



UFG

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

LUIZ AUGUSTO PEREIRA

**Caracterização funcional da proteína Triose fosfato
isomerase de *Paracoccidioides brasiliensis* como
potencial adesina**

**Goiânia
2008**

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? <input checked="" type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	
Vínculo empregatício do autor	Aluno de Pós-Graduação
Agência de fomento:	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior Sigla: CAPES
País: BRASIL	UF: GO CNPJ:
Título:	Caracterização funcional da proteína Triose fosfato isomerase de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> como potencial adesina
Palavras-chave:	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i> ; Triose fosfato isomerase; Adesina
Título em outra língua:	Functional characterization of the <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> triosephosphate isomerase protein for potential adhesion function
Palavras-chave em outra língua:	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i> ; Triose phosphate isomerase; Adhesin
Área de concentração:	MICROBIOLOGIA
Data defesa: (dd/mm/aaaa)	04/09/2008
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

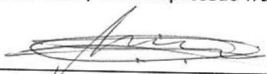
*Necessita do CPF quando não constar no SisPG

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

**Caracterização funcional da proteína Triose fosfato
isomerase de *Paracoccidioides brasiliensis* como potencial
adesina**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás para obtenção do Título de Doutor em Medicina Tropical e Saúde Pública.

Orientadora:

Prof^a Dr^a Célia Maria de Almeida Soares

**Goiânia
2008**

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

P436c Pereira, Luiz Augusto.
Caracterização funcional da proteína Triose fosfato isomerase de *Paracoccidioides brasiliensis* como potencial adesina [manuscrito] / Luiz Augusto Pereira. - 2008.
79 f. : figs.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Célia Maria de Almeida Soares
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Goiás,
Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, 2008.
Bibliografia.
Inclui lista de abreviaturas e siglas.

1. Triose fosfato isomerase 3. *Paracoccidioides brasiliensis* 3. Proteína – Análise I. Título.

CDU: 547.455.3:543.645.6

BANCA EXAMINADORA DA TESE DE DOUTORADO

Aluno: LUIZ AUGUSTO PEREIRA

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

Membros:

1. Prf. Dr. Cirano José Ulhoa, ICB - UFG
2. Prf. Dr. Ivan Torres Nicolau Campos, ICB - UFG
3. Prf^a. Dr^a. Silvia Maria Salem Izaac, ICB – UFG
4. Prf^a. Dr^a. Maria José Soares Mendes Giannini, FCF - UNESP
5. Prf^a. Dr^a. Célia Maria de Almeida Soares, ICB – UFG (Orientadora)
6. Prf. Dr. Luiz Artur Mendes Bataus, ICB – UFG (Suplente)
7. Prf^a. Dr^a. Divina das Dores de Paula Cardoso, IPTESP – UFG (Suplente)
8. Prf^a. Dr^a. Maristela Pereira, ICB – UFG (Suplente)
9. Prf^a. Dr^a. Maria do Rosário Rodrigues Silva, IPTESP – UFG (Suplente)
10. Prof^a. Dr^a. Lúcia Kioko Hasimoto e Souza, IPTESP – UFG (Suplente)

Data: 04/09/2008

*"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

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 prestatividade, que foram singulares na realização deste trabalho;

Aos Professores do Laboratório de Biologia Molecular da UFG, pelo apoio e colaboração constantes;

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

A todos os colegas doutorandos do Laboratório de Biologia Molecular, que com suas valiosas recomendações técnicas me auxiliaram na realização deste trabalho;

A todos os colegas mestrandos do Laboratório de Biologia Molecular, que compartilharam e vivenciaram todas as alegrias e frustrações durante o curso;

Aos colegas da Iniciação Científica, que sempre foram prestativos, me auxiliando em várias ocasiões, principalmente à Mariana;

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 amiga Mônica Santiago, em especial, pelo carinho e companheirismo sempre presentes comigo;

Aos amigos Wesley, Alexandre e Rogério, pela parceria e alegria em todos os momentos;

À Erica, que em certos momentos críticos me apoiou e soube me compreender;

As 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
ABREVIATURAS E SIGLAS.....	viii
RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	x
I- INTRODUÇÃO.....	11
I.1 – <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	11
I.1.1– Aspectos Gerais.....	11
I.1.2– Dimorfismo de <i>P. brasiliensis</i>	13
I.1.3– Paracoccidioidomicose.....	15
I.2– Matriz Extracelular.....	17
I.3– Moléculas Envolvidas no Processo de Adesão de Fungos Patogênicos	19
I.4– Adesinas de <i>P. brasiliensis</i>	22
I.5– Triose Fosfato Isomerase (TPI).....	24
I.5.1– Características da TPI.....	25
I.5.2– TPI como antígeno.....	26
I.5.3– Triose Fosfato Isomerase de <i>P. brasiliensis</i>	28
I.6– Frutose Bifosfato Aldolase (FBA).....	29
I.6.1– Características da Frutose 1,6-Bifosfato Aldolase.....	29
I.6.2– Frutose Bifosfato Aldolase de <i>P. brasiliensis</i>	30
II- JUSTIFICATIVAS.....	32
III- OBJETIVOS.....	34
IV- ARTIGO PUBLICADO.....	37
V- RESULTADOS COMPLEMENTARES.....	46
V.1– Expressão e purificação da PbFBA1 recombinante.....	47
Figura 1- Eletroforese em gel de poliacrilamida da PbFBA1 recombinante expressa em <i>E. coli</i>	48
V.2– Análise de especificidade do anticorpo policlonal anti-PbFBA1.....	49
Figura 2 – Western blotting com anticorpo policlonal anti-PbFBA1.....	51
V.3– Reatividade imunológica da PbFBA1 recombinante.....	52
Figura 3 – Immunoblotting da PbFBA1 recombinante com soro de pacientes.....	53

V.4– Localização celular da FBA de <i>P. brasiliensis</i>	54
Figura 4- Imuno-citocalização da FBA em célula leveduriforme de <i>P. brasiliensis</i>	56
V.5– Cristalização da proteína PbTPI recombinante	57
Figura 5- Cristais de PbTPI recombinante	58
VI- CONCLUSÕES	59
VII- PERSPECTIVAS	63
VIII- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64
IX- ANEXOS	75
Anexo I- Sequência de nucleotídeos do cDNA, do gene e de aminoácidos deduzida da TPI de <i>P. brasiliensis</i>	75
Anexo II- Correspondência da revista FEMS Yeast Research	76

ABREVIATURAS E SIGLAS

EC	Enzyme Commission
A	Absorbância
cDNA	DNA complementar
PCR	Reação em cadeia da Polimerase
gp	Glicoproteína
GST	Glutathiona S-transferase
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo
Kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
mM	Milimolar
ng	Nanograma
°C	Grau centígrado
ORF	“Open Reading Frame” – Quadro de leitura aberta
pb	pares de bases
PBS	Phosphate Buffer Solution - Tampão Fosfato Salino
Pb	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
pH	Potencial hidrogeniônico
pI	Ponto isoelétrico
BCIP	5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato
NBT	Azul de nitrotetrazólio
PCM	Paracoccidioidomicose
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
TPI	Triosefosfato isomerase
FBA	Frutose-1,6-bifosfato aldolase
ATCC	American Type Culture Collection
GAPDH	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
EDTA	Ácido Etileno Diamino Tetra Acético

RESUMO

Paracoccidioides brasiliensis é um importante patógeno humano que causa a paracoccidioidomicose (PCM), uma micose sistêmica com ampla distribuição na América Latina. A adesão e a invasão de células são eventos essenciais envolvidos na infecção e disseminação do patógeno. Para isso, patógenos utilizam suas moléculas de superfície para se ligar a componentes da matriz extracelular e estabelecer a infecção. Uma proteína antigênica de *P. brasiliensis* foi isolada a partir do gel de eletroforese bidimensional de proteínas totais do fungo e caracterizada. Peptídeos obtidos por sequenciamento parcial da proteína de 29 kDa e pI 5.8 mostraram homologia com triose fosfato isomerase (TPI) de diversos organismos. O cDNA e o gene completos que codificam para TPI de *P. brasiliensis* (PbTPI) foram caracterizados, e ambos contém uma ORF que codifica para uma proteína com 249 aminoácidos que apresenta todos os peptídeos caracterizados na PbTPI nativa. O cDNA completo que codifica para PbTPI foi expresso em *Escherichia coli*. A proteína recombinante TPI foi utilizada para produção de anticorpo policlonal em coelho. Através de imunomicroscopia de transmissão eletrônica e análises por Western blotting, foi detectada a presença da TPI, na parede celular de leveduras de *P. brasiliensis* e no citoplasma. A expressão da PbTPI foi analisada na transição das fases de micélio para levedura. A PbTPI nativa está preferencialmente expressa na fase parasitária de *P. brasiliensis*. A PbTPI recombinante foi capaz de se ligar a laminina e fibronectina em ensaios de Western blotting de afinidade. PbTPI se liga preferencialmente a laminina, como foi determinado por ensaio de inibição com peptídeos sintéticos. Uma observação importante, é que tanto o tratamento de *P. brasiliensis* com anticorpo anti-PbTPI, quanto de pneumócitos e células VERO tratados com a TPI recombinante, promoveram considerável inibição da aderência e internalização de *P. brasiliensis* às células cultivadas *in vitro*. Essas observações indicam que a TPI possivelmente contribui para a adesão do microrganismo aos tecidos do hospedeiro e para a disseminação da infecção.

Palavras chave: *Paracoccidioides brasiliensis*; Triose fosfato isomerase; Adesina

ABSTRACT

Paracoccidioides brasiliensis, an important human pathogen causative of paracoccidioidomycosis (PCM), a systemic mycosis with broad distribution in Latin America. Adhesion to and invasion of host cells are essential steps involved in the infection and dissemination of pathogens. Furthermore, pathogens use their surface molecules to bind to host extracellular matrix components to establish infection. An adhesin of *P. brasiliensis* was isolated from two dimensional electrophoresis and characterized. Peptides obtained by partial sequencing of the isolated protein, which presented a molecular mass of 29 kDa and pI 5.8, were subjected to sequence analysis of their amino acids, that revealed strong homology to triose phosphate isomerase (TPI) from several sources. The complete cDNA and gene encoding TPI of *P. brasiliensis* (PbTPI) were characterized 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 complete coding PbTPI cDNA was cloned and over expressed in *Escherichia coli* host. The purified recombinant TPI was used to produce polyclonal antibody in rabbit. By immunoelectron microscopy and Western blot analysis, TPI was detected in the cell wall and the cytoplasm of the yeast phase of *P. brasiliensis*. The expression of PbTPI was analyzed in transition from mycelia to yeast phase. The native PbTPI is preferentially expressed in the yeast parasitic phase of *P. brasiliensis*. The recombinant PbTPI was found to bind to laminin and fibronectin in ligand far-Western blot assays. TPI binds preferentially to laminin, as determined by peptide inhibition assays. Of special note, the treatment of *P. brasiliensis* yeast cells with anti-PbTPI polyclonal antibody and the incubation of pneumocytes and VERO cells with the recombinant protein promoted inhibition of adherence and internalization of *P. brasiliensis* to those *in vitro* cultured cells. These observations indicate that TPI could be contribute to the adhesion of the microorganism to host tissues and to the dissemination of infection.

Keywords: *Paracoccidioides brasiliensis*; Triose phosphate isomerase; Adhesin.

I- INTRODUÇÃO

I.1- *Paracoccidioides brasiliensis*

I.1.1 - Aspectos Gerais

Paracoccidioides brasiliensis é um fungo dimórfico, agente etiológico da paracoccidioidomicose (PCM), uma micose sistêmica geograficamente restrita a América Latina (Restrepo & Tobón 2005). Este fungo apresenta forma leveduriforme nos tecidos do hospedeiro ou quando cultivado *in vitro* a 36°C e forma miceliana (infectiva) em condições saprobióticas no meio ambiente, ou quando cultivado em temperaturas inferiores a 28°C (Bagagli *et al.* 2006). As leveduras de *P. brasiliensis* são caracterizadas por apresentarem brotamentos múltiplos, formados pela evaginação da célula-mãe, onde uma célula central é circundada por várias células periféricas, conferindo um aspecto de roda de leme de navio. A forma miceliana pode ser identificada por filamentos septados com conídeos terminais ou intercalares (Queiroz-Telles, 1994; Restrepo-Moreno, 2003).

P. brasiliensis é considerado um fungo imperfeito, devido a não ser caracterizado ainda, o mecanismo de reprodução de sua fase sexuada. Segundo San-Blas *et al.* (2002) em estudo de revisão, *P. brasiliensis* poderia ser agrupado ao filo Ascomycota, subdivisão Euascomycotina, classe Plectomyceto, sub-classe Euascomycetidae, ordem Onygenales,

família Onygenaceae, subfamília Onygenaceae Anamórficos, gênero *Paracoccidioides*, espécie *Paracoccidioides brasiliensis*.

Matute *et al.* (2006) descreveram a existência de três diferentes espécies filogenéticas de *P. brasiliensis*: S1 (espécie 1), PS2 (espécie filogenética 2) e PS3 (espécie filogenética 3). A espécie filogenética PS3 está geograficamente restrita à Colômbia, enquanto S1 está distribuída no Brasil, Argentina, Paraguai, Peru e Venezuela. Alguns isolados da espécie filogenética PS2 foram encontrados no Brasil nos estados de São Paulo e Minas Gerais e ainda na Venezuela (Matute *et al.* 2006). Recentemente, Carrero *et al.* (2008) comparando seqüências de 21 *loci* de 14 genes em isolados de *P. brasiliensis* de diferentes origens, através do método de comparação genealógica GCPSR (genealogical concordance phylogenetic species recognition) sugeriram que haveria mais do que três espécies filogenéticas, visto que o isolado Pb 01 apresenta significativas diferenças nas comparações com outros isolados das espécies descritas anteriormente.

A determinação exata do habitat de *P. brasiliensis* ainda é desconhecida, mas sugere-se que o fungo viva saprobicamente na natureza, próximo a ambientes de água fresca, tais como rios ou córregos e de forma temporária no solo (Bagagli *et al.* 2006; Terçarioli *et al.* 2007). O indício de que o fungo esteja presente no solo, foi conseguido com o seu isolamento a partir de duas espécies de tatus, o *Dasybus novemcintus* e o *Cabassou centralis* (Corredor *et al.* 2005).

Atualmente, foi obtida a identificação de *P. brasiliensis* através de “Nested-PCR” utilizando oligonucleotídeos da região ITS (Internal Transcribed Spacer) do fungo. A reação de amplificação foi realizada a partir do DNA extraído de vísceras de alguns mamíferos selvagens, como *Cavia aperea* (porco-da-Guiné), *Sphiggurus spinosus* (porco-espinho), *Procyon cancrivorus* (guaxinin), *Gallictis vittata* (furão) e também de duas espécies de tatus

(*Dasybus novemcinctus* e *Dasybus septemcinctus*), encontrados em regiões consideradas endêmicas para PCM. Os autores sugerem que, provavelmente, a infecção por *P. brasiliensis* em hospedeiros silvestres de áreas endêmicas seria bem mais comum do que postulado anteriormente por outros pesquisadores (Richini-Pereira *et al.* 2008).

P. brasiliensis alcança o hospedeiro, usualmente através da via respiratória, por inalação de propágulos do micélio, presentes no ambiente. Nos pulmões esses propágulos se convertem à fase leveduriforme, de onde podem disseminar-se para diferentes órgãos e tecidos (San Blas *et al.* 2002).

I.1.2- 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*, *Coccidioides immitis* e *Sporothrix schenckii*, e acredita-se que esta capacidade de alteração morfológica seria um importante mecanismo de virulência e patogenicidade destes fungos (Kurokawa *et al.* 1998). O dimorfismo é considerado um mecanismo de defesa importante para a adaptação de fungos às condições adversas do hospedeiro humano, à invasão de tecidos e ao estabelecimento da doença (San-Blas *et al.* 2002).

A temperatura é o estímulo mais notório no dimorfismo do fungo *P. brasiliensis*, que se apresenta com aspecto miceliano a 22°C-25°C e com aspecto leveduriforme a 35°C-37°C (San-Blas *et al.* 2002). Silva *et al.* (1994) caracterizaram *in vitro* o processo de diferenciação do isolado Pb01 (ATCC MYA-826). A diferenciação de micélio para levedura, e o inverso, ocorrem de maneira espontânea, após a alteração da temperatura de cultivo. Em

ambos, ocorre um período de latência que se dá entre 48-72 horas, atingindo 70-80% de diferenciação no décimo dia, o que caracteriza o processo de dimorfismo *in vitro* de *P. brasiliensis* como sendo lento e gradual.

O Projeto Genoma Funcional e Diferencial de *P. brasiliensis*, desenvolvido por grupos de pesquisa da região Centro-Oeste do Brasil, o que inclui o laboratório de Biologia Molecular da UFG, resultou no seqüenciamento de ESTs (Expressed Sequence Tags) nas fases miceliana e leveduriforme do isolado Pb01, possibilitando a detecção de genes diferencialmente expressos (Felipe *et al.* 2003; Felipe *et al.* 2005). Dessa forma, foram identificados transcritos que codificam para proteínas envolvidas no processo de estresse, componentes das vias de sinalização e seqüências gênicas específicas de *P. brasiliensis* que não possuem nenhum homólogo no genoma humano, todos preferencialmente expressos na fase leveduriforme do fungo.

Tendo em vista que a eficiência de instalação de *P. brasiliensis* no hospedeiro se dá pela transição da forma miceliana (infectante), para a leveduriforme (patogênica), o estudo de genes/proteínas com expressão diferencial durante a transição dimórfica do fungo, tem sido alvo de estudo de diferentes grupos (Nunes *et al.* 2005; Bastos *et al.* 2007).

Nunes *et al.* (2005), avaliaram através de microarranjos de DNA a expressão de genes de *P. brasiliensis* durante a transição de micélio para levedura. Nesse estudo foram identificados vários genes diferencialmente expressos durante a transição morfológica. Estão inclusos neste estudo genes que codificam para enzimas envolvidas no metabolismo de aminoácidos, transdução de sinal, síntese de proteínas, metabolismo da parede celular, estrutura do genoma, resposta ao estresse oxidativo, controle do crescimento e desenvolvimento do fungo.

O perfil transcricional de *P. brasiliensis* durante a diferenciação morfológica de

micélio para levedura foi avaliado por Bastos *et al.* (2007). Vários genes potencialmente relacionados com a síntese de membrana e parede celular mostraram-se aumentados durante a diferenciação celular de micélio para levedura, sugerindo que *P. brasiliensis* favorece o remodelamento da membrana e da parede celular nos estágios iniciais da morfogênese. Durante a transição também foi verificada a presença de enzimas que participam do ciclo do glioxalato como a isocitrato liase, malato desidrogenase, citrato sintase e aconitase, sugerindo que a transição morfológica em *P. brasiliensis* é mediada pela ativação de vias metabólicas alternativas que influenciam na adaptação ao ambiente, o que provavelmente garantiria a sobrevivência do fungo dentro do hospedeiro.

I.1.3- Paracoccidioidomicose

A PCM apresenta distribuição heterogênea, havendo áreas de baixa e alta endemicidade (Shikanai-Yasuda *et al.* 2006). 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 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. 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 (Shikanai-Yasuda *et al.* 2006).

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 freqüência, ocorrem lesões nas mucosas orais e nasais, pele e gânglios linfáticos. Menos freqüentemente, podem ocorrer envolvimento ocular, destruição óssea, e comprometimento dos sistemas nervoso e vascular (Shikanai-Yasuda *et al.* 2006).

Independentemente do órgão afetado a PCM usualmente é associada à formação de fibrose, o que pode interferir permanentemente com a qualidade de vida dos pacientes (Tobón *et al.* 2003). O grande número de tecidos que *P. brasiliensis* pode colonizar e infectar sugere que o fungo deve ter desenvolvido mecanismos que o capacitam a aderir, extravasar e

invadir barreiras impostas pelos tecidos do hospedeiro (Lenzi *et al.* 2000; Mendes-Giannini *et al.* 2008).

De acordo com dados de inquéritos epidemiológicos realizados no Brasil, Venezuela, Colômbia e Argentina, utilizando reação intradérmica com antígeno polissacarídico de *P. brasiliensis* (paracoccidioidina), observou-se que em torno de 50% dos habitantes de zonas endêmicas tenham sido expostos ao agente desta micose (Shikanai-Yasuda *et al.* 2006). O Brasil é responsável por 80% das descrições de casos da doença, 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.

Em estudo de revisão de óbitos por PCM entre 1980 e 1995 (3.181 casos), realizado por Coutinho *et al.* (2002), verificou-se 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 é de 1,45/milhão de habitantes ao ano, considerando ambos os sexos.

I.2- Matriz Extracelular

A matriz extracelular (MEC) é uma rede complexa de macromoléculas que proporciona um arcabouço físico para a estabilização da estrutura tecidual. A MEC de tecidos

animais é importante para as interações célula a célula e fornece um substrato às mesmas para aderirem e proliferarem, modulando diretamente a forma e funções celulares. Está especialmente adaptada dependendo do tecido em que se localiza, sendo flexível e resistente em tendões e na derme, dura e densa em ossos e dentes e absorvente em cartilagens.

A MEC de mamíferos é composta por duas classes principais de macromoléculas: as glicosaminoglicanas (GAG), encontradas normalmente ligadas a proteínas formando proteoglicanas e as proteínas fibrosas, que desempenham funções estruturais e adesivas, incluindo nessa classe, laminina, fibronectina e colágeno (Verstrepen & Klis 2006). A composição da MEC varia em diferentes tecidos e durante fases de injúria, inflamação e reparo tecidual (Kotton *et al.* 2003).

Laminina é uma glicoproteína de aproximadamente 900 kDa, que apresenta diferentes isoformas. Está presente na membrana basal de vários órgãos e principalmente nos pulmões (Lebleu *et al.* 2007). A interação com laminina é crucial em vários processos biológicos que requerem adesão celular, tais como, diapedese, coesão celular dentro do tecido, metástase de células cancerosas e infecções (Beck *et al.* 1990). Alguns receptores com afinidade à laminina foram descritos em células que normalmente interagem com a membrana basal, tais como células epiteliais ou endoteliais, células musculares e neurais (Bouchara *et al.* 1997). Células que possuem a capacidade migrar da corrente sanguínea para os tecidos, como por exemplo, macrófagos, leucócitos e células tumorais metastáticas, também podem exibir esses receptores (Wright *et al.* 2008).

Fibronectina é uma glicoproteína dimérica de 440 kDa, presente na forma solúvel no plasma sanguíneo e em outros fluídos corporais, e na forma fibrilar como componente essencial da MEC de diversos tecidos (Mohri 1996). Esta proteína atua como molécula de adesão em tecidos de mamíferos, um processo que envolve a ligação de receptores específicos

da superfície celular com domínios presentes na molécula de fibronectina (Roman *et al.* 2006; Vakonakisa & Campbell 2007; Butler *et al.* 2008).

O colágeno é encontrado em praticamente todos os tecidos de origem animal. É produzido através do entrelaçamento de cadeias peptídicas de resíduos de aminoácidos, formando as fibras colágenas, principais constituintes da MEC, e representa um importante alvo para adesão de muitas espécies de microrganismos. Existem atualmente mais de vinte tipos de colágeno caracterizados, sendo os mais importantes nos processos de adesão de patógenos o colágeno tipo IV, que é encontrado principalmente na lâmina basal, um dos componentes da membrana basal dos epitélios e o colágeno tipo I que é o mais abundante na constituição da matriz intersticial de vários tecidos, sempre formando fibras e feixes resistentes (Gil *et al.* 1996; Di lullo *et al.* 2002).

Vários fungos de relevância médica, como *P. brasiliensis* (Mendes-Giannini *et al.* 2008); *Candida albicans* (Sheppard *et al.* 2004); *Histoplasma capsulatum* (McMahon *et al.* 1995); *Sporothrix schenckii*, (Figueiredo *et al.* 2004) e *Coccidioides immitis* (Hung *et al.* 2002) apresentam moléculas capazes de interagir com componentes da MEC. O processo de adesão implica que o patógeno reconheça carboidratos e/ou proteínas ligantes na superfície da célula do hospedeiro ou proteínas constituintes da membrana basal para favorecer sua interação (Patti *et al.* 1994). O grande número de tecidos que os fungos podem colonizar e infectar sugere que eles possuam uma variedade de moléculas presentes em sua superfície capazes de favorecer o processo de adesão (Sullivan *et al.* 2004).

I.3- Moléculas Envolvidas no Processo de Adesão de Fungos Patogênicos

Várias moléculas que se comportam como adesinas tem sido estudadas em fungos

patogênicos, visto que, a adesão de microrganismos às proteínas da MEC é provavelmente o primeiro passo para o estabelecimento do processo infeccioso nos tecidos do hospedeiro.

Manoproteínas são componentes da parede de fungos, e desempenham um importante papel na relação parasito-hospedeiro. Algumas manoproteínas favorecem a adesão de fungos à superfície das células do hospedeiro. Em *C. albicans* uma manoproteína de 65 kDa (MP65) foi caracterizada como uma adesina. A propriedade adesiva de MP65 foi evidenciada, ao observar-se que o anticorpo produzido contra MP65 foi capaz de inibir a adesão do fungo à placas de polietileno. Outra evidência foi mostrada quando um mutante de *C. albicans*, o qual não expressa MP65 na parede celular, apresentou menor capacidade de adesão, quando comparado com o tipo selvagem (Sandini *et al.* 2007).

Foi descrita em *C. albicans*, uma família gênica denominada ALS (Agglutinin-Like Sequence), composta de pelo menos oito genes, que codificam para proteínas capazes de influenciar na aderência do fungo (Sheppard *et al.* 2004; Filler 2006). O papel funcional destas proteínas foi avaliado, utilizando-se mutantes de *C. albicans* para os genes *ALS1* e *ALS3*. A deleção desses genes ocasionou a redução da capacidade de aderência dos mutantes à células endoteliais da veia umbilical humana (HUVEC) e células de epitélio bucal (BEC), em relação ao tipo selvagem (Zhao *et al.* 2004).

A atividade da enzima fosfolipase foi correlacionada como fator de aderência de diversos patógenos às células epiteliais. Foi demonstrado que a fosfolipase B1 (PLB1) é um fator de virulência em *Cryptococcus neoformans*, e que estaria envolvido no início da criptococose pulmonar (Santangelo *et al.* 2004). A enzima PLB1 degrada dipalmitoil fosfatidilcolina (DPPC), o principal componente do fluído surfactante presente nas vias pulmonares. A deleção do gene que codifica PLB1 inibiu significativamente a capacidade de adesão de *C. neoformans* à culturas de pneumócitos (linhagem A549). Embora a fosfolipase

não seja considerada uma molécula de adesão clássica, os autores enfatizam a forte correlação entre a atividade da PLB1 e a adesão de *C. neoformans* ao tecido pulmonar (Ganendren *et al.* 2006).

Foi proposto que a habilidade de *H. capsulatum* em interagir com laminina seria um mecanismo importante para o estabelecimento da histoplasmose. Experimentos de adesão, em que o fungo foi colocado em contato com laminina imobilizada, mostraram que *H. capsulatum* interage com a proteína de maneira rápida e específica; a presença do anticorpo anti-laminina inibiu significativamente a adesão do fungo. A adesão é mediada possivelmente por uma glicoproteína de 50 kDa identificada na parede celular de *H. capsulatum*. O tratamento prévio do fungo com o anticorpo anti-proteína de 50 kDa e o peptídeo IKVAV (Isoleucina-Lisina-Valina-Alanina-Valina – presente na molécula de laminina) foram capazes de inibir sua adesão à molécula de laminina (McMahon *et al.* 1995).

S. schenckii é o agente etiológico da esporotricose, uma micose subcutânea que comumente acomete indivíduos imunocomprometidos, e pode se disseminar por vários tecidos e órgãos. Estudos de interação entre *S. schenckii* e proteínas da MEC mostraram que o fungo foi capaz de aderir à laminina, colágeno e fibronectina, e que essa interação foi mediada por moléculas de 90 e 135 kDa, localizadas na superfície do fungo. A interação entre *S. schenckii* a proteínas da MEC foi avaliada através de experimentos de competição com peptídeos presentes na molécula de fibronectina e laminina. Foi sugerido que os peptídeos RGD (Arginina-Glicina-Aspartato - presente na fibronectina) e YIGSR (Tirosina-Isoleucina-Glicina-Serina-Arginina - presente na laminina) interagem com as adesinas presentes na superfície de *S. schenckii*, uma vez que esses inibiram significativamente a ligação do fungo às proteínas da MEC (Lima *et al.* 2004).

C. immitis é o agente causador da coccidioidomicose, uma doença crônica que

causa comprometimento pulmonar. Hung *et al.* (2002), identificaram um gene de *C. immitis* que codifica para uma glicoproteína (SOWgp) presente na parede externa de esporos. Ensaios *in vitro*, com a proteína recombinante mostraram que esta molécula apresenta capacidade de se ligar à laminina, fibronectina e colágeno. A deleção do gene que codifica para SOWgp resultou na perda parcial da capacidade de esporos do mutante em se ligar às proteínas da MEC, bem como foi observada também uma significativa redução da virulência dos mesmos, quando utilizados em infecção experimental de camundongos.

Blastomyces dermatitidis é o agente etiológico da blastomicose, uma infecção respiratória que acomete indivíduos e animais no mundo inteiro. Foi demonstrado que uma glicoproteína de 120 kDa, denominada BAD1 presente na superfície de *B. dermatitidis*, estaria possivelmente mediando a ligação do fungo a macrófagos humanos e que esse processo é dependente do nível de expressão de BAD1 em diferentes isolados de *B. dermatitidis* (Brandhorst *et al.* 2003).

Através da utilização de dois isolados isogênicos (apresentava BAD1 - ATCC 26199 e não apresentava BAD1 – mutante 55) em modelo de infecção animal (BALB/c), foi avaliado o papel desta glicoproteína na adesão e virulência de *B. dermatitidis*. Camundongos infectados com o isolado de *B. dermatitidis* (ATCC 26199), desenvolveram blastomicose disseminada letal semanas após a inoculação, ao passo que, camundongos infectados com a mesma dose letal do isolado que continha o gene que codifica para BAD1 mutado (mutante 55) sobreviveram. A capacidade de adesão e virulência foi restabelecida em *B. dermatitidis* depois da reconstituição do fenótipo, em que a expressão de BAD1 foi recuperada (Wüthrich *et al.* 2006).

I.4 - Adesinas de *P. brasiliensis*

P. brasiliensis é capaz de aderir, atravessar e invadir barreiras impostas pelos tecidos do hospedeiro (Hanna *et al.* 2000; Mendes-Giannini *et al.* 2000). Vários estudos têm caracterizado componentes da matriz extracelular envolvidos na interação de *P. brasiliensis* com o hospedeiro (Vicentini *et al.* 1994; Andreotti *et al.* 2005; Mendes-Giannini *et al.* 2006). A laminina é, provavelmente, uma das principais moléculas envolvidas no processo de adesão de *P. brasiliensis* a tecidos do hospedeiro, facilitando a sua disseminação pelo organismo (Mendes-Giannini *et al.* 2008). A primeira adesina descrita em *P. brasiliensis* foi a glicoproteína de 43 kDa, com a capacidade de interagir com laminina (Vicentini *et al.* 1994). Foi demonstrado que a interação da gp43 a laminina foi inibida *in vivo* e *in vitro* por anticorpos anti-gp43 (Vicentini *et al.* 1994; Gesztesi *et al.* 1996). Posteriormente, foi evidenciada também a interação da gp43 com fibronectina, outro importante componente de matriz extracelular (Mendes-Giannini *et al.* 2006).

Foram descritas outras moléculas em *P. brasiliensis* provavelmente envolvidas no processo de adesão do fungo. Uma adesina de 30 kDa isolada de *P. brasiliensis* que apresentou capacidade de ligação à laminina, mas não a outros componentes da MEC foi capaz de inibir intensamente a adesão de *P. brasiliensis* a células epiteliais previamente tratadas com esta molécula (Andreotti *et al.* 2005).

Foi mostrado que *P. brasiliensis* apresenta em sua superfície celular duas proteínas com massas moleculares de 19 e 32 kDa que interagem com diferentes proteínas da MEC, tais como laminina, fibrinogênio e fibronectina. Ensaios realizados com conídeos de *P. brasiliensis*, pré-incubados com anticorpo monoclonal anti-32 kDa inibiram, de maneira dose-dependente, a aderência do fungo às proteínas da MEC (González *et al.* 2005).

Em estudo de PCM experimental com camundongos BALB/c foi mostrado que o

tratamento prévio de conídeos (forma infectante) do fungo com laminina, fibronectina e fibrinogênio promoveu um menor dano tissular nos pulmões, baço e fígado analisados por exame histopatológico no período pós-infecção, em comparação com órgãos de animais não tratados. Foi proposto então que os componentes da MEC bloqueariam moléculas na superfície dos conídeos de *P. brasiliensis* que estariam atuando como fatores de adesão, diminuindo assim o potencial do patógeno de aderir e disseminar no foco inicial de infecção (González *et al.* 2008).

A proteína gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) de *P. brasiliensis* foi descrita como adesina. A imunocitocalização realizada com anticorpo anti-GAPDH mostrou que esta molécula está presente no citoplasma e também na parede celular de leveduras do fungo. A proteína recombinante apresenta capacidade de ligação a laminina, fibronectina e colágeno tipo I, além de influenciar consideravelmente a adesão e conseqüentemente a internalização do fungo a culturas de pneumócitos (Barbosa *et al.* 2006).

Recentemente foi descrita outra molécula presente na superfície do fungo que apresenta capacidade de aderir às proteínas da MEC, a *PbDfg5p*. Esta proteína caracterizada como pertencente à família das glicosil hidrolases estaria relacionada com a formação e manutenção da parede celular de fungos. Em *P. brasiliensis* sua presença na parede celular foi evidenciada através de imuno-eletromicroscopia, bem como em extratos protéicos de parede celular, obtidos a partir do tratamento de leveduras com β -1,3 endo glucanase. A *PbDfg5p* recombinante apresentou capacidade de se ligar a laminina, fibronectina, colágeno tipo I e tipo IV, além de apresentar um motivo RGD em sua seqüência predita, característica comum de algumas adesinas (Castro *et al.* 2008).

I.5- Triose Fosfato Isomerase (TPI)

I.5.1- Características da TPI

Triose Fosfato Isomerase (EC 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). O monômero da 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 ($(\beta\alpha)_8$). A estrutura é altamente conservada em vários organismos, desde bactérias até eucariotos superiores, apesar de ocorrerem algumas diferenças consideráveis na seqüência de aminoácidos (Jiménez *et al.* 2000).

A presença de alguns resíduos de aminoácidos altamente conservados na seqüência de TPI tem sido útil na caracterização de novas seqüências 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.

Swinkels *et al.* (1986) caracterizaram em *Trypanosoma brucei* uma TPI presente em glicossomos, organelas citoplasmáticas onde há alta concentração de enzimas associadas a funções metabólicas básicas de alguns protozoários. 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.5.2- TPI como antígeno

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). Ainda segundo os autores, esta TPI agregaria características para avaliação como antígeno vacinal contra esquistossomose (Harn *et al.* 1992; Miao *et al.* 1998).

Zhu *et al.* (2004) utilizando a seqüência da TPI de *S. japonicum* (SjCTPI) em vacinas de DNA, promoveu a imunização de camundongos BALB/c por via intramuscular, seguida de infecção experimental com cercarias do verme. A comparação entre os resultados da contagem de ovos e vermes recuperados do fígado dos animais de dois grupos, um

imunizado somente com a seqüência da SjCTPI (G1) e outro com SjCTPI mais a seqüência da Interleucina-12 (G2), mostraram índices de redução de 30,2% de ovos e 52,9% de vermes para o G1 e redução de 32,7% de ovos e 47,0% de vermes para o G2, em comparação com o grupo controle (GC). A eficácia protetora da TPI de *S. japonicum* foi testada ainda, através de vacinas de DNA em porcos, mostrando uma redução do número de ovos encontrados no fígado dos animais analisados de 49,4% somente com a SjCTPI, e a redução foi intensificada para 65,8% com a adição da seqüência de Interleucina-12, em relação aos controles (Zhu *et al.* 2006).

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, provavelmente devido a sua exposição a fagócitos do hospedeiro durante a infecção.

Um mutante pouco virulento de *C. albicans* (CNC13), que apresenta deleção para MAP (Mitogen Activated Protein) quinase HOG1, foi usado em diferentes títulos para imunizar camundongos BALB/c. Os diferentes soros obtidos foram analisados em relação a sua capacidade de imunoprotetora, através de um modelo de candidíase sistêmica em murinos com leveduras virulentas. Foram determinadas duas categorias de soro: um protetor e outro não-protetor contra infecção experimental. Utilizando técnicas de proteômica, eletroforese bi-dimensional seguida de Western blotting, com extratos protéicos das leveduras virulentas de *C. albicans*, reagidos com o soro “protetor”, foram evidenciados perfis que correspondiam a anticorpos contra algumas proteínas antigênicas, dentre elas, triose fosfato isomerase e frutose bifosfato aldolase. Foi sugerido então, que estas proteínas seriam capazes de produzir imunidade frente ao patógeno, tornando-se possíveis candidatas ao desenvolvimento de

vacinas contra candidíase (Fernández-Arenas *et al.* 2004).

I.5.3- 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 presentes no soro de pacientes com PCM. O sequenciamento dos aminoácidos da região amino terminal, e de regiões internas evidenciou três peptídeos: ITWTLAGHSER, RQLDAVAEEVSPAEW e VVIAYEPIWAIGTGK, que apresentaram homologia (100 – 72%) com a seqüência de triose fosfato isomerase de vários organismos.

Bastos (2003), em sua dissertação de mestrado, caracterizou uma seqüência parcial de 949 pares de bases do gene codificante para PbTPI. A obtenção do fragmento de DNA foi realizada através de PCR com DNA genômico do fungo, utilizando um par de oligonucleotídeos degenerados. A construção dos oligonucleotídeos 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.

Pereira *et al.* (2004) caracterizaram as seqüências genômica e de cDNA codificantes para a TPI de *P. brasiliensis*. Ambas as seqüências apresentam uma ORF de 750 pb que codifica para uma proteína de 249 aminoácidos e apresenta todos os peptídeos descritos no trabalho de Fonseca *et al.* (2001). A seqüência genômica codificante para PbTPI apresenta cinco íntrons, o que corresponde à descrição existente em outros fungos como *Aspergillus orizae* e *Emericella nidulans*. Este trabalho mostrou ainda que a PbTPI

recombinante purificada, obtida a partir de expressão heteróloga em *E. coli*, apresenta uma massa molecular de 29 kDa e reatividade com anticorpos presentes no soro de pacientes com PCM, semelhante à TPI nativa do fungo.

No presente trabalho procuramos avaliar esta molécula com relação à sua capacidade de se ligar a alguns componentes de MEC, culturas de células epiteliais e posteriormente sua influência na adesão e internalização de *P. brasiliensis* a culturas celulares, com o intuito de obter indícios do provável papel funcional da TPI nos primeiros estágios de interação do fungo com tecidos do hospedeiro.

I.6- Frutose Bifosfato Aldolase (FBA)

I.6.1- Características da Frutose 1,6-Bifosfato Aldolase

A enzima frutose 1,6-bifosfato aldolase (EC4.1.2.13) ou simplesmente aldolase, pertence à classe das liases, sub-classe das carbono-carbono liases, e catalisa uma reação reversível de clivagem da frutose 1,6-bifosfato em duas trioses fosfato diferentes: gliceraldeído 3-fosfato, uma aldolase e dihidroxiacetona fosfato, uma cetose (Lai & Horecker 1972). Existem duas classes distintas de aldolases devido ao mecanismo de reação (Marsh & Lebherz 1992).

As FBA Classe I, encontradas principalmente em eucariotos superiores, especialmente em animais e plantas superiores (Schnarrenberger *et al.* 1990), são enzimas homotetraméricas com peso molecular aproximado de 160 kDa e que apresentam um lisina no sítio-ativo da molécula para estabilizar a reação intermediária formando uma base de Schiff (von der Osten *et al.* 1989). As FBA Classe II são principalmente encontradas em

microorganismos, algas verdes, fungos e algumas bactérias. São enzimas homodiméricas que necessitam de um íon divalente, geralmente Zn^{2+} , na sua estrutura para estabilizar os metabólitos intermediários durante a sua atividade catalítica e geralmente apresentam sensibilidade a EDTA (Marsh & Lebherz 1992).

Crowe *et al.* (2003) caracterizaram uma FBAI, juntamente com outras proteínas de parede celular, por eletroforese bidimensional em *C. albicans*, capazes de se ligar a plasminogênio. Essa FBA de *C. albicans* estaria provavelmente desenvolvendo um papel de adesina semelhante à enzima GAPDH, já bem caracterizada nesta levedura.

A hipótese da interação da enzima FBA com outras proteínas no processo infeccioso, não necessariamente mediando a adesão, foi evidenciada por Nandan *et al.* (2007). Os autores caracterizaram uma FBA citoplasmática de *Leishmania donovani* capaz de se ligar à enzima tirosina fosfatase-1 (SHP-1) de macrófagos, promovendo uma diminuição de sua atividade fagocítica *in vitro*.

I.6.2- Frutose Bifosfato Aldolase de *P. brasiliensis*

A frutose 1,6-bifosfato aldolase de *P. brasiliensis* (PbFBA) foi descrita primeiramente por Fonseca *et al.* (2001). Através do fracionamento de extrato protéico solúvel do fungo, por eletroforese bidimensional e posterior ensaio de “immunoblotting”, observou-se que uma proteína de peso molecular 39 kDa e ponto isoelétrico 6.1 era reconhecida por anticorpos de pacientes portadores de PCM. O sequenciamento dos aminoácidos da região amino terminal, e de peptídeos internos identificou dois peptídeos que apresentaram homologia de 60 e 75%, respectivamente com aldolases de *Saccharomyces cerevisiae* e *Schizosaccharomyces pombe*.

Carneiro *et al.* (2005) caracterizaram seqüências de cDNA codificantes para duas aldolases de Classe II (*Pbfba1* e *Pbfba2*), através do rastreamento da biblioteca de cDNA do isolado Pb01 com uma sonda homóloga de 434 pares de base, sendo que algumas diferenças foram observadas entre as duas aldolases. O alinhamento das seqüências preditas de aminoácidos da *PbFBA1* e *PbFBA2* mostrou diferença em 99 resíduos de aminoácidos, sendo que apenas a *PbFBA2* apresentou um motivo RGD, comumente encontrado em algumas adesinas capazes de se ligar à fibronectina, um componente de matriz extracelular.

Marques *et al.* (2004) analisando genes transcritos preferencialmente na fase leveduriforme do isolado Pb18 mostraram que uma frutose bifosfato aldolase (FBAI) de *P. brasiliensis* é 4,7 vezes mais expressa na fase leveduriforme do que na forma miceliana. Este dado corrobora as observações de Fonseca *et al.* (2001) e Carneiro *et al.* (2005) de que a FBA de *P. brasiliensis* está preferencialmente expressa na fase leveduriforme do fungo.

No presente trabalho procuramos produzir a *PbFBA1* através de expressão heteróloga em sistema bacteriano, comparar suas características com a proteína nativa e posteriormente obter um anticorpo a partir da proteína recombinante, com intuito de avaliar esta molécula com relação à sua localização na fase leveduriforme de *P. brasiliensis*,

II- JUSTIFICATIVAS

A capacidade de *P. brasiliensis* de provocar uma micose sistêmica com grande variedade de manifestações clínicas depende de complexos fatores de interação entre o fungo e o hospedeiro humano. No processo infeccioso de *P. brasiliensis*, as leveduras são expostas a tecidos do hospedeiro, desta forma certas proteínas presentes na superfície da célula podem se comportar como adesinas, favorecendo a interação do fungo. A caracterização de algumas proteínas que aparentemente influenciam na interação com o hospedeiro, muitas vezes conferindo um fenótipo mais patogênico por permitir ao fungo aderir com maior facilidade aos tecidos do hospedeiro, vem colaborando para um maior entendimento da instalação do fungo e desenvolvimento da PCM.

Embora os mecanismos de adesão e infecção de *P. brasiliensis* permaneçam ainda pouco esclarecidos, é aceito atualmente que a capacidade de *P. brasiliensis* de aderir aos tecidos do hospedeiro seja um fator importante para o estabelecimento da doença.

Estudos prévios demonstraram que a triose fosfato isomerase de *P. brasiliensis* é reconhecida por anticorpos presentes no soro de pacientes portadores de PCM, e está preferencialmente expressa na fase leveduriforme do fungo. Devido ao interesse de descrever novas moléculas antigênicas, potencialmente associadas à interação do fungo com o hospedeiro, e visto que, outras moléculas anteriormente evidenciadas como constitutivas no proteoma do fungo tem apresentado comportamento de adesina, é que resolvemos avaliar esta proteína antigênica do fungo no presente trabalho com relação a sua provável capacidade de se ligar a alguns componentes de MEC, semelhante a outras adesinas descritas na literatura.

Desta forma, a partir da seqüência completa de cDNA codificante para a proteína PbTPI e a obtenção da proteína recombinante purificada, descrita por nós em trabalhos anteriores, é que estabelecemos as condições iniciais que tornariam possível analisar funcionalmente a proteína nativa quanto a sua expressão e localização celular.

Devido a recentes caracterizações de proteínas antigênicas, que anteriormente acreditava-se serem apenas enzimas presentes no citoplasma, como promissoras moléculas envolvidas no processo de adesão a tecidos do hospedeiro por *P. brasiliensis* e também por outros fungos patogênicos, é que utilizamos a PbTPI recombinante em experimentos capazes de avaliar o seu possível comportamento de adesina.

A frutose bifosfato aldolase de *P. brasiliensis* apresentou-se também, como molécula promissora no estudo de novos antígenos do fungo, sendo adotada como parte adicional do trabalho experimental proposto inicialmente para a tese, devido a esta proteína ser também, uma enzima de via glicolítica como a TPI, e apresentar descrições na literatura como molécula antigênica presente em outros organismos patogênicos.

III- OBJETIVOS

O estudo de moléculas envolvidas na interação patógeno-hospedeiro é um dos principais interesses de nosso grupo de trabalho.

Visando este enfoque, o presente estudo teve os seguintes objetivos:

1- Caracterização funcional da Triose Fosfato Isomerase de *P. brasiliensis*.

1.1- Purificação da proteína recombinante TPI de *P. brasiliensis* e produção de anticorpos policlonais específicos.

- Estratégias:

- ✓ Expressão heteróloga da proteína PbTPI em sistema bacteriano *Escherichia coli* (linhagem XL-1b);
- ✓ Purificação da proteína recombinante em condições não desnaturantes através de cromatografia de afinidade.
- ✓ Inoculação da proteína recombinante purificada em coelhos, associada ao adjuvante completo de Freund, através de via sub-cutânea.

1.2- Localização da TPI em células leveduriformes de *P. brasiliensis*.

- Estratégia:

- ✓ Imunocitoquímica realizada com o anticorpo anti-PbTPI através de microscopia eletrônica de transmissão.

1.3- Avaliar a capacidade da PbTPI recombinante purificada de se ligar a componentes da matriz extracelular.

- Estratégias:

- ✓ Avaliação da capacidade de ligação da proteína recombinante purificada a culturas celulares (Vero e A549) - “Experimento de binding”;
- ✓ Ensaio de interação da proteína recombinante imobilizada em membrana de nitrocelulose com componentes de MEC (laminina, fibronectina, e colágeno tipo I e tipo IV) - experimento de “Far-Western blotting”.

1.4- Avaliar a influência da PbTPI recombinante purificada e do anticorpo policlonal anti-PbTPI, nos processos de adesão e invasão de *P. brasiliensis* à culturas celulares.

- Estratégias:

- ✓ Contagem do número de células leveduriformes de *P. brasiliensis* aderidas à monocamada de duas linhagens celulares, pneumócitos - A549 e células Vero, previamente tratadas com a PbTPI recombinante purificada, em comparação a controles não tratados;
- ✓ Contagem do número de células leveduriformes de *P. brasiliensis*, tratadas previamente com o anticorpo anti-PbTPI, após incubação com a monocamada de células A549 e Vero, em comparação com controles de leveduras não tratadas.

2- Caracterização da proteína Frutose 1,6-bifosfato Aldolase 1 de *P. brasiliensis*.

2.1- Expressão heteróloga do cDNA completo que codifica para FBA1 de *P. brasiliensis* e purificação da proteína recombinante.

- Estratégias:

- ✓ Clonagem do cDNA completo da PbFBA1 em vetor de expressão (pGEX4-T3 - GE Healthcare) e da expressão da proteína de fusão em *E. coli* (XL-1b);
- ✓ Purificação da proteína recombinante em condições não desnaturantes através de cromatografia de afinidade.

2.2- Produção de anticorpos policlonais, anti-PbFBA1 recombinante e análise de

reconhecimento à proteína nativa de *P. brasiliensis*.

- Estratégias:

- ✓ Inoculação da proteína recombinante purificada em camundongo, associada ao adjuvante completo de Freund, através de via sub-cutânea.
- ✓ Western blotting realizado com extrato de proteínas solúveis, obtido de ambas as fases do fungo.

2.3- Determinar a localização celular da FBA em *P. brasiliensis*.

- Estratégia:

- ✓ Imunocitoquímica realizada com o anticorpo anti-PbFBA1 através de microscopia eletrônica de transmissão em células leveduriformes.

2.4- Analisar a reatividade imunológica da proteína recombinante PbFBA1.

- Estratégia:

- ✓ "Immunoblotting" utilizando soros de pacientes com diagnóstico clínico e imunológico de PCM.

IV- ARTIGO PUBLICADO

Artigo – Analysis of the *Paracoccidioides brasiliensis* triosephosphate isomerase suggests the potential for adhesion function

Autores: Luiz Augusto Pereira, Sonia Nair Bao, Monica Santiago Barbosa, Juliana Leal M. da Silva, Maria Sueli S. Felipe, Jaime Martins de Santana, Maria Jose S. Mendes-Giannini & Celia Maria de Almeida Soares

Revista: FEMS Yeast Research 7 (2007) 1381–1388
Published on behalf of the Federation of European Microbiological Societies.
(Received 14 February 2007; revised 3 May 2007; accepted 14 June 2007; First published online 23 August 2007)

Artigo



RESEARCH ARTICLE

Analysis of the *Paracoccidioides brasiliensis* triosephosphate isomerase suggests the potential for adhesin functionLuiz Augusto Pereira¹, Sônia Nair Bão², Mônica Santiago Barbosa¹, Juliana Leal M. da Silva³, Maria Sueli S. Felipe⁴, Jaime Martins de Santana⁵, Maria José S. Mendes-Giannini³ & Célia Maria de Almeida Soares¹¹Laboratório de Biologia Molecular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Goiás, Brazil; ²Laboratório de Microscopia, Universidade de Brasília, Brasília, DF; ³Laboratório de Micologia Clínica, Universidade Estadual Júlio de Mesquita Filho, Araraquara, São Paulo;⁴Laboratório de Biologia Molecular, Universidade de Brasília; and ⁵Laboratório Interdisciplinar em Doença de Chagas, Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brazil

Correspondence: Célia Maria de Almeida Soares, Laboratório de Biologia Molecular, ICB2, Campus 2, Universidade Federal de Goiás, 74001-970, Goiânia, Goiás, Brazil. Tel./fax: +55 62 35211110; e-mail: celia@icb.ufg.br

Received 14 February 2007; revised 3 May 2007; accepted 14 June 2007.
First published online 23 August 2007.

DOI:10.1111/j.1567-1364.2007.00292.x

Editor: José Ruiz-Herrera

Keywords

Paracoccidioides brasiliensis; TPI; interaction with epithelial cells; infection.

Abstract

Paracoccidioides brasiliensis is an important fungal pathogen. The disease it causes, paracoccidioidomycosis (PCM), ranges from localized pulmonary infection to systemic processes that endanger the life of the patient. *Paracoccidioides brasiliensis* adhesion to host tissues contributes to its virulence, but we know relatively little about molecules and the molecular mechanisms governing fungal adhesion to mammalian cells. Triosephosphate isomerase (TPI; EC 5.3.1.1) of *P. brasiliensis* (PbTPI) is a fungal antigen characterized by microsequencing of peptides. The protein, which is predominantly expressed in the yeast parasitic phase, localizes at the cell wall and in the cytoplasmic compartment. TPI and the respective polyclonal antibody produced against this protein inhibited the interaction of *P. brasiliensis* to *in vitro* cultured epithelial cells. TPI binds preferentially to laminin, as determined by peptide inhibition assays. Collectively, these results suggest that TPI is required for interactions between *P. brasiliensis* and extracellular matrix molecules such as laminin and that this interaction may play an important role in the fungal adherence and invasion of host cells.

Introduction

The pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* causes paracoccidioidomycosis (PCM), one of the most important systemic mycoses in Latin America. The severe nature of the disease and the occurrence of sequelae, frequently causing pulmonary dysfunction and other disabilities, render it a pathogen of considerable medical importance. The fungus is thermally dimorphic, grows as a yeast-like structure in the host tissue and as mycelium in the saprobic condition. The mycelial phase produces infective propagules that lodge in the host alveoli, and adhere and invade the alveolar cells and/or the basal lamina (Franco & Montenegro, 1994).

The attachment of microorganisms to a biological surface is a complex process involving specific interactions between adhesins and complex receptors on host tissues (Finlay & Cossart, 1997). During their evolution, fungal pathogens have acquired the ability to exploit cell surface matrix components as ligands for attachment (Rostand & Esko, 1997). The extracellular matrix of the alveolar basal lamina

is a complex mixture of molecules, including fibronectin, laminin, and collagens. Although the matrix is not available for binding in normal cells, the components can be exposed after tissue damage resulting from either inflammatory process or lytic activity by toxins of the microorganism (Patti *et al.*, 1994).

The adhesion of *P. brasiliensis* to cells is seen as an important determinant of pathogenesis. The fungal proteins functioning as adhesins in *P. brasiliensis* are just now coming to light. Some fungal proteins including a glycoprotein of 43 kDa (gp43), a 30 kDa protein, proteins of 19 and 32 kDa and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) have been identified and found to mediate adhesion to extracellular matrix components and human cells (Vicentini *et al.*, 1994; Andreotti *et al.*, 2005; Gonzales *et al.*, 2005; Barbosa *et al.*, 2006; Mendes-Giannini *et al.*, 2006).

Triosephosphate isomerase (TPI) is an enzyme catalyzing the conversion of dihydroxy acetone phosphate (DHAP) to glyceraldehyde-3-phosphate (G3P). The protein was well characterized in *P. brasiliensis* by immunoproteomic

analysis; it was originally described in our laboratory as a fungal antigen reactive with sera of PCM patients and sequences from N-terminal and internal peptides were obtained (Fonseca *et al.*, 2001). Subsequently, the cognate cDNA was obtained and the recombinant protein was over-produced in a heterologous system (Pereira *et al.*, 2004).

It has been reported that pathogen-derived TPI plays an important role in host–parasite interaction. The immunization of experimental animals with monoclonal antibodies to TPI, with the recombinant protein, as well as with plasmid DNA, led to a significant protection against schistosomiasis (Harn, 1987; Miao *et al.*, 1998; Zhu *et al.*, 2006). Recently, the enzyme was described as a novel binding protein of the integrin α Ib cytoplasmic domain (Liu *et al.*, 2006).

Little is known about molecules related to fungal host–interaction, such as adhesion molecules and the molecular mechanisms governing *P. brasiliensis* adhesion to mammalian cells. With this in mind, we investigated the role of TPI as a putative novel molecule involved in the fungus interaction with the host. This work describes the production of an antirecombinant TPI (rPbTPI) polyclonal antibody that recognizes the native protein in yeast and mycelium, as well as recognizing the recombinant molecule. Immunoelectron microscopy was employed to define the TPI subcellular localization in *P. brasiliensis*. The PbTPI was detected in the cytoplasm and in the cell wall of the yeast phase of *P. brasiliensis*. TPI binds preferentially to laminin, as determined by peptide inhibition assays. Treatment of *P. brasiliensis* yeast cells with the anti-TPI polyclonal antibody promoted inhibition of interaction of *P. brasiliensis* to epithelial cells. Likewise, the treatment of *in vitro* cultured epithelial cells with the recombinant protein blocked binding of *P. brasiliensis*.

All the data indicate that TPI present on the surface of *P. brasiliensis* is able to interact with host extracellular matrix proteins. This fungal cell-wall characterized protein could be crucial for the initial fungal adherence and invasion, thus promoting the fungal infection.

Materials and methods

Paracoccidioides brasiliensis isolates growth conditions and differentiation assays

Paracoccidioides brasiliensis Pb01 strain (ATCC-MYA-826) has been investigated by our laboratory and was cultivated for 7 days in semisolid Fava Netto's medium at 36 °C in the yeast form and at 22 °C for its mycelia phase, as previously described (Barbosa *et al.*, 2006). The differentiation was performed in the same medium above, without agar, by changing the temperature of the culture from 22 to 36 °C for the mycelium to yeast transition, as described (Moreira *et al.*, 2004). The cells were previously grown in liquid

medium for 18 h before changing the incubation temperature, which was maintained for 15 days. Aliquots were taken at different time intervals and processed for further analysis.

Heterologous expression of *P. brasiliensis* TPI, recombinant protein purification and antibody production

The production and purification of the recombinant TPI was performed as described (Pereira *et al.*, 2004). Briefly, the cDNA was cloned into the EcoRI/XhoI sites of pGEX-4T-3 (GE Healthcare). The recombinant TPI was expressed in the soluble form by the bacteria and the protein was purified by affinity chromatography under nondenaturing conditions. The recombinant protein was used to generate specific rabbit polyclonal serum. The rPbTPI (300 µg) was injected into rabbit with Freud's adjuvant, three times at 2-week intervals. The obtained serum, containing specific anti-TPI polyclonal antibodies, was sampled and stored at –20 °C.

Preparation of fungal cell extracts

Yeast and mycelial protein crude extracts were obtained as described (Barbosa *et al.*, 2006). Two types of extracts were produced: (1) a total cell homogenate and (2) a cell-free homogenate. For the preparation of total cell homogenate, mycelium and yeast cells were frozen and exhaustively ground with mortar and pestle in the presence of protease inhibitors. The mixture was centrifuged (12 000 g) at 4 °C for 10 min, and the supernatant was used. The cell-free extracts of the yeast cells were obtained as described (Barbosa *et al.*, 2006). In brief, yeast cells of *P. brasiliensis* (300 mg) were resuspended in 1.0 mL of 10 mM phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.2, and vortexed for 30 s. The cells were centrifuged (5600 g) for 1 min, and the supernatant was collected and used for further analysis. The protein content of samples was determined.

Determination of TPI specific activity

The enzymatic activity was determined by coupling the conversion of dihydroxyacetone phosphate to glyceraldehyde 3-phosphate, as described (Plaut & Knowles, 1972). The increase in the absorbance at 340 nm caused by the reduction of NAD was monitored. One activity unit (U) is defined as the conversion of 1 µmol substrate min⁻¹ at 25 °C. The reaction mixture was composed of 100 mM triethanolamine buffer, pH 7.6, 5 mM EDTA, 0.2 mM NAD, 20 µg mL⁻¹ glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, 1 mM dihydroxyacetone phosphate, and 20 µL (at a concentration of 1.5 mg mL⁻¹) of cell extracts. The substrate dihydroxyacetone phosphate was solubilized in triethanolamine buffer, as described above. The concentration of NADH and the specific enzymatic activity were estimated using the

extinction coefficient of the product ($\epsilon_{340} = 6220 \text{ M cm}^{-1}$). Chemicals used in the enzymatic assay were from Sigma Chemical Co. (St Louis, MO).

Western-blot analysis

SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was carried out and the proteins were electrophoretically transferred to a nylon membrane, according to standard protocols. TPI was detected with the polyclonal antibody (1 : 1000 diluted). The reaction was revealed with 5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate/nitroblue tetrazolium (BCIP/NBT).

Ultrastructure of the yeast cells and immunocytochemistry of TPI

For the ultrastructural and immunocytochemistry studies, we employed the protocols previously described in Barbosa *et al.* (2006). After fixation of the yeast cells, ultrathin sections were stained with 3% (w/v) uranyl acetate and lead citrate.

For ultrastructural immunocytochemistry studies, the ultrathin sections were incubated for 1 h with the polyclonal antibody raised against the recombinant TPI (diluted 1 : 100) and for 1 h at room temperature with the labeled secondary antibody rabbit IgG, Au-conjugated (10 nm average particle size; 1 : 20 dilution). The grids were stained as described above and observed with a Jeol 1011 transmission electron microscope (Jeol, Tokyo, Japan). Controls were obtained.

Affinity ligand assays

Far-Western assays were carried out as previously described (Guichet *et al.*, 1997; Barbosa *et al.*, 2006). Recombinant TPI was submitted to SDS-PAGE and blotted onto nitrocellulose membranes, which were assayed for laminin and fibronectin binding as follows. The membranes were incubated with 30 μg laminin mL^{-1} or 30 μg fibronectin mL^{-1} , for 90 min. The blots were sequentially incubated with rabbit antibodies antilaminin or antifibronectin (1 : 100 diluted) and with peroxidase-labelled goat antirabbit immunoglobulin (1 : 1000 diluted). The reactive bands were developed with hydrogen peroxide and diaminobenzidine. Controls were obtained.

Binding assays of recombinant PbTPI to *in vitro* cultured A549 pneumocytes and Vero cells

Type II pneumocyte line A549 from the American Type Culture Collection (ATCC CCL185, Manassas, VA) and African green monkey kidney cells (Vero cells, ATCC CCL81) were used in the experiments. Briefly, the A549 pneumocytes and Vero cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) and Medium 199 (Sigma), respectively, both supplemented with 10% (v/v) heat-inactivated fetal calf serum. Monolayers of cells were in-

cubated with 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of *P. brasiliensis* recombinant TPI at 36 °C for 5 h. Distilled water was added for 4 h and the cell lysates were fractionated by electrophoresis (12% SDS-PAGE). Proteins in the gel were electrotransferred to membranes. Western blot analysis was performed as described before. Negative controls were obtained by analyzing the supernatant of lysed cells not preincubated with the recombinant TPI, as well as by coating the cell culture flask with 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of TPI.

Interference of TPI and polyclonal antibody in interaction of *P. brasiliensis* to *in vitro* cultured cells

A549 pneumocytes and Vero cells were incubated for 1 h at 36 °C with the recombinant TPI at 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ in 10 mM PBS. After washing the cells in the respective culture mediums 1 $\times 10^8$ yeast cells of *P. brasiliensis* were added to the cultures. Incubation was performed for 5 h at 36 °C, as previously described (Barbosa *et al.*, 2006). In parallel, 1 $\times 10^8$ yeast cells of *P. brasiliensis* were incubated for 1 h at 36 °C with the polyclonal antibody anti-TPI (1 : 1000 diluted). Cells were washed and allowed to interact with the A549 pneumocytes or Vero cells. Three types of control experiments were performed: (1) with yeast cells not preincubated with the recombinant TPI protein; (2) with yeast cells not preincubated with the anti-TPI antibody and (3) with yeast cells preincubated just with bovine serum albumin (BSA), at 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$. The number of *P. brasiliensis* yeast cells interacting with the *in vitro* cultured epithelial cells was determined, as described (Esquenazi *et al.*, 2003; Mendes-Giannini *et al.*, 2004). Results are presented as the means of counts performed three times with SDs included.

Inhibitory effects of synthetic peptides on binding of TPI to pneumocytes

A549 epithelial cells at 1 $\times 10^6$ cells mL^{-1} were grown in microtitre plates, for 24 h in DMEM as described above. The cells were fixed in solution containing paraformaldehyde (v/v) 4%, washed and blocked in PBS containing 10% fetal calf serum for 1 h at room temperature. The cells were incubated with the recombinant TPI at 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$, in the presence and absence of individual synthetic peptides (200 $\mu\text{g mL}^{-1}$), (Manque *et al.*, 2000). After 1 h at 36 °C, cells were washed with PBS and incubated with the polyclonal anti-TPI antibody (1 : 1000 diluted). After washing, the cells were incubated with the peroxidase-labelled goat antirabbit IgG (1 : 3000 diluted). Semiquantitative analysis was conducted by the addition of the peroxidase substrate (hydrogen peroxide/diaminobenzidine) to the wells and by the determination of the $\text{OD}_{492 \text{ nm}}$. The peptide fragments Arg-Gly-Asp-Ser (RGDS) from fibronectin, Arg-Gly-Asp (RGD), from fibronectin and laminin and Tyr-Ile-

Gly-Ser-Arg (YIGSR) from laminin were used in the experiments. As a negative control, TPI was omitted and replaced by PBS.

Statistical analysis

Results are expressed as the mean \pm SE of the mean of three independent experiments. Statistical analysis was performed using ANOVA (*F*-test followed by Duncan test). *P*-values of 0.05 or less were considered statistically significant.

Results

Production of polyclonal antibody and analysis of TPI accumulation in *P. brasiliensis*

The cDNA encoding the *P. brasiliensis* TPI (GenBank accession number AY250089) was overexpressed into bacterial cells. After induction with IPTG, a 56-kDa fusion recombinant protein was detected in the bacterial lysates (Fig. 1a, lane 2). The fusion protein was cleaved by the addition of thrombin protease (Fig. 1a, lane 3). As observed, highly purified protein was obtained that migrated on SDS-PAGE as a single species of 29 kDa. The purified recombinant TPI was used to produce rabbit polyclonal antibody. The protein total extracts of *P. brasiliensis* yeast and mycelium (Fig. 1a, lanes 4 and 5, respectively) were visualized after Coomassie blue staining. Those samples, including the recombinant TPI before and after thrombin cleavage, were blotted onto membranes and reacted to the polyclonal antibody (Fig. 1a, lanes 6–9). As demonstrated, a single band of 29 kDa was detected in extracts of both yeast and mycelium (Fig. 1a, lanes 6 and 7). Recombinant TPI in the bacterial lysates and purified recombinant TPI were also recognized as a single band by the polyclonal antibody (Fig. 1a, lanes 8 and 9, respectively). No cross-reactivity to the rabbit preimmune serum was evidenced with the samples (data not shown).

Total cellular extracts from mycelium, mycelium in transition to yeast at days 1, 7 and 15 after the temperature shift, were taken and analyzed by one-dimensional gel electrophoresis (Fig. 1b, lanes 1–4, respectively). The samples were run in parallel and transferred to membrane to react with the polyclonal antibody (Fig. 1b, lanes 5–8). The native protein is weakly accumulated in the mycelia phase (Fig. 1b, lane 5) and its expression is progressively increased during the transition to yeast (Fig. 1b, lanes 6–8).

Detection of TPI protein by immunoelectron microscopy of *P. brasiliensis* yeast cells

Immunocytochemistry experiments were performed to define the cellular localization of the TPI protein in yeast cells.

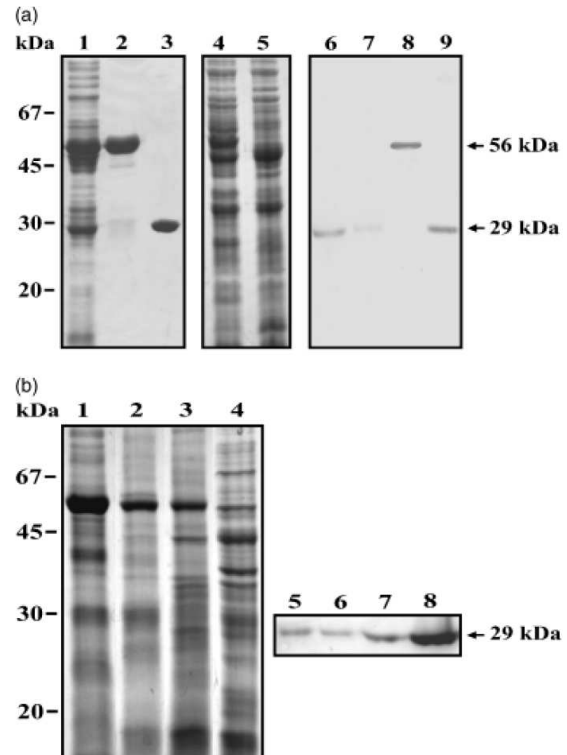


Fig. 1. Recognition of *P. brasiliensis* TPI by the rabbit polyclonal antibody and protein expression during fungal dimorphic transition. (a) Recombinant and native TPI are recognized by the polyclonal antibody. *Escherichia coli* XL1-Blue cells harbouring the pGEX-4T-3-TPI plasmid were grown at 30 °C to an $A_{260\text{nm}}$ of 0.6 and harvested after (lane 1) a 2 h incubation with 0.1 mM IPTG. Lane 2 – the affinity-isolated recombinant TPI. Lane 3 – the recombinant fusion protein cleaved by thrombin. Lane 4 – protein extracts from yeast (30 µg), Lane 5 – protein extracts from mycelium (30 µg). The proteins were fractionated by one-dimensional gel electrophoresis and stained using Coomassie blue. Lanes 6–9 – Western blot analysis of the native and recombinant TPI. The same samples and quantities of proteins were fractionated (12% SDS-PAGE) and transferred to membrane. Lane 6 – protein extracts from yeast. Lane 7 – protein extracts from mycelium. Lane 8 – *E. coli* transformed with pGEX-4T-3-TPI total extract; Lane 9 – the recombinant fusion protein cleaved by thrombin. The blots were reacted to the polyclonal anti-TPI antibody. Molecular size markers are indicated. Arrows indicate the recombinant fusion protein and the native TPI. (b) Analysis of the expression of TPI during the transition from mycelium to yeast in *P. brasiliensis*. The proteins (30 µg) were fractionated by one-dimensional gel electrophoresis and stained using Coomassie blue. Lane 1 – mycelium. Lanes 2–4 – mycelium in transition to yeast after 1, 7 and 15 days of the temperature shift, respectively. Lanes 5–8 – The same protein extracts (lanes 1–4) were probed to the anti-PbTPI polyclonal antibody. Reactions were performed as described.

Electron microscopy of conventionally embedded cells revealed the ultrastructure of the *P. brasiliensis* yeast form (Fig. 2a). In yeast cells processed by the postembedding method,

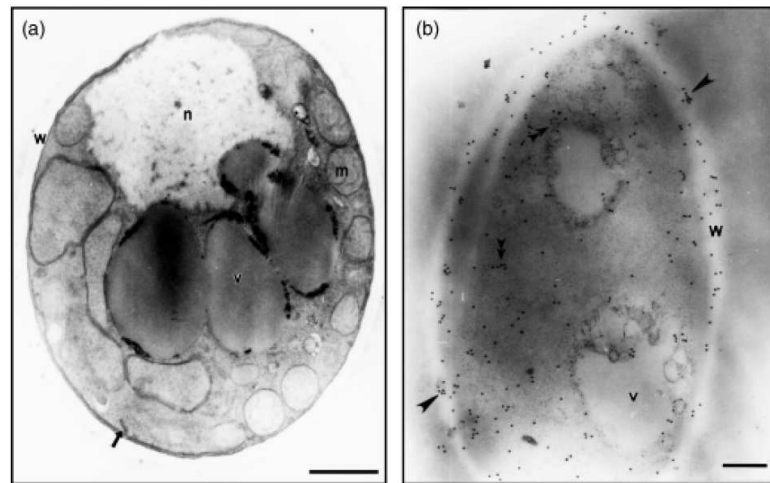


Fig. 2. Immunoelectron microscopy detection of TPI in *P. brasiliensis* yeast cells by postembedding methods. (a) Transmission electron microscopy of *P. brasiliensis* yeast cells; nucleus (n), intracytoplasmic vacuoles (v) mitochondria (m). The plasma membrane (arrow) and cell wall (w) are also shown. (b) Gold particles (arrowheads) are observed at the fungus cell wall (w) and in the cytoplasm (double arrowheads). Bars, 1 μm (a), 0.2 μm (b).

gold particles were present in cytoplasm and the cell wall (Fig. 2b). Control samples not exposed to the polyclonal antibody, as well as sample incubated with the rabbit preimmune serum, prior to the incubation with the gold-conjugated antibody were free of label (data not shown).

Enzymatic activity of native and recombinant TPI of *P. brasiliensis*

As the TPI of *P. brasiliensis* was found to be localized both at the cell wall and internally in the cytoplasm, we attempted to evaluate the enzymatic activity of the native protein in total cellular extracts of yeast and mycelium, as well as in the cell-free extract of yeast cells, which corresponds to the most superficial components of the cell wall. Also the recombinant protein was assayed for its enzymatic activity. Table 1 contains the results of these experiments. The TPI specific activity was substantially higher in the yeast cells when compared with mycelia, in agreement with the higher amount of the protein in the parasitic phase, as demonstrated by Western blot analysis. Additionally, the cell-free extract fraction exhibited a high specific activity of TPI, corroborating the high amount of gold particles found in the fungal cell wall by the immunoelectron microscopy experiments. The recombinant molecule presented the highest activity in the tested samples.

Binding of recombinant TPI to extracellular matrix proteins and to *in vitro* cultured A549 pneumocytes and Vero cells

The ability of the recombinant TPI of *P. brasiliensis* to bind laminin and fibronectin was determined by far-

Table 1. Analysis of the enzymatic activity of the native and recombinant *P. brasiliensis* TPI

Protein source	PbTPI specific activity (U mg ⁻¹ protein)*
Yeast 'cell free' extract	2.02 ± 0.0075
Yeast	1.9 ± 0.0059
Mycelium	0.6 ± 0.0038
Purified recombinant TPI (rPbTPI)	18.8 ± 0.0015

*One activity unit (U) is defined as the conversion of 1 μmol substrate min⁻¹ at 25 °C. Activities are means of three independent determinations.

Western blotting assays (Fig. 3a). The recombinant protein manifests the ability to bind to laminin (Fig. 3a, lane 2) and fibronectin (Fig. 3a, lane 3). The positive control was developed with the anti-TPI polyclonal antibody (Fig. 3a, lane 1). Negative controls were obtained by incubating the recombinant molecule with just the secondary antibody or in the absence of the extracellular matrix proteins (data not shown). An additional control demonstrated the specificity of the binding of TPI to the extracellular matrix proteins, as no reactivity between BSA and the extracellular matrix proteins was demonstrated and the polyclonal antibody to TPI did not present cross-reactivity to BSA (data not shown). The adhesin characteristic of TPI was also evaluated by interaction of the recombinant protein with pneumocytes and Vero cells (Fig. 3b and c, respectively). The purified protein behaved as an adhesin, binding to the *in vitro* cultured cells (Fig. 3b and c, lane 2). Negative and positive controls were developed, respectively, with pneumocytes A549 and Vero cells not incubated with the recombinant TPI (Fig. 3b and c, respectively, lane 3), as well

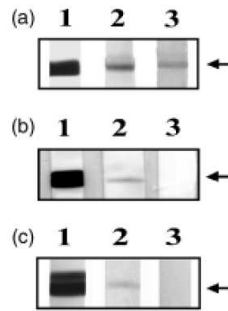


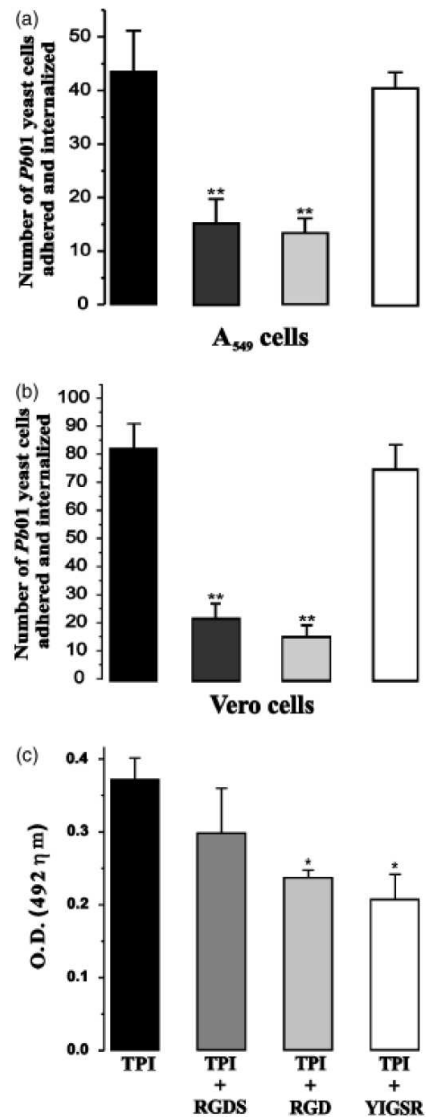
Fig. 3. Interaction of the *rPbTPI* to extracellular matrix components and to the *in vitro* cultured A549 pneumocytes and Vero cells. (a) The *rPbTPI* (0.5 µg) was subjected to SDS-PAGE and electroblotted. The membranes were reacted with laminin (lane 2) and fibronectin (lane 3) and subsequently incubated with the rabbit IgG antilaminin and antifibronectin antibodies, respectively. Use of peroxidase-conjugated antirabbit IgG revealed the reactions. The positive control was obtained by incubating the recombinant protein with the anti-TPI polyclonal antibody (lane 1). (b and c) Cultured pneumocytes (b) and Vero cells (c) were incubated with 50 µg of recombinant TPI for 5 h at 36 °C. The cells were lysed, the supernatant was fractionated by SDS-PAGE and proteins were transferred to membranes. Detection was performed by incubation with rabbit anti-TPI polyclonal antibody and subsequent reaction with alkaline phosphatase-coupled anti-rabbit IgG. The reaction was developed with BCIP/NBT. Positive control, recombinant protein transferred to the membranes (lane 1); supernatant of pneumocytes or Vero cells after incubation of the cells with the recombinant TPI (lane 2); supernatant of pneumocytes and Vero cells not incubated with the recombinant TPI (lane 3).

as with the recombinant protein added to the cell culture flask, in the absence of the cells monolayer (Fig. 3b and c, lanes 1).

Fig. 4. Interaction assay data and competitive assay with *PbTPI* and peptides during the interaction with pneumocytes. (a and b) Histograms showing the interaction (adhesion plus internalization) of *P. brasiliensis* yeast cells to pneumocytes A549 and Vero cells, respectively. Prior to each assay, the yeast cells were treated for 1 h with the anti-TPI polyclonal antibody (1 : 1000 diluted). In another set of experiments the A549 and Vero cells were pretreated for 1 h with 50 µg mL⁻¹ of the *rPbTPI*. The interaction of *P. brasiliensis* to pneumocytes and Vero cells was analyzed after 5 h (a and b, respectively). Black bars, control; dark grey bars, epithelial cells treated with the recombinant TPI; light grey bars, *Paracoccidioides brasiliensis* yeast cells treated with the anti-TPI polyclonal antibody; white bars, cells treated with BSA. The values represent the mean ± SD of three independent experiments performed in triplicate. Asterisks denote values statistically different from control at *P* < 0.0001. Vertical bars indicate SD. (c) Pneumocyte A549 cells were incubated with TPI (10 µg mL⁻¹); TPI (10 µg mL⁻¹) and the synthetic peptides of fibronectin (RGDS and RGD), and laminin (RGD and YIGSR) and anti-*PbTPI* antiserum (1 : 1000). The interaction was visualized using ELISA. The results were expressed in absorbance units and correspond to mean values ± SD of triplicate experiments. **P* < 0.05.

Inhibitory effects of TPI and polyclonal antibody on *P. brasiliensis* interaction to cells and competitive assay with TPI and peptides during interaction with pneumocytes

Yeast cells were assayed for the interaction with *in vitro* cultured pneumocytes and Vero cells, as shown in Fig. 4a and b, respectively. *Paracoccidioides brasiliensis* yeast cells were treated with the antibody anti-TPI prior to interaction with the *in vitro* cultured cells; pneumocytes and Vero cells were pretreated with recombinant TPI prior to the interaction with *P. brasiliensis* yeast cells. As demonstrated, the treatment of pneumocytes with recombinant TPI resulted in 65% inhibition of the adherence and internalization of



P. brasiliensis to those cells. In addition, the treatment of *P. brasiliensis* yeast cells with the polyclonal antibody resulted in 69% inhibition of the adherence and internalization to pneumocytes (Fig. 4a). Similar results were obtained when Vero cells were infected with *P. brasiliensis*. The treatment of the epithelial cells with the recombinant TPI resulted in 73% inhibition of fungal adherence and internalization. We observed an 85% inhibition of adhesion/internalization with the treatment of the yeast cells with the polyclonal antibody (Fig. 4b).

As laminin and fibronectin bind to immobilized TPI we attempted to evaluate whether peptides of those molecules had the ability to inhibit TPI binding to *in vitro* cultured pneumocytes. Competitive binding was performed with synthetic peptides corresponding to the adhesive recognition sequences of fibronectin and laminin, as shown in Fig. 4c. The peptide RGDS from fibronectin exhibited a small inhibitory effect ($P > 0.05$) on the binding of TPI to *in vitro* cultured pneumocytes. Synthetic peptide RGD, from fibronectin and laminin, inhibited the interaction of TPI with the cultured pneumocytes by 36.0% ($P < 0.05$), as shown. The peptide YIGSR, from laminin, showed an inhibitory effect of 44.1% ($P < 0.05$).

Discussion

In the present study we have investigated the role of TPI as an adhesin putatively involved in host cell binding. The fungal cell wall is the initial site of interaction between fungal cells and their host and thus is a key structure for entry and infection. Although not formally considered an intracellular pathogen, *P. brasiliensis* can enter epithelial cells (Hanna *et al.*, 2000; Mendes-Giannini *et al.*, 2000). Endocytosis of this fungus requires intact epithelial cell microfilaments and microtubules and triggers host-cell apoptosis (Mendes-Giannini *et al.*, 2004). Although the invasion of nonphagocytic cells is likely central to the pathogenesis of the disease, there is a paucity of knowledge about the fungal surface proteins that induce invasion, as well as the host-cell receptors to the fungal adhesins.

In addition to a cytoplasmic location, the TPI of *P. brasiliensis* is present at the fungal cell wall. Despite its external location, the protein lacks an N-terminal signal peptide, as previously demonstrated (Fonseca *et al.*, 2001; Pereira *et al.*, 2004). Evidence has been accumulating using as current models *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans*, clearly showing that many proteins that lack an N-terminal peptide also reach the cell surface. Of special note, many of those surface proteins lacking the N-terminal signal peptide are also found in the cytoplasm, where they perform well-known functions (Nombela *et al.*, 2006). Some of those nonconventionally secreted proteins are involved in binding to host components (Gozalbo *et al.*, 1998). In regard to

P. brasiliensis, we have demonstrated that two adhesins, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (Barbosa *et al.*, 2006) and TPI, described here, do not present canonical sequences to surface trafficking. In addition to its probable binding to host-cell components mediating fungal adhesion and invasion, TPI exhibits enzymatic activity at the cell wall, as demonstrated in this work.

Adhesion encoding genes are not constitutively expressed, but in general are activated by diverse environmental triggers (Cheng *et al.*, 2005). We demonstrated that the expression of TPI is developmentally regulated in *P. brasiliensis*, with expression increasing as the fungus adopts the pathogenic yeast-like morphology. Data on TPI enzymatic activity corroborate the Western blot result.

The ability of *P. brasiliensis* to colonize host tissues may be facilitated by fungal surface proteins with high affinity to extracellular matrix molecules, and the outcome of such colonization depends largely on the receptor/ligand interactions between the host cells and the fungus. As it has been proposed that initial infection of *P. brasiliensis* originates in the lung following inhalation of airborne conidia (Franco *et al.*, 1994), the fungal ability to initiate infection may be due to the adhesion of its spores to both extracellular matrix molecules and lung epithelial cells. The TPI can be involved in the interaction of *P. brasiliensis* with the extracellular matrix components laminin and fibronectin, as inferred by the adhesion experiments of those molecules with immobilized TPI. The recombinant TPI and the polyclonal antibody raised against the molecule were able to interfere with the interaction of *P. brasiliensis* to *in vitro* cultured epithelial cells. Competitive assays with the RGD peptide, part of the laminin and fibronectin molecules, reduced by 36.0% the adhesion of TPI to pneumocytes. On the other hand, YIGSR derived from the laminin reduced the binding by 44.1% and RGDS did not reduce significantly the adhesion of TPI to pneumocytes. On the basis of those findings we can speculate that laminin mainly mediates the adhesion of TPI to the epithelial cells.

Recognition and binding to the host cells is a key step in the pathogenesis of many fungi, and consequently the characterization of novel adherence molecules and identification of the molecular basis of *P. brasiliensis* attachment to host cells remain important objectives.

Acknowledgements

The work at Universidade Federal de Goiás was funded by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) and Secretaria de Ciência e Tecnologia do Estado de Goiás (SECTEC-GO). The authors wish to thank Dr George S. Deepe Jr, Division of Infectious Diseases, University of Cincinnati, OH, USA, for providing

invaluable discussion and for the critical review of this manuscript.

References

- Andreotti PF, Monteiro da Silva JL, Bailão AM, Soares CMA, Benard G, Soares CP & Mendes-Giannini MJ (2005) Isolation and partial characterization of a 30-kDa adhesin from *Paracoccidioides brasiliensis*. *Microbes Infect* **7**: 875–881.
- Barbosa MS, Bao SN, Andreotti PF, de Faria FP, Felipe MS, dos Santos Feitosa L, Mendes-Giannini MJ & Soares CMA (2006) Glycerinaldehyde 3-phosphate dehydrogenase of *Paracoccidioides brasiliensis* is a cell surface protein, involved in fungal adhesion to extracellular matrix proteins and interaction with cells. *Infect Immun* **74**: 382–389.
- Cheng G, Wozniak K, Wallig MA, Fidel PL Jr, Trupin SR & Hoyer LL (2005) Comparison between *Candida albicans* agglutinin-like sequence gene expression patterns in human clinical specimens and models of vaginal candidiasis. *Infect Immun* **73**: 1656–1663.
- Esquenazi D, de Souza W, Alviano CS & Rozental S (2003) The role of surface carbohydrates on the interaction of microconidia of *Thrichophyton mentagrophytes* with epithelial cell. *FEMS Immunol Med Microbiol* **30**: 113–123.
- Finlay BB & Cossart P (1997) Exploitation of mammalian host cell functions by bacterial pathogens. *Science* **276**: 718–725.
- Fonseca CA, Jesuino RSA, Felipe MSS, Cunha DA, Brito W & Soares CMA (2001) Two-dimensional electrophoresis and characterization of antigens from *Paracoccidioides brasiliensis*. *Microbes Infect* **3**: 535–542.
- Franco M & Montenegro MR (1994) Pathology. *Paracoccidioidomycosis* (Franco M, Lacaz C, Restrepo A & Del Negro G, eds), pp. 131–147. CRC Press, Boca Raton, FL.
- González A, Gómez BL, Díez S, Hernández O, Restrepo A, Hamilton AJ & Cano LE (2005) Purification and partial characterization of a *Paracoccidioides brasiliensis* protein with capacity to bind to extracellular matrix proteins. *Infect Immun* **73**: 2486–2495.
- Gozalbo D, Gil-Navarro I, Azorin I, Renau-Piqueras J, Martínez JP & Gil ML (1998) The cell wall-associated glycerinaldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Candida albicans* is also a fibronectin and laminin binding protein. *Infect Immun* **66**: 2052–2059.
- Guichet A, Copeland JW, Erdelyi M, Hlousek D, Zavorszky P, Ho J, Brown S, Percival-Smith A, Krause HM & Ephrussi A (1997) The nuclear receptor homologue Ftz-F1 and the homeodomain protein Ftz are mutually dependent cofactors. *Nature* **385**: 548–552.
- Hanna SA, Monteiro da Silva JL & Giannini MJ (2000) Adherence and intracellular parasitism of *Paracoccidioides brasiliensis* in vero cells. *Microbes Infect* **2**: 877–884.
- Harn DA (1987) Immunization with schistosome membrane antigens. *Acta Trop Suppl* **12**: 46–49.
- Liu QY, Corjay M, Feuerstein GZ & Nambi P (2006) Identification and characterization of triosephosphate isomerase that specifically interacts with the integrin α IIb cytoplasmic domain. *Biochem Pharmacol* **72**: 551–557.
- Manque PM, Eichinger D, Juliano MA, Juliano L, Araya JE & Yoshida N (2000) Characterization of the cell adhesion site of *Trypanosoma cruzi* metacyclic stage surface glycoprotein gp82. *Infect Immun* **68**: 478–484.
- Mendes-Giannini MJS, Taylor ML, Bouchara JB et al. (2000) Pathogenesis II: fungal responses to host responses: interaction of host cells with fungi. *Med Mycol* **38**: 113–123.
- Mendes-Giannini MJ, Hanna SA, da Silva JL, Andreotti PF, Vincenzi LR, Benard G, Lenzi HL & Soares CP (2004) Invasion of epithelial mammalian cells by *Paracoccidioides brasiliensis* leads to cytoskeletal rearrangement and apoptosis of the host cell. *Microbes Infect* **6**: 882–891.
- Mendes-Giannini MJS, Andreotti PF, Vincenzi LR, da Silva JLM, Lenzi LH, Benard G, Zancopé-Oliveira RM, Guedes LM & Soares CP (2006) Binding of extracellular matrix proteins to *Paracoccidioides brasiliensis*. *Microbes Infect* **8**: 1550–1559.
- 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.
- Moreira SFI, Bailão AM, Barbosa MS, Jesuino RSA, Felipe MSS, Pereira M & Soares CMA (2004) Monofunctional catalase P of *Paracoccidioides brasiliensis*: identification, molecular cloning and expression analysis. *Yeast* **21**: 173–182.
- Nombela C, Gil C & Chaffin L (2006) Non-conventional protein secretion in yeast. *Trends Microbiol* **14**: 15–21.
- Patti JM, Allen BL, Mc Gavin MJ & Hook M (1994) MSCRAMM-mediated adherence of microorganisms to host tissues. *Annu Rev Microbiol* **48**: 585–617.
- Pereira LA, Pereira M, Felipe MSS, Zancopé-Oliveira RM & Soares CMA (2004) Proteomic identification, nucleotide sequence, heterologous expression and immunological reactivity of the triosephosphate isomerase of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Microbes Infect* **6**: 892–900.
- Plaut B & Knowles JR (1972) pH-dependence of the triose phosphate isomerase reaction. *Biochem J* **129**: 311–320.
- Rostand KS & Esko JD (1997) Microbial adherence to and invasion through proteoglycans. *Infect Immun* **65**: 1–8.
- Vicentini AP, Gesztesí JL, Franco MF, de Souza W, Moraes JZ, Travassos LR & Lopes JD (1994) Binding of *Paracoccidioides brasiliensis* to laminin through surface glycoprotein gp43 leads to enhancement of fungal pathogenesis. *Infect Immun* **62**: 1465–1469.
- Zhu Y, Si J, Harn DA, Xu M, Ren J, Yu C, Liang Y, Yin X, He W & Cao G (2006) *Schistosoma japonicum* triose-phosphate isomerase plasmid DNA vaccine protects pigs against challenge infection. *Parasitology* **132**: 1–5.

V- RESULTADOS COMPLEMENTARES

Resultados de experimentos realizados durante o período de prorrogação do prazo requerido para término do curso de doutorado

No presente trabalho apresentamos resultados de obtenção da proteína recombinante PbFBA1. A proteína recombinante foi obtida através de expressão heteróloga em *E. coli*, e posteriormente utilizada na imunização de camundongos com intuito de se obter anticorpos específicos. O anticorpo policlonal obtido foi utilizado para identificar a FBA nativa em extrato protéico total de *P. brasiliensis*. A localização celular da aldolase de *P. brasiliensis* foi realizada, utilizando-se o anti-PbFBA1 em experimento de imuno-citocalização de células leveduriformes do isolado Pb01. A análise da reatividade imunológica da PbFBA1 recombinante foi realizada com soros de pacientes portadores de PCM.

Os experimentos iniciais de caracterização da PbFBA1 de *P. brasiliensis*, bem como de cristalização da proteína recombinante PbTPI foram realizados paralelamente ao projeto principal proposto inicialmente para o curso de Doutorado, e os resultados são apresentados e comentados a seguir, seguindo a ordem das figuras:

V.1- Expressão e purificação da PbFBA1 recombinante

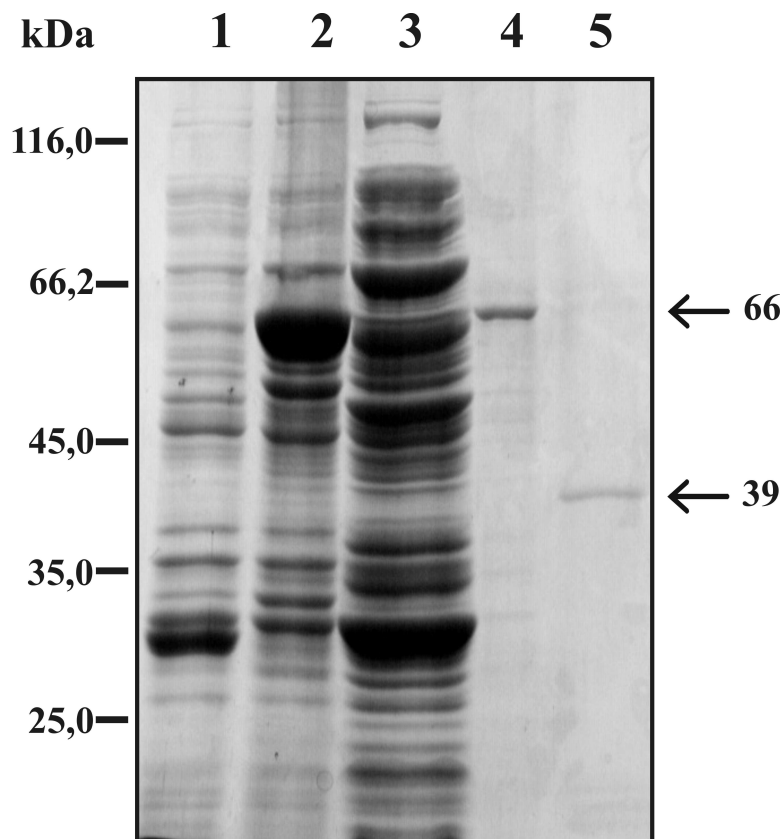
Metodologia:

Expressão heteróloga do cDNA codificante da PbFBA1:

- Clonagem em vetor de expressão pGEX-4T-3 (Amersham, Biosciences) do cDNA completo da *Pbfb1* de 1083 pb, descrito por Carneiro *et al.* (2005) – dado não mostrado;
- Indução da expressão heteróloga da proteína de fusão em sistema bacteriano *E. coli* XL-1b com 0,2 mM de IPTG por 2 horas a 30°C – Figura1, linha2;
- Purificação da proteína recombinante através de cromatografia de afinidade a GST, em coluna contendo glutationa posterior clivagem enzimática da proteína de fusão com trombina protease – Figura 1, linha 5.

A proteína recombinante purificada obtida por expressão heteróloga no presente trabalho apresenta o mesmo peso molecular calculado para seqüência de aminoácidos predita da *Pbfb1* descrita por Carneiro *et al.* (2005) e da frutose bifosfato aldolase nativa isolada por Fonseca *et al.* (2001).

Figura 1 – Eletroforese em gel de poliacrilamida da PbFBA1 recombinante expressa em *E. coli*. Os extratos protéicos foram fracionados por SDS-PAGE 12%, e posteriormente corado com Comassie blue. Linha 1- extrato protéico de *E. coli* transformada apenas com o vetor; Linha 2 – *E. coli* transformada com pGEX-4T-3PbFBA1 e incubada com 0,2 mM de IPTG por 2 horas; Linha 3- Sobrenadante obtido a partir da lise celular de suspensão de *E. coli* em PBS 1X, transformada com o vetor pGEX-4T-3PbFBA1; Linha 4- Proteína de fusão PbFBA1-GST obtida por cromatografia por afinidade com glutationa; Linha 5- PbFBA1 recombinante purificada após clivagem da proteína de fusão com trombina protease. O marcador de peso molecular está evidenciado à esquerda e as setas à direita mostram os pesos moleculares calculados da proteína de fusão PbFBA1-GST e PbFBA1 recombinante purificada, 66 kDa e 39 kDa respectivamente.



V.2- Análise de especificidade do anticorpo policlonal anti-PbFBA1

Metodologia:

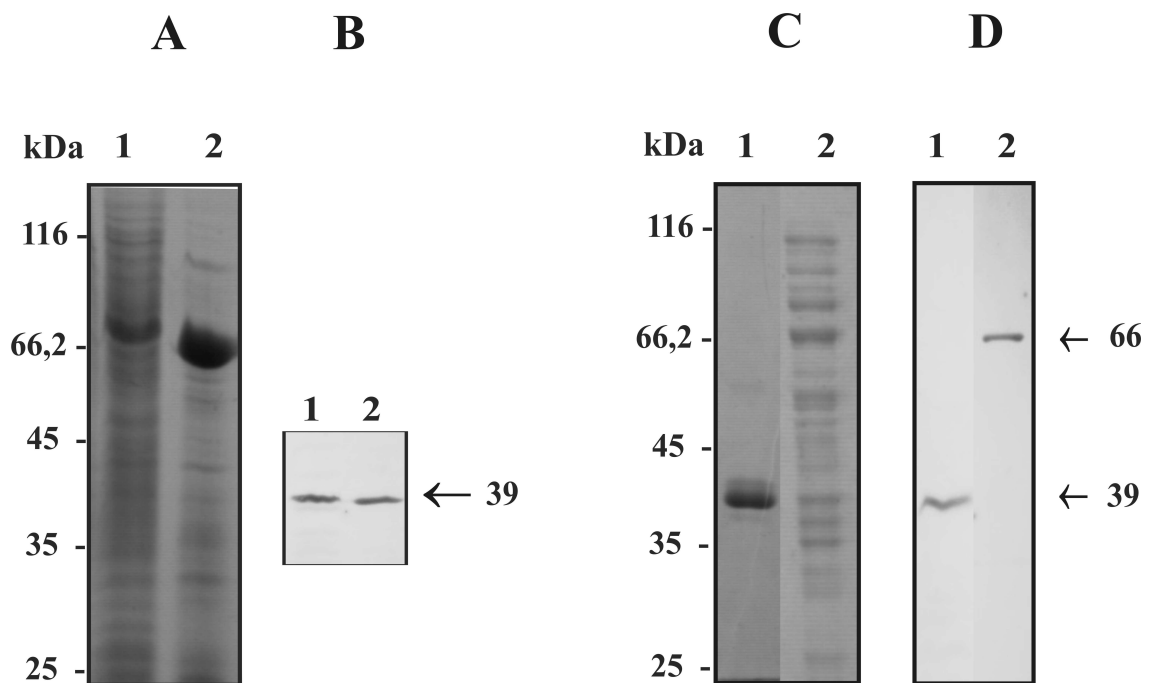
- 1- Produção de soro policlonal em camundongo utilizando, anti-PbFBA1 recombinante:
 - Inoculação da proteína recombinante purificada PbFBA1 (200 microgramas), associada ao adjuvante completo de Freund, em camundongo, através de via sub-cutânea em três imunizações (0, 15 e 30 dias);
 - O soro pré-imune foi obtido do animal antes da primeira imunização;
 - O soro imune foi obtido a partir do sangue total do animal sacrificado após 60 dias e armazenado a -20°C.

- 2- Análise de reconhecimento específico da frutose bifosfato aldolase recombinante e nativa de *P. brasiliensis* pelo soro policlonal:
 - O isolado Pb 01 foi crescido em meio Fava-Neto a 36°C e 27°C;
 - Os extratos protéicos totais das fases miceliana e leveduriforme do isolado Pb01 foram obtidos segundo Fonseca *et al.* (2001) e fracionados por SDS-PAGE 10% - Figura 2A, linha 1 e 2;
 - As proteínas fracionadas foram transferidas para membrana de nitrocelulose e utilizadas em experimento de Western blotting com soro policlonal anti-PbFBA1 (1:1000), segundo Fonseca *et al.* (2001) – Figura 2B, linhas 1 e 2.
 - A PbFBA1 recombinante purificada e o sobrenadante obtido a partir da lise celular de suspensão de *E. coli* em PBS 1X transformada com o vetor pGEX-4T-3PbFBA1 foram fracionados por SDS-PAGE 10%, Figura 2C, linhas 1 e 2. Posteriormente as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose e incubadas com anti-PbFBA1 (1:1000) e conjugado acoplado a fosfatase alcalina. A revelação do conjugado foi realizada com substrato cromogênico NBT-BCIP – Figura 2D, linhas 1 e 2.

As proteínas reconhecidas nos extratos protéicos de ambas as fases do fungo pelo anticorpo apresentam mesmo peso molecular que a frutose bifosfato aldolase descrita por Fonseca *et al.* (2001).

A produção do soro policlonal em camundongo utilizando, PbFBA1 recombinante foi realizada no Laboratório Interdisciplinar em Doença de Chagas da Universidade de Brasília, pelo Prf. Dr. Jaime Martins de Santana.

Figura 2 – Western blotting com anticorpo policlonal anti-PbFBA1. A e C mostram o fracionamento de extratos protéicos através de SDS-PAGE 10% corado com Comassie blue. B e D correspondem às membranas de nitrocelulose contendo as proteínas transferidas dos géis mostrados na Figura 2 A e C, respectivamente. Figura A, linha 1 – Extrato protéico total de células leveduriformes de Pb01, 30 microgramas; Figura A, linha 2 – Extrato protéico total de células micelianas de Pb01, 30 microgramas; Figura B, linhas 1 e 2 – Membrana de nitrocelulose contendo os extratos protéicos de ambas as fases do fungo, incubada com anti-PbFBA1 (1:1000) e conjugado acoplado a fosfatase alcalina; Figura C, linha 1 – PbFBA1 recombinante purificada, 0,5 microgramas; Figura C, linha 2 – Sobrenadante da lise celular de *E. coli* transformada com o vetor pGEX-4T-3PbFBA1, 10 microgramas; Figura B, linhas 1 e 2 - Membrana de nitrocelulose incubada com anti-PbFBA1 (1:1000) e conjugado acoplado a fosfatase alcalina. Os marcadores de peso molecular estão evidenciados à esquerda e as setas à direita mostram os pesos moleculares calculados da proteína de fusão PbFBA1-GST – 66 kDa, PbFBA1 recombinante purificada e as proteínas nativas do fungo – 39 kDa, reconhecidas especificamente pelo anticorpo anti-PbFBA1.



V.3- Reatividade Imunológica da PbFBA1 recombinante

Metodologia:

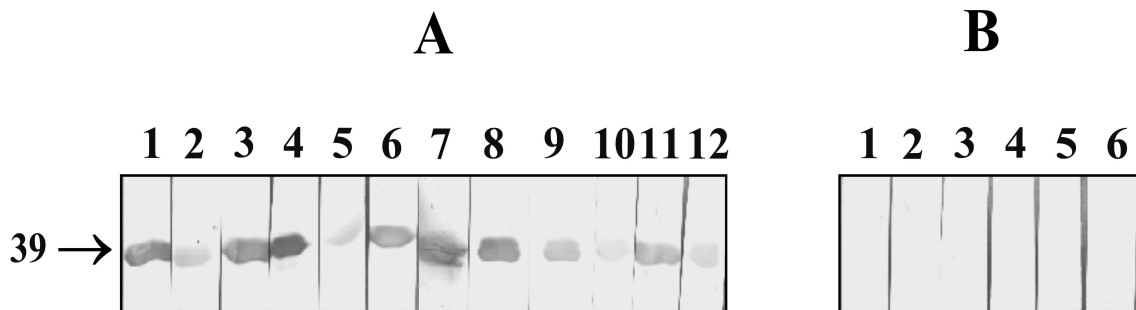
Análise da reatividade imunológica da PbFBA1 recombinante através de Imunoblotting com soro de pacientes com PCM e de indivíduos saudáveis:

- A PbFBA1 recombinante purificada foi fracionada por SDS-PAGE 10% e posteriormente transferida para membrana de nitrocelulose;

- As membranas foram incubadas separadamente com soros de pacientes (1:100) com diagnóstico clínico e laboratorial de PCM (Figura 3A, linhas 1 a 12) e com soro de indivíduos saudáveis (Figura 3B, linhas 1 a 6) e posteriormente com conjugado anti-IgG humano acoplado a fosfatase alcalina (Gibco BRL[®]), segundo Fonseca *et al.* (2001). A revelação do conjugado foi realizada com substrato cromogênico NBT-BCIP.

A proteína recombinante PbFBA1 apresenta reatividade imunológica com anticorpos presentes no soro de pacientes com PCM, semelhante à proteína nativa com mesmo peso molecular descrita por Fonseca *et al.* (2001).

Figura 3 – Imunoblotting da PbFBA1 recombinante com soro de pacientes. A PbFBA1 recombinante (0,5 microgramas) foi submetida a SDS-PAGE 10% e posteriormente transferida para membrana de nitrocelulose. As membranas foram incubadas separadamente com 12 soros de pacientes com PCM (diluição 1:100) – Figura 3A, linhas 1 a 12, e com 6 soros de pacientes saudáveis (diluição 1:100) – Figura 3B, linhas 1 a 6. Após a reação as membranas foram incubadas com conjugado anti-IgG humana acoplado com fosfatase alcalina (diluição 1:1000) e a reação foi revelada com NBT/BCIP. O peso molecular da PbFBA1 recombinante está evidenciado à esquerda.



V.4- Localização celular da FBA de *P. brasiliensis*

Metodologia:

A localização da frutose bifosfato aldolase de *P. brasiliensis* foi realizada através imunoeletromicroscopia de transmissão utilizando o anticorpo anti-PbFBA1 e um conjugado anti-mouse acoplado com partícula de ouro.

- Células leveduriformes de *P. brasiliensis*, crescidas a 36°C por 7 dias, foram fixadas e preparadas em resina para microscopia, segundo Barbosa *et al.* (2006);

- Os cortes intactos foram observados em microscópio de transmissão eletrônica Jeol 1011 (Jeol, Tokyo, Japan) para avaliação das estruturas celulares – Figura 4A;

- A análise imuno-citoquímica dos cortes foi realizada após incubação de 1 hora com anticorpo anti-PbFBA1 recombinante (diluído 1:100) e posteriormente com anticorpo secundário (anti-mouse IgG, acoplado a partícula de ouro coloidal, 10 nanômetros; diluído 1:20), seguida de tratamento para evidenciação das partículas, segundo Barbosa *et al.* (2006);

- A observação dos cortes tratados com o anticorpo Anti-PbFBA1 foi realizada em microscópio de transmissão eletrônica Jeol 1011 (Jeol, Tokyo, Japan) para observação das partículas de ouro (Figura 4 B e E). Os controles foram incubados com soro pré-imune de camundongo (diluído 1:100), seguido do anticorpo secundário (Figura 4C) e somente com o anticorpo secundário (Figura 4D).

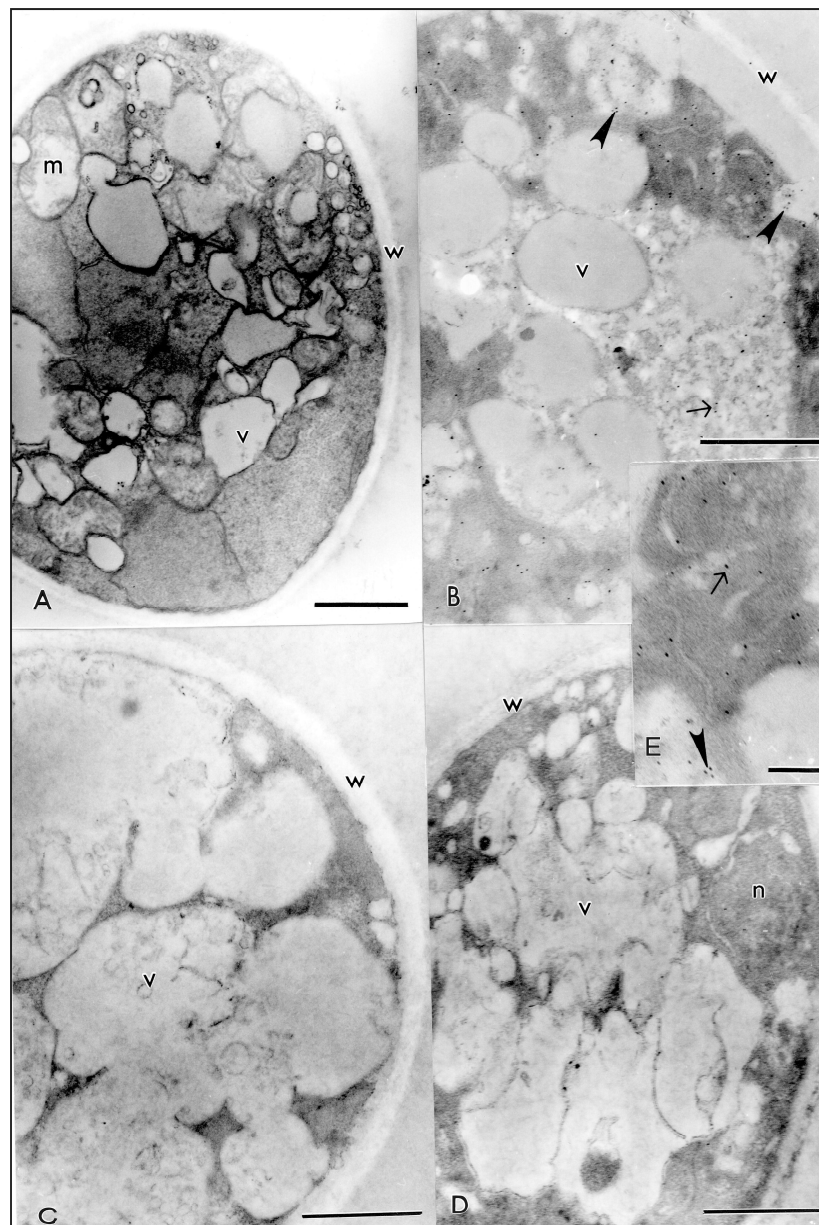
A observação das partículas de ouro nos cortes tratados com o anticorpo anti-PbFBA1 recombinante evidenciou a localização da frutose bifosfato aldolase de *P. brasiliensis* essencialmente no citoplasma das células leveduriformes.

A identificação desta proteína no citoplasma das células foi comparada com os resultados de “Western blotting” realizados com extrato de proteínas citoplasmáticas solúveis obtido por

maceração mecânica de células leveduriformes do isolado Pb01, lavadas exaustivamente com tampão PBS 1X e extrato “cell free” preparado segundo Andreotti *et al.* (2005). A proteína de peso molecular 39 kDa foi observada somente no extrato de células leveduriformes e não no extrato “cell free” (dados não mostrados).

Os dados do experimento de citolocalização da frutose bifosfato aldolase de *P. brasiliensis* foram obtidos em colaboração com a colega de doutorado Mônica Santiago Barbosa e a Prf^a. Dr^a. Sônia Nair Bao do Laboratório de Microscopia Eletrônica da Universidade de Brasília.

Figura 4- Imuno-citocalização da FBA em célula leveduriforme de *P. brasiliensis*. A- célula leveduriforme do isolado Pb01; B- Célula leveduriforme tratada com anticorpo anti-PbFBA1 e conjugado acoplado a partícula de ouro; C- Controle tratado com soro pré-imune de camundongo; D- Controle tratado somente com conjugado; E- Detalhe de região da Figura 4B em aumento de 10X. As estruturas celulares estão designadas por letras minúsculas: núcleo (n), vacúolo intra-citoplasmático (v), mitocôndria (m) e parede celular (w). Barras - 1 μm (A), 1,3 μm (B), 1,2 μm (C), 1,2 μm (D) e 0,7 μm (E). As setas evidenciadas mostram as partículas de ouro do conjugado reconhecendo o anticorpo anti-PbFBA1 apenas no citoplasma da célula leveduriforme.



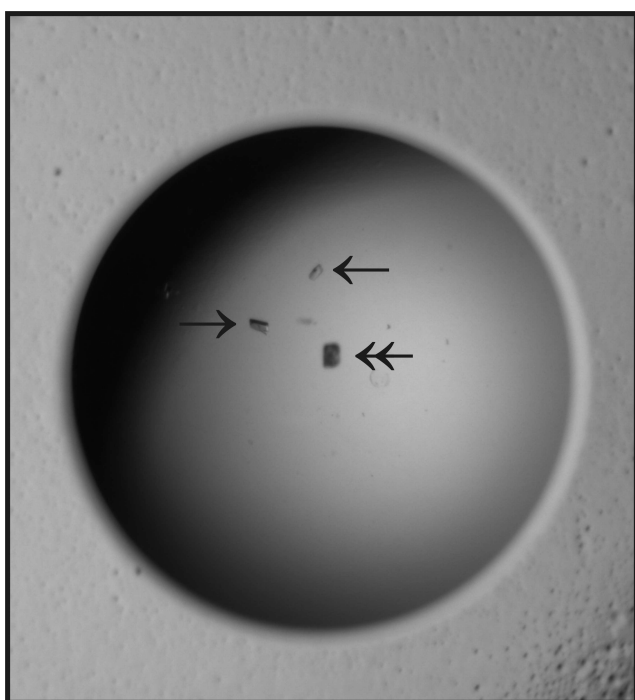
V.5- Cristalização da proteína PbTPI recombinante

Metodologia:

Os cristais foram obtidos após Screen 1, em sistema comercial da Hampton research® - Pre-Crystallization Test™, a partir do processo de difusão de vapor por gota suspensa. O método de screen utilizado consiste em colocar 300uL da condição testada no poço da placa e em lamínula tamanho 22X22 mm com intuito de produzir uma gota com 2uL da solução da proteína com 2uL da mesma condição aplicada no poço. Esse procedimento se repete para todas as 50 condições testadas com o sistema comercial.

Os dados preliminares obtidos do experimento de cristalização da PbTPI recombinante de *P. brasiliensis* foram obtidos em colaboração com o Prof. Dr. Benildo Sousa Cavada do Laboratório de Moléculas Biologicamente Ativas da Universidade Federal do Ceará.

Figura 5- Cristais de PbTPI recombinante. Gota de solução de PEG 8000 20% observada em aumento de 20X contendo cristais da PbTPI recombinante. A fotografia abaixo mostra a única condição (0,2M de Acetato de magnésio tetrahidratado, 0,1M de Cacodilato de sódio trihidratado em pH 6,5 e PEG 8000 20%) em que foram obtidos cristais de proteína. As setas simples mostram cristais pequenos e translúcidos, comuns de proteínas. A seta dupla mostra um cristal opaco e de tamanho maior, comum de sal.



VI- CONCLUSÕES

As conclusões finais do trabalho são:

- Diversos organismos, como bactérias, fungos e protozoários apresentam característica patogênica aos seres humanos devido a um determinante em comum que é a sua capacidade de ligação às moléculas do hospedeiro, presentes na superfície das células e tecidos. As moléculas dos patógenos responsáveis por esta função são denominadas adesinas (Soto & Hultgren, 1999). Neste trabalho demos sequência à caracterização da proteína TPI de *P. brasiliensis* como adesina potencialmente envolvida nos mecanismos de adesão e invasão, requeridos durante o processo infectivo do fungo. A partir da sequência completa do cDNA que codifica para a TPI de *P. brasiliensis* e sua consequente expressão heteróloga e purificação da proteína recombinante foi possível, através da imunização em coelhos, a obtenção de um anticorpo policlonal que reconhece especificamente a TPI nativa do fungo.

- O anticorpo anti-PbTPI reconhece a proteína nativa em ambas as fases do fungo, o que favoreceu a análise da expressão da PbTPI em alguns pontos da transição da fase miceliana para leveduriforme através de experimentos de Western-blotting. A triose fosfato isomerase de *P. brasiliensis* está preferencialmente expressa na fase leveduriforme. Este dado foi corroborado, com a análise de atividade enzimática específica para TPI em extratos proteicos de ambas as fases do fungo, que mostrou um maior número de unidades enzimáticas no extrato protéico de levedura do que em micélio. Paralelamente foi analisada a atividade enzimática da TPI de *P. brasiliensis* em extrato *cell free* de culturas do fungo na fase leveduriforme, mostrando a presença da mesma, o que possivelmente nos leva a crer que o

fungo seja capaz de secretar esta enzima.

- Com o intuito de se definir a localização celular da TPI em *P. brasiliensis*, realizamos inicialmente experimentos de Western blotting, utilizando extrato de proteínas presentes na porção mais superficial da parede do fungo. Os resultados mostraram a presença da TPI no extrato “cell free” obtido de células leveduriformes de *P. brasiliensis*. A evidência da localização desta proteína na superfície do fungo foi confirmada posteriormente com a realização de experimentos de imunocitoquímica associada à microscopia eletrônica de transmissão de células leveduriformes, mostrando que a TPI esta presente na parede, bem como no citoplasma do fungo.

- Embora *P. brasiliensis* não seja considerado um organismo intracelular obrigatório, foi relatado que o fungo pode aderir e invadir células epiteliais *in vitro* e *in vivo*. Aceita-se que a adesão do patógeno às células do hospedeiro seja um pré-requisito para o estabelecimento da infecção. Neste trabalho foi mostrado através dos resultados de experimentos de “Western blotting” de afinidade que a PbTPI recombinante foi capaz de ligar a laminina e fibronectina, condição observada também em outras proteínas de *P. brasiliensis*, caracterizadas com possíveis adesinas. Foi sugerido que a habilidade de *S. aureus* de se ligar a ambas, laminina e fibronectina, representaria um mecanismo importante pelo qual o micro-organismo poderia aderir e colonizar diferentes tecidos no hospedeiro. Do mesmo modo, a laminina parece ser importante para a adesão de *P. brasiliensis* (Mendes-Giannini *et al.*, 2006), podendo participar na disseminação e invasão tecidual por parte desse fungo (Andreotti *et al.*, 2005; Vicentini *et al.*, 1994)

- O comportamento de adesina da TPI de *P. brasiliensis*, foi avaliado também pela interação da proteína recombinante com culturas celulares de pneumócitos (A549) e células Vero. Foi verificado que a proteína se liga às células da monocamada e é detectada por

“Western blotting” no extrato total da cultura obtido após lise osmótica. Este comportamento da molécula reforça a hipótese do seu papel como adesina. Os indícios observados nos levam a crer que regiões específicas da PbTPI, bem como sua conformação espacial possam favorecer a ligação da mesma a componentes da ECM.

- Ensaios com células leveduriformes do isolado Pb01 pré-incubadas com anticorpo policlonal anti-PbTPI mostraram forte inibição da adesão e conseqüentemente internalização do fungo em culturas celulares de pneumócitos e células Vero, sugerindo sua influência na adesão e invasão do fungo a tecidos, etapas primordiais no processo infectivo de *P. brasiliensis*.

A presença de PbTPI em quantidades mais significativas na fase leveduriforme de *P. brasiliensis* do que na fase miceliana, sugere um possível papel da TPI na fase parasitária deste fungo. Além disso, esta proteína está localizada na parede celular de *P. brasiliensis* onde ela foi capaz de interagir com os componentes da ECM, como laminina e fibronectina. Os dados sugerem que a TPI está potencialmente envolvida nos mecanismos de adesão e colonização de tecidos, requeridos durante o processo infectivo do fungo. Esses dados podem levar a uma melhor compreensão da interação de *P. brasiliensis* com o hospedeiro e da patogênese da PCM.

- Paralelamente ao projeto principal do doutorado iniciamos a caracterização funcional de outra enzima da via glicolítica do fungo *P. brasiliensis*, a frutose 1,6-bifosfato aldolase 1. Foi obtida a PbFBA1 recombinante purificada, que apresenta o mesmo peso molecular da seqüência predita de aminoácidos da *Pbfb1*, descrita anteriormente, bem como da FBA nativa também descrita. O anticorpo policlonal anti-PbFBA1 produzido em camundongo reconhece especificamente uma proteína de 39 kDa no extrato protéico total de ambas as fases do isolado Pb01. Utilizando-se o anticorpo anti-PbFBA1 realizamos experimento de imuno-

citocalização, evidenciando que esta proteína está presente essencialmente no citoplasma do fungo, confirmada por “Western blotting” realizado com proteínas solúveis de ambas as fases do fungo. A PbFBA1 recombinante é reconhecida por anticorpos presentes no soro de pacientes portadores de PCM e não de indivíduos saudáveis, semelhante à FBA nativa descrita anteriormente.

Dado os recentes relatos na literatura do papel das FBA como antígeno em outros microorganismos patogênicos, acreditamos que esta molécula em *P. brasiliensis* possa desempenhar importante papel no processo infeccioso e se apresenta ainda como foco de possíveis estudos para o futuro, necessitando a realização de mais experimentos para se avaliar o seu papel funcional.

VII- PERSPECTIVAS

A realização desse trabalho permitiu a visualização das seguintes perspectivas:

- 1- Mapear os epítomos da molécula TPI, que efetivamente interagem com as proteínas da MEC;
- 2- Avaliar o potencial papel protetor da TPI contra infecção por *P. brasiliensis*, através de PCM em modelos animais;
- 3- Caracterizar a estrutura tridimensional da PbTPI, através de cristalografia de proteína (em andamento)
- 4- Caracterizar enzimaticamente a PbTPI recombinante, bem como a TPI nativa;

VIII- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Andreotti PF, Monteiro da Silva JL, Bailão AM, Soares CM, Benard G, Soares CP, Mendes-Giannini MJ 2005. Isolation and partial characterization of a 30 kDa adhesin from *Paracoccidioides brasiliensis*. *Microbes Infect* 7(5-6):875-81.

Bagagli E, Bosco S M, Theodoro R C, Franco M. 2006. Phylogenetic and evolutionary aspects of *Paracoccidioides brasiliensis* reveal a long coexistence with animal hosts that explain several biological features of the pathogen. *Infect Genet Evol* 6:344-51.

Barbosa MS, Bão SN, Andreotti PF, de Faria FP, Felipe MS, dos Santos Feitosa L, Mendes-Giannini MJ, Soares CM 2006. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Paracoccidioides brasiliensis* is a cell surface protein involved in fungal adhesion to extracellular matrix proteins and interaction with cells. *Infect Immun* 74(1):382-9.

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.

Bastos KP, Bailão AM, Borges CL, Faria FP, Felipe MS, Silva MG, Martins WS, Fiúza RB, Pereira M, Soares CM 2007. The transcriptome analysis of early morphogenesis in *Paracoccidioides brasiliensis* mycelium reveals novel and induced genes potentially associated to the dimorphic process. *BMC Microbiol* 7:29.

Beck K, Hunter I, Engel J 1990. Structure and function of laminin; anatomy of a multidomain glycoprotein. *FASEB J* 4:148-160.

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.

Bouchara JP, Sánchez M, Chevailler A, Marot-Leblond A, Lissitzky JC, Tronchin G, Chabasse D 1997. Sialic acid-dependent recognition of laminin and fibronogen by *Aspergillus fumigatus* conidia. *Infect Immun* 65:2717-2724.

Brandhorst T, Wüthrich M, Finkel-Jimenez B, Klein B 2003. A C-terminal EGF-like domain governs BAD1 localization to the yeast surface and fungal adherence to phagocytes, but is dispensable in immune modulation and pathogenicity of *Blastomyces dermatitidis*. *Mol Microbiol* 48(1):53-65.

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

Butler LM, Khan S, Rainger GE, Nash GB 2008. Effects of endothelial basement membrane on neutrophil adhesion and migration. *Cell Immunol (in press)*.

Carrero LL, Niño-Vega G, Teixeira MM, Carvalho MJ, Soares CM, Pereira M, Jesuino RS, McEwen JG, Mendoza L, Taylor JW, Felipe MS, San-Blas G 2008. New *Paracoccidioides brasiliensis* isolate reveals unexpected genomic variability in this human pathogen. *Fungal Genet Biol*. 45:605-612.

Castro NS, Barbosa MS, Maia ZA, Bão SN, Felipe MS, Santana JM, Soares Mendes-Giannini MJ, Pereira M, de Almeida Soares CM 2008. Characterization of *Paracoccidioides brasiliensis* PbDfg5p, a cell-wall protein implicated in filamentous growth. *Yeast* 25(2):141-54.

Corredor GG, Peralta LA, Castaño JH, Zuluaga JS, Henao B, Arango M, Tabares AM, Matute DR, McEwen JG, Restrepo A 2005. The naked-tailed armadillo *Cabassous centralis* (Miller 1899): a new host to *Paracoccidioides brasiliensis*. Molecular identification of the isolate. *Med Mycol* 43:275-280.

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.
- Di Lullo GA, Sweeney SM, Korkko J, Ala-Kokko L, San Antonio JD 2002. Mapping the ligand-binding sites and disease-associated mutations on the most abundant protein in the human, type I collagen. *J Biol Chem* 277(6):4223-31.
- Felipe MS, Andrade RV, Petrofeza SS, Maranhão AQ, Torres FA, Albuquerque P, Arraes FB, Arruda M, Azevedo MO, Baptista AJ, Bataus LA, Borges CL, Campos EG, Cruz MR, Daher BS, Dantas A, Ferreira MA, Ghil GV, Jesuino RS, Kyaw CM, Leitão L, Martins CR, Moraes LM, Neves EO, Nicola AM, Alves ES, Parente JA, Pereira M, Poças-Fonseca MJ, Resende R, Ribeiro BM, Saldanha RR, Santos SC, Silva-Pereira I, Silva MA, Silveira E, Simões IC, Soares RB, Souza DP, De-Souza MT, Andrade EV, Xavier MA, Veiga HP, Venancio EJ, Carvalho MJ, Oliveira AG, Inoue MK, Almeida NF, Walter ME, Soares CMA, Brígido MM 2003. Transcriptome characterization of the dimorphic and pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* by EST analysis. *Yeast*. 20:263-271.
- Felipe MS, Andrade RV, Arraes FB, Nicola AM, Maranhão AQ, Torres FA, Silva-Pereira I, Poças-Fonseca MJ, Campos EG, Moraes LM, Andrade PA, Tavares AH, Silva SS, Kyaw CM, Souza DP, Pereira M, Jesuino RS, Andrade EV, Parente JA, Oliveira GS, Barbosa MS, Martins NF, Fachin AL, Cardoso RS, Passos GA, Almeida NF, Walter ME, Soares CMA, Carvalho MJ, Brígido MM 2005. Transcriptional profiles of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* in mycelium and yeast cells. *J Biol Chem* 280(26):24706-24714.
- Fernández-Arenas E, Molero G, Nombela C, Diez-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.
- Figueiredo CC, De Lima OC, De Carvalho L, Lopes-Bezerra LM, Morandi V 2004. The in vitro interaction of *Sporothrix schenckii* with human endothelial cells is modulated by cytokines and involves endothelial surface molecules. *Microb Pathog* 36(4):177-88.
- Filler SG 2006. Candida-host cell receptor-ligand interactions. *Curr Opin Microbiol* 9:333-339.

Fonseca CA, Jesuíno 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 1987. Host-parasite relationships in paracoccidioidomycosis. *J Med Vet Mycol* 25:5-18.

Ganendren R, Carter E, Sorrell T, Widmer F, Wright L 2006. Phospholipase B activity enhances adhesion of *Cryptococcus neoformans* to a human lung epithelial cell line. *Microbes Infect* (4):1006-15.

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.

Gesztesi JL, Puccia R, Travassos LR, Vicentini AP, de Moraes JZ, Franco MF, Lopes JD 1996. Monoclonal antibodies against the 43,000 Da glycoprotein from *Paracoccidioides brasiliensis* modulate laminin-mediated fungal adhesion to epithelial cells and pathogenesis. *Hybridoma* 15(6):415-22.

Gil ML, Peñalver MC, López-Ribot JL, O'Connor JE, Martinez JP 1996. Binding of extracellular matrix proteins to *Aspergillus fumigatus* conidia. *Infect Immun* 64:5239-5247.

González A, Gómez BL, Diez S, Hernández O, Restrepo A, Hamilton AJ, Cano LE 2005. Purification and partial characterization of a *Paracoccidioides brasiliensis* protein with capacity to bind to extracellular matrix proteins. *Infect Immun* 73(4):2486-95.

González A, Gómez BL, Muñoz C, Aristizabal BH, Restrepo A, Hamilton AJ, Cano LE. 2008. Involvement of extracellular matrix proteins in the course of experimental paracoccidioidomycosis. *FEMS Immunol Med Microbiol* 53(1):114-25.

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.

Hanna SA, Monteiro da Silva JL, Giannini MJ 2000. Adherence and intracellular parasitism of *Paracoccidioides brasiliensis* in Vero cells. *Microbes Infect* 2(8):877-84.

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.

Hung CY, Yu JJ, Seshan KR, Reichard U, Cole GT 2002. A parasitic phase-specific adhesin of *Coccidioides immitis* contributes to the virulence of this respiratory Fungal pathogen. *Infect Immun* 70(7):3443-56.

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.

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

Kottom TJ, Köhler JR, Thomas CF Jr, Fink GR, Limper AH 2003. Lung epithelial cells and extracellular matrix components induce expression of *Pneumocystis carinii* STE20, a gene complementing the mating and pseudohyphal growth defects of STE20 mutant yeast. *Infect Immun* 71(11):6463-71.

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.

Lebleu VS, Macdonald B, Kalluri R 2007. Structure and Function of Basement Membranes. *Exp Biol Med* 232: 1121–1129.

Lenzi HL, Calich VLG, Mendes-Giannini MJS, Xidiex CF, Miyaji M, Mota EM, Machado MP, Restrepo A 2000. Two patterns of extracellular matrix expression in experimental paracoccidioidomycosis. *Med Mycol* 38:115-119.

Lima OC, Bouchara JP, Renier G, Marot-Leblond A, Chabasse D, Lopes-Bezerra LM 2004. Immunofluorescence and flow cytometry analysis of fibronectin and laminin binding to *Sporothrix schenckii* yeast cells and conidia. *Microb Pathog* 37(3):131-40.

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 1986. Paracoccidioidomicose. 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.

Marques ER, Ferreira ME, Drummond RD, Felix JM, Menossi M, Savoldi M, Travassos LR, Puccia R, Batista WL, Carvalho KC, Goldman MH, Goldman GH 2004. Identification of genes preferentially expressed in the pathogenic yeast phase of *Paracoccidioides brasiliensis*, using suppression subtraction hybridization and differential macroarray analysis. *Mol Genet Genomics* 271(6):667-77.

Matute DR, McEwen JG, Puccia R, Montes BA, San-Blas G, Bagagli E, Rauscher JT, Restrepo A, Morais F, Nino-Vega G, Taylor JW 2006. Cryptic speciation and recombination

in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* as revealed by gene genealogies. *Mol Biol Evol* 23:65-73.

McMahon JP, Wheat J, Sobel ME, Pasula R, Downing JF and Martin WJ 1995. Murine laminin binds to *Histoplasma capsulatum*. A possible mechanism of dissemination. *J Clin Invest* 96:1010-1017.

Mendes-Giannini MJ, Taylor ML, Bouchara JB, Burger E, Calich VL, Escalante ED, Hanna SA, Lenzi HL, Machado MP, Miyaji M, Monteiro Da Silva JL, Mota EM, Restrepo A, Restrepo S, Tronchin G, Vincenzi LR, Xidieh CF, Zenteno E 2000. Pathogenesis II: fungal responses to host responses: interaction of host cells with fungi. *Med Mycol* 38 Suppl 1:113-23.

Mendes-Giannini MJ, Andreotti PF, Vincenzi LR, da Silva JL, Lenzi HL, Benard G, Zancopé-Oliveira R, de Matos Guedes HL, Soares CP 2006. Binding of extracellular matrix proteins to *Paracoccidioides brasiliensis*. *Microbes Infect* 8(6):1550-9.

Mendes-Giannini MJ, Monteiro da Silva JL, de Fátima da Silva J, Donofrio FC, Miranda ET, Andreotti PF, Soares CP 2008. Interactions of *Paracoccidioides brasiliensis* with host cells: recent advances. *Mycopathologia* 165:237–248.

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.

Mohri H 1996. Fibronectin and integrin interactions. *J Invest Med* 44:429-441.

Nunes LR, Costa de Oliveira R, Leite DB, da Silva VS, dos Reis Marques E, da Silva Ferreira ME, Ribeiro DC, de Souza Bernardes LA, Goldman MH, Puccia R, Travassos LR, Batista WL, Nóbrega MP, Nobrega FG, Yang DY, de Bragança Pereira CA, Goldman GH 2005. Transcriptome analysis of *Paracoccidioides brasiliensis* cells undergoing mycelium-to-yeast

transition. *Eukaryot Cell* 4(12):2115-2128.

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.

Patti JM, Allen BL, McGavin MJ and Hook M 1994. MSCRAMM-mediated adherence of microorganisms to host tissues. *Annu Rev Microbiol* 48:585-617.

Pereira LA, Pereira M, Felipe MS, Zancopé-Oliveira RM, Soares CM 2004. Proteomic identification, nucleotide sequence, heterologous expression and immunological reactivity of the triosephosphate isomerase of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Microbes Infect* 6(10):892-900.

Pereira LA, Bão SN, Barbosa MS, da Silva JL, Felipe MS, de Santana JM, Mendes-Giannini MJ, de Almeida Soares CM 2007. Analysis of the *Paracoccidioides brasiliensis* triosephosphate isomerase suggests the potential for adhesin function. *FEMS Yeast Res* 7(8):1381-8.

Queiroz-Telles F 1994. *Paracoccidioides brasiliensis* ultrastructural Wndings. In: Franco M, Lacaz CS, Restrepo-Moreno A, Del Negro G (Eds.), *Paracoccidioidomycosis*. CRC Press, London, p. 27-44.

Reis VLL, Rolla VC, Rangel CA, Sampaio MBNO, Tavares W, Praxedes H, Rocha WB 1986. Paracoccidioidomicose disseminada aguda com extenso derrame pleural. *Arq Bras Med* 60:275-80.

Restrepo A, Tobón A. 2005. *Paracoccidioides brasiliensis*. In: Mandell GL, Bennett JE, Dollin R (Eds), *Principles and Practice of Infectious Diseases*, Philadelphia, p. 3062-3068.

Restrepo-Moreno A 2003. Paracoccidioidomycosis. In: Dismukes, W.E., Pappas, P.G., Sobel, J. (Eds.), *Clinical Mycology*. Oxford University Press, New York, p 328-345.

Richini-Pereira VB, Bosco Sde M, Griese J, Theodoro RC, Macoris SA, da Silva RJ, Barrozo L, Tavares PM, Zancopé-Oliveira RM, Bagagli E 2008. Molecular detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in road-killed wild animals. *Med Mycol*. 46:35-40.

Roman J, Rivera HN, Roser-Page S, Sitaraman SV, Ritzenthaler JD 2006. Adenosine induces fibronectin expression in lung epithelial cells: implications for airway remodeling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 290(2):L317-25.

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.

Sandini S, La Valle R, De Bernardis F, Macrì C, Cassone A 2007. The 65 kDa mannoprotein gene of *Candida albicans* encodes a putative beta-glucanase adhesin required for hyphal morphogenesis and experimental pathogenicity. *Cell Microbiol* 9(5):1223-38.

Santangelo R, Zoellner H, Sorrell T, Wilson C, Donald C, Djordjevic J, Shounan Y, Wright L 2004. Role of extracellular phospholipases and mononuclear phagocytes in dissemination of cryptococcosis in a murine model. *Infect Immun* 72(4):2229-39.

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.

Silva SP, Felipe MSS, Pereira M, Azevedo MO, Soares CMA 1994. Phase transition and stage-specific protein synthesis in the dimorphic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Exp Mycol* 18: 294-299.

Sheppard DC, Yeaman MR, Welch WH, Phan QT, Fu Y, Ibrahim AS, Filler SG, Zhang M, Waring AJ, Edwards Jr JE 2004. Functional and Structural Diversity in the Als Protein Family of *Candida albicans*. *J Biol Chem* 279:30480–30489.

Shikanai-Yasuda MA, Telles Filho F de Q, Mendes RP, Colombo AL, Moretti ML 2006. Guidelines in paracoccidioidomycosis. *Rev Soc Bras Med Trop* 39(3):297-310.

Sullivan DJ, Moran GP, Pinjon E, Al-Mosaid A, Stokes C, Vaughan C, Coleman DC 2004. Comparison of the epidemiology, drug resistance mechanisms, and virulence of *Candida dubliniensis* and *Candida albicans*. *FEMS Yeast Res* 4(4-5):369-76.

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.

Terçarioli GR, Bagagli E, Reis GM, Theodoro RC, Bosco SM, Macoris SA, Richini-Pereira VB 2007. Ecological study of *Paracoccidioides brasiliensis* in soil: growth ability, conidia production and molecular detection. *BMC Microbiol* 7:92.

Tobón AM, Agudelo CA, Osorio ML, Alvarez DL, Arango M, Cano LE, Restrepo A 2003. Residual pulmonary abnormalities in adult patients with chronic paracoccidioidomycosis: prolonged follow-up after itraconazole therapy. *Clin Infect Dis* 37(7):898-904.

Vakonakis I and Campbell ID 2007. Extracellular matrix: from atomic resolution to ultrastructure. *Current Opinion in Cell Biol* 19:578–583.

Verstrepen KJ and Klis FM 2006. Flocculation, adhesion and biofilm formation in yeasts. *Molecular Microbiology* 60(1):5-15.

Vicentini AP, Gesztesi JL, Franco MF, de Souza W, de Moraes JZ, Travassos LR, Lopes JD 1994. Binding of *Paracoccidioides brasiliensis* to laminin through surface glycoprotein gp43 leads to enhancement of fungal pathogenesis. *Infect Immun* 62(4):1465-9.

Zhao X, Oh SH, Cheng G, Green CB, Nuessen JA, Yeater K, Leng RP, Brown AJ, Hoyer LL 2004. ALS3 and ALS8 represent a single locus that encodes a *Candida albicans* adhesin; functional comparisons between Als3p and Als1p. *Microbiology* 150(Pt 7):2415-28.

Zhu Y, Si J, Harn DA, Yu C, Liang Y, Ren J, Yin X, He W, Hua W 2004. The protective immunity of a DNA vaccine encoding *Schistosoma japonicum* Chinese strain triose-phosphate isomerase in infected BALB/C mice. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 35(3):518-22.

Zhu Y, Si J, Harn DA, Xu M, Ren J, Yu C, Liang Y, Yin X, He W, Cao G 2006. *Schistosoma japonicum* triose-phosphate isomerase plasmid DNA vaccine protects pigs against challenge infection. *Parasitology* 132(Pt 1):67-71.

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

Wright A, Li YH, Zhu C 2008. The differential effect of endothelial cell factors on in vitro motility of malignant and non-malignant cells. *Ann Biomed Eng* 36(6):958-69.

Wüthrich M, Finkel-Jimenez B, Brandhorst TT, Filutowicz HI, Warner T, Klein BS 2006. Analysis of non-adhesive pathogenic mechanisms of BAD1 on *Blastomyces dermatitidis*. *Med Mycol* 44(1):41-9.

IX- ANEXOS

Anexo I- Sequência de nucleotídeos do cDNA, do gene e de aminoácidos deduzida da TPI de *P. brasiliensis*. Esta figura é parte integrante do trabalho “*Proteomic identification, nucleotide sequence, heterologous expression and immunological reactivity of the triosephosphate isomerase of Paracoccidioides brasiliensis*” publicado na revista *Microbes and infection* 6(2004) 892-900.

```
-80 gtctcctaaaccttcaacgaaccatttaactatataatcctagaaattcttattcatttattccogtcaaataaaggata
-19 ataaaattctccagccaccATGCCTCGTAAATTCCTTTGTTGGCGGCAACTCAAGATgtatgtgtgtctgttcctgaat
      M P R K F F V G G N F K M
62 caaaacgtcaaattgctctaccacaccccaaaatcttctataacaaccggaa[tactga]aaatcacttccactactc
142 aattccattccaccagGAATGGCACCGCTAAATCTATCACCCATATCATCACCAACCTCAACTCTGCCAAGCTTGATCC
      N G T A K S I T H I I T N L N S A K L D P
14  TTCCACTGAAATTGTCATCGCCCGCCTGCAATCTACCTGGTGTCTGCACGACAACCTGCGAACGGCCAAGTCGCCGTTT
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 CTGCACAGAAATGTTGATAAGCCTAATGGAGCCTTTACTGGGGAGTTGAGCGTGGAACAGCTCAGAGATGAAAAATC
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 I
382 ACTTGGACGTTGGCTGGACATAGCGAACGAAGATTTTACTCAGAGAAGATGATGAGgtatgttggatttcttatagta
88  T W T L A G H S E R R V L L R E D D E
462 tgtgtggtggtgcaagattttgtttccottaacactatattatcattttatgcccgaatcggtccatttttaagtta
542 gtcccgttattttccaattcccaacgctgctgtattgagattcgtgatatcttcccaacttt[aactaa]attgtcata
622 ccggaatatt[ag]TTGTAGCACGAAAACAAAGGCTGCCATTAACGGTGGTCTCAATGTAATTCCTTGCATTGGCGAGT
107      F V A R K T K A A I N G G L N V I L C I G E
702 CTCTTGAGgtaaactaccaccatttcgatattaaacccttttatgtagttgaaatatcgaaaacgaaggcaaaacaaa
129 S L E
782 agattctcaggggaacgtgtttcoggtgaagcga[agctgac]gacacggtctccatata[ag]AACCGGAAGCTGGAAAG
132      E R E A G K
862 ACTATCGATGTTGTAACAAGGCAATTGGACGCGGTTGCCGAGGAAGTCTCTCTGCAGAATGGAATAAGGTCGCATCGC
138 T I D V V T R Q L D A V A E E V S P A E W N K V V I A
942 CTATGAGCCCATCTGgtataactgcttctacgtttcattgtctttcaagaacgaacctacaa[tcctaac]aaccactcca
165 Y E P I W
1022 cctcccagGGCCATCGGAACGGGCAAGGTCGCCACAACAGAGCAAGCACAAGAAGTGCATGCCTCCATCCGGAATGGC
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 TGAATGAGAAAATCTCCCTGAAGCGGCGAAAACACCCCGGTTATTACGGCGGAAGCGTTACGGAGAGCAACTGTCGG
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 GATCTCGCCGCGCAGCCTGATGTTGACGGGTTTTGGTGGGCGGAGCTAGTTTAAACCTGCTgtatgttttcacagaat
220 D L A A Q P D V D G F L V G G A S L K P A
1262 attgtcatgataggaataccccatcctgcaaacggataaat[tactaac]tcaagtcgcagTTTGTGCATATCATCAACGCC
241      F V D I I N A
1342 CGTTTATAGacgggttttgtagtttagttcttagttacgacataaaatcccttacggcagaatgacgttttcctagtcctc
248 R L *
1422 cagtttctttccgctaacactgccataaaagctgatattgggttatgcggttattggaacctggagacctgacatgga
1502 aatggcctgacttctgttttgaattgaaaataataaataataaacactgttcgtcagtgacgtatttatatct
```

Figure 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 introns 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 introns 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 on gray box represent sequences identified by micro sequencing of the endoproteinase Lys-C digested peptides of the 29-kDa antigen recognized by serum of PCM patients.

Anexo II. – Correspondência da revista *FEMS Yeast Research*.



FEMS Yeast Research: *Copyright Assignment Form*

Author's name: Luiz Augusto Pereira.....

Author's address: Laboratório de Biologia Molecular, ICB II, Campus II- Universidade Federal de Goiás, 74001-970, Goiânia- Goiás, Brazil

Title of article ("Article"): Analysis of the *Paracoccidioides brasiliensis* Triosephosphate Isomerase suggests the potential for adhesin function.....

Manuscript no. (if known): FEMSYR-07-02-0027.R1

Names of all authors in the order in which they appear in the Article: Luiz Augusto Pereira; Sonia Nair Bão, Mônica Santiago Barbosa, Juliana Leal Monteiro da Silva, Maria Sueli Soares Felipe, Jaime Martins de Santana, Maria José Soares Mendes-Giannini and Célia Maria de Almeida Soares.

To enable Blackwell Publishing Ltd (Blackwell Publishing) to publish your Article in *FEMS Yeast Research* (the Journal), the ownership of copyright must be established. The Article is deemed to include all material submitted for publication with the exception of Letters to the Editor, and includes the text, figures, tables, author contact details and all supplementary material accompanying the Article.

Please read this form carefully, sign at the bottom (if your employer owns copyright in your work, arrange for your employer to sign where marked), and return the ORIGINAL to the address below. (US Federal Government authors please note: your Article is in the public domain.)

Your Article will not be published unless a Copyright Assignment Form has been signed and received by Blackwell Publishing.

Please note: You retain the following rights to re-use the Article, as long as you do not sell or reproduce the Article or any part of it for commercial purposes (i.e. for monetary gain on your own account or on that of a third party, or for indirect financial gain by a commercial entity). These rights apply without needing to seek permission from Blackwell Publishing.

- **Prior to acceptance:** Provided that you acknowledge that the Article has been submitted for publication in the Journal by the Federation of Microbiological Societies and Blackwell Publishing you may use the unpublished Article, in form and content as submitted for publication in the Journal, in the following ways:
 - you may share print or electronic copies of the Article with colleagues;
 - you may post an electronic version of the Article on your own personal website, on your employer's website/repository and on free public servers in your subject area.
- **After acceptance:** Provided that you give appropriate acknowledgement to the Journal, the Federation of Microbiological Societies and Blackwell Publishing, and full bibliographic reference for the Article when it is published, you may use the accepted version of the Article as originally submitted for publication in the Journal, and updated to include any amendments made after peer review, in the following ways:
 - you may share print or electronic copies of the Article with colleagues;
 - you may use all or part of the Article and abstract, without revision or modification, in personal compilations or other publications of your own work;
 - you may use the Article within your employer's institution or company for educational or research purposes, including use in course packs;
 - 12 months after publication you may post an electronic version of the Article on your own personal website, on your employer's website/repository and on free public servers in your subject area. Electronic versions of the accepted Article must include a link to the published version of the Article together with the following text: 'The definitive version is available at www.blackwell-synergy.com'.

Please note that you are not permitted to post the Blackwell Publishing PDF version of the Article online.

All requests by third parties to re-use the Article in whole or in part will be handled by Blackwell Publishing. Any permission fees will be retained by the Journal. All requests to adapt substantial parts of the Article in another publication (including publication by Blackwell Publishing) will be subject to your approval (which is deemed to be given if we have not heard from you within 4 weeks of your approval being sought by us writing to you at your last notified address). Please address any queries to journalsrights@oxon.blackwellpublishing.com.

In signing this Agreement:

1. You hereby warrant that this Article is an original work, has not been published before and is not being considered for publication elsewhere in its final form either in printed or electronic form;
2. You hereby warrant that you have obtained permission from the copyright holder to reproduce in the Article (in all media including print and electronic form) material not owned by you, and that you have acknowledged the source;
3. You hereby warrant that this Article contains no violation of any existing copyright or other third party right or any material of an obscene, indecent, libellous or otherwise unlawful nature and that to the best of your knowledge this Article does not infringe the rights of others;
4. You hereby warrant that in the case of a multi-authored Article you have obtained, in writing, authorization to enter into this Agreement on their behalf and that all co-authors have read and agreed the terms of this Agreement;
5. You warrant that any formula or dosage given is accurate and will not if properly followed injure any person;
6. You will indemnify and keep indemnified the Editors, the Federation of Microbiological Societies and Blackwell Publishing against all claims and expenses (including legal costs and expenses) arising from any breach of this warranty and the other warranties on your behalf in this Agreement.

By signing this Agreement you agree that Blackwell Publishing may arrange for the Article to be:

continua

- Published in the above Journal, and sold or distributed, on its own, or with other related material;
- Published in multi-contributor book form or other edited compilations by Blackwell Publishing;
- Reproduced and/or distributed (including the abstract) throughout the world in printed, electronic or any other medium whether now known or hereafter devised, in all languages, and to authorize third parties (including Reproduction Rights Organizations) to do the same;
- You agree to Blackwell Publishing using any images from the Article on the cover of the Journal, and in any marketing material.

You authorize Blackwell Publishing to act on your behalf to defend the copyright in the Article if anyone should infringe it, although there is no obligation on Blackwell Publishing to act in this way.

Blackwell Publishing undertakes that every copy of the Article published by Blackwell Publishing will include the full bibliographic reference for your Article, together with the copyright statement.

BOX A: to be completed if copyright belongs to you

You hereby assign to the Federation of Microbiological Societies copyright in the Article including the abstract for the full period of copyright and all renewals, extensions, revisions and revivals throughout the world in any form and in all languages. The Federation of Microbiological Societies may assign the rights granted in this Copyright Assignment Form.

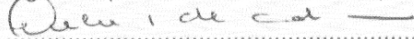
BOX B: to be completed if copyright belongs to your employer (e.g. HMSO, CSIRO)

The copyright holder grants the Federation of Microbiological Societies an exclusive licence to publish the Article including the abstract in printed and electronic form, in all languages, and to administer subsidiary rights agreements with third parties for the full period of copyright and all renewals, extensions, revisions and revivals.

Print Name of Copyright holder:
This will be printed on the copyright line on each page of the Article. It is your responsibility to provide the correct information of the copyright holder.

BOX C: to be completed if the Article is in the public domain (e.g. US Federal Government employees) You certify that the Article is in the public domain. No licence to publish is therefore necessary.

Signature (on behalf of all co-authors (if any))



Print name: Célia Maria de Almeida Soares

Date: June 14, 2007

If your employer claims copyright in your work, this form must also be signed below by a person authorized to sign for and on behalf of your employer, as confirmation that your employer accepts the terms of this licence.

Signature (on behalf of the employer of the author (s)) Print name:.....

Print name of employer:

Date:

The rights conveyed in this assignment will only apply upon acceptance of your Article for publication.

Data Protection: The Publisher may store your name and contact details in electronic format in order to correspond with you about the publication of your Article in the Journal. We would like to contact you from time to time with information about new Blackwell publications and services in your subject area. (For European contributors, this may involve transfer of your personal data outside the European Economic Area.) Please check the following boxes if you are happy to be contacted in this way:

(conventional mailing) (via e-mail)

Please return the signed form to:

(a scanned copy or a fax to +31 15 269 3921 is acceptable, but the original must follow within 7 days)
FEMS Yeast Research, FEMS Central Office, Keuring Buismanweg 4, 2628 CL Delft, The Netherlands