síntese de ácidos graxos, responsáveis principalmente pela produção de energia (Meyerhof & Beck 1944; Knowles 1991). A enzima apresenta cerca de 250 resíduos de aminoácidos, e uma estrutura secundária composta de 8 regiões de cadeia beta e 8 regiões de alfa hélice, que determinam uma estrutura terciária em forma de barril ($\beta\alpha$)₈, o qual é altamente conservada em vários organismos, desde bactérias até eucariotos, apesar de ocorrerem algumas diferenças consideráveis na sequência de aminoácidos (Jiménez et al. 2000).

A presença de alguns resíduos de aminoácidos altamente conservados na sequência de TPI tem sido úteis na caracterização de novas sequências ortólogas depositadas em bancos de dados. Três principais resíduos, Lys13, His95 e Glu167, são responsáveis pela formação da região catalítica da molécula (Lolis et al. 1990; Schliebs et al. 1996). Os resíduos conservados Arg191 e Asp227, são descritos por Kursula et al. (2002) como essenciais na formação e estabilização da estrutura dimérica. Gonzalez-Mondragon et al. (2004) em um estudo com mutantes de TPI em *Saccharomyces cerevisiae*, mostraram que o resíduo conservado Cys126 apresenta um papel na estabilização da estrutura espacial da região catalítica da molécula.

I.4.2- Propriedades da TPI

A caracterização da enzima TPI em algumas arqueobactérias hipertermofílicas, como *Pyrococcus woesei*, *Methanothermus fervidus* e *Methanobacterium bryantii*, evidenciou uma importante adaptação enzimática das mesmas a altas temperaturas, onde a TPI apresenta uma estrutura quaternária em forma de homotetrâmero, e não como dímero, a qual é comumente caracterizada em outros organismos (Kohlhoff et al. 1996, Walden et al. 2004).

O estudo de uma TPI monomérica que apresentava atividade catalítica foi realizado por Schliebs et al. (1996), utilizando um recombinante da TPI selvagem de *Trypanosoma sp.* Em *T. cruzi* foi purificada uma proteína de aproximadamente 27-kDa que, após análises de sequenciamento da região N-terminal, mostrou peptídeos com alta homologia a TPI de *Leishmania mexicana* e *T. brucei* (Bourguignon et al. 1998).

Em *Schistosoma mansoni* a TPI foi identificada em extratos ricos em membrana citoplasmática de cercárias por um anticorpo monoclonal (M.1) (Harn et al. 1985). Em ensaios de imunização passiva de ratos, utilizando-se imuno-complexos com anticorpo M.1, observou-se uma proteção parcial contra infecção experimental pelas cercárias do parasita (Harn et al. 1992). A utilização da TPI nativa, purificada a partir de extratos de *S. japonicum*, em experimentos de imunização de murinos, promoveu uma diminuição do número de vermes encontrados no fígado destes animais, em comparação aos controles testados (Miao et al. 1998). Alguns autores destacam que a TPI é um promissor antígeno vacinal contra esquistossomose (Harn et al. 1992; Miao et al. 1998).

Zysk et al. (2000) realizando experimentos de rastreamento em uma biblioteca de expressão de *Streptococcus pneumoniae*, utilizando soros de pacientes em fase coalescente

de infecção, mostraram que a TPI deste microorganismo era reconhecida por imunoglobulinas da classe IgG.

Fernández-Arenas et al. (2004) mostraram que anticorpos da classe IgG, que reconhecem a TPI de *Candida albicans*, presentes no soro de camundongos infectados com um mutante do fungo, foram capazes de promover uma função imuno protetora quando administrados a outros camundongos também infectados.

Swinkels et al. (1986) caracterizaram em *Trypanosoma brucei* uma TPI presente em glicossomos. Os estudos cristalográficos desta enzima, associados ao conhecimento do seu mecanismo favoreceram a seleção de substâncias que promoviam a inibição da atividade enzimática devido à desestabilização da estrutura dimérica. Esses estudos mostraram que a TPI de *T. brucei* e *T. cruzi*, bem como a de outros parasitas seriam um alvo em potencial para desenvolvimento de novas drogas seletivas (Garza-Ramos et al. 1998; Téllez-Valencia et al. 2002).

I.5- Triose Fosfato Isomerase de *P. brasiliensis*

Fonseca et al. (2001) descreveram primeiramente a TPI de *P. brasiliensis* (PbTPI). Através do fracionamento de extrato protéico do fungo, por eletroforese bidimensional e posterior ensaio de “Immunoblotting”, observou-se que uma proteína de massa molecular 29-kDa e ponto isoelétrico 5.8 era reconhecida por anticorpos de pacientes com PCM. O material foi isolado para sequenciamento dos aminoácidos da região amino terminal, e de peptídeos internos.

Bastos (2003), em sua dissertação de mestrado, caracterizou uma sequência parcial

de 949 pares de base do gene codificante para *PbTPI*. A obtenção do fragmento foi realizada através de PCR com DNA genômico do fungo, utilizando um par de oligonucleotídeos degenerados. A construção dos primers foi realizada a partir das seqüências dos peptídeos obtidos previamente, e da comparação de regiões conservadas no alinhamento de cDNAs de TPI de outros fungos, descritos em bancos de dados.

II- JUSTIFICATIVA

O fungo *P. brasiliensis* é o agente etiológico da PCM, uma micose sistêmica de alta prevalência na América Latina, afetando principalmente indivíduos em idade adulta do sexo masculino, sendo o Brasil responsável por 80% dos registros de casos da doença. A PCM apresenta graves quadros de infecção, em geral de evolução crônica, que variam em severidade e prognóstico, tornando a doença um importante problema de saúde pública.

O Laboratório de Biologia Molecular da Universidade Federal de Goiás, vem trabalhando na caracterização de moléculas relacionadas com a interação do fungo *P. brasiliensis* ao hospedeiro. A caracterização de proteínas antigênicas do fungo é uma das abordagens na identificação de moléculas de interação parasito-hospedeiro. A determinação de um conjunto de proteínas antigênicas de *P. brasiliensis*, através de eletroforese bidimensional e “Immunoblotting” com soros de pacientes com várias formas de PCM, seguida de isolamento e sequenciamento parcial de peptídeos das mesmas, evidenciou uma proteína de 29-kDa caracterizada como uma triose fosfato isomerase (TPI).

Nosso trabalho tem como objetivo clonar as seqüências de cDNA e genômica codificantes da TPI de *P. brasiliensis*, e realizar a expressão heteróloga e purificação da proteína recombinante em sistema bacteriano, com o objetivo de explorar sua reatividade imunológica, bem como caracterizar seus principais epítomos.

A caracterização desta proteína que apresenta importante função metabólica em vias de produção de energia, a qual é capaz de determinar a produção de anticorpos em pacientes com PCM, tem apresentado uma importância especial, visto que até o momento poucos

antígenos deste fungo foram caracterizados. O estudo das propriedades antigênicas desta proteína em *P. brasiliensis* apresenta uma importância especial, visto que a TPI tem sido caracterizada em modelos de infecção de outros patógenos, como sendo capaz de elicitar uma resposta imunológica protetora.

A produção heteróloga da molécula recombinante permitirá a realização de ensaios para avaliação de reatividade imunológica visando a utilização, isolada ou em associação a outras moléculas, no imunodiagnóstico da PCM. Em adição, a avaliação do papel da molécula na proteção contra a doença poderá ser realizada.

III- OBJETIVOS

Os objetivos do trabalho foram:

1. Clonar e caracterizar o cDNA completo codificante da enzima TPI de *P. brasiliensis* (*PbTPI*).
 - Estratégia:
 - ✓ Rastreamento na biblioteca de cDNA, utilizando sonda homóloga obtida.
2. Clonar e caracterizar o gene completo que codifica a *PbTPI*.
 - Estratégia:
 - ✓ Realização de reação de PCR a partir do DNA genômico do fungo utilizando-se um par de oligonucleotídeos correspondentes às extremidades 5' e 3' do cDNA clonado.
3. Promover a expressão heteróloga do cDNA codificante da *PbTPI*.
 - Estratégias:
 - ✓ Clonagem em vetor de expressão pGEX-4T-3 (Amersham, Biosciences);
 - ✓ Indução da expressão heteróloga da proteína recombinante em sistema bacteriano;
 - ✓ Purificação da proteína recombinante através de cromatografia de afinidade e clivagem enzimática da proteína de fusão.
4. Analisar a reatividade imunológica da proteína recombinante (*rPbTPI*).
 - Estratégia:
 - ✓ "Immunoblotting" utilizando soros de pacientes com diagnóstico clínico e imunológico de PCM.

IV- ARTIGO

Artigo – Proteomic Identification, Nucleotide Sequence, Heterologous Expression and Immunological Reactivity of the Triosephosphate Isomerase of *Paracoccidioides brasiliensis*

Autores: Luiz A. Pereira, Maristela Pereira, Maria S.S. Felipe, Rosely M. Zancopé-Oliveira, Célia M. de Almeida Soares

Revista: Microbes and Infection Volume 6, Issue 10, August 2004, Pages 892–900. (Received 4 March 2004, Accepted 5 May 2004, Available online 10 July 2004)

Artigo



Available online at www.sciencedirect.com



Microbes and Infection 6 (2004) 892–900

Microbes and
Infection

www.elsevier.com/locate/micinf

Original article

Proteomic identification, nucleotide sequence, heterologous expression and immunological reactivity of the triosephosphate isomerase of *Paracoccidioides brasiliensis*

Luiz A. Pereira ^a, Maristela Pereira ^a, Maria S.S. Felipe ^b, Rosely M. Zancopé-Oliveira ^c,
Célia M. de Almeida Soares ^{a,*}

^a Laboratório de Biologia Molecular, ICBIL, ICB2, Campus 2, UFG, Universidade Federal de Goiás, 74001-970, Goiânia, Goiás, Brazil

^b Laboratório de Biologia Molecular, Universidade de Brasília, 70910-900, Brasília, DF, Brazil

^c Setor de Imunodiagnóstico, Serviço de Micologia, IPEC, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

Received 4 March 2004; accepted 5 May 2004

Available online 22 June 2004

Abstract

An antigen of *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb) was gel isolated and characterized. Endoproteinase Lys-C-digested peptides of the purified protein, which presented a molecular mass of 29 kDa and pI of 5.8, were subjected to sequence analysis of their amino acids. Searches at databases comparing the sequence of amino acids from the three peptides of the native protein revealed strong homology to triosephosphate isomerase (TPI: E.C. 5.3.1.1) from several sources. The complete cDNA and gene encoding PbTPI were obtained and both contained an open reading frame predicted to encode a 249-amino acid protein that presented all the peptides characterized in the native PbTPI. The *Pbtpi* gene contained six exons interrupted by five introns. Analysis performed with the deduced PbTPI suggested its usefulness in providing phylogenetic relatedness, as well as evidencing the correlation between the phylogeny provided by the deduced protein and intron positions in the cognate genes. The immunological reactivity of PbTPI was examined. The complete coding cDNA of PbTPI was overexpressed in an *Escherichia coli* host to produce high levels of recombinant fusion protein with glutathione S-transferase (GST) that had been purified by affinity chromatography. The purified recombinant TPI was recognized by sera of patients with confirmed paracoccidioidomycosis and not by sera of healthy individuals. Thus, recombinant PbTPI can be a valuable addition to the still small arsenal of *P. brasiliensis* immunoreactive proteins, which could be tested for incorporation into assays for serodiagnosis of the disease.

© 2004 Elsevier SAS. All rights reserved.

Keywords: *Paracoccidioides brasiliensis*; Triosephosphate isomerase; Gene cloning and structural analysis; Recombinant protein; Immunological reactivity

1. Introduction

The enzyme triosephosphate isomerase (TPI) is widely distributed in nature, converting glyceraldehyde-3-phosphate to dehydroxyacetone phosphate in the glycolytic pathway. TPI (EC 5.3.1.1), is a well-studied enzyme con-

served in function across eukarya, bacteria and archaea. Although highly conserved in its structure, considerable variation can be found in some amino acids and regions of the molecule [1].

It has been reported that pathogen-derived TPI plays an important role in host-parasite interaction. A monoclonal antibody, M1, recognizes a 28-kDa antigen found in all life cycle stages of schistosomes [2]. Passive transfer of this anti-*Schistosoma mansoni* TPI monoclonal antibody was reported to confer partial protection to cercarial infection in mice [3]. Also, immunization with the TPI antigen bound to the monoclonal antibody M1 induced reduced worm burdens after cercarial challenge [4]. The immunization of mice with the native purified TPI from *Schistosoma japonicum* led to a

Abbreviations: BCIP, 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate; CTAB, cationic hexadecyl trimethyl ammonium bromide; HPLC, high performance liquid chromatography; IPTG, Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside; NBT, nitroblue tetrazolium; Pb, *Paracoccidioides brasiliensis*; PCM, Paracoccidioidomycosis; PVDF, Polyvinylidene difluoride; TPI, Triosephosphate isomerase.

* Corresponding author. Tel./fax: +55-62-521-1110.

E-mail address: celia@icb.ufg.br (C.M. de Almeida Soares).

1286-4579/\$ - see front matter © 2004 Elsevier SAS. All rights reserved.
doi:10.1016/j.micinf.2004.05.001

significant reduction in the number of eggs deposited in the animal liver [5].

Paracoccidioides brasiliensis is a soil-borne fungus and the causative agent of paracoccidioidomycosis (PCM). Infection starts with inhalation of fungal propagules, which reach the pulmonary alveolar epithelium, where they differentiate to the yeast pathogenic form [6]. The disease is endemic primarily in Latin America [7]. Although the majority of clinical forms of the disease are asymptomatic, severe and progressive infection occurs which can involve pulmonary and extrapulmonary tissues [6,7]. Due to the severity of its clinical forms the prompt and accurate diagnosis of PCM is of great importance.

Although some *P. brasiliensis* antigens have been characterized by several methods there are still few purified and characterized molecules. The 43-kDa glycoprotein was the first *P. brasiliensis* antigen to be characterized [8]. Other antigenic products included a 58-kDa antigen [9] and a 25-kDa protein [10], both considered potential markers in *P. brasiliensis* immunological identification. Also, a 27-kDa antigen has been characterized [11] and proposed in combined use with a purified 87-kDa antigen for the serodiagnosis of PCM [12].

We previously described a recombinant HSP60 of *P. brasiliensis* as a highly specific antigen for the detection of antibodies in sera of patients with PCM [13,14]. Because our laboratory is engaged in a program to identify and characterize molecules potentially associated with the fungus–host interaction and in an attempt to discover additional antigenic molecules of *P. brasiliensis*, we had identified and characterized some serum reactive proteins. Among them we isolated a molecule of 29 kDa, with isoelectric point (pI) of 5.8, characterized by homology search analysis as a TPI homologue of *P. brasiliensis* [15]. In the present paper we report the sequences of three peptides of the characterized TPI homologue of *P. brasiliensis*, as well as the nucleotide sequences of both the cDNA and the cognate gene. Phylogenetic relationships were inferred. In addition, we also report the heterologous overexpression of the recombinant TPI and its purification. The recognition of the recombinant purified TPI by sera from individuals with *P. brasiliensis* infection was performed. We also evaluated the reactivity of the purified TPI to sera from healthy individuals. This work provides support for the further study of this *P. brasiliensis* enzyme as a candidate antigen in the detection of antibody in sera of patients with PCM.

2. Materials and methods

2.1. Study isolate and growth conditions

P. brasiliensis isolate Pb01 (ATCC-MYA-826) was studied in our laboratory. It was grown as yeast cells, at 36 °C in semi-solid Fava Netto's medium, as previously described [15,16].

2.2. Isolation and amino acid sequencing of TPI

The TPI was isolated as described [15]. In brief, the yeast cellular extracts were fractionated by two-dimensional gel electrophoresis according to O'Farrell [17]. After performing the second dimension according to Laemmli [18] the proteins were transferred for 1 h at 400 mA to polyvinylidene difluoride membranes (PVDF) (Immobilon-P, Millipore Corp. Bedford, MA). The spot corresponding to the 29-kDa protein, pI 5.8, the molecule reactive to sera of PCM patients, was cut out from the two-dimensional gels of the yeast *P. brasiliensis* proteome. The protein (200 pmoles) was eluted and digested with the endoproteinase Lys-C. The fragments were separated by reversed-phase high-performance liquid chromatography (HPLC) and subjected to Edman's degradation.

2.3. DNA extraction of *P. brasiliensis*

P. brasiliensis yeast cells were harvested, washed and frozen in liquid nitrogen. Grinding with a mortar and pestle broke the cells, and the genomic DNA was prepared by the cationic hexadecyl trimethyl ammonium bromide (CTAB) method according to Del Sal et al. [19].

2.4. Generation of the TPI DNA probe by PCR

P. brasiliensis genomic DNA was used as a template for the PCR amplification of a partial fragment encoding the TPI. Degenerate oligonucleotide primers were designed based on the genomic sequences encoding TPI of *Emericella nidulans* (GenBank accession number gi217920), *Aspergillus oryzae* (gi9955866) and *Candida albicans* (gi6841083). The degenerate sense S1 (5'-ATGSCWCGYMAATTYYT-YGTNGG-3') and the antisense At1 (5'-ATRGGYTCRTA-RGCGAYRAC-3') primers were used in a PCR reaction that was conducted in a total volume of 50 µl containing 50 ng of DNA as template. The resulting 949-bp product was subcloned into pGEM-T-Easy (Promega, Madison, USA). The sequence was determined on both strands by automated DNA sequencing, applying the Sanger DNA sequencing method [20].

2.5. Cloning of the TPI cDNA

A yeast cDNA library was constructed into *EcoRI* and *XhoI* sites of Lambda Zap II (Stratagene/LaJolla/CA/USA). The screening of this library was performed using the 949-bp fragment radiolabelled with [α -³²P]dCTP. Plating 5×10^6 plaque-forming units (p.f.u.), DNA transfer to membranes and hybridization were performed as described in standard procedures [21]. Five positive clones were obtained and phage particles were released from the plaques. The in vivo excision of pBluescript phagemids (Stratagene) in *Escherichia coli* XL1 blue MR' was performed. The nucleotide sequence was determined on both strands.

2.6. Cloning of the *tpi* gene

The complete genomic sequence encoding TPI was obtained by PCR amplification of the total DNA of *P. brasiliensis*. Primers were constructed based on the cDNA sequence. A 1350-bp PCR product was obtained by using sense primer S1 (5'-ATGSCWCGYMAATTYTTGTNGG-3') and the C-terminal At2 (5'-CTAYARNCKRGMRTTGAYRATATCRAC-3') as the antisense primer. The PCR reaction was performed with 50 ng of total DNA of *P. Brasiliensis*, and the amplification conditions were 30 cycles at 94 °C for 45 s, annealing at 42 °C for 1 min and 30 s, and extension at 72 °C for 2 min. An amplified PCR product of 1350 bp was gel purified, subcloned into pGEM-T-Easy vector (Promega) and sequenced by the dideoxy-chain termination method [20].

2.7. Sequence analysis

The obtained cDNA and genomic DNA sequences were translated and compared to all non-redundant polypeptides in the translated NCBI (National Center for Biotechnology Information) database. Sequence analyses were performed by using the BLAST program [22], the PROSITE [23] and Pfam [24] databases.

2.8. TPI inferred phylogeny and intron positions analysis

The phylogenetic relationships of *PbTPI* were generated with 17 selected sequences from organisms of diverse taxons presenting identity to *PbTPI* (matches were retained with an expected probability value below e^{-70}) and with all the fungi TPI complete protein and genomic sequences available at databases. The entire compared amino acid sequences were visualized using TreeView software. A phylogenetic tree was constructed by multiple sequence alignments using the Clustal X program [25]. Trees were constructed by using the neighbor-joining method [26]. Robustness of branches was estimated using 1000 boot-strapped replicates. The intron positions were analyzed in the complete genomic sequences and numbered according to the corresponding amino acid residues in the cognate proteins.

2.9. Southern blotting analysis

Total DNA (20 µg) was digested with the restriction enzymes *EcoRI*, *SacI*, *ApaI* and *AvaI*. The DNA was electrophoresed on a 0.8% agarose gel and transferred to a nylon membrane (Amersham Biosciences, Little Chalfont, UK). The blot was probed to the 750-bp nucleotide sequence including the complete *PbTPI* ORF, labeled with [α -³²P]dCTP, by using the random primer DNA labeling kit RPN1604 (Amersham Biosciences).

2.10. RNA isolation and Northern blot analysis

Total RNA was obtained from yeast cells grown in vitro at 36 °C, by using the trizol method (GIBCO™, Invitrogen,

Carlsbad, CA). Northern hybridization was performed with 10 µg of total RNA fractionated on a 1.2% [w/v] agarose-formaldehyde gel. The RNA was transferred to a nylon membrane. The labeled probe of 750 bp was hybridized to the blot under high-stringency conditions.

2.11. Expression of *PbTPI* by *E. coli* and purification of the recombinant protein

Oligonucleotide primers were designed to amplify the 750-bp cDNA containing the complete coding region of *Pbtpi*. The nucleotide sequences of the sense and antisense primers (E1 and E2, respectively) were (5'-GAATTC-TATGCCTCGTAAATTCTTTG-3') and (5'-CTCGAGCTAT-AAACGGGCGTTGATGAT-3'), which contained engineered *EcoRI* and *XhoI* restriction sites (underlined), respectively. The amplification parameters were as follows: an initial denaturation step at 94 °C for 1 min, followed by 30 cycles of denaturation at 94 °C for 45 s, annealing at 45 °C for 1 min and 30 s and extension at 72 °C for 2 min. The 750-bp PCR product was digested with *EcoRI* and *XhoI*, separated by agarose gel electrophoresis, gel excised and subcloned into the *EcoRI/XhoI* sites of pGEX-4T-3 (Amersham, Biosciences) to yield the pGEX-4T-3-TPI construct. The recombinant plasmid was used to transform the *E. coli* XL1 blue competent cells using the heat shock method [21]. To confirm that the *Pbtpi* was cloned into pGEX-4T-3 and could produce an in-frame molecule fused to glutathione S-transferase (GST), complete sequencing of the DNA was performed on both strands. Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) (0.1 mM) was used to induce the recombinant protein expression. The recombinant TPI was expressed in the soluble form by the bacteria and the protein was purified by affinity chromatography under non-denaturing conditions, as previously reported [14]. The purity and size of the recombinant protein were evaluated by running the purified molecule on a 12% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) followed by Coomassie blue staining.

2.12. Western blotting analysis

The purified recombinant TPI was fractionated by SDS-PAGE, according to Laemmli [18]. The gels were either stained with Coomassie brilliant blue R250 or blotted on nylon membranes. The membranes were blocked with Tris-buffered saline (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7.6) containing 5% non-fat dry milk and reacted to sera from patients with proven PCM, tested by immunodiffusion against *P. brasiliensis* exocellular antigens. The blots were also reacted to samples from healthy individuals. The secondary antibody was alkaline phosphatase coupled anti-human IgG, (Sigma, Aldrich, Co). The reactions were developed with BCIP/NBT (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate and nitroblue tetrazolium).

2.13. Nucleotide sequence accession numbers

The *P. brasiliensis* nucleotide sequences reported in this paper and the deduced amino acid sequences have been submitted to the GenBank database under accession numbers AY250089 (cDNA) and AY037936 (genomic).

3. Results

3.1. Nucleotide and deduced amino acid sequences of *PbTPI*

Protein isolation and microsequencing of the three peptides obtained by Lys-C digestion of the 29-kDa, pI 5.8 protein provided the sequences ITWTLAGHSER; RQLDA-VAEEVSPAEW and VVIAYEPIWAIGTGK (Fig. 1). High sequence homology (100–72%) was observed between the three peptides of the native protein and TPIs from several organisms. In order to isolate the complete gene and cDNA encoding TPI of *P. brasiliensis*, we initially obtained a PCR product containing a fragment of the *P. brasiliensis tpi* gene, as inferred from homology search analysis to sequences deposited at databases. The 949-bp PCR product was labeled with [α - 32 P]dCTP and used as a probe to screen a *P. brasiliensis* cDNA library. The entire cDNA consisted of 1080 bp and encoded a protein of 249 amino acids, as showed in Fig. 1. The translated amino acid sequence predicted a pro-

tein with a molecular mass of 29 kDa and pI of 5.8, in agreement with the data reported for the native protein [15]. The complete cDNA presented all of the three peptides obtained from the native TPI, indicating that the coding sequence for the isolated serum-reactive protein was obtained.

The complete genomic sequence was obtained by PCR and was compared to the cDNA. The 5' and 3' untranslated regions (UTR) were not present in the obtained DNA due to the positions of primers S1 and At2, as shown in Fig. 1. The *Pbtpi* presented introns, a characteristic of the *P. brasiliensis* ORFs sequenced so far. The genomic sequence included five introns, of 120, 196, 134, 74 and 76 bp. All of the intron/exon boundaries conformed to the basic consensus GT/AG for eukaryotic splice donor and acceptor sites [27] and presented the putative splice box which matches the filamentous-fungus consensus sequence (NNCTPuAPy), located at the 3' terminus of the introns [28].

3.2. Characteristics of the deduced amino acid sequence

The deduced amino acid sequence of the *P. brasiliensis* TPI displayed strong homology to TPIs of both prokaryotic and eukaryotic origin. Alignment of the predicted *P. brasiliensis* protein sequence (*PbTPI*) with reported sequences of triosephosphate isomerase by Clustal X analysis revealed high levels of homology. Fig. 2 shows the comparison of the *PbTPI* with known TPI sequences. Positions in which a gap

```

-80 gtctcctaacccttcacgaaccatttaattactatataatcctagaattcttatcattatcccgctcaataaagata
-19 ataaaattctccagccaccATGCCCTCGTAAATTCCTTTGGTGGCGGCAACTTCAAGATgtatgtgtgtctcctgaat
      M P R K F F V G G N F K M
62 caaaacgtcaaatcgtctctaccacacccaaatcttctataacaacggaaTactgatjaaatcacttccactactc
142 aattccattccacccagGAATGGCACCCTAAATCTATCACCCTATATCACCACCTCAACTCTGCCAAGCTTGATCC
      N G T A K S I T H I I T N L N S A K L D P
222 TTCCACTGAAATTTGTCATCGCCCGCTGCAATCTACCTGGTCTTGCACGACAACTTGCAGACGGCCAAAGTCGCGCTT
35 S T E I V I A P P A I Y L V L A R Q L A N G Q V A V
302 CTGCACAGAAATGTGTTGATAAGCCTAATGGAGCCTTTACTGGGAGTTGAGCGTGGACAGCTCAGAGATGAAAAATC
61 S A Q N V F D K P N G A F T G E L S V E Q L R D E K
382 ACTTGGACGTGGCTGGCATAGCGAAGAGTTTACTCAGAGAAGATGATGAGgtatgtgtgtgtcttctatagta
88 F W T L A G H S E R R V L L R E D D E
462 tgtgtgtgtgtgtgcaagattttgttttcccttaaacataattatcattttatgcccgaatcggtccatttttaagtta
542 gtcccgatttttccaattcccaacgtggtgtattgagattcgtgatattcttcccaacttttaactaatattgtcata
622 cgggaattattttagTTAGACGGAACAAAGAGCTGCCATTACGGTGGTCTCAATGTAATCTTTGTCATTGGCGAGT
107 F V A R K T K A A I N G G L N V I L C I G E
702 CTCTTGAGgttaactaccacatttcgatattataaccctttatgcgagttgaaatcgaaaacgaagcgaacaa
129 S L E
782 agattctcaggggaacgtgtttcgtgtgaagcgagagctgacgacaggtctccatatatagGAACGCGAAGCTGGAAG
132 E R E A G K
862 ACTATCGATGTTGTAACAGGCAATGGACGCCGTTGCCGAGGAAGTCTCTCTCGCAGAAATGGAATAAGTCTCATCCG
138 T I D V V T R Q L D A V A E E V S P A E N N K V V I A
942 CTATGAGCCCATCTGgttaactactgctctacgtttcattgtctttcaagaaacgaacactacaTcctaadgaaccactcca
165 Y E P I W
1022 cctccccagGCCCATCGGAACGGCAAGGTGCGCCACAACAGAGCAAGCAAGAAGTGCATGCCTCCATCCGGAATGGC
170 A I G T G K V A T T E Q A Q E V H A S I R K W
1102 TGAATGAGAAAATCTCCCTGAAGCGGCCGAAACACCCGCTTATTACGGCGGAAGCGTTACGGAGAGCAACTGTCGG
193 L N E K I S P E A A E N T R V I Y G G S V T E S N C R
1182 GATCTCGCCGCGCAGCTGATGTTGACGGGTTTTTGGTGGCGGAGCTAGTTTAAACCTGCTgtatgttttcacagaat
220 D L A A Q P D V D G F L V G G A S L K P A
1262 attgtcatgataggaataaccocactcctgcaaacggataaatTactaacTcaagtcgagTTGTGTCATATCATCAACGCC
241 F V D I I N A
1342 CGTTTATAGacggtttttgtagtttagttcttagttacacataaaatcccttacggcagaatgacgttttcttagtccct
248 R L *
1422 cagtttttttccgcttaacactgccataaaagctgatattgggttatcggggtattggaaacctggagacctgacatgga
1502 aatggcctgactttctgtttgtgaattgaaaaataataaataaataaactgttgcgtcagtgacgtatttatatct

```

Fig. 1. Nucleotide sequences of the cDNA, of the gene and the deduced amino acid of *PbTPI*. Nucleotide and amino acid numbers are shown on the left. The intron sequences are represented in lowercase. Nucleotides in bold italics represent the conserved 5' and 3' consensus of the introns. The putative splice boxes in the intron sequences are marked by rectangles. Underlined regions represent the primers used in the amplification of the described sequences. Numbering for the amino acid sequence begins at the methionine encoded by the first initiation codon and ends at the first termination codon. Amino acids in gray box represent sequences identified by microsequencing of the endoproteinase Lys-C-digested peptides of the 29-kDa antigen recognized by serum of PCM patients.

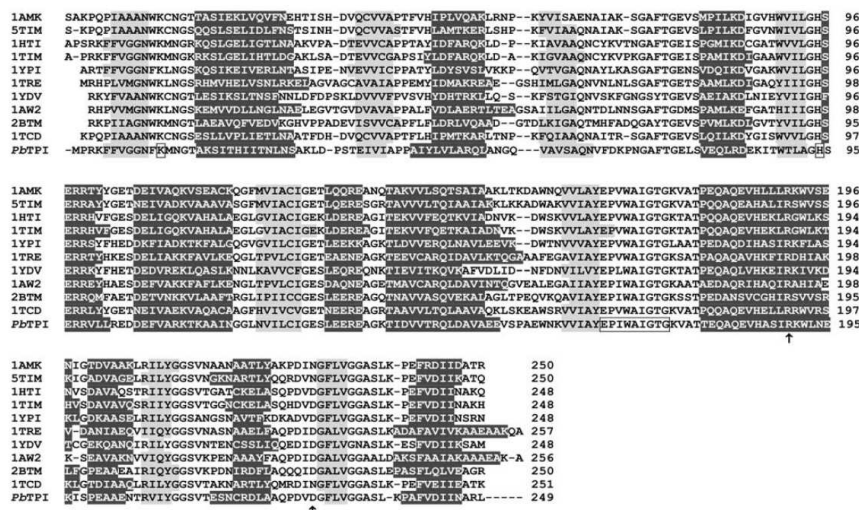


Fig. 2. Comparison of the predicted amino acid sequence of *P. brasiliensis* TPI with those of selected TPI proteins. The selected sequences were those which had been previously characterized by crystallographic analysis and presently registered at the PDB (Protein Data Bank, <http://nlist.rcsb.org/pdb/>). By using the program Clustal X, *PbTPI* was aligned with those from 1AMK, *Leishmania mexicana*; 5TIM, *Trypanosoma brucei brucei*; 1HTI, *H. sapiens*; 1TIM, *Gallus gallus*; 1YPI, *Saccharomyces cerevisiae*; 1TRE, *E. coli*; 1YDV, *P. falciparum*; 1AW2, *Vibrio marinus*; 2BTM, *Bacillus stearothermophilus*; 1TCD, *Trypanosoma cruzi*. The amino acids in gray represent the conserved regions for beta-strand conformation and those in dark gray correspond to the alpha helix conformation. The boxed amino acid sequences in *PbTPI* correspond to the putative active site region. Rectangles represent the amino acids putatively related to the catalysis. Arrows represent the amino acids putatively related to the protein folding.

was introduced to optimize homology are shown as dashes. A 74–54% identity was found when comparing *PbTPI* with both prokaryotes and eukaryotes. Among the compared TPIs, the highest homology was with *E. nidulans*, 75% identical. Not surprisingly, the sequence homology was highest in those regions of the protein that are known to be part of the active site, as defined by crystallographic studies of some TPIs. The putative active site region in *PbTPI* presented a highly conserved motif (A/V)YEP(L/I/V/M)W(S/A)-IGT(G/K) located at residues 164–174 in the deduced protein sequence of *P. brasiliensis*, as described for other TPIs [29,30]. The most essential catalytic residues should be Lys 12, His 94 and Glu 166, as described from mutational and structural studies from several TPIs [31]. Also the Arg190 and Asp226 were conserved in *PbTPI* and should be related to the formation of a salt bridge, described as important for the efficient protein-folding in the dimeric interface [32]. TPI has been described as a well-conserved dimeric protein, consisting of two identical subunits of around 250 residues, with spacial conformation of the ($\beta\alpha$)8 barrel fold. The barrel is composed of eight parallel β -strands, labeled β 1 to β 8, and the corresponding α helices (α 1– α 8). The loops connecting the β -strands to the subsequent helices are numbered from 1 to 8 [33]. The *PbTPI* presented the conserved amino acids present in strands and helices, as shown in Fig. 2. The predicted secondary structure of the *PbTPI* was performed by using the automated comparative protein modeling in SWISS-MODEL – (<http://www.expasy.org/swissmod/SWISS-MODEL.html>). The predicted alpha–beta barrel structure was also evidenced in the *PbTPI* (data not shown).

3.3. Phylogenetic analysis of *PbTPI* and *P. brasiliensis* tpi gene structure analysis

The Pfam (<http://www.sanger.ac.uk/software/pfam/index.shtml>), NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) and EMBL (<http://www.ebi.ac.uk/embl/>) databases were used to search for complete protein sequences of TPI and also for the complete genomic sequences. A phylogenetic tree was constructed by using the multiple alignment program developed by Thompson et al. [25]. Fig. 3A presents the deduced phylogenies of TPIs, as calculated from neighbor-joining analysis of amino acid sequences [26]. The TPI sequences were well-resolved into clades corresponding, respectively, to animals, plants and fungi. The tree was rooted to the external group *Plasmodium falciparum*. The evolutionary relationship of the fungi TPIs was suggested. The Ascomycota TPIs (*P. brasiliensis*, *A. oryzae*, *E. nidulans* and *Magnaporthe grisea*) were more correlated to each other than to the Basidiomycete (*Ustilago maydis* and *Coprinopsis cinerea*). Other TPI sequences in the tree grouped into their respective taxons, i.e., TPIs from animals and plants formed separate and distinct clades. The mosaic structure of the fungal *tpi* genes, which presented the complete sequences described at the database, was analyzed. Fig. 3B presents intron positions correlated to the amino acid sequences of the TPI proteins. Conspicuously, Eurotiomycetes (*P. brasiliensis*, *A. oryzae* and *E. nidulans*), which clustered together in the tree presented in Fig. 3A, have five introns, with all of them at identical positions. Two TPI sequences of fungi (*A. oryzae* and *E. nidulans*) presented a short intron “sliding” of one

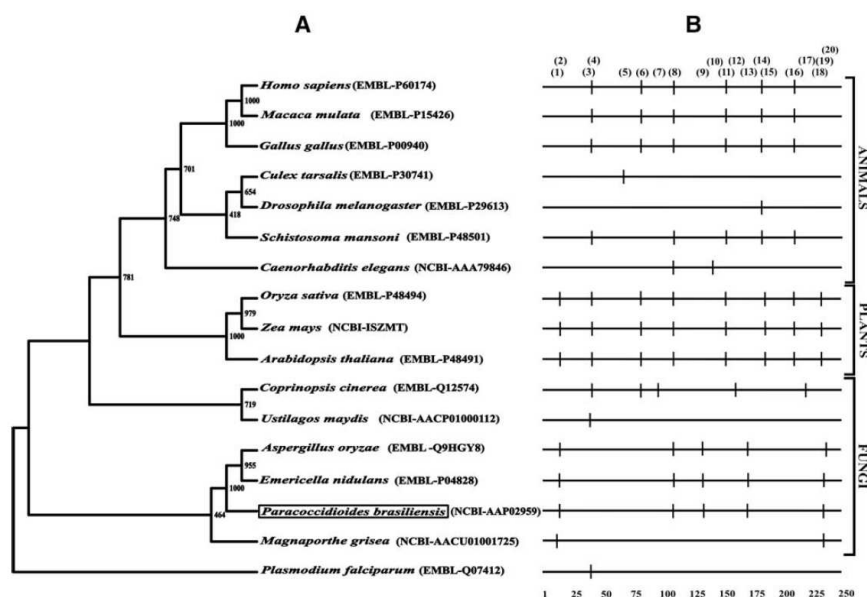


Fig. 3. Phylogeny of *PbTPI* and structure of the *P. brasiliensis tpi* gene. (A) Phylogeny of 17 species inferred from the protein sequences of triosephosphate isomerases. The numbers on the branches are bootstrap values obtained with 1000 replications. Using the sequences of the deduced TPIs from NCBI and EMBL databases, the evolutionary relationship were performed. Accession numbers are provided for each sequence. (B) Structural diagram of TPI genes presenting the intron positions (shown as vertical hatches on a horizontal bar), as indicated by the corresponding amino acids. The sequences utilized were described in panel A. Numbers at the top represent the order of intron positions and the scale numbers at the bottom represent amino acid positions.

amino acid: (Fig. 3B). The plants with eight introns were also in a separate clade, and animals with six introns represented an individual cluster. Those data suggest a relationship between intron positions and phylogenetic analysis of the proteins. A tree was constructed by the neighbor-joining method on the basis of the Jaccard matrix obtained by the presence or absence of the introns in the defined position in the analyzed genes. Three groups of organisms with identical numbers of introns at identical positions in each group were observed: animals, plants and the Eurotiomycetes (data not shown).

3.4. Hybridization analysis

Southern blot analysis using the TPI probe was able to detect a single DNA fragment in the *P. brasiliensis* DNA digested with the restriction enzymes *EcoRI*, *SacI*, *ApaI* and *AvaI* (Fig. 4A). Northern blot analysis detected the presence of one mRNA species of 1.4 kb (Fig. 4B). Those data indicate the presence of a single *tpi* gene in the *P. brasiliensis* genome.

3.5. Expression and purification of the recombinant TPI

The expression of the pGEX-4T-3-TPI produced about 20 mg of the fusion protein in one liter of *E. coli* culture. The predicted molecular size of the recombinant protein was 55 kDa, which included the vector-encoded fusion peptide of 26 kDa at its N-terminus. SDS-PAGE was used to examine the composition of the cell lysates, as shown in Fig. 5A. The fusion protein was purified using glutathione-sepharose 4B.

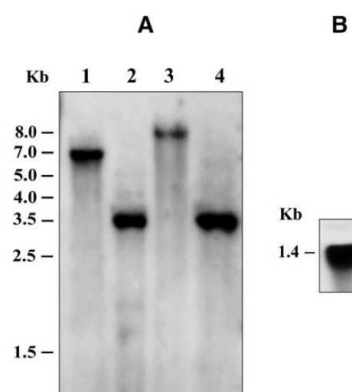


Fig. 4. Analysis of the *P. brasiliensis tpi* gene. (A) Southern blot analysis for determination of the copy number of *P. brasiliensis tpi* gene. Total DNA (30 µg) was digested with restriction enzymes (1) *EcoRI*; (2) *SacI*; (3) *ApaI*; (4) *AvaI*. The position of the size markers is indicated. B- Northern blot of total RNA from yeast cells. The RNA size was calculated by using the 0.24–9.5-kb marker RNA ladder (Invitrogen™ Life Technologies). Both blots were hybridized to the radiolabeled 750-bp probe.

The molecular size of the recombinant fusion protein correlated with the predicted size (Fig. 5A, lane 3). The fusion protein was cleaved by the addition of thrombin protease. As observed in Fig. 5A, highly purified protein was obtained, which migrated on SDS-PAGE as a single band of 29 kDa (Fig. 5A, lane 4).

Four serum samples from *P. brasiliensis*-infected individuals and three serum samples from control individuals were reacted in immunoblot assays with 1.0 µg of the recom-

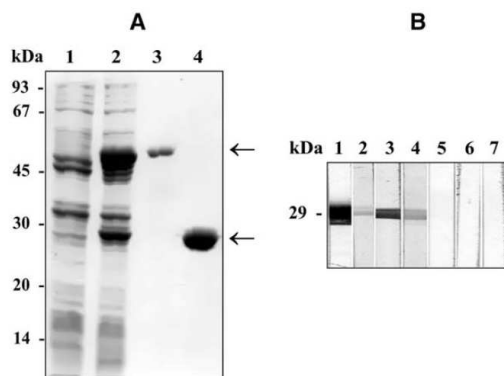


Fig. 5. SDS-PAGE analysis of the 29-kDa recombinant protein expressed by *E. coli* transformed with the *PbTPI* construct and immunoblot. (A) *E. coli* XL1-b cells harboring the PGEX-4T-3-TPI plasmid were grown at 30 °C to an A260 of 0.6 and harvested before (lane 1) or after (lane 2) a 2-h incubation with 0.1 mM IPTG. The cells were lysed by extensive sonication. Lane 3, The affinity-isolated recombinant TPI; lane 4, The recombinant fusion protein was cleaved by thrombin. Electrophoresis was carried out on 12% SDS-PAGE and the proteins stained by Coomassie blue R-250. Molecular markers are indicated. (B) Immunoblot analyses of the recombinant protein. 1.0 µg of purified TPI was reacted to sera of PCM patients diluted 1:100 (lanes 1–4) and to control sera diluted 1:100 (lanes 5–7). After reaction to the anti-human IgG alkaline phosphatase coupled antibody (diluted 1:1000), the reaction was developed with BCIP/NBT).

binant TPI (Fig. 5). Strong reactivity was observed with sera of PCM patients (Fig. 5B, lanes 1–4). No cross-reactivity was observed with control sera (Fig. 5B, lanes 5–7).

4. Discussion

Using a strategy of identifying in the *P. brasiliensis* proteome, proteins reactive to sera of patients with PCM, we partially characterized a potentially important immunogenic molecule which presented homology to TPI in this fungus [15]. In the present study we extended our characterization of the native TPI homologue of *P. brasiliensis* and reported the cloning and expression of the cognate cDNA and gene. We also cloned and overproduced the recombinant protein and analyzed its immunological reactivity.

Pbtpi encodes a protein with a predicted molecular size of 29 kDa and calculated *pI* of 5.8, in agreement with the data obtained for the native TPI [15]. The predicted deduced *PbTPI* contains 249 residues, enclosing in its sequence regions identified as the catalytic residues of the TPIs [29–31]. Also, the sequence analysis of the deduced protein showed very well conserved amino acid residues that may form the ($\beta\alpha$)₈ barrel structure, which contains the characteristic catalytic residues of TPI enzymes. On the basis of those structural similarities, and based on the presence of the three sequenced peptides of the native protein in the deduced sequence, we were able to suggest that the gene and cDNA encoding the TPI of *P. brasiliensis* has been cloned.

The *PbTPI* showed high identity to the corresponding sequence of closely related Eurotiomycetes, suggesting its

usefulness in the determination of phylogenetic relationships. We found similar results using the glyceraldehyde-3-phosphate (GAPDH) sequences of *P. brasiliensis* [34]. Corroborating our suggestion, sequences of TPIs have been previously reported as useful for the determination of evolutionary relationships [35,36]. The genomic organization of the *P. brasiliensis tpi* gene was conserved, considering the intron positions of the Eurotiomycetes sequences presented in the database. This data is of interest since it was correlated to the phylogenetic relatedness provided by the analysis of the protein. Our data correlating the TPI phylogeny tree with the intron positions suggest that both can be useful to infer phylogenetic relationships in genes, as we described previously for *P. brasiliensis* GAPDH [34]. Moreover, given that TPIs from fungi were phylogenetically distant from the *Homo sapiens* TPI, the development of TPI inhibitors that do not react with the host molecule could be feasible.

The single pattern obtained in Southern blot analysis suggests the presence of only one TPI gene in *P. brasiliensis*. Northern blot showed a single transcript migrating as an mRNA species of 1.4 kb, reinforcing the presence of only one gene in the fungus genome. Data obtained from the *P. brasiliensis* transcriptome analysis corroborate this observation [37].

The purified protein obtained from bacteria transformed with the *PbTPI* plasmid construction and subjected to SDS-PAGE exhibited a monomeric band of around 29 kDa, in accordance with the size of the deduced protein and in agreement with the molecular size of the native molecule of *P. brasiliensis*. Those data reinforce the evidence that the previously characterized immunogenic 29-kDa protein, presenting identity to TPIs from several sources, has been cloned [15].

Anti-*P. brasiliensis* IgG levels are usually elevated in patients with recently diagnosed PCM, and these levels, in addition to the diagnosis of the disease, have been shown to be good markers for monitoring response to therapy [38]. Progress has recently been made in the application of recombinant proteins to the serodiagnosis of PCM. Recombinant molecules of a 43-kDa glycoprotein (gp43) and the 23-kDa antigen had been used in serodiagnosis tests [39,40]. We had recently cloned an hsp60 antigen and used it as a serodiagnostic marker in PCM [13,14]. The usefulness of the recombinant *PbTPI* in future diagnosis of PCM is promising, since the recombinant molecule was able to react to antibodies present in sera of PCM patients, but in not in sera of control individuals. Our data indicate that the recombinant form of the antigen TPI evaluated in this study should be of value in the diagnosis of PCM. Future work will focus on this subject.

Acknowledgments

The authors want to thank Ernane G. Bastos for helpful technical contributions for this work. The authors also thank

Dr José Alexandre F. Diniz and Alexandre S. Coelho for helpful discussions regarding the phylogenetic analysis. This work was supported by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

References

- [1] T. Alber, D.W. Banner, A.C. Bloomer, G.A. Petsko, D. Phillips, P.S. Rivers, I.A. Wilson, On the three-dimensional structure and catalytic mechanism of triose phosphate isomerase, *Philos. T. Roy. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 293 (1981) 159–171.
- [2] D.A. Harn, M. Mitsuyama, E.D. Huguenel, L. Oligino, J.R. David, Identification by monoclonal antibody of a major (28 kDa) surface membrane antigen of *Schistosoma mansoni*, *Mol. Biochem. Parasitol.* 16 (1985) 335–345.
- [3] D.A. Harn, W. Gu, L.D. Oligino, M. Mitsuyama, A. Gebremichael, D.A. Ritcher, Protective monoclonal antibody specifically recognized and alters the catalytic activity of schistosome triosephosphate isomerase, *J. Immunol.* 148 (1992) 562–567.
- [4] D.A. Harn, Immunization with schistosome membrane antigens, *Acta Trop.* 44 (1987) 46–49.
- [5] Y.X. Miao, S.X. Liu, D.P. McManus, Isolation of native, biochemically purified triosephosphate isomerase from a Chinese strain of *Schistosoma japonicum* and its protective efficacy in mice, *Parasitol. Int.* 47 (1998) 195–199.
- [6] E. Brummer, E. Castañeda, A. Restrepo, *Paracoccidioidomycosis: an update*, *Clin. Microbiol. Rev.* 6 (1993) 89–117.
- [7] A. Restrepo, *Paracoccidioides brasiliensis*, in: G.I. Mandel, J.F. Bennet, R. Dolin (Eds.), *Principles and Practice of Infectious Diseases*, Churchill Livingstone, Philadelphia, 2000, pp.2768–2772.
- [8] P.S. Cisalpino, R. Puccia, L.M. Yamaguchi, M.I.N. Cano, J.F. Silveira, L.R. Travassos, Cloning, characterization and epitope expression of the major diagnostic antigen of *Paracoccidioides brasiliensis*, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 4553–4560.
- [9] J.I. Figueroa, A.J. Hamilton, M.H. Allen, R.J. Hay, Isolation and partial characterization of a *Paracoccidioides brasiliensis* 58 kDa extracellular glycoprotein which is recognized by human immune sera, *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 89 (1995) 566–572.
- [10] J.I. Figueroa, A.J. Hamilton, M.H. Allen, R.J. Hay, Immunohistochemical detection of a novel 22-to-25-kilodalton glycoprotein of *Paracoccidioides brasiliensis* in biopsy material and partial characterization by using species specific monoclonal antibody, *J. Clin. Microbiol.* 32 (1994) 1566–1574.
- [11] B.L. Ortiz, A.M. García, A. Restrepo, J.G. McEwen, Immunological characterization of a recombinant 27-kilodalton antigenic protein from *Paracoccidioides brasiliensis*, *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 3 (1996) 239–241.
- [12] S. Diéz, B.L. Gómez, J.G. McEwen, A. Restrepo, R.J. Hay, A.J. Hamilton, Combined use of *Paracoccidioides brasiliensis* recombinant 27-kilodalton and purified 87-kilodalton antigens in an enzyme-linked immunosorbent assay for serodiagnosis of paracoccidioidomycosis, *J. Clin. Microbiol.* 41 (2003) 1536–1542.
- [13] S.M. Izacc, F.J. Gómez, R.S.A. Jesuino, C.A. Fonseca, M.S.S. Felipe, G.S. Deepe Jr, C.M.A. Soares, Molecular cloning, characterization and expression of the heat shock protein 60 gene from the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*, *Med. Mycol.* 39 (2001) 445–455.
- [14] D.A. Cunha, R.M. Zancopé-Oliveira, M.S.S. Felipe, S.M. Salem-Izacc, G.S. Deepe Jr, C.M.A. Soares, Heterologous expression, purification and immunological reactivity of a recombinant HSP60 from *Paracoccidioides brasiliensis*, *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 9 (2002) 374–377.
- [15] C.A. Fonseca, R.S.A. Jesuino, M.S.S. Felipe, D.A. Cunha, W.A. Brito, C.M.A. Soares, Two-dimensional electrophoresis and characterization of antigens from *Paracoccidioides brasiliensis*, *Microb. Infect.* 3 (2001) 535–542.
- [16] S.F.I. Moreira, A.M. Bailao, M.S. Barbosa, R.S.A. Jesuino, M.S.S. Felipe, M. Pereira, C.M.A. Soares, Monofunctional catalase P of *Paracoccidioides brasiliensis*: identification, characterization, molecular cloning and expression analysis, *Yeast* 21 (2004) 173–182.
- [17] P.Z. O'Farrel, H. Goodman, P.H. O'Farrel, High resolution two-dimensional electrophoresis of protein, *J. Biol. Chem.* 250 (1975) 4007–4021.
- [18] U.K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227 (1970) 680–685.
- [19] G. Del Sal, G. Manfioletti, C. Schneider, The CTAB-DNA precipitation method: a common mini-scale preparation of template DNA from phagemids, phages or plasmids suitable for sequencing, *Biotech* 7 (1989) 514–520.
- [20] F. Sanger, S. Nicklen, A.R. Coulson, DNA sequencing with chain-terminating inhibitors, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74 (1977) 5463–5467.
- [21] J. Sambrook, D.W. Russel (Eds.), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, New York, 2001.
- [22] S.F. Altschul, W. Gish, W. Miller, E.W. Myers, D.J. Lipman, Basic local alignment search tool, *J. Mol. Biol.* 215 (1990) 403–410.
- [23] L. Falquet, M. Pagni, P. Bucher, N. Hulo, C.J. Sigrist, K. Hofmann, A. Bairoch, The PROSITE database, its status in 2002, *Nucleic Acids Res.* 30 (2002) 235–238.
- [24] A. Bateman, E. Birney, L. Cerruti, R. Durbin, L. Etwiller, S.R. Eddy, S. Griffiths-Jones, K.L. Howe, M. Marshall, E.L. Sonnhammer, The pfam protein families database, *Nucleic Acids Res.* 30 (2002) 276–280.
- [25] J.D. Thompson, T.J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin, D.G. Higgins, The clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools, *Nucleic Acids Res.* 24 (1997) 4876–4882.
- [26] N. Saitou, M. Nei, The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees, *Mol. Biol. Evol.* 4 (1987) 406–425.
- [27] R. Breathnach, P. Chambon, Organization and expression of eukaryotic split genes coding for proteins, *Annu. Rev. Biochem.* 50 (1981) 349–383.
- [28] S.J. Gurr, S.E. Unkles in: J.R. Kinghorn (Ed.), *Gene Structure in Eukaryotic Microbes*, IRL Press, Oxford, 1987, pp.93–139.
- [29] J. Xiang, J. Sun, N.S. Sampson, The importance of hinge sequence for loop function and catalytic activity in the reaction catalyzed by triosephosphate isomerase, *J. Mol. Biol.* 307 (2001) 1103–1112.
- [30] M.E. Noble, J.P. Zeelen, R.K. Wierenga, Structures of the "open" and "closed" state of trypanosomal triosephosphate isomerase, as observed in a new crystal form: implications for the reaction mechanism, *Prot. Struct. Funct. Genet.* 16 (1993) 311–326.
- [31] W. Schliebs, N. Thanki, R. Eritja, R. Wierenga, Active site properties of monomeric triosephosphate isomerase (monoTIM) as deduced from mutational and structural studies, *Protein Sci.* 5 (1996) 229–239.
- [32] I. Kursula, S. Partanen, A.M. Lambeir, R.K. Wierenga, The importance of the conserved Arg-191–Asp227 salt bridge of triosephosphate isomerase for folding, stability, and catalysis, *FEBS Lett.* 518 (2002) 39–42.
- [33] R.K. Wierenga, The TIM-barrel fold: a versatile framework for efficient enzymes, *FEBS Lett.* 492 (2001) 193–198.
- [34] S. Barbosa, D.A. Cunha-Passos, M.S.S. Felipe, R.S.A. Jesuino, M. Pereira, C.M.A. Soares, The Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is differentially regulated in phases of *Paracoccidioides brasiliensis*: Molecular and phylogenetic analysis, *Fungal Genet. Biol.* 41 (2004) 667–675.

- [35] M. Logsdon JR, M.G. Tyshenko, C. Dixon, J.D. Jafari, V.K. Walker, J.D. Palmer, Seven newly discovered intron positions in the triose-phosphate isomerase gene: evidence for the introns-late theory, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92 (1995) 8507–8511.
- [36] J. Kwiatowski, M. Krawczyk, M. Kornacki, K. Bailey, F.J. Ayala, Evidence against the exon theory of genes derived from the triose-phosphate isomerase gene, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92 (1995) 8503–8506.
- [37] M.S.S. Felipe, R.V. Andrade, S.P. Silva, A.Q. Maranhão, F.A.G. Torres, P. Albuquerque, E.S. Alves, F.D. Arraes, M. Arruda, M.O. Azevedo, A.J. Baptista, L.A. Bataus, C. Borges, E.G. Campos, B.S. Daher, A. Dantas, M. Ferreira, G.V. Ghil, R.S.A. Jesuino, C.M. Kyaw, L. Leitão, C.R. Martins, L.M.P. Moraes, A. Nicola, E.S. Alves, J. Parente, M. Pereira, M.J. Poças-Fonseca, R. Resende, B.M. Ribeiro, R.R. Saldanha, S.A. Santos, I. Silva-Pereira, M.A.S. Silva, E. Silveira, I.C. Simões, R. Soares, D.P. Souza, M.T. De-Souza, E.V. Andrade, M.A.S. Xavier, H.P. Veiga, E.J. Venancio, M.J.A. Carvalho, A.G. Oliveira, M.K. Inoue, N.F. Almeida, M.E.M.T. Walter, C.M.A. Soares, M.M. Brígido, Transcriptome characterization of the dimorphic and pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* by EST analysis, *Yeast* 20 (2003) 263–271.
- [38] J.P. Bueno, M.J.S. Mendes-Giannini, G.M. del Negro, C.M. Assis, C.K. Takiguchi, M.A. Shikanai-Yasuda, IgG, IgM and IgA antibody response for the diagnosis and follow up of paracoccidioidomycosis: comparison of counterimmunoelectrophoresis and complement fixation, *J. Med. Vet. Mycol.* 35 (1997) 213–217.
- [39] S.N. Diniz, K.C. Carvalho, P.S. Cisalpino, J.F. Silveira, L.R. Trassas, R. Puccia, Expression in bacteria of the gene encoding the gp43 antigen of *Paracoccidioides brasiliensis*: immunological reactivity of the recombinant fusion proteins, *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 9 (2002) 1200–1204.
- [40] B.L. Ortiz, S. Díez, M.E. Urán, J.M. Rivas, M. Romero, U. Caicedo, A. Restrepo, J.G. McEwen, Use of the 27-kilodalton recombinant protein from *Paracoccidioides brasiliensis* in serodiagnosis of paracoccidioidomycosis, *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 5 (1998) 826–830.

V- CONCLUSÕES

As conclusões finais do trabalho são:

- O sequenciamento de alguns clones rastreados a partir de uma biblioteca de cDNA do fungo *P. brasiliensis* e de fragmentos amplificados por PCR a partir de DNA genômico do mesmo evidenciaram a caracterização das seqüências de cDNA e do gene completas para a proteína Triose Fosfato Isomerase deste fungo.
- A proteína deduzida a partir do cDNA e do gene apresentou uma massa molecular calculada de 29-kDa e ponto isoelétrico predito de 5.8, semelhante à proteína nativa evidenciadas em trabalhos anteriores do nosso grupo. As seqüências de aminoácidos correspondentes aos três peptídeos caracterizados anteriormente, também foram observadas na proteína deduzida de *PbTPI*.
- Os motivos conservados em TPI Lys12, His94, Cys126, Glu166, Arg190 e Asp226 foram encontrados na seqüência deduzida de *PbTPI*. A provável estrutura secundária de *PbTPI* foi analisada por comparação com outras seqüências de TPIs já caracterizadas por métodos cristalográficos. Observou-se a conservação das regiões de 8 α -hélices e de 8 cadeias β , que formam a estrutura do barril $(\beta\alpha)_8$, comum para esta enzima.
- A comparação da sequencia genômica de *Pbtpi* com genes descritos de TPI de outros fungos caracterizados em bancos de dados mostrou conservação com relação ao número de introns presentes, sendo ainda maior entre as seqüências de TPI dos fungos eurotiomicetos, onde as posições dos introns são muito similares. A construção de uma árvore

filogenética a partir das seqüências de aminoácidos de TPI de alguns organismos mostrou a formação de clados específicos. Estes dados foram reafirmados com a comparação das posições dos introns nos respectivos genes cognatos.

- Os dados obtidos a partir dos experimentos de “Southern” e “Northern blot”, evidenciaram que o gene *Pbtpi* provavelmente está presente em apenas uma cópia no genoma de *P. brasiliensis*.

- A expressão heteróloga do cDNA de *PbTPI* em um sistema bacteriano e posterior purificação da proteína recombinante foi avaliada por análise em SDS-PAGE, evidenciando uma proteína de 29-kDa, em concordância com a proteína nativa e com a massa molecular calculada para a seqüência deduzida de aminoácidos.

- Os ensaios de “Immunoblotting” com a *PbTPI* recombinante mostraram que esta também foi reconhecida por anticorpos presentes no soro de pacientes com PCM, de maneira similar à proteína nativa analisada anteriormente.

VI- PERSPECTIVAS

De acordo com os dados obtidos em nosso trabalho apresentamos as seguintes perspectivas:

- Análise da reatividade imunológica da proteína recombinante, utilizando-se soros de pacientes com PCM e com outras micoses;
- Obtenção de anticorpos contra a proteína recombinante visando estudos de citolocalização;
- Caracterização da atividade enzimática da *PbTPI* recombinante;
- Avaliar a estrutura da proteína recombinante, através de métodos cristalográficos;
- Realizar ensaios de imunoproteção com a proteína recombinante;

VII- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ajello L, Polonelli L 1985. Imported Paracoccidioidomycosis: A Public Health Problem In Non-Endemic Areas. *Eur J Epidemiol* 1: 160-165.

Albornoz MCB 1971. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from rural soil in Venezuela. *Sabouraudia* 9: 248-253.

Almeida F 1930. Estudos comparativos do granuloma coccidioico nos Estados Unidos e no Brasil. Novo gênero para o parasita brasileiro. *An Fac Med S Paulo* 5: 125-141.

Arango M, Yarzabal L 1982. T-Cell Dysfunction and Hyperimmunoglobulinemia E in Paracoccidioidomycosis. *Mycopathologia*. 79:115-123.

Bagagli E, Sano A, Coelho KI, Alquati S, Miyaji M, Camargo ZP, Gomes GM, Franco M, Montenegro MR 1998. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillos (*Dasypus noveminctus*) captured in endemic area of paracoccidioidomycosis. *Am j trop med hyg* 58: 505-12.

Bastos EGP 2003. Caracterização de Sequências Codificantes para o Antígeno Triose Fosfato Isomerase do Fungo Patogênico Humano *Paracoccidioides brasiliensis*. *Dissertação de Mestrado*. Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Goiânia.

Bialek R, Ibricevic A, Fothergill A, Begerow D 2000. Small subunit ribosomal DNA sequence shows *Paracoccidioides brasiliensis* closely related to *Blastomyces dermatitidis*. *J Clin Microbiol* 38: 3190-3193.

Blotta MHSL, Camargo ZP 1993. Immunological Response to Cell-free Antigens of *Paracoccidioides brasiliensis*: Relationship with Clinical Forms of Paracoccidioidomycosis. *J Clin Microbiol* 31: 671-676.

Blotta MHSL, Mamoni RL, Oliveira SJ, Nouér AS, Papaiordanou PM, Goveia A, Camargo ZP 1999. Endemic regions of paracoccidioidomycosis in Brazil: a clinical and epidemiologic study of 584 cases in the southeast region. *Am J Trop Med Hyg* 61: 390-394.

Brummer E, Castaneda E, Restrepo A 1993. Paracoccidioidomycosis: an update. *Clin Microbiol Rev* 6: 89-117.

Bourguignon SC, Meirelles MN, Pacheco RS, Giovanni De Simone S 1998. Purification and Partial Characterization of *Trypanosoma cruzi* Triosephosphate Isomerase. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 93: 219-224.

Calich VLG, Vaz CAC, Burger E 1998. Immunity to *Paracoccidioides brasiliensis* *Infect Res Immun* 149: 407-417.

Camargo ZP, Guesdon JL, Drouhet E, Improvisi L 1984. Magnetic enzyme-linked immunosorbent assay (MELISA) for determination of specific IgG in paracoccidioidomycosis. *J Med Vet Mycol* 22: 291-299.

Camargo ZP, Unterkircher C, Travassos LR 1989. Identification of antigenic polypeptides of *Paracoccidioides brasiliensis* by immunoblotting. *J Med Vet Mycol* 27: 407-412.

Camargo ZP, Franco MF 2000. Current knowledge on pathogenesis and immunodiagnosis of paracoccidioidomycosis. *Rev Iberoam Micol* 17: 41-48.

Cano LE, Brummer E, Stevens DA, Restrepo A 1986. An evaluation of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for quantitation of antibodies to *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Med Vet Mycol* 24: 467-475.

Cano LE, Gómez B, Brummer E, Restrepo A, Stevens DA 1994. Inhibitory Effect Of Deferoxamine Or Macrophage Activation On Transformation Of *Paracoccidioides brasiliensis* Conidia Ingested by Macrophages: Reversal by Holotransferrin. *Infect Immun* 62: 1494-1496.

Chequer-Bou-Habib D, Daniel-Ribeiro C, Banic DM, Francescone do Vale AC, Galvao-Castro B 1989. Polyclonal B cell activation in paracoccidioidomycosis. *Mycopathologia* 108: 89-93.

Chequer-Bou-Habib D, Ferreira-da-Cruz MF, Oliveira-Neto MP, Galvao-Castro B 1989. The possible role of circulating immune complexes in paracoccidioidomycosis. *Braz J Med Biol Res Braz Biol* 22: 205-212.

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

Cisalpino LS, Puccia R, Yamauchi LM, Cano MI, Franco da Silveira J, Travassos LR 1996. Cloning, characterization and epitope expression of the major diagnostic antigen of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Biol Chem* 271: 4553-4560.

Costa AA, Gomez FJ, Pereira M, Felipe MSS, Jesuino RSA, Deep Jr GS, Soares CMA 2002. Characterization of the gene coding for mannosyltransferase, a yeast antigen of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Microbes Infect* 4: 1027-1034.

Coutinho ZF, Silva D, Lazéra M, Petri V, Oliveira RM, Sabroza PC, Wanke B 2002. Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980-1995). *Cad Saúde Pública* 18: 1441-1454.

Cunha DA, Zancopé-Oliveira RM, Felipe MSS, Izacc SMS, Deepe Jr GS, Soares CMA 2002. Heterologous expression, purification and immunological reativity of a recombinant HSP60 from *Paracoccidioides brasiliensis*. *Clin Diag Lab Imm* 9: 374-377.

Díez S, Gómez BL, Restrepo A, Hay RJ, Hamilton AJ 2002. *Paracoccidioides brasiliensis*

87-kilodalton antigen, a heat shock protein useful in diagnosis: characterization, purification and detection in biopsy material via immunohistochemistry. *J Clin Microbiol* 40: 359-365.

Díez S, Gómez BL, McEwen JG, Restrepo A, Hay RJ, Hamilton AJ 2003. Combined use of *Paracoccidioides brasiliensis* recombinant 27-kilodalton and purified 87-kilodalton antigens in an enzyme-linked immunosorbent assay for serodiagnosis of paracoccidioidomycosis. *J Clin Microbiol* 41: 1536-1542.

Diniz SN, Cisalpino PS, Koury MC, Andrade GMQ, Nogueira MGS, Goes AM 1999. In vitro human immune reactivity of fast protein liquid chromatography fractionated *Paracoccidioides brasiliensis* soluble antigens. *Microb Infect* 1: 353-360.

Diniz SN, Carvalho KC, Cisalpino PS, Silveira JF, Travassos LR, Puccia R 2002. Expression in bacteria of the gene encoding the gp43 antigen of *Paracoccidioides brasiliensis*: immunological reactivity of recombinant fusion proteins. *Clin Diagn Lab. Immunol* 6: 1200-1204.

Fava-Netto C 1990. Antígeno polissacarídico do *Paracoccidioides brasiliensis*. *Interciencia* 15: 209-211.

Fernández-Arenas E, Molero G, Nombela C, Díez-Orejas R, Gil C 2004. Contribution of the antibodies response induced by a low virulent *Candida albicans* strain in protection against systemic candidiasis. *Proteomics* 4: 1204-1215.

Ferreira MS, Freitas L H, Lacaz CS, Del Negro GM, Aiello NT, Garcia MN, Assis CM, Salebian A, Heris-Vaccari EM 1990. Isolation and characterization of a *Paracoccidioides brasiliensis* strains from dogs food probably contaminated with soil in Uberlândia Brazil. *J Med Vet Mycol* 28: 253-256.

Fonseca CA, Jesuino RSA, Felipe MSS, Cunha DA, Brito WA, Soares CMA 2001. Two-dimensional electrophoresis and characterization of antigens from *Paracoccidioides brasiliensis*. *Microbes Infect* 3: 535-542.

Franco M, Montenegro MR, Mendes RP, Marquez SA, Dillon NL, Mota NGS 1987. Paracoccidioidomycosis: a recently proposed classification of its clinical forms. *Rev Soc Bras Med Trop* 20: 129–132.

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

Furtado JS, Brito T, Freymuller E 1967. The structure and reproduction of *Paracoccidioides brasiliensis* in human tissue. *J Med Vet Mycol* 5: 226-229.

Garza-Ramos G, Cabrera N, Saavedra-Lira E, Tuena de Gómez-Puyou M, Ostoa-Saloma P, Pérez-Montfort R, Gómez-Puyou A 1998. Sulfhydryl reagent susceptibility in proteins with high sequence similarity Triosephosphate isomerase from *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania mexicana*. *Eur J Biochem* 253: 684-691.

Gezuele E 1989. Aislamiento de *Paracoccidioides sp.* de heces de un pingüino de la Antártida, Abstract B-2. In Proceedings IV International Symposium on Paracoccidioidomycosis. Caracas, Venezuela.

Ginarte M, Pereiro MJ, Toribio J 2003. Imported paracoccidioidomycosis in Spain. *Mycoses* 46: 407-11.

Gonzalez-Mondragon E, Zubillaga RA, Saavedra E, Chanez-Cardenas ME, Perez-Montfort R, Hernandez-Arana A 2004. Conserved Cysteine 126 in Triosephosphate Isomerase Is Required Not for Enzymatic Activity but for Proper Folding and Stability. *Biochemistry* 43: 3255-3263.

Gómez BL, Figueroa JI, Hamilton AJ, Ortiz B, Robledo MA, Hay RJ, Restrepo A 1997. Use of monoclonal antibodies in diagnosis of paracoccidioidomycosis: new strategies for detection of circulating antigens. *J Clin Microbiol* 35: 3278-3283.

Gómez BL, Figueroa JI, Hamilton AJ, Díez S, Rojas M, Tobón AM, Hay RJ, Restrepo A

1998. Antigenemia in patients with paracoccidioidomycosis detection of the 87-kDa determinant during and after antifungal therapy. *J Clin Microbiol* 36: 3309-3316.

Guého E, Leclerc MC, Hoog GS, Dupont B 1997. Molecular taxonomy and epidemiology of *Blastomyces* and *Histoplasma* species. *Mycoses* 40: 69-81.

Harn DA, Mitsuyama M, Huguenel ED, Oligino L, David JR 1985. Identification by monoclonal antibody of a major (28 kDa) surface membrane antigen of *Schistosoma mansoni*. *Mol Biochem Parasitol* 16: 345-354.

Harn DA, Gu W, Oligino LD, Mitsuyama M, Gebremichael A, Ritcher DA 1992. Protective monoclonal antibody specifically recognized and alters the catalytic activity of schistosome triosephosphate isomerase. *J Immunol* 148: 562-567.

Jiménez L, Vibanco-Pérez N, Navarro L, Landa A 2000. Cloning, expression and characterisation of a recombinant triosephosphate isomerase from *Taenia solium*. *Int J Parasitol* 30: 1007-1012.

Kanetsuna F, Carbonell LM, Azuma I, Yamamura Y 1972. Biochemical studies on the thermal dimorphism of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Bacteriol* 110: 208.

Karhawi ASK, Colombo AL, Salomão R 2000. Production of IFN- γ is impaired in patients with paracoccidioidomycosis during active disease and is restored after clinical remission. *Medic Mycol* 38: 225-229.

Kashino SS, Fazioli RA, Moscardi-Bacchi M, Franco M, Singer-Vermes LM, Burger E, Calich VLG 1995. Effect of macrophage blockade on the resistance of inbred mice to *Paracoccidioides brasiliensis* infection. *Mycopathologia* 130: 131-140.

Knowles JR 1991. Enzyme catalysis: not different, just better. *Nature* 350: 121- 124.

Kohlhoff M, Dahm A, Hense, R 1996. Tetrameric triosephosphate isomerase from

hyperthermophilic Archea. *FEBS Lett* 383: 245-250.

Kurita N, Oarada M, Ito E, Miyaji M 1999. Antifungal activity of human polymorphonuclear leucocytes against yeast cells of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Medic Mycol* 37: 261-267.

Kurokawa CS, Sugizaki MF, Peraçoli MTS 1998. Virulence factors in fungi of systemic mycosis. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 40: 125-135.

Kursula I, Partanen S, Lambeir AM, Wierenga RK 2002. The importance of the conserved Arg-191-Asp227 salt bridge of triosephosphate isomerase for folding, stability, and catalysis. *FEBS Lett*. 518: 39-42.

Lacaz CS; Porto E; Martins JEC 1991. Paracoccidioidomycose, p.248-292. Micologia Médica. São Paulo.

Lacaz CS 1994. *Paracoccidioides brasiliensis*: morphology, evolutionary cycle, maintenance during saprophytic life, biology, virulence, taxonomy, p. 13-22. In M Franco, CS Lacaz, A Restrepo-Moreno, G Del Negro, *Paracoccidioidomycosis*. CRC Press, Flórida.

Leclerc MC, Phillipe H, Guého E 1994. Phylogeny of dermatophytes and dimorphic fungi based on large subunit ribosomal RNA sequence comparisons. *J Med Vet Mycol* 32: 331-341.

Lolis E , Alber T , Davenport RC, Rose D, Hartman FC, Petsko GA 1990. Structure of yeast triosephosphate isomerase at 1.9-Å resolution. *Biochemistry* 29: 6609- 6618.

Londero AT, Melo IS 1983. Paracoccidioidomycosis in childhood. A critical review. *Mycopathologia* 82:49-55.

Londero AT 1986. Paracoccidioidomycose. Patogenia, formas clínicas, manifestações pulmonares e diagnóstico. *J Pneumol* 12: 41-57.

Lutz A 1908. Uma mycose pseudo-coccidica localizada na boca e observada no Brasil:

“Contribuição ao conhecimento das hiphoblastomycoses americanas”. *Brás Méd* 22: 121-124.

Manguiaterra ML, Giusiano GE, Alonso JM, Gorodner JO 1999. *Paracoccidioides brasiliensis* infection in a subtropical region with important environmental changes. *Bull Soc Pathol Exot* 92: 173-176.

Mcewen JG, Ortiz BL, Garcia AM, Florez AM, Botero S, Restrepo A 1996. Molecular cloning, nucleotide sequencing, and characterization of a 27-kDa antigenic protein from *Paracoccidioides brasiliensis*. *Fung Gen Biol* 20: 125-131.

Mcgowan KL, Buckley HR 1985. Preparation and Use of Cytoplasmic Antigens for the Serodiagnosis of *Paracoccidioidomycosis*. *J Clin Microbiol* 22: 39-43.

Mendes-Giannini MJS, Camargo ME, Lacaz CA, Ferreira AW 1984. Immunoenzymatic absorption test for serodiagnosis of *paracoccidioidomycosis*. *J Clin Microbiol* 20: 103-108.

Meyerhof O, Beck LV 1944. Triosephosphate isomerase. *J Biol Chem* 156: 109-120.

Miao YX, Liu SX, McManus DP 1998. Isolation of native, biochemically purified triosephosphate isomerase from a Chinese strain of *Schistosoma japonicum* and its protective efficacy in mice. *Parasitol Int* 47: 195-199.

Moscardi-Bacchi M, Franco M 1985. Experimental *paracoccidioidomycosis* in the mouse III. Histopathological and immunological findings after intravenous infection in the presence or absence of previous immunization. *Rev Soc Bras Med Trop* 18: 101-108.

Munk ME, Kajdacsy-Balla A, Del Negro G, Cuce LC, Silva WD 1992. Activation of human complement system in *paracoccidioidomycosis*. *J Med Vet Mycol* 30: 317-321.

Musatti CC, Peraçoli MTS, Soares AMVC, Rezkallah-Iwasso MT 1994. Cell-Mediated Immunity In Patients With *Paracoccidioidomycosis*, p. 175-186. In M Franco, CS Lacaz, A

Restrepo-Moreno, G Del Negro, Paracoccidioidomycosis. CRC Press, Flórida.

Oliveira SL, Silva MF, Soares AM, Silva CL 1993. Cell wall fractions from *Paracoccidioides brasiliensis* induce hypergamaglobulinemia. *Mycopathologia* 121: 1-5.

Ortiz BL, Garcia AM, Restrepo A, Mcewen JG 1996. Immunological characterization of a recombinant 27-kilodalton antigenic protein from *Paracoccidioides brasiliensis*. *Clin Diag Lab Immunol* 2: 239-241.

Ortiz BL, Díez S, Urán ME, Rivas JM, Romero M, Caicedo V, Restrepo A, Mcewen JG 1998. Use of the 27-kilodalton recombinant protein from *Paracoccidioides brasiliensis* in serodiagnosis of Paracoccidioidomycosis. *Clin Diag Lab Immunol* 6: 826-830.

Paniago AM, Aguiar JI, Aguiar ES, da Cunha RV, Pereira GR, Londero AT, Wanke B 2003. Paracoccidioidomicose: estudo clínico e epidemiológico de 422 casos observados no estado do Mato Grosso do Sul. *Rev Soc bras Med trop* 36: 455-459.

Panunto-Castelo A, Freitas-da-Silva G, Bragheto IC, Martinez R, Roque-Barreira MC 2003. *Paracoccidioides brasiliensis* exoantigens: recognition by IgG from patients with different clinical forms of paracoccidioidomycosis. *Microbes infect* 5: 1205-1211.

Pereira AJCS, Barbosa W 1988. Inquérito intradérmico para paracoccidioidomicose em Goiânia. *Rev Pat Trop* 17: 157-86.

Pinto AR, Puccia R, Diniz SN, Franco MF, Travassos LR 2000. DNA-based vaccination against murine paracoccidioidomycosis using the gp43 gene from *Paracoccidioides brasiliensis*. *Vaccine* 18: 3050-3058.

Puccia R, Schenkman S, Gorin PAJ, Travassos LR 1986. Exocellular components of *Paracoccidioides brasiliensis*: Identification of a specific antigen. *Infect Immun* 53: 199-206.

Reis VLL, Rolla VC, Rangel CA, Sampaio MBNO, Tavares W, Praxedes H, Rocha WB

1986. Paracoccidioidomycose disseminada aguda com extenso derrame pleural. *Arq Bras Med* 60: 275-80.

Restrepo A, Salazar ME, Cano LE, Stover EP, Fredman D, Stevens DA 1984. Estrogens inhibit mycelium-to-yeast transformation in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*: implications for resistance of females to paracoccidioidomycosis. *Infect Immun* 46: 346-353.

Restrepo A, Cano LE, Ochoa MT 1984. A yeast derived antigen from *Paracoccidioides brasiliensis* useful for serologic testing. *J Med Vet Mycol* 22: 23-29.

Restrepo A, Cano LE, Tabares AM 1983. A comparison of mycelial filtrate and yeast lysate paracoccidioidin in patients with paracoccidioidomycosis. *Mycopathologia* 84: 49-54.

Restrepo F, Restrepo M, Restrepo A 1983. Blood groups and HLA antigens in paracoccidioidomycosis. *Sabouraudia* 21: 35-39.

Restrepo A, Trujillo M, Gomez I 1989. Inapparent lung involvement in patients with the subacute juvenile type of paracoccidioidomycosis. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 31: 18-22.

Restrepo A, Mcewen JG, Castañeda E 2001. The habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*: how far from solving the riddle?. *Med Mycol* 39: 233-241.

Restrepo-Moreno A 1994. Ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*, p. 121-130. In M Franco, CS Lacaz, A Restrepo-Moreno, G Del Negro, *Paracoccidioidomycosis*. CRC Press, Flórida.

Rivitti EA, Aoki V 1999. Deep Fungal Infections in Tropical Countries. *Clin Dermatol* 17: 171-190.

Salem-Izaac SM, Gomez J, Jesuino RSA, Fonseca CA, Pereira M, Felipe MSS, Deepe GSJ, Soares CMA 2001. Molecular Cloning, Characterization and Expression of a Gene Encoding the Heat Shock Protein 60 from *Paracoccidioides brasiliensis*. *Med Mycol* 39: 445-455.

San-Blas G, San-Blas F 1989. Antigenic structure of *Paracoccidioides brasiliensis*, p. 171-192. In E. Kurstak (ed.), Immunology of fungal diseases. Marcel Dekker Inc., New York.

San-Blas G 1993. Paracoccidioidomycosis and its etiologic agent: *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Med Vet Mycol* 31: 99–113.

San-Blas G, Nino-Vega G, Iturriaga T 2002. *Paracoccidioides brasiliensis* and paracoccidioidomycosis: Molecular approaches to morphogenesis, diagnosis, epidemiology, taxonomy and genetics. *Med Mycol* 40: 225-242.

Sano A, Nishimura K, Miyaji M 1999. The research encouragement award. Effects of sex hormones on sexual difference of experimental paracoccidioidomycosis. *Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi* 40: 1-8.

Schliebs W, Thanki N, Eritja R, Wierenga R 1996. Active site properties of monomeric triosephosphate isomerase (monoTIM) as deduced from mutational and structural studies, *Protein Scienc* 5: 229-239.

Singer-Vermes LM, Burger E, Russo M, Vaz CAC, Calich VLG 1993. Advances in experimental Paracoccidioidomycosis using an isogenic murine model. *Arch Med Res* 24: 239-245.

Splendore A 1912. Un'affezione micotica com localizzazione nella mucosa della bocca, osservata in Brasile, determinata da funghi appartenenti alla tribu degli Exoascei (*Zymonema brasiliensis*, n. sp.), In: Volume in onore del Prof. Angelo Celli nel 25° anno di insegnamento, Roma.

Swinkels BW, Gibson WC, Osinga KA, Kramer R, Veeneman GH, Van Boom HJ, Borst P 1986. Characterization of the gene for the microbody (glycosomal) triosephosphate isomerase of *Trypanosoma brucei*. *EMBO J* 5: 1291-1298.

Téllez-Valencia A, Ávila-Ríos S, Pérez-Montfort R, Rodríguez-Romero A, Gómez-Puyou MT, López-Calahorra F, Gómez-Puyou A 2002. Highly specific inactivation of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma cruzi*. *Biochem Bioph Res Co* 295: 958–963.

Zysk G, Bongaerts RJM, Thoren E, Bethe G, Hakenbeck R, Heinz HP 2000. Detection of 23 Immunogenic Pneumococcal Proteins Using Convalescent-Phase Serum. *Infection and Immunity* 68: 3740–3743.

Yarzabal L, Bout D, Naquira F, Fruit J, Andrieu S 1977. Identification and purification of the specific antigen of *Paracoccidioides brasiliensis* responsible for immunoelectrophoretic band E. *Sabouraudia* 15: 79-85.

Yarzabal L 1982. Composicion antigenica de *Paracoccidioides brasiliensis*, p. 59-67. In G Del Negro, CS Lacaz, AM Fiorillo (ed.), *Paracoccidioidomycose. Blastomycose sul-americana*. Sarvier-EDUSP, Brazil.

Yarzabal L, Andrieu S, Bout D, Naquira F 1976. Isolation of a specific antigen with alkaline phosphatase activity from soluble extracts of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Sabouraudia* 14: 275-280.

Yarzabal L, Biguet J, Vaucelle T, Andrieu S, Torres JM, Da Luz S 1973. Analisis immunoquimico de extractos solubles de *Paracoccidioides brasiliensis*. *Sabouraudia* 11: 80-88.

Walden H, Taylor G, Lilie H, Knura T, Hensel R 2004. Triosephosphate isomerase of the hyperthermophile *Thermoproteus tenax*: thermostability is not everything. *Biochem Soc Trans* 32: 305.

Walmsley MIB, Walmsley AR 2000. cAMP signalling in pathogenic fungi: control of dimorphic switching and pathogenicity. *Trends Microbiol* 8: 133-141.

Wanke B, Londero AT 1994. Epidemiology and paracoccidioidomycosis infection, p. 109–

130. In M Franco, CS Lacaz, A Restrepo-Moreno, G Del Negro, *Paracoccidioidomycosis*. CRC Press, Flórida.

VIII- ANEXOS

Anexo I. – Sequência do cDNA de *PbTPI* depositada no NCBI sob o número de acesso AY250089.

LOCUS AY250089 1080 bp mRNA linear PLN 13-JAN-2004
DEFINITION Paracoccidioides brasiliensis triose phosphate isomerase mRNA, complete cds.
ACCESSION AY250089
VERSION AY250089.2 GI:40805817
ORGANISM Paracoccidioides brasiliensis
Eukaryota; Fungi; Ascomycota; Pezizomycotina; Eurotiomycetes; Onygenales; mitosporic Onygenales; Paracoccidioides.
REFERENCE 1 (bases 1 to 1080)
AUTHORS Pereira, L.A., Pereira, M., Jesuino, R.S.A., Bastos, E.G.P., Felipe, M.S.S. and Soares, C.M.A.

```
1 gtctcctaaa ccttcacgaa ccatttaatt actatatatc ctagaaattc ttatcattta
61 ttcccgtaaa ataaaggata ataaaattct ccagccacca tgcctcgtaa attctttggt
121 ggcggcaact tcaagatgaa tggcaccgct aaatctatca cccatatcat caccaacctc
181 aactctgcca agcttgatcc ttccactgaa attgtcatcg cccgcctgc aatctacctg
241 gtgcttgacac gacaacttgc gaacggccaa gtcgccgttt ctgcacagaa tgtgtttgat
301 aagcctaata gagcctttac tggggagtgt agcgtggaac agctcagaga tgaaaaaatc
361 acttggaagt tggctggaca tagcgaacga agagttttac tcagagaaga tgatgagttt
421 gtagcacgga aaacaaaggc tgccattaac ggtggtctca atgtaattct ttgcattggc
481 gagtctcttg aggaacgcga agctggaaag actatcgatg ttgtaacaag gcaattggac
541 gccgttgccg aggaagtctc tcctgcagaa tgggaataagg tcgtcatcgc ctatgagccc
601 atctgggcca tcggaacggg caaggtcgcc acaacagagc aagcacaga agtgcagccc
661 tccatccgga aatggctgaa tgagaaaatc tcccctgaag cggccgaaaa caccgcggtt
721 atttacggcg gaagcggtac ggagagcaac tgtcgggatc tcgccgcgca gcctgatggt
781 gacgggtttt tgggtggcgg agctagttaa aaacctgctt ttgtcgatat catcaacgcc
841 cgtttataga cggttttggt agttagtctt tagttacgac ataaaatccc ttacggcaga
901 atgacgtttt cctagtccct cagtttcttt tccgctaaca ctgccataaa agctgatatt
961 gggttatgcg ggtattggaa acctggagac ctgacatgga aatggcctga ctttcttggt
1021 ttgcaattga aaaatataaa ataattaata aactgttcg tcagtgcagt atttatatct
```

Anexo II. – Sequência do gene *Pbtpi* depositado no NCBI sob o número de acesso AY037936.

LOCUS AY037936 1680 bp DNA linear PLN 27-FEB-2004
 DEFINITION Paracoccidioides brasiliensis triosephosphate isomerase gene, complete cds.
 ACCESSION AY037936
 VERSION AY037936.3 GI:44662778
 ORGANISM Paracoccidioides brasiliensis
 Eukaryota; Fungi; Ascomycota; Pezizomycotina; Eurotiomycetes; Onygenales; mitosporic Onygenales; Paracoccidioides.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 1680)
 AUTHORS Pereira,L.A., Pereira,M., Felipe,M.S.S. and Soares,C.M.A.

```

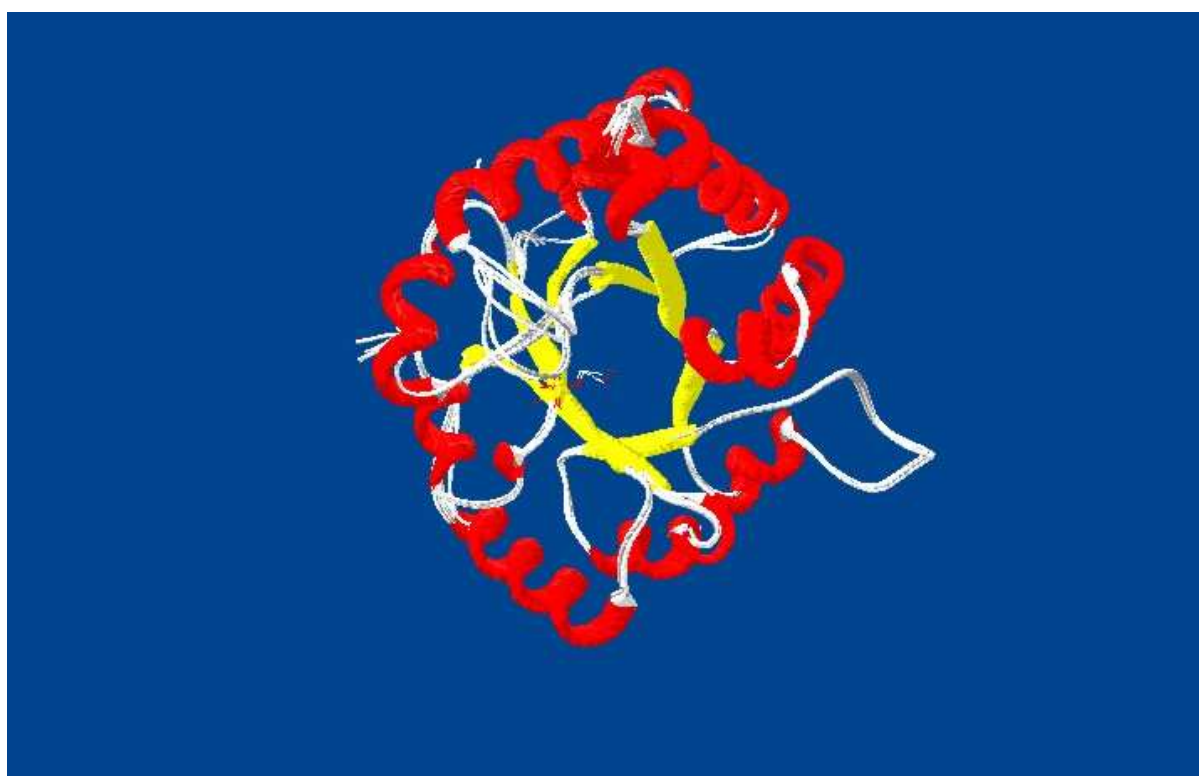
1 gtctcctaaa ccttcacgaa ccatttaatt actatatatc ctagaaattc ttatcattta
61 ttcccgtaaa ataaaggata ataaaattct ccagccacca tgcctcgtaa attctttggt
121 ggcggcaact tcaagatgta tgtgtgttct gttcctgaat caaaacgtca aattcgtctc
181 taccacaccc caaaatcttc ctataacaac cggaatactg ataaatcact tccactactc
241 aattccattc caccacaggaa tggcaccgct aaatctatca cccatatcat caccaacctc
301 aactctgcca agcttgatcc ttccactgaa attgtcatcg cccgcctgc aatctacctg
361 gtgcttgcac gacaacttgc gaacggccaa gtcgccgttt ctgcacagaa tgtgtttgat
421 aagcctaata gagcctttac tggggagtgt agcgtggaac agctcagaga tgaaaaaatc
481 acttggacgt tggctggaca tagcgaacga agagtgttac tcagagaaga tgatgaggta
541 tgttggattt cttatagtga tgtgtggttg gtgcaagatt ttgttttccc ttaaactata
601 tattatcatt ttatgccgga atcgggtcca ttttaagtta gtcccgttat tttccaattc
661 cccaacgtgc gtgtattgag attcgtgata tcttcctcaa ctttaactaa tattgtcata
721 ccggaatatt tagttttagt cacggaaaac aaaggctgcc attaacggtg gtctcaatgt
781 aattccttgc attggcgagt ctcttgaggt aaactaccca ccatctcgat attaaaccct
841 tttatgcgag ttgaaatatc gaaaacgaag gcaaaacaaa agattctcag gggaacgtgt
901 ttcggttgaa gcgagagctg acgacacggt ctccatataat aggaacgcga agctggaaag
961 actatcgatg ttgtaacaag gcaattggac gccgttgccg aggaagtctc tcctgcagaa
1021 tgggaataagg tcgtcatcgc ctatgagccc atctggtaat actgcttcta cgtttcattg
1081 tctttcaaag aacgaaccta caatcctaac aaccactcca cctccccagg gccatcggaa
1141 cgggcaaggc cgccacaaca gagcaagcac aagaagtgca tgcctccatc cggaatggc
1201 tgaatgagaa aatctcccct gaagcggccg aaaacacccg cgttatttac ggcggaagcg
1261 ttacggagag caactgtcgg gatctcgccg cgcagcctga tgttgacggg tttttggtgg
1321 gcggagctag tttaaaacct gctgtatggt ttcacagaat attgtcatga taggaatacc
1381 ccatacctgca aacggataaa ttactaactc aagtcgcagt ttgtcgatat catcaacgcc
1441 cgtttataga cggttttggt agttagttct tagttacgac ataaaatccc ttacggcaga
1501 atgacgtttt cctagtccct cagtttcttt tccgctaaca ctgccataaa agctgatatt
1561 gggttatgca ggtattggaa acctggagac ctgacatgga aatggcctga ctttcttgtt
1621 ttgcaattga aaaatataaa ataattaata acactgttcg tcagtgcagt atttataatc

```

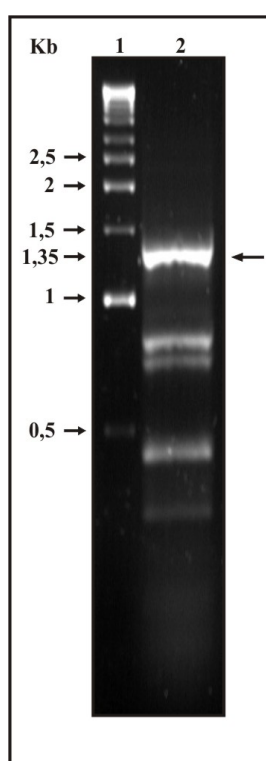
Anexo III. – Alinhamento das seqüências de aminoácidos referentes a TPI de fungos e tabela com os valores de identidade encontrados. O alinhamento foi realizado pelo software ClustalX (1.81). As regiões sombreadas correspondem aos peptídeos da região carboxi e amino terminal alinhados para construção dos oligonucleotídeos S1 e At2. Estes resultados são parte integrante do painel *Identification, Structural Analysis and Heterologous Expression of a cDNA Encoding the Triose Phosphate Isomerase (TPI) Of Paracoccidioides brasiliensis*, apresentado no XXII CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, realizado de 17 a 20 de Novembro de 2003 no Centro de Convenções Centrosul - Florianópolis – SC.

Aspergillus oryzae gi9955876; *Emericella nidulans* gi217921; *Neurospora crassa* gi28920460; *Saccharomyces cerevisiae* gi173007; *Candida albicans* gi6841083.

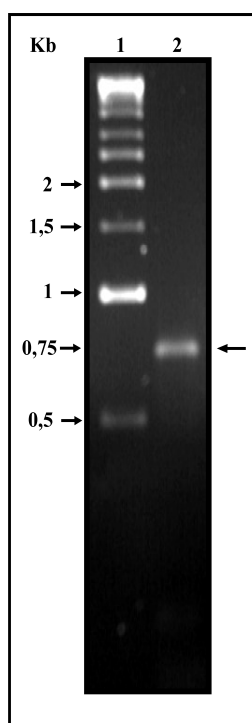
Anexo IV. – Imagem da estrutura terciária predita do monômero de *PbTPI*. A estrutura apresenta 8 regiões de cadeias β (amarelo) e 8 regiões de α hélice (vermelho), constituindo um barril ($\beta\alpha$)₈. A imagem foi gerada por modelagem protéica automática, baseada na comparação com proteínas ortólogas já caracterizadas, no site SWISS-MODEL (<http://www.expasy.org/swissmod/SWISS-MODEL.html>). Estes resultados são parte integrante do painel *Identification, Structural Analysis and Heterologous Expression of a cDNA Encoding the Triose Phosphate Isomerase (TPI) Of Paracoccidioides brasiliensis*, apresentado no XXII CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, realizado de 17 a 20 de Novembro de 2003 no Centro de Convenções Centrosul - Florianópolis – SC.



Anexo V. – Gel de agarose 0,8% mostrando o produto de PCR de 1350 pb obtido a partir do DNA genômico de *P. brasiliensis* utilizando os primers I1 e Ate. Estes resultados são parte integrante do painel *Identification, Structural Analysis and Heterologous Expression of a cDNA Encoding the Triose Phosphate Isomerase (TPI) Of Paracoccidioides brasiliensis*, apresentado no XXII CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, realizado de 17 a 20 de Novembro de 2003 no Centro de Convenções Centrosul - Florianópolis – SC.



Anexo VI. – Gel de agarose 0,8% mostrando o produto de PCR de 750 pb obtido a partir de DNA plasmidial , utilizando os primers 5'sense e 3'anti-sense construídos para clonagem da ORF de *Pbtpi* no vetor de expressão pGEX-4T-3[®]. Estes resultados são parte integrante do painel *Identification, Structural Analysis and Heterologous Expression of a cDNA Encoding the Triose Phosphate Isomerase (TPI) Of Paracoccidioides brasiliensis*, apresentado no XXII CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, realizado de 17 a 20 de Novembro de 2003 no Centro de Convenções Centrosul - Florianópolis – SC.



Anexo VII. – Correspondência da revista *Microbes and Infection*.

--

Dr Célia Maria de Almeida Soares
Laboratório de Biologia Molecular

----- Mensagem Original -----

De: Camille.Locht@pasteur-lille.fr
Para: celia@icb.ufg.br <celia@icb.ufg.br>
Assunto: Institut Pasteur [mic040515] - Decision concerning your submission
Data: 05/05/04 14:13

>
>
> Dear Celia Soares,
>
> Your manuscript mic040515 "Proteomic Identification, Nucleotide Sequence, Heterologous Expression and Immunological Reactivity of the Triosephosphate Isomerase of *Paracoccidioides brasiliensis*" has been carefully examined by the reviewers.
> We are pleased to inform you that it is now considered acceptable for publication in the journal *Microbes and Infection*.
>
> Thank you for submitting your paper to *Microbes and Infection*.
>
> Sincerely,
>
> Camille Locht
> COMMENTS FROM REFEREE #1:
>
> MATERIALS AND METHODS
> Pag 3, last line:
> 2.8. TPI inferred phylogeny and introns positions analysis
>
> In relation to pag. 4, first paragraph, various lines: in order to clarify concepts information is needed concerning these points:
>
> 1.- Could the authors indicate which techniques or methods were used to undertake the phylogenetic analysis?
>
> 2.- Which optimization criteria was used to construct the various trees (Maximum Parsimony, Maximum Likelihood, Bayesian analysis, Distance, others)?
>
> 3.- If the trees were constructed following the options given in ClustalX, then the criteria used should have been Neighbor Joining (Thompson, Gibson et al. 1997). However if they authors used a different program such as PAUP* or TCS, the criteria utilized should be specified.
>
>
> RESULTS
>
> Page 6. Second paragraph. Fourth Line. A bootstrap phylogenetic tree was

constructed...
> 1.- Bootstrap is a support measure that by means of permutations determines how high the branches can go and as such by itself it is not a phylogenetic tree.
>
> Page 6. Second paragraph. Fourth Line. ...by using the algorithm described by Thomson et al...
> 2.- ClustalX is an alignment program not an algorithm one could use to tree construction. Once more if the criteria used to build up the trees was the one given in ClustalX, then the criteria used should have been Neighbor Joining (Thompson, Gibson et al. 1997).
>
> Page 6. Second paragraph, Line 7...The strong evolutionary relationship of the Fungi TPIs was confirmed.
> 3.- It is inappropriate to affirm that trees constructed on the basis of a single gene, TPI in this case, represent a true phylogenetic arrangement.
The data obtained represents the evolutionary traits for this particular gene not for the whole microorganism (Hillis 1997)
>
> 4.- In order to be sure that a strong evolution relationship has been confirmed between those genes codifying for TPI in fungi, a larger sample of test organisms beside those representing the Ascomycota and Basidiomycota should be included. Additionally, it would be advisable to test a larger number of the above representatives.
>
> Page 6. Second paragraph. 12th Line Figure 3B presents introns position correlated to the amino acids sequences of the TPI proteins...
>
> 5.- If introns were to be given a stronger position as defining characters, a topology should be constructed with the pertaining data and determine how much coincidence can be derived from the genealogy resulting from the TPI analysis. Ideally, a phylogeny should be constructed with a wider variety of genes
>
> As for Figure 3A, pag 10 .. Phylogeny pf the Pb TPI and structure...
>
> 1.- It is not clear if the tree is rooted or not. If it were rooted, which external group was utilized for this purpose? The recognized brother group in the Kingdom Fungi are the animals (Wainright, Hinkle et al. 1993; (Scamardella 1999).), Considering that among the groups included in the tree the one most distantly located from the Fungi would be not the Protista but Plasmodium falciparum, it is recommended to root the tree to the latter microorganism. If the tree has no proper roots its representation is confusing as it tends to show that the divergences between animals and Fungi

are more primitive than those between the Fungi and Plants. Finally, the tree has no roots it becomes only a connective net (Holder and Lewis 2003). Specification of the optimaxing criteria should be defined.

>
>
> DISCUSSION
> Page 7. Third paragraph. Fourth line. ...sequences of TGPIs have been previously reported...

>
> 1.- Although the TPI gene encompasses the Fungi in a single group, cannot accept its determination as fully validating the phylogenetic relationships, unless the polarity of the tree is validated. Generally, the genes range of taxonomic validity considering phylogeny is limited. The analysis of this gene as presented in this manuscript does not allow to obtain novel conclusions nor do they resolve a problem.

>
>
> REFERENCES
>
>
> • Hillis, D. M. (1997). "Phylogenetic analysis." Curr Biol 7(3): R129-31.
> • Holder, M. and P. O. Lewis (2003). "Phylogeny estimation: traditional and Bayesian approaches." Nat Rev Genet 4(4): 275-84
> • Scamardella, J. M. (1999). "Not plants or animals: a brief history of the origin of Kingdoms Protozoa, Protista and Protocista." In Microbiol 2(4): 207-16.
> • Thompson, J. D., T. J. Gibson, et al. (1997). "The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools." Nucleic Acids Res. 24: 4876-4882.
> • Wainright, P. O., G. Hinkle, et al. (1993). "Monophyletic origins of the metazoa: an evolutionary link with fungi." Science 260(5134): 340-2.

>
>
>
>
> COMMENTS FROM REFEREE #3:
>
> The paper contains useful data that is certainly publishable after attention to the English.

>
>
>